



INFORME TECNICO FINAL

PROYECTO “Caracterización genética de poblaciones de Nothofagus obliqua (Mirb. et Oerst.) y Nothofagus alpina (Poepp. et Endl.) Oerst. (=N. nervosa (Phil.) Dim. et Mil.) mediante marcadores moleculares e isoenzimáticos ”

Convenio IICA – BID ATN/SF 6486 RG

Líder del Proyecto: Dr. Mario Paredes

Junio 2003

Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur

Argentina, Bolivia
Brasil, Chile
Paraguay, Uruguay

IICA
Instituto Interamericano
de Cooperación para
la Agricultura

Caracterización genética de poblaciones de *Nothofagus obliqua* (Mirb.et Oerst.) y *Nothofagus alpina* (Poepp.et Endl.) Oerst. (=N.nervosa (Phil.) Dim. et Mil.) mediante marcadores moleculares e isoenzimáticos

Informe Técnico Final de Proyecto

**FONDO REGIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA
(FONTAGRO)**

***Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA
CRI, Quilamapu, Chile
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA
EEA Bariloche, Argentina***

Junio de 2003

PARTICIPANTES

Director del Proyecto

Mario Paredes C, Ing. Agr. Ph.D.
CRI Quilamapu, INIA, Chillán, Chile

Director Alterno

Leonardo Gallo, Ing. For., Dr.
EEA INTA Bariloche, Argentina

Instituciones responsables del proyecto

Investigadores, CRI Quilamapu, INIA, Chillán, Chile

Viviana Becerra, Ing. Agr. Msc.
Rodrigo Avilés, Ing. Civil, Industrial
Carmen Rojo, Ing. Agr.

Investigadores, EEA, INTA, Bariloche, Argentina

Paula Marchelli, Dr.
María Marta Azpillicueta, Ing. For.
Paula Crego, Lic. Biol.

Instituciones asociadas, Chile

Gustavo Moreno, Ing. For., Corporación Nacional Forestal (CONAF), Chillán, Chile.
Roberto Ipinza, Ing. For., Dr. Instituto Forestal, (INFOR), Concepción, Chile.
Braulio Gutierrez, Ing. For., Instituto Forestal, (INFOR), Concepción, Chile.
María Paz Molina, Ing. For., Instituto Forestal, (INFOR), Concepción, Chile.
Oriana Ortiz, Centro For., (CEFOR), Valdivia, Chile.

Institución asociada, Argentina

Administración de Parques Nacionales, Argentina

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN EJECUTIVO	1
IDENTIFICACIÓN Y COLECTA DE POBLACIONES DE <i>N. alpina</i> Y <i>N. Obliqua</i> EN CHILE Y ARGENTINA	3
DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICAS DETECTADA CON MARCADORES ISOENZIMÁTICOS EN RAULÍ.....	13
DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DETECTADA CON MARCADORES ISOENZIMÁTICOS EN ROBLE	27
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE <i>NOTHOFAGUS OBLIQUA</i> Y <i>N. ALPINA</i> MEDIANTE RAPD	38
DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DETECTADA CON MARCADORES DE ADN DE CLOROPLASTO	52
CONSERVACIÓN DE SEMILLA DE MEDIOS HERMANOS Y ESTABLECIMIENTO DE ENSAYOS DE PROGENIE.....	57
DESARROLLO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS.....	64
IMPACTOS ESPERADOS	65
ACTIVIDADES DE COORDINACIÓN Y DIFUSIÓN.....	67
BIBLIOGRAFIA	70
ANEXOS	73

RESUMEN EJECUTIVO

El *objetivo principal* del Proyecto fue evaluar la variabilidad genética de roble y raulí mediante el uso de marcadores moleculares (RAPDs, cpADN) e isoenzimáticos para la fijación de criterios de conservación, mejoramiento genético, reforestación, manejo y aprovechamiento.

Los *objetivos específicos* planteados para el proyecto fueron:

- identificar y diferenciar genéticamente procedencias de *N. nervosa* y *N. obliqua*;
- evaluar la variabilidad genética de roble y raulí chileno y argentino a través de marcadores bioquímicos (isoenzimas) y de roble y raulí chileno y argentino mediante el uso de marcadores moleculares (RAPD y cpADN);
- determinar niveles y dirección de introgresión en los híbridos naturales formados por *N. nervosa* y *N. obliqua* (isoenzimas);
- asociar la información genética con la distribución geográfica de las especies y poblaciones;
- disponer de semilla de medio hermanos para un futuro establecimiento de ensayos de progenie;
- disponer de un banco de semillas de las poblaciones argentinas de ambas especies.

En Chile, la colecta de poblaciones se realizó utilizando una selección de sitios basado en antecedentes de variación climática, distribución geográfica, límites fitogeográficos y variación genecológica observable.

En Argentina, la metodología utilizada en lo que respecta a recolección de semilla a nivel poblacional se realizó con redes colocadas en las poblaciones, previamente a la caída de los frutos. La cosecha de familias de medio hermanos para su utilización en el análisis de control genético y ensayos de progenie se realizó con ayuda de pértigas, cosechando los frutos a partir del árbol madre. Los estudios de laboratorio se realizaron a través de técnicas de electroforesis horizontal en gel de almidón (isoenzimas) y método PCR-RFLP para los análisis moleculares (cpADN).

Los objetivos planteados para la componente Argentina se cumplieron según los plazos estipulados por el Proyecto. El grado de ejecución de los mismos con respecto al estudio de las poblaciones Argentinas superó lo planificado originalmente ya que se analizó un número mayor de poblaciones.

En lo referente a nuevas tecnologías desarrolladas, y en el marco del Convenio INRA-INTA se desarrollaron en el Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, Cestas, INRA, Francia un set de SSRs para *Nothofagus*. En dicho Instituto se probaron y caracterizaron los nuevos primers, así como la transferibilidad de los SSRs desarrollados para *Quercus* (europeos y americanos), género emparentado. La potencialidad de este marcador radica en su futura aplicación en estudios de flujo génico, necesarios para entender la estructura genética hallada a partir de este Proyecto en las poblaciones argentinas de ambas especies.

La difusión de los conocimientos generados a partir del Proyecto se llevó a cabo a través de publicaciones científicas, capítulos en libros técnicos, presentaciones en Congresos e Informes Técnicos (**Anexo 1**).

Los resultados obtenidos muestran en el lado argentino para ambas especies una alta diferenciación genética entre poblaciones relativamente cercanas dentro de una misma

cuenca lacustre. La diversidad genética, en cambio, mostró patrones de variación diferentes para ambas especies. Mientras que en Raulí la mayor diversidad genética se observó en las poblaciones argentinas ubicadas al Oeste en Roble las poblaciones con mayor diversidad se encontraron al Este. La distribución geográfica de los haplotipos de ADN de cloroplasto muestra en general una variación latitudinal para ambas especies en Argentina y longitudinal en Chile. El análisis conjunto de ambos tipos de marcadores permitió la identificación de áreas prioritarias para la conservación (según criterios genéticos) a partir de lo cual surgieron pedidos oficiales a las autoridades competentes en cada caso para la recategorización, en el caso de áreas de jurisdicción de Parques Nacionales y pedido de declaración como área de reserva, en el caso de bosque de propiedad privada, como así también la identificación de zonas de transferencia de semilla para el futuro manejo silvícola de la región. Dada la importancia y alcance de los resultados obtenidos, la continuidad en los estudios posibilitaría una mayor profundización en el conocimiento y entendimiento de las causas que modelan y modelaron la estructura genética actual de estos bosques, brindando de esta manera la posibilidad de contar con mayor número de herramientas para la formulación de estrategias de conservación y manejo para dichas áreas.

Las restricciones y limitantes encontradas para el desarrollo del proyecto se relacionaron con la recolección del material de estudio. En el lado Argentino no pudo realizarse una cosecha individual de 10 árboles por población tal como estaba planeado originalmente ya que no hubo disponibilidad de fondos para tal fin. Por este motivo se optó por la metodología de cosecha descripta arriba que fue ejecutada con fondos de INTA y de la Administración de Parques Nacionales. Por otro lado, las muestras de ADN de poblaciones chilenas que debían ser analizadas en Argentina (variación en ADN de cloroplasto) presentaron fallas en la amplificación. Se debió recurrir entonces a muestras obtenidas en plántulas ubicadas en el vivero de INTA EEA Bariloche generadas a partir de una muestra incompleta de semillas enviadas por el INFOR. Por este motivo el análisis de ADN de cloroplasto se pudo realizar con sólo 11 poblaciones chilenas de Raulí (estaban planificadas 22) y 9 poblaciones chilenas de Roble (estaban planificadas 23).

IDENTIFICACIÓN Y COLECTA DE POBLACIONES DE *N. alpina* Y *N. Obliqua* EN CHILE Y ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

El mayor conocimiento científico y el aprovechamiento productivo del bosque de roble y raulí en Chile y Argentina implica la necesidad de identificar y colectar poblaciones representativas de su distribución geográfica.

En Chile, estas dos especies representan un total de 1.672.475 hectáreas, de las cuales 1.234.732 hectáreas son renovalas, 429.536 hectáreas son de bosques adultos y 8.207 hectáreas son de bosque choaparrado. En Argentina, el roble y el raulí ocupan una superficie aproximada de 55.000 has, distribuidas en forma interrumpida en una región de aproximadamente 1 millón de has.

En Chile, el roble, se encuentra distribuido en la Cordillera de Los Andes, desde Colchagua (34°30' de Lat. S), por el norte y hasta la zona de Llanquihue (X región), por el sur. En la Cordillera de la Costa, crece entre los cerros La Campana, El Roble y La Campanita (V región), por el norte hasta la zona de Osorno (X región), por el sur (Donoso, 1994). En su límite norte, en la Cordillera de Los Andes, se encuentra entre los 1.000 y 2.000 metros de altitud, en cambio en la zona norte de la Cordillera de la Costa, habita entre los 850 y 2.220 metros de altitud, en exposiciones sur y sureste. A medida que el bosque andino se desplaza hacia el sur se va haciendo más continuo y se va reduciendo su presencia en altura, desde alturas mayores a los 1000m hasta los 600m (Donoso, 1994). El raulí, es una de las especies nativas más valiosas. En la Cordillera de los Andes se encuentra distribuida desde el sur del río Teno (VII región) hasta Valdivia (X región), partir de los 500 metros de altitud. En la Cordillera de la Costa esta especie se encuentra presente desde la ribera norte del río Itata (VIII región) hasta Valdivia, en las partes altas hasta los 1.200 metros de altitud (Donoso, 1978).

En Argentina, el raulí se distribuye a lo largo de numerosas cuencas lacustres de origen glaciario en sentido oeste-este. Esta especie se ubica en forma continua en un rango longitudinal que va desde los 39°25" a los 40°35" Lat. Sur y en altitud desde los 600 hasta los 800 m, mientras que el roble se presenta en forma fragmentada entre los 36°49" y los 40°11"S y desde los 800m hasta los 1000 m de altura. Ambas especies se distribuyen dentro de un rango de precipitaciones de 3.000 a 1.200 mm (Gallo *et al.*, 2000).

La amplia variedad de ambientes en que se desarrollan estas especies hace suponer una gran variabilidad genética que es necesario estudiar y capturar. Por lo tanto, los objetivos de esta etapa del proyecto fueron: 1) Identificar y colectar poblaciones de roble y raulí que sean representativas de su diversidad genética; 2) Proveer de material genético para los estudios bioquímicos, moleculares y ensayos de progenie; y 3) Conservar parte de este material genético en Bancos de germoplasma.

COMPONENTE CHILENO

Materiales y Métodos

La primera etapa, incluyó un estudio de la distribución geográfica del roble y raulí para seleccionar las poblaciones a incluir en este proyecto. Para la identificación de las poblaciones se utilizaron datos de variación climática latitudinal y altitudinal, distribución geográfica actual de las poblaciones, límites fitogeográficos y variación genecológica observable (Vergara *et al.*, 1998).

Resultados

Los antecedentes recopilados permitieron distinguir tres macroclimas: centro-norte, centro y sur. En el macroclima centro-norte se identificó solo una región de procedencia de roble, en cambio, en el macroclima centro se identificaron seis regiones de procedencia de roble y tres procedencias de raulí y en el macroclima sur se detectaron 7 regiones de procedencia de roble y cuatro de raulí, lo que totalizó 14 regiones de procedencia de roble y 7 de raulí (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Distribución de regiones de procedencia

Macroclima	Regiones de Procedencia	
	<i>Roble</i>	<i>Raulí</i>
Centro - Norte	1-C	
Centro	2-C 3-C * 6-D * 8-A 9-A 10-A	3-C * 8-A 9-A
Sur	4-C 5-C * 7-D * 11-A 12-A 13-A 14-A	5-C * 11-A 13-A 14-A

La distribución geográfica fue dividida en macroclimas (centro-norte, centro, sur), regiones de procedencia (14 en roble y 7 en raulí), y procedencia y puntos de colecta (39 en roble y 18 en raulí) (**Fig. 1**). Finalmente, los puntos de muestreo o poblaciones cosechadas dentro de cada zona de procedencias se caracterizaron en función del sitio, bosque y a nivel individual.

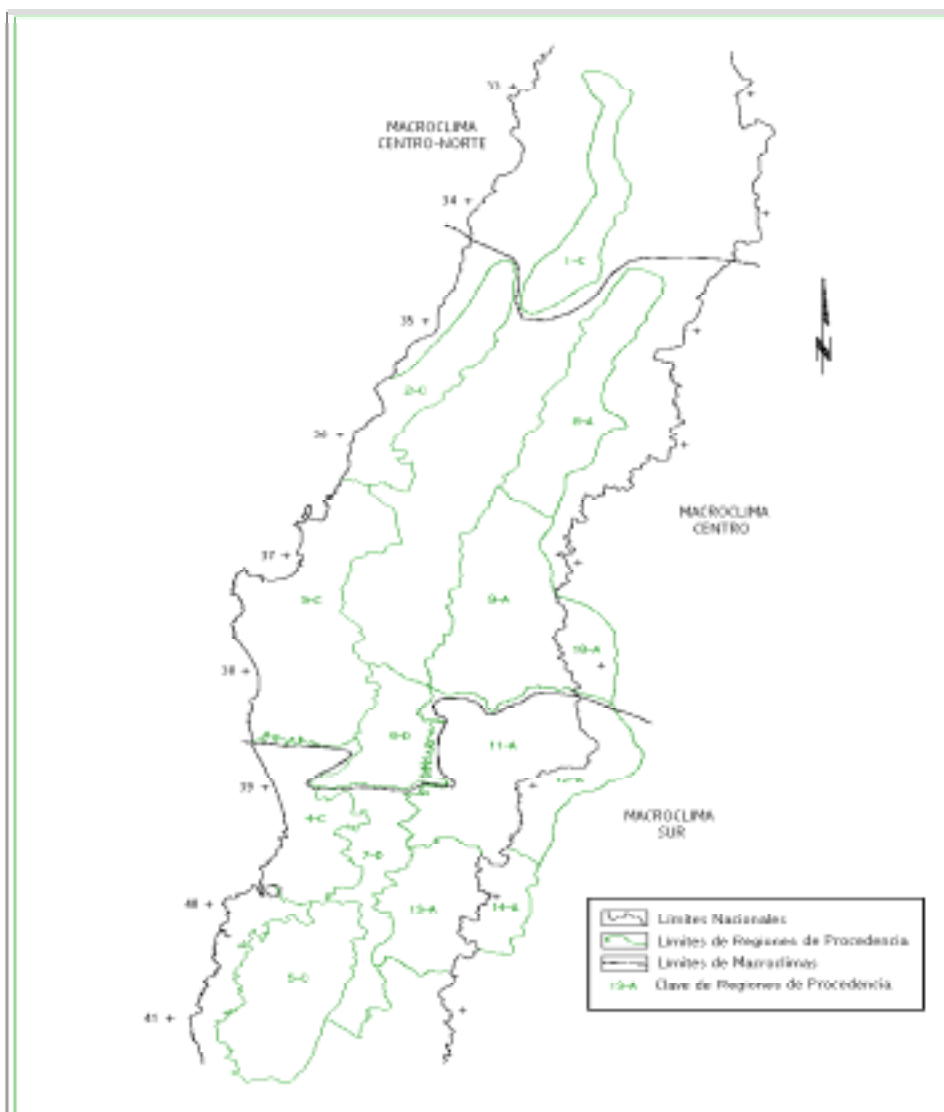


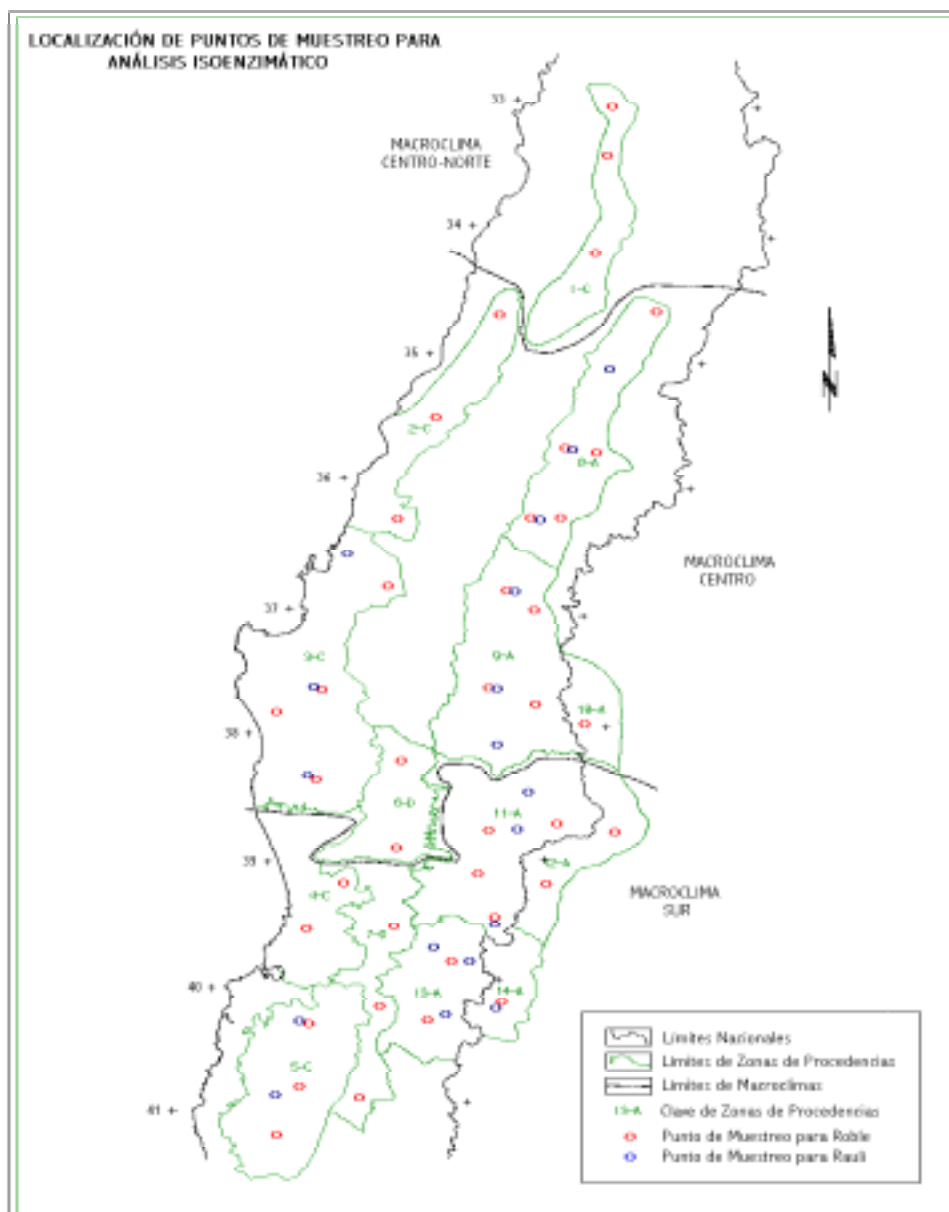
Fig. 1: Delimitación de regiones de procedencia

Posteriormente, en roble, se identificaron 39 procedencias o poblaciones o puntos de muestreo y para el caso de raulí, se determinaron 8 poblaciones. Cada población se describió su ubicación geográfica: región, provincia, comuna y ubicación específica (**Cuadro 2**).

Cuadro 2: Ubicación de puntos de muestreo o poblaciones

Especie	Región	Poblaciones	REG	PROV	COM	LUGAR
Roble	1-C	1. Til-Til	RM	Chacabuco	Til-Til	Cuesta La Dormida
		2. Lampa	RM	Chacabuco	Lampa	Roblería de Lampa
		3. Alhue	RM	Melipilla	Alhue	El Membrillo
	2-C	4. Alto colorado	VI	Card. Caro	Pichilemu	Alto Colorado
		5. R. N. Los Ruiles	VII	Cauquenes	Cauquenes	Los Ruiles
		6.1 Ninhue	VIII	Ñuble	Ninhue	Cerro Curahuén
		6.2 Quirihue	VIII	Ñuble	Quirihue	Quirihue
	3-C	7. Cayumanqui	VIII	Concepción	Quillón	Cerro Cayumanqui
		8. Curanilahue	VIII	Arauco	Curanilahue	San José de Colico
		9. L. Lanalhue	VIII	Arauco	Cañete	Cam. Cañete-Purén
		10. Pichipillahuén	IX	Malleco	Galvarino	Pichipillahuén
	4-C	11. Cuesta Lastarria	IX	Cautín	Loncoche	San Antonio
		12. Cruces	X	Valdivia	Valdivia	Sector Cayumapu
	5-C	13. Llanacura	X	Valdivia	La Unión	Trumao
		14. Río negro	X	Osorno	Río Negro	Río negro
		15. Purranque	X	Osorno	Purranque	Cam. Purranque-Fruttillar
	6-D	16. Victoria	IX	Malleco	Victoria	Inspector Fernández
		17. Quepe	IX	Cautín	Freire	Quepe
	7-D	18. Malalhue	X	Valdivia	Lanco	Purulón
		19. Futrono	X	Valdivia	Futrono	Futrono
		20. Rupanco	X	Osorno	P. Octay	Hacienda Rupanco
	8-A	21. Sierras de Bellavista	VI	Colchagua	San Fernando	Sierras de Bellavista
		22. Alto Lircay	VII	Talca	San Clemente	Altos de Lircay
		23. Altos de Vilches	VII	Curicó	Molina	Altos de Vilches
		24. Vilches	VII	Talca	San Clemente	Vilches
		25. Bullileo	VII	Linares	Parral	Bullileo
	9-A	26. R. Nac. Ñuble	VIII	Ñuble	Recinto	Las Trancas
		27. Ralco	VIII	Bio-Bio	Santa Bárbara	Camino Ralco-Pangue
		28. Recinto	VIII	Ñuble	Pinto	Cam. Pinto-Recinto km.10
		29. Sta. Bárbara	VIII	Bio-Bio	Santa Bárbara	Parcela 43
	10-A	30. Loncopué, Arg.				
	11-A	31. L. Galletue	IX	Malleco	Melipeuco	Icalma
		32. Cunco	IX	Cautín	Cunco	Lomacura
		33. L. Colico	IX	Cautín	Cunco	Puerto Puma
		34. Curarrehue	IX	Cautín	Curarrehue	Puesco
	12-A	35. P. Pino Hachado, Arg				
		36. Aluminé, Arg.				
	13-A	37. Choshuenco	X	Valdivia	Panguipulli	Puerto Fuy
		38. Llifén	X	Valdivia	Futrono	Llifén
	14-A	39. Lago Lacar, Arg.				
Raulí	3-C	1. Quebrada Bellavista	VII	Colchagua	San Fernando	Sierras de Bellavista
		2. Cord. Nahuelbuta	VIII	Bio-Bio	Nacimiento	Los Guindos
		3. Pichipillahuén	IX	Malleco	Galvarino	Pichipillahuén
	5-C	4. Las trancas	X	Valdivia	La Unión	Cam. Trumao-Hueicolla
		5. Huellusca	X	Osorno	Purranque	Huellusca
	8-A	6. Radal 7 Tazas	VII	Curicó	Molina	Radal
		7. Vilches	VII	Talca	San Clemente	Vilches
		8. Emb. Bullileo	VII	Linares	Parral	Bullileo
	9-A	9. Recinto	VIII	Ñuble	Pinto	Los Lleuques - Atacalpo
		10. Sta. Bárbara	VIII	Bio-Bio	Santa Bárbara	El huachi
		11. Jauja	IX	Malleco	Collipulli	Jauja
	11-A	12. Malalcahuello	IX	Malleco	Curacautín	Malalcahuello
		13. Melipeuco	IX	Cautín	Melipeuco	El Manzano
		14. Curarrehue	IX	Cautín	Curarrehue	Puesco
	13-A	15. Releco	X	Valdivia	Panguipulli	Releco
		16. Neltume	X	Valdivia	Panguipulli	Neltume
		17. Arquihue	X	Valdivia	Futrono	Llifén
	14-A	18. Lago Lacar, Arg.				

En la **figura 2**, se ilustra la posición de cada punto de muestreo en el plano de regiones de procedencia, para ambas especies.



Cuadro 4. Descripción de los puntos de muestreo de raulí

Punto	Posición Geográfica	Posic. Fisiográfica	Exposición	Frecuencia Semilleros	Estructura del bosque	Nº árboles/ha	Tipo de Regeneración	Estado Productivo	Posición social
1. Quebrada Bellavista									
2. Cord. Nahuelbuta	CC	LM y LA	E	B	RSD	500	MM	SM	D,C y O
3. Pichipillahuén	CCor	LM	S	M	BAS y CN	200	MM	AS,SM	D,O
4. Las trancas	CC	LM	SE y E	M	RSD	400	MM	SM	D y O
5. Hueyusca	CC	LB	SE y S	M	DSD	400	MM	SM	D,C y O
6. Radal 7 Tazas	CCoc	LM	S.S.E	M	RSD	400	MM	SM	D,O
7. Vilches	CCoc	LM	N	B	RSD	450	MM	BS	D,C
8. Emb. Bulileo	CCoc	LM	S.O	B	RSD	450	MM	AS	D,A
9. Recinto	CA oc	LM y LB	S Y SE	M	RSD	400	MM	SM	D,C y O
10. Sta. Bárbara	DI	VA		A	RSD	625	MM	AS	D,C y O
11.Jauja	PCA	LM	N.O	B	RSD	550	MM	SM	D,C
12. Malalcahuello	CA	LM	S	B	AA		MM	BS	A
13. Melipeuco	CA	LM	S	B	RSD	600	MM	BS	AD
14. Curarrehue	CA	LM	E	B	BAS y AA	250	MM	SM	D,O
15. Releco	PCA	LA	O	B	RSD	400	MM	SM	D,O,A
16. Neltume	CA	LM	S.E	B	RSD	400	MM	BS	D
17. Arquihue	CA	LM	O	N	BAS y AA	200	MM	nula	D,C
18. Lago Lacar, Arg.									

Descripción del Sitio

Posición geográfica del punto: describe la posición geográfica del punto dentro de la sección transversal de la geografía chilena, de acuerdo con la siguiente clasificación: Planicies litorales (PL); Cordillera de la Costa, ladera occidental; Cordillera de la Costa, ladera oriental (C.C.occ); Depresión Intermedia (D.I); Precordillera Andina (PCA); Cordillera Andina (C.A).

Posición fisiográfica del punto: describe la posición del rodal donde se colectó semilla dentro de la topografía del paisaje, de acuerdo a la siguiente pauta: Cumbre (CU); Ladera alta (LA); Ladera media (LM); Ladera baja (LB); Valle (VA).

Exposición: describe la exposición predominante de la ladera en que se encuentra el punto de colecta.

Frecuencia de semilleros: define la proporción de árboles con semilla dentro del rodal, de acuerdo con la siguiente pauta: Alta: más del 50% de los individuos del rodal presentan semillas (A); Media: entre el 10 y 50% de los árboles del rodal presentan semillas (M); Baja: menos del 10% de los árboles del rodal presentan semillas (B); Nula: no se observan árboles con semilla en el rodal (N).

Descripción del Bosque

Estructura: se define considerando la estructura original de los bosques de *Nothofagus* y su condición actual. Lo anterior los clasifica en renovales (bosques de segundo crecimiento) y bosque adulto, información que se complementa con su situación de densidad y de regeneración. Adicionalmente se consideran algunas estructuras adicionales que escapan a esta clasificación.

- RD: Renoval Denso: bosque de segundo crecimiento con una densidad superior a los 830 arb/ha, que presenta un estrato dominante de especies de *Nothofagus*. Corresponde a un rodal coetáneo con regeneración de especies tolerantes.
- RSD: Renoval semidenso: bosque de segundo crecimiento que evidencia distintos grados de intervención que han reducido su densidad a un rango entre 400 y 830 árboles por hectárea. Presenta mayor regeneración en el sotobosque.
- RA: Renoval abierto: bosque de segundo crecimiento que evidencia una considerable reducción de su densidad por efecto de intervenciones (raleo, floreo u otras). Conserva la estructura de renoval, la coetaneidad de los individuos y la presencia de *Nothofagus* en el estrato dominante.
- BA: Bosque adulto: condición del bosque en que la estructura representa estados sucesionales avanzados, con presencia de especies tolerantes y semitolerantes en el estrato codominante e incluso dominante. En esta situación los árboles de roble y/o raulí se presentan con un distanciamiento mucho mayor, con pocos individuos por hectárea (menos de 100), los que pueden manifestar una condición de árboles emergentes o dominantes en el perfil vertical.
- BAS: Bosquetes aislados: corresponde a grupos de árboles separados de un rodal continuo, como consecuencia de la fragmentación del rodal original. En la práctica corresponden a pequeños bosquetes de protección o sombreadores para ganado.
- AA: Árboles aislados: corresponde a los últimos individuos remanentes de rodales que ya no existen. Presentan un nulo o muy escaso grado de agrupación con otros árboles de la misma especie. Es el caso típico de robles individuales aislados en medio de campos ganaderos o agrícolas.
- CN: Cortinas naturales: corresponde a árboles que permanecen como remanentes de un rodal original, que fueron conservados intencionalmente en un arreglo lineal para cumplir funciones de delimitación de potreros, servir como protección, cercos, etc.

Densidad media: representa una estimación del número de árboles por hectárea, existente en el rodal desde donde se colectó la semilla

Tipo de regeneración: describe el tipo de regeneración que originó al rodal desde donde se colecta la semilla. Monte bajo: Rodal generado mediante algún sistema natural de propagación vegetativa, fundamentalmente rebrotes de tocón y de raíz (MB); Monte alto: Rodal generado por una estrategia de reproducción sexual (semillas)(MA); Monte medio: Rodal generado por una combinación de las estrategias anteriores (MM).

Descripción de los individuos cosechados

Estado productivo del árbol: entrega información respecto de la cantidad de semillas que presenta cada árbol cosechado. Corresponde a una evaluación subjetiva que considera la facilidad con que se obtienen las semillas desde el árbol seleccionado, se clasifica en los tres niveles siguientes: Alta Semillación: árboles con una alta densidad de cúpulas en su copa que permiten obtener con relativa facilidad la cantidad de frutos requeridos por el estudio (AS); Semillación Moderada: baja cantidad de cúpulas en el árbol, por lo que la obtención de las semillas requeridas se logra con dificultad (SM); Baja Semillación: poca densidad de cúpulas por árbol, lo que dificulta o impide conseguir el volumen de semillas planificado (BS)

Posición Social: describe la posición de los árboles cosechados dentro de la estructura vertical de los estratos del rodal. Se utiliza la clasificación tradicional (Dominantes, codominantes, intermedios y suprimidos) y se combina con la posición de los árboles al interior o en los linderos del rodal. Árboles dominantes (D); Árboles Codominantes (C); Árboles Intermedios (I); Árboles suprimidos (S); Árboles aislados (A); Arbol orillero (O).

Toda la semilla colectada en la temporada 1999/2000 y 2000/2001 fue identificada y seleccionada en el laboratorio para ser viverizada en invernadero para la obtención de plantas para los ensayos de progenie y las muestras de hojas para la caracterización molecular (RAPD y cpADN).

En la temporada 2002/2003 se procede a realizar una tercera colecta, pero esta vez solo se incluyó un punto de muestreo por zona de procedencia, en roble como en raulí (Cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. Zonas de procedencia y puntos de muestreo para roble

Zona de procedencia	Punto de muestreo
1C	Cerro el Roble, Til Til
2 C	Quirihue
3 C	Lago Lanalhue
4 C	Cuesta Lastarria
5 C	Llancacura
6 D	Quepe
7-D	Malalhue
8 A	Vilches
9 A	Recinto
11 A	Cunco, Melipeuco
13 A	Choshuenco, Neltume

Cuadro 6. Zonas de procedencia y puntos de muestreo de raulí

Zona de procedencia	Punto de muestreo
3 C	Cord. De Nahuelbuta
5 C	Llancacura
8 A	Vilches
9 A	Sta. Bárbara
11 A	Melipeuco
13 A	Neltume, Remeco

Parte de esta colecta está almacenada en el Banco de Germoplasma del CRI Quilamapu, INIA, Chillán.

COMPONENTE ARGENTINA

Ver capítulo: ["Conservación de semilla de medios hermanos y establecimiento de ensayos de progenie"](#).

CONCLUSIONES

La Zonificación propuesta y la cosecha de semillas efectuada permitió contar con un valioso material de investigación que posibilitó cuantificar variabilidad genética mediante isoenzimas y marcadores moleculares y en pruebas de progenie. Una parte de las procedencias colectadas se almacenó en el Banco de Germoplasma del INIA Quilamapu.

El trabajo de Regiones de Procedencias, permitió ordenar rápidamente el complejo de variación de las especies, definir un sistema de muestreo continuo y generar zonas de mejoramiento en forma práctica y manejable.

La colecta de material genético (semilla) constituyó un gran esfuerzo debido a que estas especies de *Nothofagus* presentan añerísmo (años de buena y mala producción de semilla) por lo cual fue necesario realizar esta labor en varios años.

DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICAS DETECTADA CON MARCADORES ISOENZIMÁTICOS EN RAULÍ

INTRODUCCIÓN

El raulí (*Nothofagus alpina*=*N. nervosa*) es una especie de alto valor económico debido a la calidad de su madera. A pesar de esta situación, se observa una reducción de las áreas de distribución de la especie, con la consecuente pérdida de variabilidad genética (Vergara y Bohle, 2000) es producto de largo proceso de alteraciones y degradaciones de su potencial natural, producto de actividades de sustitución, intervenciones de carácter destructivo, como floreo y habilitación de terrenos para uso agrícola y ganadero. Para enfrentar esta situación es necesario implantar medidas adecuadas que permitan obtener pautas de utilización, considerando el valor económico, función social, ecológica y productiva de la especie.

Para la formulación de una política de conservación y aprovechamiento de estos recursos genéticos es indispensable tener un conocimiento básico de la variabilidad y de la estructura genética de las especies. La información básica sobre la organización de la diversidad genética de los *Nothofagus* en estudio, su distribución geográfica, la posible asociación entre ambas y la posible presencia de razas o híbridos, podría servir de base para fijar criterios sobre plantación, colección, conservación, manejo y aprovechamiento racional de estas especies. Esta información sobre diversidad genética es básica para apoyar también a los programas de mejoramiento genético de estas especies.

Estudios realizados en Chile y en Argentina sobre algunas especies de *Nothofagus* indican que existe bastante variabilidad fenotípica en algunas características morfológicas, anatómicas y químicas, de emergencia y crecimiento de plántulas. Estos estudios han determinado también que, en algunos casos, esta variación fenotípica está asociada con factores geográficos como son latitud y altitud. Una de las desventajas del uso de caracteres morfológicos en estudios de variabilidad genética es que generalmente representan solo una pequeña parte de la variación genética presente en el genoma de la especie y están influenciados por el medio ambiente. De esta situación, se desprende la importancia de complementar la información morfológica con otro tipo de estudios que reflejen con mayor claridad la variación genética presente en la especie.

Los análisis de isoenzimas han demostrado ser un medio práctico de resolver diferentes problemas en genética de poblaciones de árboles forestales y cultivos perennes como variación genética de poblaciones centrales y marginales (Tigerstedt 1973, Guries y Ledig 1982, Kertadikara y Prat 1995), variación genética entre y dentro de las poblaciones (Guries y Ledig 1982, Loukas y otros, 1983, Stavrakakis y Loukas 1983, Takahashi y otros 1994, Beaver y otros, 1995) variación genética entre poblaciones cultivadas y silvestres (Ouazzani y otros 1993), estructura genética y sistemas de apareamiento en poblaciones naturales (Gallo y otros 1997) y *Nothofagus* (Haase, 1993). Aunque la variación electroforética detectable en isoenzimas es sólo una pequeña fracción de la diversidad genética de la población, y ella puede o no predecir la variación de genes que controlan procesos fisiológicos o ecológicamente importantes.

Un estudio realizado en 22 poblaciones naturales de raulí en Chile, usando 10 sistemas enzimáticos (GOT, ACP, AAP, PGI, SKDH, MNR, MDH, PER, LAP, CAT), detectó un alto porcentaje de loci polimórficos (86%), las frecuencias alélicas tuvieron un comportamiento similar a otras especies estudiadas, con algunos alelos en alta y otros en baja frecuencia, y con un rango de alelos/locus de 2 a 4, un alto porcentaje de consanguinidad lo que redundó en una deficiencia de heterocigotos. Al separar la variabilidad genética de las

poblaciones se encontró un alto porcentaje de la diversidad genética dentro de la población en comparación a entre las poblaciones y una relación entre la similitud genética y la distribución geográfica de las poblaciones estudiadas (Pineda, 2000).

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Determinar el control genético de algunos sistemas isoenzimáticos; y 2) Usar esta información para estudiar la estructura genética de esta especie.

COMPONENTE CHILENO

Materiales y métodos

En Chile, se analizaron seis procedencias de raulí representativas de las macroregiones centro y sur del país (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Macroclima, región de procedencia y poblaciones de raulí utilizadas en el análisis isoenzimático

<i>Macroclima</i>	Región de procedencia	Población
Centro	3 C	Nahuelbuta
	8 A	Vilches
	9 A	Sta. Bárbara
Sur	5 C	Cord. Nahuelbuta
	11 A	Neltume
	13 A	Melipeuco

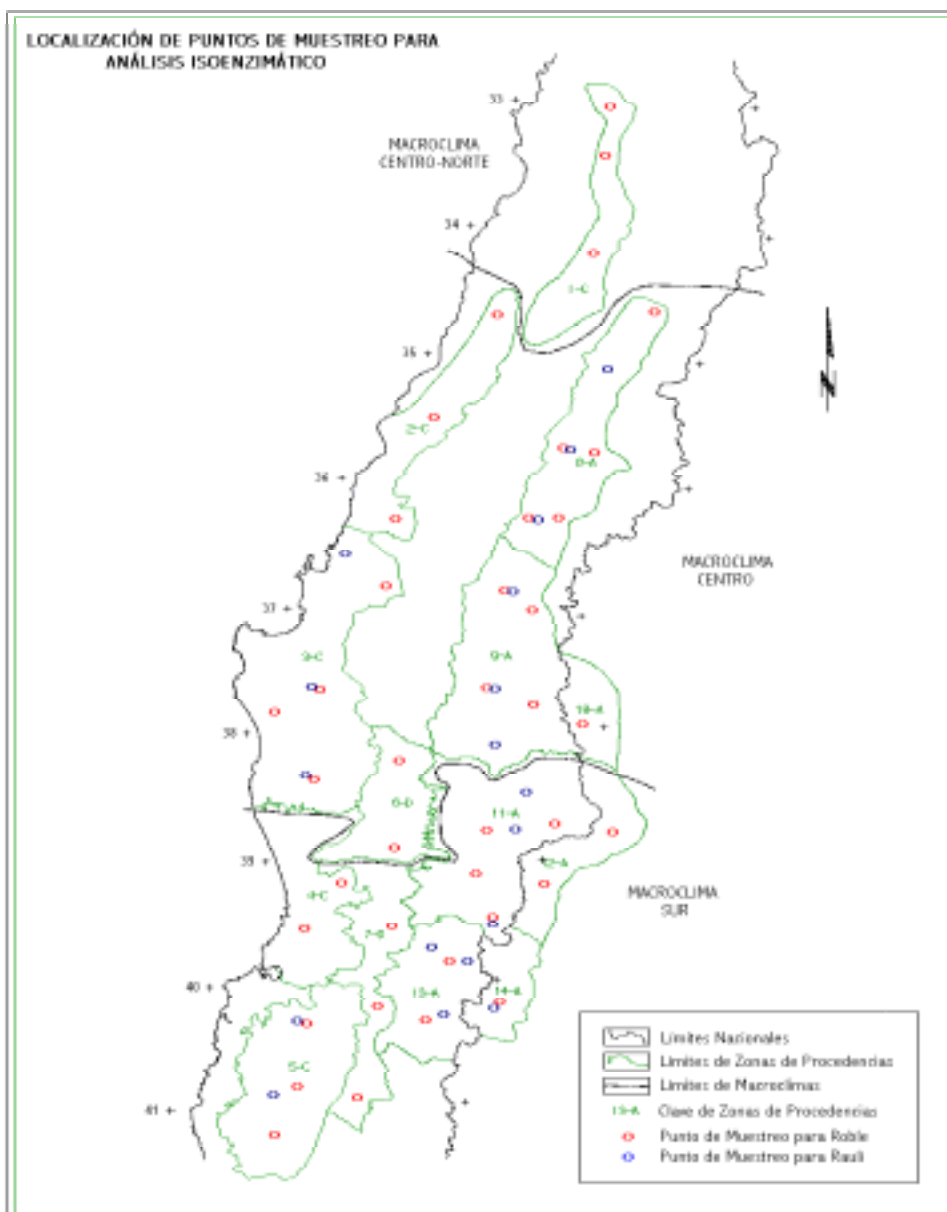


Fig 1. Ubicación geográfica de las procedencias de roble y raulí evaluadas en el estudio

Los sistemas isoenzimáticos analizados fueron ADH, IDH, MDH, PGI, GOT y SKDH. Estos sistemas fueron seleccionados por su buena resolución y consistencia en los trabajos realizados por el INTA. Una parte de este trabajo se realizó en el INTA para homologar la tecnología (procedimientos y lectura de los geles).

Análisis estadístico

Los datos de isoenzimas fueron usados para estimar varios estadígrafos de variación genética como: número de alelos por locus, porcentaje de diversidad génica, porcentaje de heterocigocidad, coeficiente de polimorfismo (PIC), coeficiente de consanguinidad. Estos estadígrafos fueron calculados por locus y como promedio de la población. Además de estos valores se calcularon las frecuencia alélicas, varianza y la desviación estándar por locus y las frecuencias alélicas por población. Con estas frecuencias alélicas se

pueden distinguir los alelos que se encuentra en una alta frecuencia como aquellos alelos con baja frecuencia, considerados “raros” a nivel de toda la población.

Para determinar la similitud entre las procedencias estudiadas se calculó la distancia genética de acuerdo entre pares de procedencias utilizando la distancia genética de Nei (1973). Estos valores fueron usados posteriormente para confeccionar un dendrograma, utilizando el método de UPGMA para visualizar las relaciones genéticas entre las poblaciones evaluadas. Para estudiar la estructura genética de las procedencias evaluadas se realizó un análisis de varianza para determinar la importancia de sus componentes. De esta manera se pudo apreciar los porcentajes de variación entre y dentro de las poblaciones.

Resultados

El análisis de los datos isoenzimáticos indicó que todos los sistemas ADH, IDH, PGI y GOT presentaron una buena resolución, con excepción del sistema SKDH que presentó problemas de resolución y consistencia en las muestras en las poblaciones analizadas por lo que se resolvió no incluirlo del análisis.

Entre los sistemas que presentaron una buena resolución ADH, IDH y PGI presentaron una sola zona de tinción en comparación con el MDH que presentó dos zonas de tinción denominadas MDH-B y MDH-C y GOT que presentó tres zonas, llamadas GOT-A, GOT-B y GOT-C (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Parámetros de variación genética para 8 loci enzimáticos en 6 poblaciones chilenas de *Notophagus alpina*.

Loci	Tamaño muestra	Número alelos	Diversidad Génica	Heterocigocidad	PIC	Coef consanguinidad
ADH	200	2	0.057	0.027	0.055	0.534
IDH	200	2	0.128	0.137	0.120	-0.070
MDH-B	200	3	0.611	0.053	0.529	0.914
MDH-C*	200	1	-	-	-	-
PGI	200	3	0.080	0.028	0.077	0.655
GOT-A	200	3	0.457	0.242	0.399	0.473
GOT-B	200	5	0.323	0.292	0.300	0.099
GOT-C	200	4	0.125	0.115	0.122	0.085
Media	200	2.88	0.223	0.112	0.200	0.501

*Monomorfo

Las isoenzimas utilizadas detectaron 23 alelos y un promedio de 2,9 alelos por loci. El sistema que detectó un mayor número de alelos fue el GOT, ya que con sus tres zonas de tinción se pudieron visualizar 12 alelos. Dentro de este último sistema, GOT-B detectó 4 alelos, GOT-C 4 alelos y GOT-C 3 alelos. Los sistemas MDH, PGI detectaron 4 y 3 alelos, respectivamente y los sistemas ADH y IDH detectaron solo 2 alelos cada uno de ellos (**Cuadro 2**).

El promedio de diversidad genética obtenido fue de 0.22, sin embargo se observaron diferencias entre los sistemas isoenzimáticos evaluados. El sistema isoenzimático que detectó mayor diversidad genética fue GOT con sus tres zona de tinción, GOT-A (0.46), GOT-B (0.32) y GOT-C (0.13), seguido de MDH-B (0.61). Por otro lado, los valores mas pequeños fueron de ADH (0.06), PGI (0.08) IDH (0.13) (**Cuadro 2**).

El nivel de heterocigocidad promedio fue de un 0.11. El sistema isoenzimático que detectó mayor heterocigocidad fue GOT-B (0.29), GOT-A (0.24) y GOT-C (0.12). El nivel de heterocigocidad en los restantes sistemas isoenzimáticos fue bajo y fluctuó entre 0.03 y 0.14 (**Cuadro 2**).

El contenido de polimorfismo, reflejado en el PIC presentó un valor promedio de 0.20, con un mayor valor en MDH-B (0.53) seguido de GOT-A (0.40), GOT-B (0.30) y GOT-C (0.12) (**Cuadro 2**).

El coeficiente de consanguinidad promedio fue 0.50, con valores muy variables dependiendo del sistema isoenzimático. Es así como, el valor mas alto de consanguinidad se obtuvo con MDH-B (0.91), seguido de PGI (0.66), ADH (0.53) y GOT-A (0.47). El resto de los valores fluctuaron entre -0.07 y 0.10. Se presentó solo un valor negativo (**Cuadro 2**).

Al analizar los loci en las seis poblaciones de raulí, se pudo detectar diferentes frecuencias alélicas en los 23 loci. Es así como, a excepción de MDH-C que fue monomórfico, la mayor frecuencia alélica estuvo representada por el alelo 2 de ADH (0.97), el alelo 1 de PGI (0.96), el alelo 2 de GOT-C (0.93) y el alelo 4 de IDH (0.93). Los alelos menos frecuentes o “raros” fueron detectados en el alelo 4 de GOT-B y el alelo 3 de GOT-C con un 1%. La desviación estándar de las frecuencias alélicas fue bastante pequeña (**Cuadro 3**).

Cuadro 3 - Frecuencias alélicas de 23 loci en 5 poblaciones chilenas de *Notophagus alpina*

Loci	Alelos	Frecuencia alélica	Varianza	Desvío estándar
ADH	1	0.03	0.0001	0.01
ADH	2	0.97	0.0001	0.01
IDH	3	0.07	0.0002	0.01
IDH	4	0.93	0.0002	0.01
MDH-B	1	0.14	0.0008	0.03
MDH-B	2	0.42	0.0015	0.04
MDH-B	3	0.44	0.0015	0.04
MDH-C	1	1.00	0.0000	0.00
PGI	1	0.96	0.0002	0.02
PGI	2	0.00	0.0000	0.00
PGI	3	0.04	0.0002	0.01
GOT-A	1	0.07	0.0003	0.02
GOT-A	2	0.69	0.0008	0.03
GOT-A	3	0.23	0.0006	0.03
GOT-B	1	0.13	0.0003	0.02
GOT-B	2	0.81	0.0005	0.02
GOT-B	3	0.03	0.0001	0.01
GOT-B	4	0.01	0.0000	0.01
GOT-B	5	0.02	0.0001	0.01
GOT-C	1	0.04	0.0001	0.01
GOT-C	2	0.93	0.0002	0.01
GOT-C	3	0.01	0.0000	0.01
GOT-C	4	0.02	0.0000	0.01

El análisis de las frecuencias alélicas por población indicó que los alelos que estuvieron presentes en una mayor frecuencia en el análisis general por loci (alelo 2 de ADH (0.97), el alelo 1 de PGI (0.96), el alelo 2 de GOT-C (0.93), y el alelo 2 de IDH (0.93)), no se detectaron diferencias entre las poblaciones del macroclima Centro y del Sur, es decir, estos alelos estuvieron también presentes en una alta frecuencia en las poblaciones analizadas (**Cuadro 4**).

Cuadro 4 - Frecuencias alélicas de 23 loci enzimáticos por población de *N. alpina*

Loci	Alelo	A11	A13	A8	A9	C3
		Melipeuco	Neltume	Vilches	Santa Barbara	Nahuelbuta
		n=40	n=40	n=40	n=40	n=40
ADH	1	0.00	0.12	0.00	0.03	0.00
ADH	2	1.00	0.88	1.00	0.97	1.00
GOT-A	1	0.01	0.21	0.13	0.00	0.00
GOT-A	2	0.74	0.67	0.79	0.76	0.53
GOT-A	3	0.25	0.13	0.09	0.24	0.47
GOT-B	1	0.06	0.17	0.02	0.17	0.20
GOT-B	2	0.94	0.83	0.66	0.83	0.80
GOT-B	3	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00
GOT-B	4	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
GOT-B	5	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00
GOT-C	1	0.00	0.11	0.06	0.03	0.00
GOT-C	2	1.00	0.89	0.81	0.97	1.00
GOT-C	3	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
GOT-C	4	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00
IDH	3	0.19	0.06	0.00	0.03	0.07
IDH	5	0.81	0.94	1.00	0.97	0.93
MDH-B	1	0.24	0.11	0.04	0.30	0.00
MDH-B	2	0.33	0.54	0.41	0.37	0.48
MDH-B	3	0.44	0.36	0.55	0.33	0.52
MDH-C	1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
PGI	1	1.00	0.86	1.00	0.98	1.00
PGI	2	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00
PGI	3	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00

En el caso de los alelos “raros” o con una baja frecuencia, se observó una diferencia en las poblaciones del macroclima centro y sur. Por ejemplo, en la población Vilches se detectó la presencia de cuatro alelos propios de esta población (alelo1 y 5, GOT-B, alelo 3 y 4 GOT-C) y en la población Santa Bárbara se detectó un alelo específico (alelo 2 de PGI), todos ellos en un bajo porcentaje (**Cuadro 5**). Por otro lado, en la población Neltume se detectó el alelo 3 de PGI. Esta situación indica una mayor presencia de alelos específicos en las procedencias ubicadas en el macroclima centro comparada con el macroclima sur (**Cuadro 5**).

Cuadro 5 - Presencia y frecuencia de alelos específicos por macroclima y procedencia

Loci, N° alelo	Macroclima centro			Macroclima sur	
	Vilches	Sta. Bárbara	Nahuelbuta	Melipeuco	Neltume
GOT-B, 4	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
GOT-B, 5	0.11	0.0	0.0	0.0	0.0
GOT-C, 3	0.06	0.0	0.0	0.0	0.0
GOT-C, 4	0.08	0.0	0.0	0.0	0.0
PGI, 2	0.0	0.02	0.0	0.0	0.0
PGI, 3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.14

La distancia genética de las poblaciones de raulí tomando en cuenta los 23 alelos indicó una escasa diversidad genética entre las poblaciones estudiadas. Esta distancia genética se utilizó para construir un dendrograma (**Fig. 2**)

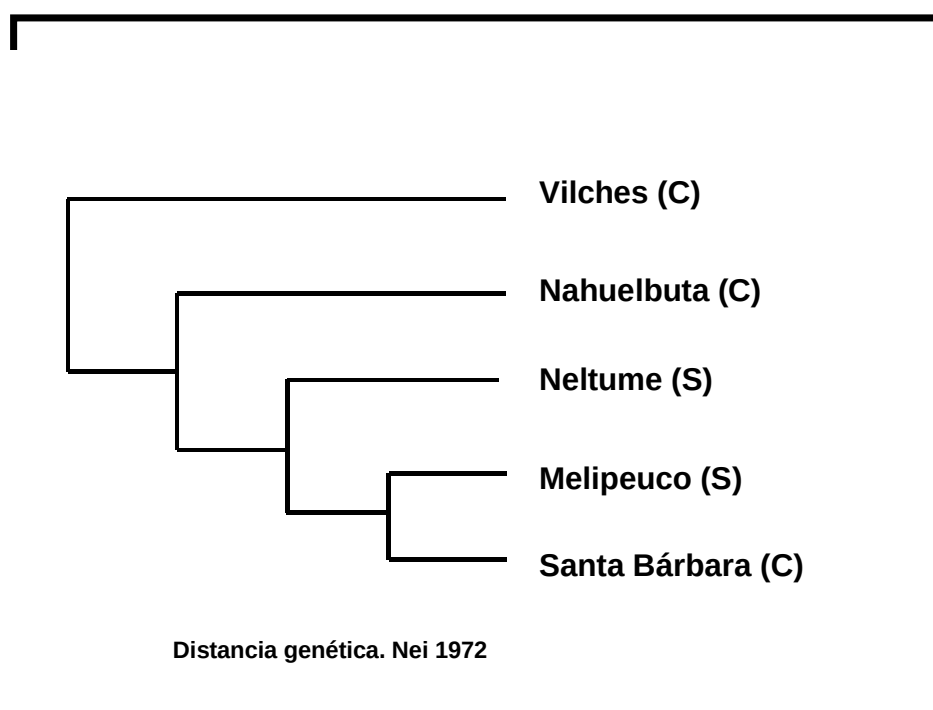


Fig 2 - Relaciones genéticas de las poblaciones chilenas

Los resultados del dendrograma indican que dos (Vilches y Nahuelbuta) del macroclima centro están mas estrechamente relacionadas genéticamente, en comparación con la población Santa Bárbara (**Fig. 2**). Sin embargo, la población Santa Bárbara se encuentra mas cercana genéticamente a Melipeuco, población perteneciente al macroclima sur (**Fig.2**)

La estructura genética de las procedencias en los dos macroclimas (Centro y Sur) indica que la variabilidad genética del raulí chileno se encuentra principalmente entre las poblaciones (70%). En este sentido, existe una menor diferenciación genética dentro de las poblaciones (26%) y solo una escasa diferenciación (6%) entre el raulí del centro y sur del país, tomando en consideración los loci analizados.

Introgresión

El estudio tendiente a detectar la presencia de introgresión en las poblaciones chilenas de raulí indicó que este fenómeno puede estar presente, como había sido descrito anteriormente con marcadores morfológicos (Donoso et al, 1990). Para este estudio se utilizó el marcador genético ADH, definido como potencial descriptor de híbridos entre ambas especies. De las seis poblaciones analizadas, se detectaron alelos específicos de ADH en dos poblaciones, lo que dio un 33% de introgresión. Las procedencias en que se detectó este fenómeno fueron Santa Bárbara y Neltume, pertenecientes a los macroclima centro y sur, respectivamente. Estos resultados podrían indicar que no existe preferencia entre los macroclimas por este flujo de genes. Si se analiza el porcentaje de introgresión dentro de cada población, se observa que el porcentaje fue de un 7,5%, igual en ambas poblaciones. Este último resultado podría confirmar la hipótesis anterior que este fenómeno es inespecífico en relación a al macroclima. Es importante señalar también que las poblaciones Neltume y Santa Barbara están ubicadas en la VIII y X región del país.

COMPONENTE ARGENTINO

Al momento de iniciar la preparación del proyecto la Unidad de Genética Forestal del INTA EEA Bariloche ya se encontraba trabajando, conjuntamente con la Administración de Parques Nacionales, en la recolección de semillas de Raulí. Un proyecto conjunto entre ambas instituciones financió la cosecha de 29 poblaciones de esta especie entre los años 1994 a 1997. A su vez, con dicho proyecto, se hicieron estudios preliminares de control genético de los marcadores isoenzimáticos. Por otra parte, durante una estadía de Paula Marchelli en Alemania (Intitut für Forstgenetik, Grosshansdorf) en el año 1997, financiada por el DAAD, se desarrollaron los marcadores de ADN de cloroplasto para Raulí. Una vez aprobado el proyecto, antes de hacerse efectivo, se comenzó a trabajar en el análisis poblacional con isoenzimas. Por esta razón, al iniciarse finalmente el proyecto, en el año 2000, ya se contaba con la semilla, se habían determinado los marcadores a utilizar y se habían analizado algunas poblaciones.

Metodología

La metodología utilizada en las diferentes etapas del Proyecto se halla descripta en forma detallada en las publicaciones científicas, capítulos en libros técnicos y presentaciones a Congresos, resultado del presente estudio (**Anexo 1**).

1. Diversidad genética

El estudio de las 20 poblaciones se realizó a través de ocho marcadores génicos isoenzimáticos previamente determinados (Mdh-B, Mdh-C, Idh, Adh, Got-A, Got-B, Got-C y Pgi-B) (Marchelli & Gallo, 2000). La ubicación geográfica de las poblaciones se muestra en el mapa de la **figura 1**. Todas los sistemas enzimáticos pertenecen al Grupo I (Bergmann, 1991) que está formado por enzimas constitutivas que participan en el metabolismo primario. De los ocho loci estudiados, seis presentaron *polimorfismo menor*, mientras que sólo dos se clasificaron como *polimorfismo mayor o mayor extendido* (Mdh-B y Got-A) en la mayoría de las poblaciones.

El número medio de alelos por locus (A_L) para la especie fue de 3,38 siendo la diversidad génica (v) de 1,29 (**Cuadro 1**). Este valor fue variable entre las poblaciones, incluso entre aquellas pertenecientes a una misma cuenca lacustre, y en ninguna población se encontraron todos los alelos (**Fig. 2; Cuadro 2**), siendo el promedio entre poblaciones de 1,98. Este valor es más alto que el número efectivo de alelos (v) que osciló entre 1,13 y

1,32, lo cual denota la presencia de polimorfismo menor con un alelo muy común y otros en baja frecuencia.

Algunos alelos (raros o no) fueron exclusivos de una o dos poblaciones. Es interesante destacar que estas poblaciones que tienen alelos únicos se ubican geográficamente en los límites sur y oeste. Por ejemplo, la población del límite sur (población 1 de Lago Espejo) presenta un alelo exclusivo en el locus *Got-C*. Por otro lado, las poblaciones 14, 19 y 26, todas situadas al oeste también presentan alelos únicos en distintos loci del sistema GOT.

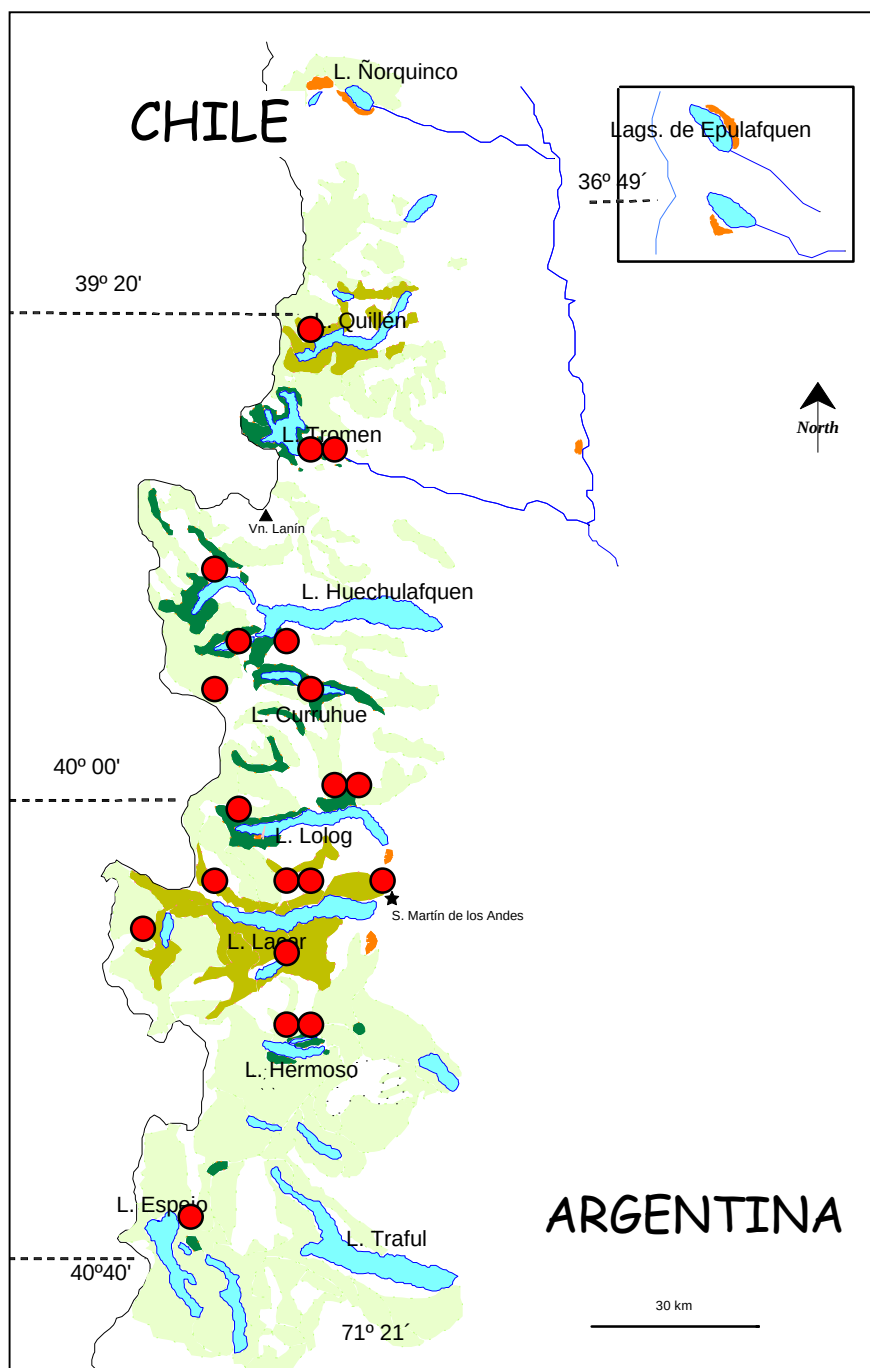


Figura 1: Distribución geográfica de las poblaciones estudiadas de Raulí en Argentina

Cuadro 1 - Diversidad genética media en poblaciones argentinas de Raúlí

Locus	A_i	ν	H_o	H_e	PPP	N
<i>Mdh-B</i>	5	1,97	0,45	0,52	1,00	4596
<i>Mdh-C</i>	3	1,02	0,01	0,02	0,45	4850
<i>Idh</i>	2	1,24	0,17	0,19	1,00	4572
<i>Adh</i>	2	1,01	0,01	0,01	0,25	4672
<i>Got-A</i>	3	1,78	0,39	0,46	1,00	4408
<i>Got-B</i>	6	1,15	0,12	0,13	1,00	4430
<i>Got-C</i>	4	1,15	0,12	0,13	1,00	4436
<i>Pgi</i>	2	1,01	0,01	0,01	0,45	4896
Media	3,38	1,29	0,16	0,18		4608
Desvío	1,51		0,17	0,20		

A_i : número de alelos por locus, ν : diversidad génica (número efectivo de alelos), H_o : proporción de heterocigotas observados, H_e : heterocigosis esperada (Nei, 1973), PPP : proporción de poblaciones polimórficas, n : número de alelos muestreados.

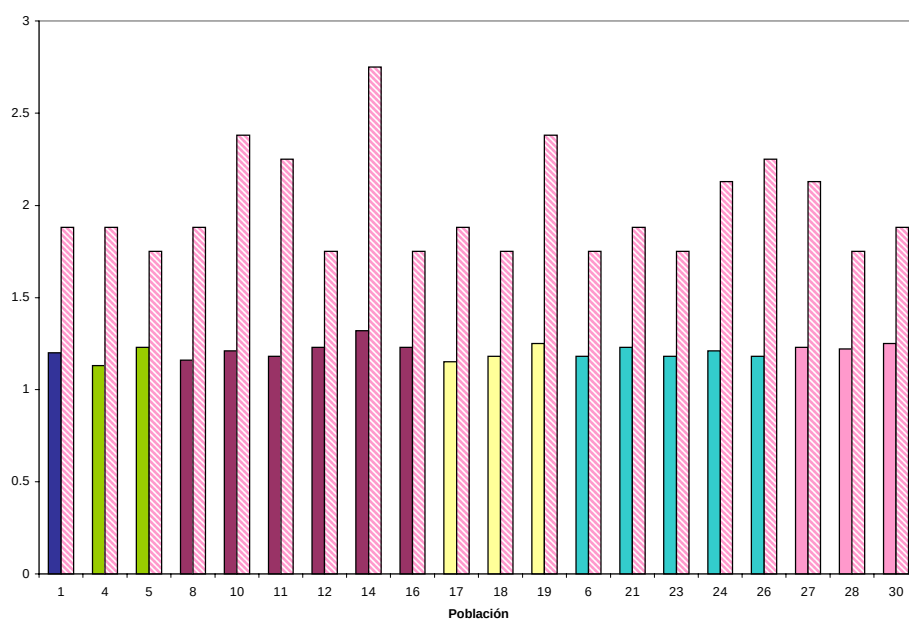


Figura 2 - Variación entre poblaciones en la diversidad génica (número efectivo de alelos, color lleno) y en el número medio de alelos (color rayado) del pool génico. Cada color representa a poblaciones de una misma cuenca

Cuadro 2 - Diversidad genética en las poblaciones de Raúlí estudiadas

Pob.	Locus																							
	Mdh-B			Mdh-C			Idh			Adh			Got-A			Got-B			Got-C			Pgi		
	v	H _o	H _e	v	H _o	H _e	v	H _o	H _e	v	H _o	H _e	v	H _o	H _e	v	H _o	H _e	v	H _o	H _e	v	H _o	H _e
1	1,94	0,49	0,49	1,00	0,00	0,00	1,12	0,10	0,11	1,00	0,00	0,00	1,91	0,43	0,48	1,12	0,10	0,11	1,19	0,16	0,16	1,01	0,01	0,01
4	2,04	0,61	0,51	1,01	0,01	0,01	1,06	0,06	0,06	1,00	0,00	0,00	1,54	0,18	0,35	1,01	0,01	0,01	1,01	0,01	0,01	1,00	0,00	0,00
5	2,10	0,56	0,52	1,00	0,00	0,00	1,69	0,45	0,41	1,00	0,00	0,00	1,81	0,52	0,45	1,06	0,06	0,06	1,05	0,05	0,04	1,00	0,00	0,00
6	1,79	0,40	0,44	1,00	0,00	0,00	1,13	0,10	0,12	1,00	0,00	0,00	1,96	0,35	0,49	1,08	0,08	0,08	1,08	0,08	0,08	1,00	0,00	0,00
8	1,97	0,37	0,49	1,02	0,02	0,02	1,05	0,05	0,05	1,00	0,00	0,00	1,66	0,40	0,40	1,08	0,08	0,08	1,08	0,08	0,08	1,01	0,01	0,01
10	1,85	0,47	0,46	1,07	0,04	0,07	1,08	0,06	0,08	1,05	0,04	0,05	1,89	0,46	0,47	1,12	0,11	0,10	1,12	0,11	0,10	1,06	0,04	0,06
11	1,91	0,47	0,48	1,03	0,03	0,03	1,19	0,14	0,16	1,04	0,03	0,04	1,61	0,36	0,38	1,05	0,05	0,05	1,05	0,05	0,05	1,06	0,03	0,06
12	1,88	0,32	0,47	1,00	0,00	0,00	1,34	0,19	0,25	1,00	0,00	0,00	1,76	0,37	0,43	1,20	0,18	0,17	1,20	0,18	0,17	1,00	0,00	0,00
14	2,02	0,40	0,50	1,01	0,01	0,01	1,05	0,05	0,04	1,01	0,01	0,01	1,83	0,48	0,45	1,81	0,45	0,45	1,86	0,44	0,46	1,01	0,01	0,01
16	2,00	0,44	0,50	1,06	0,06	0,06	1,13	0,12	0,11	1,00	0,00	0,00	1,92	0,51	0,48	1,19	0,14	0,16	1,20	0,15	0,17	1,00	0,00	0,00
17	2,09	0,59	0,52	1,00	0,00	0,00	1,03	0,03	0,03	1,04	0,04	0,04	1,35	0,25	0,26	1,10	0,10	0,09	1,10	0,09	0,09	1,00	0,00	0,00
18	1,97	0,43	0,49	1,00	0,00	0,00	1,19	0,15	0,16	1,00	0,00	0,00	1,74	0,32	0,43	1,09	0,09	0,08	1,06	0,06	0,06	1,02	0,00	0,00
19	2,01	0,52	0,50	1,02	0,00	0,02	1,59	0,38	0,37	1,01	0,01	0,01	1,54	0,36	0,35	1,22	0,20	0,18	1,21	0,19	0,18	1,01	0,01	0,01
21	1,94	0,31	0,48	1,00	0,00	0,00	1,14	0,14	0,13	1,00	0,00	0,00	1,87	0,41	0,47	1,27	0,22	0,21	1,26	0,21	0,20	1,01	0,01	0,01
23	1,58	0,28	0,37	1,00	0,00	0,00	1,12	0,11	0,11	1,00	0,00	0,00	1,90	0,34	0,47	1,15	0,14	0,13	1,15	0,14	0,13	1,00	0,00	0,00
24	2,02	0,53	0,50	1,02	0,02	0,02	1,30	0,24	0,23	1,00	0,00	0,00	1,95	0,48	0,49	1,09	0,09	0,09	1,09	0,08	0,08	1,00	0,00	0,00
26	1,95	0,47	0,49	1,06	0,06	0,06	1,20	0,10	0,17	1,00	0,00	0,00	1,55	0,32	0,35	1,09	0,06	0,08	1,06	0,04	0,05	1,00	0,00	0,00
27	2,17	0,46	0,54	1,02	0,02	0,02	1,53	0,31	0,35	1,00	0,00	0,00	1,97	0,40	0,49	1,06	0,05	0,05	1,06	0,05	0,05	1,02	0,02	0,02
28	2,11	0,41	0,53	1,00	0,00	0,00	1,52	0,29	0,34	1,00	0,00	0,00	1,85	0,36	0,46	1,06	0,06	0,06	1,07	0,07	0,06	1,00	0,00	0,00
30	2,14	0,52	0,53	1,00	0,00	0,00	1,39	0,28	0,28	1,00	0,00	0,00	1,98	0,38	0,50	1,17	0,14	0,14	1,17	0,14	0,14	1,01	0,01	0,01

La heterocigosis media observada fue de 15,9 %, aunque este valor fue muy variable entre los distintos loci analizados, siendo los más polimórficos *Mdh-B* y *Got-A* (Tabla 1.1.1). La heterocigosis para el pool génico fue muy variable no sólo entre poblaciones sino también dentro de las cuencas (**Fig. 3; Cuadro 2**), alcanzando valores de hasta 23 %.

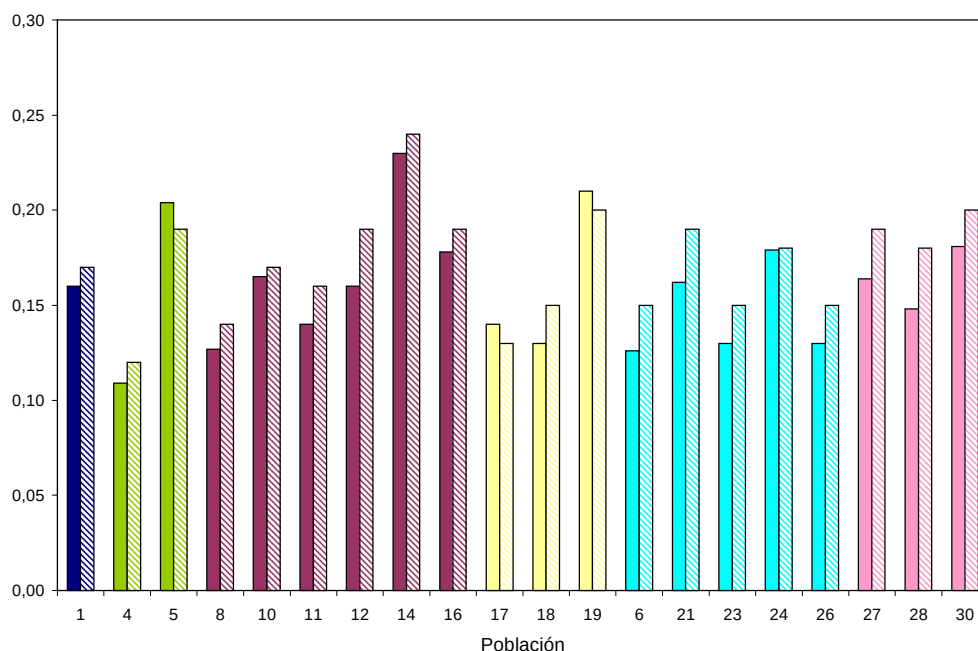


Figura 3 - Variación entre poblaciones en la heterocigosis observada (H_o , color lleno) y esperada (H_e ; Nei, 1973, color rayado). Cada color representa a poblaciones de una misma cuenca.

2. Diferenciación

Tanto las frecuencias alélicas como las genotípicas fueron significativamente distintas entre las poblaciones para todos los loci analizados ($\alpha = 0,05$).

La mayor distancia genética para el pool génico se encontró entre las poblaciones 5 y 14 ($d_o = 0,152$) y la menor entre las 27 y 28 ($d_o = 0,017$) (ambas de la cuenca del Lago Tromen). La mayoría de las distancias fueron significativamente diferentes. El análisis de cluster del pool génico separa por completo la población 14 (cuenca del Lago Lácar) y agrupa, separado del resto, a las poblaciones 19 y 30 (**Fig. 4**). Los grupos que se forman no tienen relación con la ubicación de las poblaciones en las cuencas lacustres.

El test de Mantel tampoco denotó una asociación entre las distancias genéticas y las geográficas. Las distancias genéticas entre las poblaciones dentro de una misma cuenca lacustre resultaron significativamente diferentes.

Los valores de diferenciación entre cada población y su complemento (D_i) para el pool génico variaron entre 2,4 y 8,1 %, siendo las poblaciones 5, 14, 19 y 30 las más diferenciadas. El nivel medio de diferenciación génica (δ_{ge}) para el pool de loci analizados fue de 4,7 % ($F_{ST} = 5,2$ %) (**Fig. 3**).

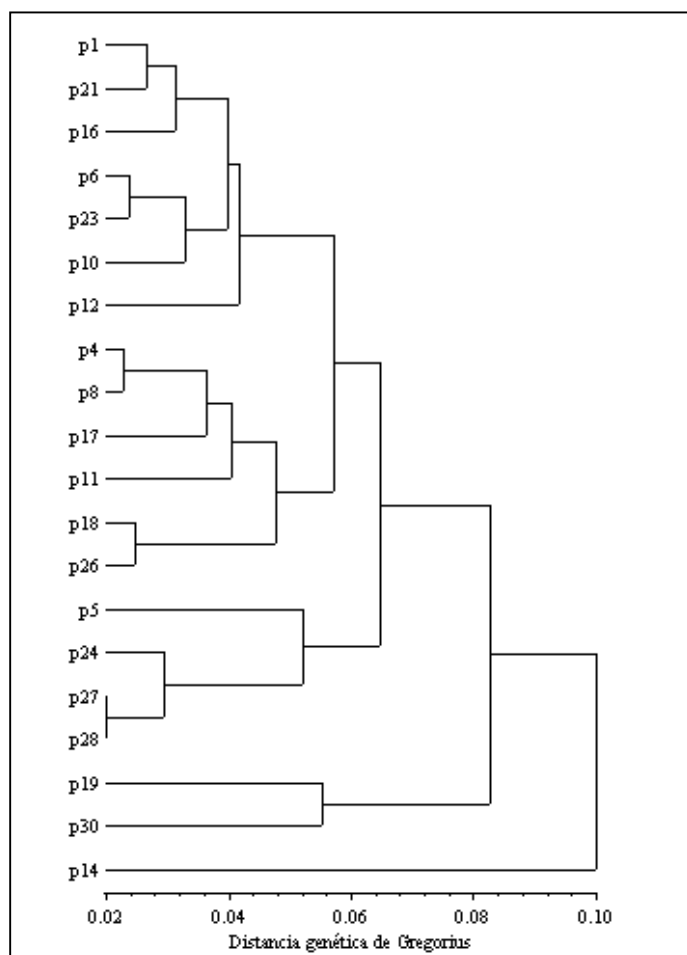


Figura 4 - Dendrograma obtenido con el método UPGMA utilizando las distancias de Gregorius para el pool de loci analizados.

3. Análisis entre cuencas y variación geográfica

Como primer paso se probó la homogeneidad de las frecuencias alélicas entre poblaciones dentro de cada cuenca, resultando en todos los casos diferencias significativas en las frecuencias alélicas en al menos tres de los ocho loci. Comparaciones de todos los pares de poblaciones posibles dentro de cada cuenca también revelaron diferencias significativas tanto en las frecuencias alélicas como en las distancias genéticas para el pool génico.

Por otro lado, se calcularon los valores de diferenciación entre poblaciones dentro de cada cuenca lacustre, los cuales también fueron muy elevados, indicando la heterogeneidad de las poblaciones (**Cuadro 3**). En algunos casos el nivel de diferenciación fue mayor que entre las 20 poblaciones, por lo que una comparación entre cuencas agrupando las poblaciones de cada una en un conjunto es totalmente inválido.

Si bien la variación dentro de las cuencas es muy grande, se evaluó la posibilidad de una variación latitudinal en las frecuencias alélicas y las medidas de diversidad genética. Los resultados mostraron una asociación significativa ($P < 0,03$) únicamente en la diversidad genética del locus *ldh*, la cual disminuye con la latitud ($r = -0,47$).

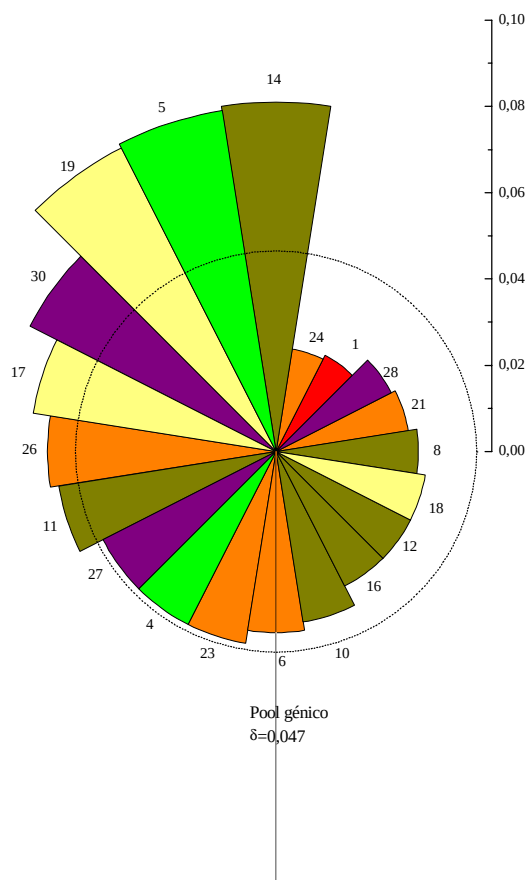


Figura 5 - “Caracol de diferenciación”, según Gregorius & Roberds (1986) para el pool génico y los ocho loci analizados. Cada sección corresponde a una población y cada color a poblaciones de una misma cuenca lacustre. El radio de cada sección representa la diferenciación de dicha población con respecto a su complemento (D_j) y el ángulo representa el tamaño proporcional de cada población (c_j). El círculo en línea punteada corresponde al nivel de diferenciación media entre poblaciones (δ).

Cuadro 3 - Diferenciación entre poblaciones dentro de las distintas cuencas para cada locus y el pool génico.

Cuenca	δ								
	<i>Mdh-B</i>	<i>Mdh-C</i>	<i>Idh</i>	<i>Adh</i>	<i>Got-A</i>	<i>Got-B</i>	<i>Got-C</i>	<i>Pgi</i>	Pool
Hermoso (2)	2,8	0,4	25,4	0,0	43,5	2,6	1,8	0,0	9,6
Lácar (6)	9,1	1,8	4,2	1,2	5,6	8,2	8,4	1,5	5,0
Lolog (3)	18,4	0,5	13,1	1,3	7,8	3,9	4,0	0,3	6,2
Huechulafquen (5)	12,9	1,2	3,2	0,0	7,2	3,4	3,1	0,2	3,9
Tromen –Quillén (3)	16,3	0,5	3,6	0,0	5,9	3,3	3,2	0,4	4,2

Entre paréntesis se indica el número de poblaciones.

DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DETECTADA CON MARCADORES ISOENZIMÁTICOS EN ROBLE

INTRODUCCIÓN

En Chile la distribución del roble (*Nothofagus obliqua*) está dividida en Regiones de Procedencia, conformadas por áreas o conjunto de áreas con condiciones ecológicas uniformes. Esta clasificación está basada principalmente en factores climáticos con apoyo de mapas de vegetación y de tipos forestales, que abarcan la Cordillera de la Costa, Valle Longitudinal y Cordillera de los Andes (Vergara *et al.* 1998).

El conocimiento de la diversidad genética de una especie es una pieza clave para cualquier iniciativa de mejoramiento o conservación genética. El roble cuentan con una gran variabilidad morfológica dentro y entre sus distintas poblaciones. Esta situación, ha sido confirmada por algunos estudios genecológicos, dentro de los que se destacan los trabajos de Donoso (1979a y 1979b). Recientemente, Ipinza *et al.* (2000), concluyeron que los rasgos morfológicos de la semilla, germinación y crecimiento inicial tiene un alto control genético y además que algunas de estas características presentan un comportamiento clinal y otras ecotípicas, a lo largo de su distribución geográfica.

La importancia de conocer la estructura de la variación genética de una especie, diferenciando poblaciones en su área de distribución, radica en que dicha información es vital al momento de decidir qué material genético utilizar en un programa de plantaciones para una región determinada o establecer una estrategia de conservación y mejoramiento genético a largo plazo (Zobel y Talbert 1984, Delmastro 1997). Por otro lado, la utilización de un carácter como marcador génico requiere el establecimiento de la relación unívoca entre el fenotipo y cada uno de los genes involucrados en su expresión. Esto se logra a través del análisis de control genético, que determina el modo de herencia (modo de transmisión y modo de acción génica) de los fenotipos enzimáticos.

Las isoenzimas han demostrado ser una técnica adecuada para describir la variación genética en *Nothofagus* (Pineda, 2000). Las principales ventajas de esta tecnología se pueden resumir en su simpleza y bajo costo. Sin embargo, el número de loci posible de detectar constituye una desventaja en relación al uso de los marcadores moleculares.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Determinar la herencia y patrones de varios sistemas isoenzimáticos; y 2) usar esta información para determinar la estructura genética de esta especie.

COMPONENTE CHILENO

Materiales y métodos

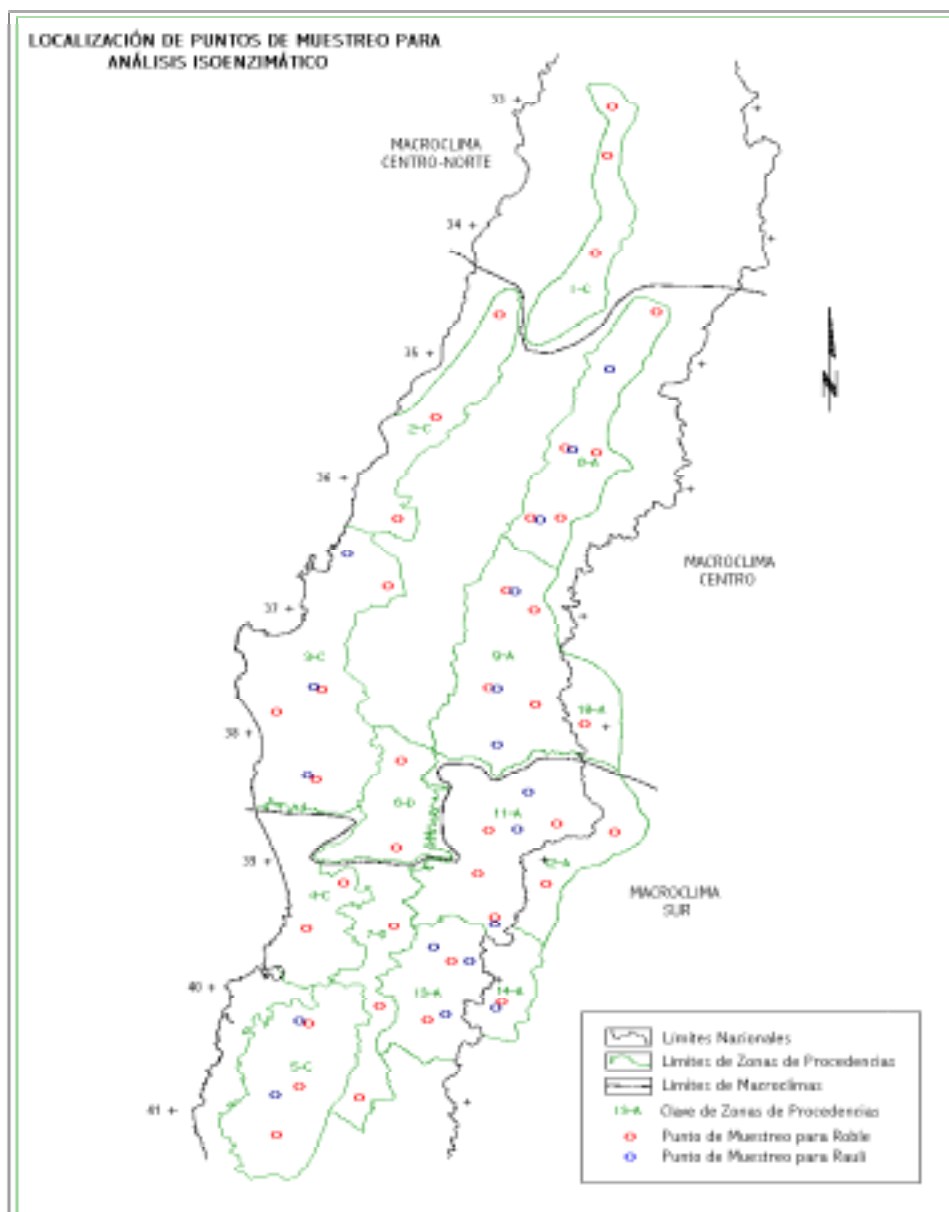
En Chile se analizaron 10 procedencias de roble representativas de las macroregiones centro y sur del país (**Cuadro 1**) ya que en las dos colectas realizadas no fue posible coleccionar semillas viable de la procedencia (1C), única procedencia que representa la zona centro-norte.

Las semillas colectadas en las tres poblaciones (Til Til, Lampa y Alhue) que componen la procedencia (1C) presentaron prácticamente un 100% de semillas vanas y dañadas por insectos, lo que hizo imposible obtener material para los análisis.

Cuadro 1 - Macroclima, procedencia y poblaciones de roble utilizadas en el análisis isoenzimático del roble en Chile

Macroclima	Procedencia	Población
Centro	2 C	Quirihue
	3 C	Lago Lanalhue
	6 D	Quepe
	8 A	Vilches
	9 A	Recinto
Sur	4 C	Cuesta Lastarria
	5 C	Llanacura
	7 D	Malalhue
	11 A	Cunco
	13 A	Choshuenco

Los sistemas isoenzimáticos analizados fueron ADH, IDH, PGI, GOT, SKDH. Estos sistemas fueron seleccionados debido a su buena resolución y consistencia en los trabajos realizados por el INTA. Además, para homologar los resultados de roble chileno y argentino, un profesional chileno viajó al Laboratorio del INTA, Bariloche a realizar estos análisis. El tamaño de la muestra fue de 40 árboles por población.



Análisis estadístico

Los datos de isoenzimas fueron usados para estimar varios estadígrafos de variación genética como: número de alelos por locus, porcentaje de diversidad génica, porcentaje de heterocigocidad, coeficiente de polimorfismo (PIC), y el coeficiente de consanguinidad. Estos estadígrafos fueron calculados por locus y como promedio poblacional. Además de estos valores se calcularon las frecuencia alélica, varianza y la desviación estándar por locus y las frecuencias alélicas por población. Con estas frecuencias alélicas se pueden distinguir los alelos que se encuentra en una alta frecuencia como aquellos alelos con baja frecuencia, considerados “raros” o con escasa presencia a nivel poblacional.

Para determinar la similitud entre las procedencias estudiadas se calculó la distancia genética de acuerdo entre pares de procedencias utilizando la distancia genética de Nei (1973). Estos valores fueron usados posteriormente para confeccionar un dendrograma, utilizando el método de UPGMA para ilustrar las relaciones genéticas entre las poblaciones estudiadas. Para estudiar la estructura genética de las procedencias evaluadas se realizó un análisis de varianza para determinar sus componentes. De esta manera se pudo apreciar los porcentajes de variación entre y dentro de las poblaciones.

Resultados

El análisis de los datos isoenzimáticos indicó que los sistemas ADH, IDH, PGI y GOT presentaron una buena resolución, sin embargo, el sistema SKDH presentó problemas de resolución y consistencia en las muestras en las poblaciones analizadas por lo que se resolvió eliminarla del análisis.

En los sistemas que presentaron una buena resolución, ADH, IDH y PGI presentaron una sola zona de tinción en comparación con el GOT que presentó tres zonas, denominadas GOT-A, GOT-B y GOT-C (**Cuadro 2**).

Cuadro 2 - N° de alelos, diversidad génica, heterocigocidad, PIC, Coeficiente de consanguinidad de poblaciones de roble.

Loci	N° alelos	Diversidad génica	Heterocigocidad	PIC	Cof. Consanguinidad
ADH	2	0.13	0.15	0.13	-0.08
IDH	4	0.28	0.23	0.26	0.15
PGI	3	0.26	0.28	0.24	-0.07
GOT-A	2	0.01	0.01	0.01	0.00
GOT-B	4	0.23	0.23	0.21	0.02
GOT-C	1	0.00	0.00	0.00	.
Promedio	2.67	0.15	0.15	0.14	0.02

En total las isoenzimas utilizadas permitieron detectar 16 alelos y el número promedio de alelos fue 2,7. El sistema que detectó un mayor número de alelos fue el GOT si se considera como sistema isoenzimático ya que con sus tres zonas de tinción detectó 7 alelos. Dentro de este sistema GOT-B detectó 4 alelos, GOT-A 2 alelos y GOT-C 1 alelo. IDH, PGI y ADH detectaron 4, 3 y 2 alelos, respectivamente (**Cuadro 2**).

El promedio de diversidad genética obtenido fue de 0.17, sin embargo se observaron diferencias entre los sistemas isoenzimáticos evaluados. Por ejemplo, PGI detectó una diversidad genética de 0.30, muy similar a GOT-C con un 0.29 comparado con ADH que

dio un valor de 0.11. GOT-C no detectó diferencias entre el material analizado, debido a su monomorfismo (**Cuadro 2**).

El nivel de heterocigosidad, siguió un patrón similar a diversidad genético, lo cual se vio reflejado en su valor promedio (0.17). Sin embargo, el valor de heterocigosidad fue diferente en algunos casos, por ejemplo, el sistema PGI presentó un valor superior al de la diversidad genética (0.35 vs 0.30) pero en el caso de IDH y GOT-B se presentaron valores inferior de heterocigosidad que de diversidad genética (**Cuadro 2**).

El PIC (Polimorphic index coefficient), presentó un valor de 0.16, con un mayor valor en el sistema PGI e IDH (0.27), similar a GOT-B (0.26), seguido de ADH (0.11) y GOT-A (0.02) (**Cuadro 2**).

El coeficiente de consanguinidad promedio fue cero, sin embargo, se observó un valor positivo de 0.15 con el sistema IDH. El resto de los valores fueron muy bajos y algunos negativos (**Cuadro 2**).

Las frecuencias alélicas de los 16 loci en las 5 poblaciones de roble indicó una diferente frecuencia, salvo en el caso de GOT-C que fue monomorfico. En esta situación, todos los árboles de las poblaciones analizadas presentaron el mismo alelo (**Cuadro 3**). En los sistemas polimórficos, los alelos con mayor frecuencia fueron: Alelo 1, GOT-A (0.99), alelo 1, ADH (0.94); alelo 3, IDH (0.84), alelo 2, GOT-B (0.83) y Alelo 3, PGI (0.82). Por otro lado, los alelos raros o con menor frecuencia fueron: alelo2 y 4 de GOT-B con un 1% (Cuadro 3). La desviación estándar de las frecuencias alélicas fue bastante baja y fluctuó entre un 1 y 2%, en los alelos polimórficos (**Cuadro 3**).

Cuadro 3 - Frecuencias alélicas de 16 loci en 10 poblaciones de roble chileno

Loci	Nº alelos	Frecuencia	Desviación estándar
ADH	1	0.93	0.01
ADH	2	0.07	0.01
IDH	1	0.06	0.01
IDH	2	0.84	0.02
IDH	3	0.08	0.02
IDH	4	0.01	0.01
PGI	1	0.03	0.01
PGI	2	0.12	0.01
PGI	3	0.85	0.02
GOT-A	1	0.99	0.00
GOT-A	2	0.01	0.00
GOT-B	1	0.11	0.01
GOT-B	2	0.87	0.02
GOT-B	3	0.02	0.01
GOT-B	4	0.01	0.00
GOT-C	1	1.00	0.00

Las frecuencias alélicas por población indicó que los alelos con mayor frecuencia en la población estuvieron representados en todas las poblaciones analizadas (**Cuadro 4**). Por ejemplo, el alelo 2 de ADH tuvo una frecuencia superior al 90% en las cuatro poblaciones analizadas. Por otro lado, los alelos raros o de menor frecuencia como el alelo 4 de GOT-

B se presentó con un 1% en la procedencias A11 y no se presentó en las procedencias A13, A9 y C14.

Cuadro 4. Frecuencias alélicas de 16 loci en 10 poblaciones chilenas de roble

Loci	Allele	Macroclima Centro					Macroclima Sur				
		C2	C3	A8	A9	D6	C4	C5	D7	A11	A13
ADH	1	0.94	1.00	0.74	0.94	0.88	0.97	0.97	1.00	0.91	1.00
ADH	2	0.06	0.00	0.26	0.06	0.13	0.03	0.03	0.00	0.09	0.00
GOT-A	1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.96	1.00
GOT-A	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00
GOT-B	1	0.00	0.16	0.03	0.19	0.06	0.15	0.15	0.00	0.06	0.08
GOT-B	2	1.00	0.84	0.97	0.81	0.94	0.80	0.85	1.00	0.86	0.92
GOT-B	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.06	0.00
GOT-B	4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00
GOT-C	2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
IDH	2	0.09	0.00	0.06	0.10	0.00	0.00	0.03	0.00	0.11	0.04
IDH	3	0.85	0.75	0.75	0.85	1.00	1.00	0.78	1.00	0.78	0.96
IDH	4	0.06	0.25	0.19	0.04	0.00	0.00	0.19	0.00	0.08	0.00
IDH	5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00
PGI	1	0.00	0.03	0.11	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.08	0.00
PGI	2	0.08	0.13	0.18	0.13	0.03	0.18	0.08	0.00	0.16	0.07
PGI	3	0.92	0.84	0.71	0.86	0.98	0.81	0.93	1.00	0.76	0.93

La distancia genética de las cuatro poblaciones, basada en los 16 alelos detectados indicó una escasa diversidad genética entre las poblaciones estudiadas. Estas distancias genéticas fueron utilizadas para construir un dendrograma (**Fig. 2**)

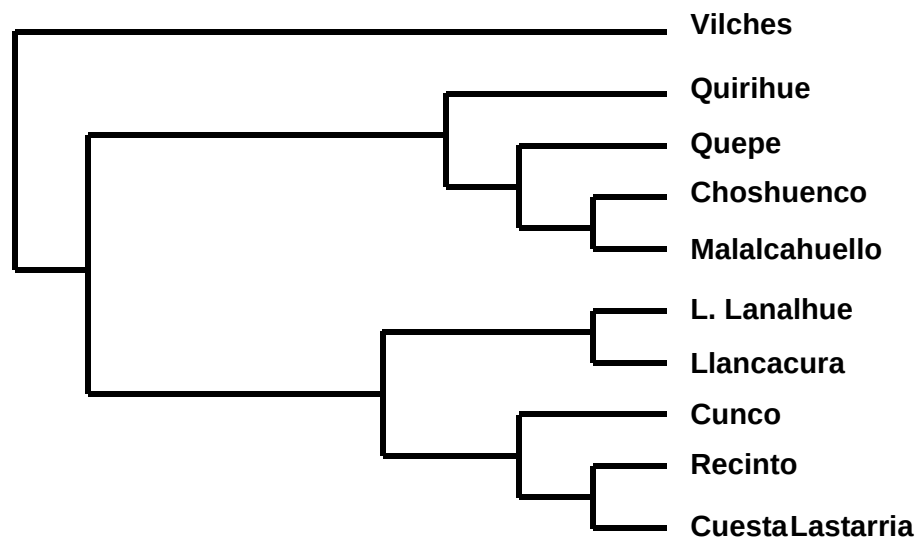


Fig. 2. Dendrograma de poblaciones de roble chileno

Las distancias genéticas indican solo una leve relación geográfica entre las poblaciones colectadas en el macroclima centro y sur (**Fig. 2**). Por ejemplo, se observa una buena asociación entre Vilches, Quirihue y Quepe, pertenecientes al macroclima centro y Llanacura y Cunco (macroclima sur).

La estructura genética de las procedencias de roble estudiadas que la diversidad genética existente en las poblaciones estuvo radicada principalmente dentro y entre las poblaciones, con un 45 y 50%, respectivamente.

Introgresión

El estudio de detección de híbridos en poblaciones de roble indicó que de las 10 procedencias evaluadas, siete presentaron híbridos, lo que equivale a un 70%. El proceso de detección de los híbridos se realizó con el marcador genético ADH. En esta oportunidad se detectaron híbridos en cuatro poblaciones en el macroclima centro y tres poblaciones en el macroclima sur, similar tendencia a la observada en raulí, donde no se presentó una preferencia del este fenómeno por macroclima. El análisis de cada población fue variable, observándose los mayores porcentajes en la población Vilches con un 50% (macroclima centro) y Melipeuco con un 35% (macroclima sur).

COMPONENTE ARGENTINO

2. Roble

Metodología

La metodología utilizada en las diferentes etapas del Proyecto se halla descripta en forma detallada en las publicaciones científicas, capítulos en libros técnicos y presentaciones a Congresos, resultado del presente estudio (**Anexo 1**).

2.1 - Diversidad genética

A través del análisis isoenzimático realizado en las 14 poblaciones del área de distribución natural de *Nothofagus obliqua* en Argentina (**Figura 2.1.1**) con los 7 marcadores génicos identificados en el análisis de control genético (Skdh, Idh-B, Adh, Pgm-A, Pgi-B, Got-B y Got-C) se realizó la caracterización genética de las mismas (**Cuadro 2.1.1**).

Cuadro 2.1.1 - Parámetros de diversidad genética poblacional

Cuenca	Población	NA	P	AP	Ho	He	v
Lácar	1. Bandurrias	12	71	1,71	0.123	0.132	1.152
	2. Yuco	14	71	2,00	0.180	0.191	1.236
	3. Nonthué	14	85	2,00	0.138	0.180	1.220
	4. Hua Hum	14	85	2,00	0.164	0.175	1.211
	5. Pío Protto	16	85	2,28	0.134	0.189	1.233
	14. Quila Quina	16	100	2,28	0.219	0.264	1.359
Quillén	6. Seccional	19	100	2,71	0.182	0.243	1.321
	7. Corral de Bueyes	16	85	2,28	0.170	0.203	1.255
	8. Cabecera Oeste	15	85	2,14	0.221	0.240	1.317
Ñorquinco	9. Pulmarí	15	85	2,14	0.139	0.229	1.298
	10. Seccional	17	100	2,42	0.204	0.297	1.422
	11. Chumpiru	14	85	2,00	0.185	0.240	1.315
Pilolil	12. Pilolil	13	71	1,85	0.242	0.256	1.344
Epulaufquen	13. Epulaufquen	16	85	2,28	0.239	0.278	1.386

P= porcentaje de loci polimórficos

He= heterocigosis esperada

AP= número medio de alelos por locus polimórfico

Ho= heterocigosis observada

v= diversidad

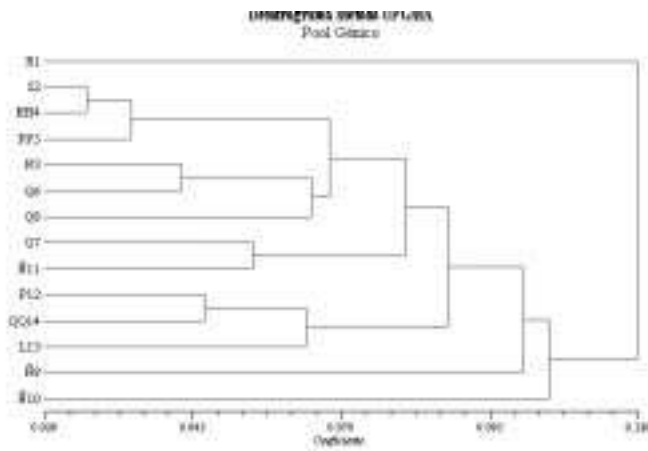


Figura 2.1.1 - Distribución geográfica de las poblaciones estudiadas de Roble en Argentina

La diversidad genética intrapoblacional presentó un patrón dentro de la cuenca, donde los valores mayores correspondían a las poblaciones de localización este. Asimismo, las poblaciones marginales Pilolil y Epulafquen, de localización este y norte respectivamente de la distribución, mostraron valores de diversidad elevados respecto al resto de las poblaciones.

Dos únicos alelos exclusivos: alelo 3 para Got-B y alelo 3 para Got-C fueron encontrados en la población ubicada en la cabecera este del Lago Quillén. La presencia del alelo 2 especie-específico de *Nothofagus nervosa* (Gallo *et al.*, 1997; Marchelli y Gallo, 1999), diagnóstico para la detección de híbridos interespecíficos *N. obliqua* x *N. nervosa*, mostró un patrón longitudinal en su frecuencia, con valores mayores en las poblaciones de localización oeste, tanto en la cuenca del lago Quillén, como en Ñorquinco, a pesar de la no presencia de poblaciones de *N. nervosa* en esta última. La población ubicada más al norte y este de la distribución (Epulafquen) presentó los mayores valores de frecuencia del alelo 2 para Adh, en un área en la que *N. nervosa* no vegeta (**Figuras 2.1.2 y 2.1.3**).

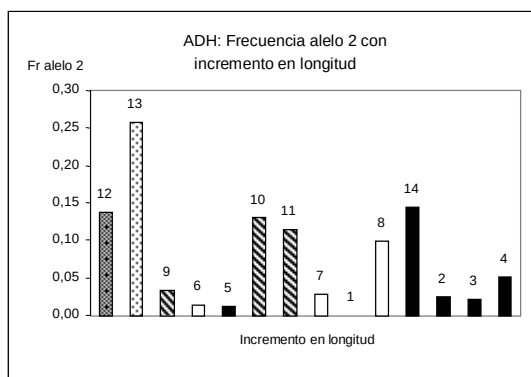


Figura 2.1.2 - Frecuencia del alelo 2 ADH vs. longitud

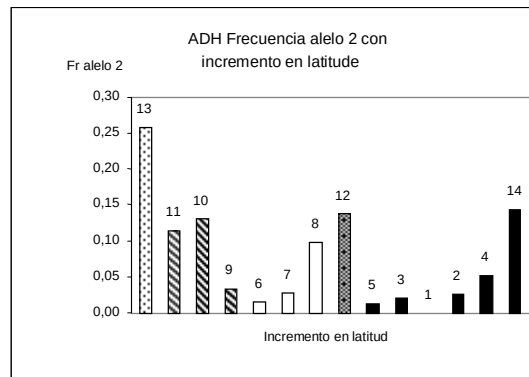


Figura 2.1.3 - Frecuencia del alelo 2 ADH vs. latitud

2.2 - Diferenciación

La diferenciación genética entre poblaciones, medida a través de la distancia genética de Gregorius (Gregorius, 1974) aplicada a un análisis de clusters a través del Método UPGMA (valor cofenético $r=0.7604$) mostró un dendrograma con clusters poco definidos y con falta de un agrupamiento notorio entre poblaciones pertenecientes a la misma cuenca (**Figura 2.2.1**).

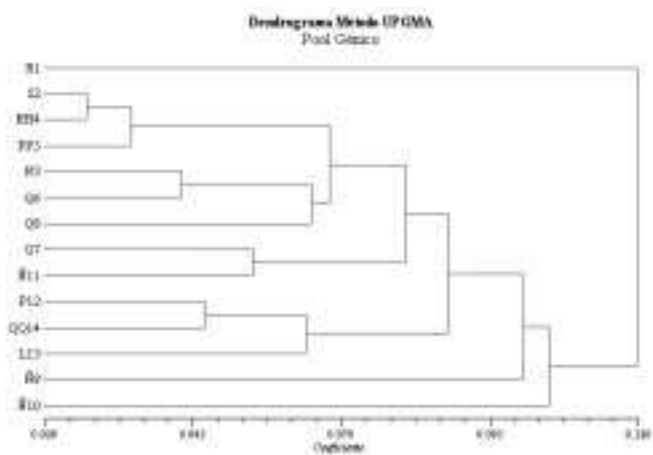


Figura 2.2.1 - Dendrograma poblaciones basado en la distancia de Gregorius

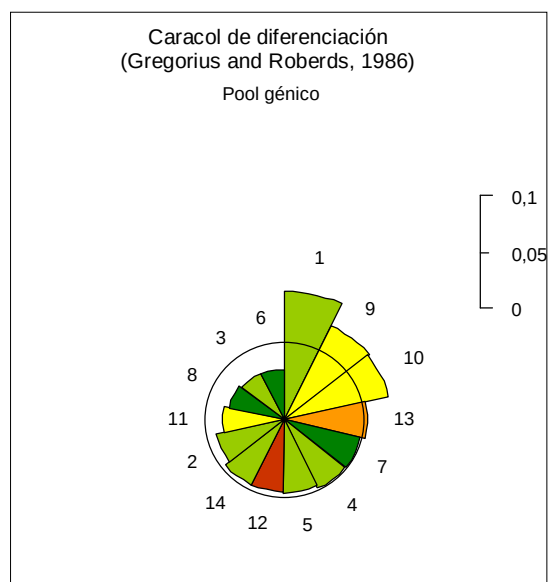


Figura 2.2.2 - Caracol de Gregorius. Diferenciación entre poblaciones Dj

Obs.: las poblaciones pertenecientes a una misma cuenca se presentan en un mismo color.

El test de Mantel para la correlación entre matrices de distancia genética y distancia geográfica confirmó el resultado hallado en el dendrograma, con un $r = 0.021$. La diferenciación del pool génico entre poblaciones, evaluada a través del parámetro D_j (**Figura 2.2.2**) mostró a las poblaciones Ñorquinco 9 y Ñorquinco 10 como las más diferenciadas respecto al complemento.

2.3 - Análisis entre cuencas y variación geográfica

El análisis de clusters tomando a las cuencas como OTUs mostró un dendrograma donde Ñorquinco y Quillén constituyen un cluster con Lácar, mientras que Pilolil y Epulafquen aparecen a una mayor distancia (**Figura 2.3.1**). Estas dos últimas cuencas conforman regiones marginales dentro del área de distribución de la especie, localizadas al este y norte, respectivamente.

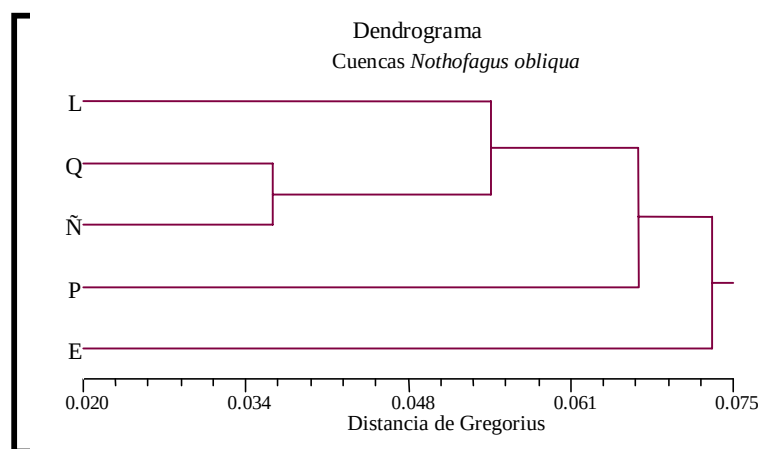


Figura 2.3.1 - Dendrograma cuencas *Nothofagus obliqua*.

Referencias: L (Cuenca Lácar), Q (Cuenca Quillén), Ñ (Cuenca Ñorquinco), P (Cuenca Aluminé), E (Cuenca Epulafquen)

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *NOTHOFAGUS OBLIQUA* Y *N. ALPINA* MEDIANTE RAPD

INTRODUCCION

El roble y el raulí pertenecen al género *Nothofagus* y corresponden a las especies *N. obliqua* y *N. alpina*, respectivamente.

En Chile, estas especies están presentes en una superficie de 1.672.475 has., con una amplia distribución geográfica que se extiende desde V hasta la X región, tanto en la Cordillera de la Costa como en los Andes y desde los 500 m (raulí) hasta los 2.000 m (roble) de altura. Esta amplia distribución geográfica a lo largo de Chile, podría ser el resultado de una alta variabilidad genética en ambas especies, lo cual les permite adaptarse a diferentes condiciones edafoclimáticas.

El conocimiento de la variabilidad genética de una especie es un requisito indispensable para fijar estrategias de conservación, mejoramiento genético y su utilización racional. Tradicionalmente, la descripción de la variabilidad se ha basado en la descripción fenotípica (morfología, crecimiento y característica productivas) del germoplasma. Actualmente, a este tipo de descripción se han incorporado otras metodologías como son los marcadores moleculares para caracterizar las especies a nivel de genotipo. El análisis de los marcadores moleculares es considerada una herramienta potencialmente poderosa en la caracterización y descripción de la estructura genética del germoplasma.

Desde hace varias décadas, a través de la biología molecular se han desarrollado varias técnicas para detectar y cuantificar la variabilidad genética (polimorfismo) a nivel de ADN. En una primera etapa, uno de los marcadores moleculares mas usados en diversas especies fueron los RFLPs (Tanksley y otros, 1989), pero actualmente es considerado un procedimiento lento y de alto costo. Posteriormente, Welsh y McClelland (1990) y Williams y otros (1990) describieron la Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD), una técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Esta técnica usa partidores de 10 mers, para amplificar al azar secuencias del ADN genómico en estudio. La amplificación del ADN, ocurre a través de ciclos térmicos secuenciales que permiten denaturar, complementar el partidador a la cadena molde y posteriormente sintetizar una nueva cadena de ADN (Williams y otros, 1990). Los diferentes patrones y bandas amplificadas permiten cuantificar diferencias genéticas entre y dentro de las especies.

Entre las ventajas del uso de RAPDs, están su herencia Mendeliana, preferentemente dominante, la facilidad de aplicación y su alta eficiencia en detectar polimorfismo. Esta habilidad de detectar regiones de ADN altamente variables tiene una tremenda potencialidad en identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica, en el estudio de la variación genética de poblaciones y en el mapeo de genes. Adicionalmente, están la rapidez en la obtención de resultados, costo, el no uso de radioactividad y una cantidad reducida de ADN.

Los objetivos de este trabajo son: **a)** determinar la diversidad genética del germoplasma de roble y raulí, usando marcadores moleculares (RAPD); **b)** establecer posibles relaciones entre la diversidad genética y su distribución geográfica; y **c)** detectar posibles híbridos entre estas dos especies.

El *objetivo general* de este estudio fue evaluar la variabilidad genética de poblaciones de roble y raulí mediante marcadores genéticos, para ayudar a la conservación, el mejoramiento genético y el manejo silvícola en ambas especies. Ello a través de los siguientes *objetivos específicos*: a) Identificar y relacionar genéticamente procedencias de raulí y roble, mediante marcadores moleculares (RAPD); b) asociar la información genética-molecular con la distribución geográfica; y c) detectar introgresión entre poblaciones naturales de estas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de diversidad genética mediante RAPD, se analizaron 10 individuos dentro de cada población chilena y argentina (**Cuadro 1**). La extracción de ADN se realizó desde hojas jóvenes y liofilizadas, tanto para el estudio de diversidad genética, como para el de introgresión (**Cuadros 1 y 2**). Durante la extracción de ADN, las hojas fueron maceradas en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. Al material macerado se le agregó 300 µl de tampón de extracción (50 mM Tris pH 8,0; 0,7 M NaCl; 10mM EDTA; 2%CTAB y β-mercaptoetanol) y se incubó durante 45 min. a 65°C.

Posteriormente, las muestras fueron enfriadas y se realizaron dos extracciones proteicas con cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). La emulsión fue centrifugada a 4.500 rpm por 15 minutos, para la separación de las fases. El sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo limpio, y se precipitó el ADN con Isopropanol. El precipitado fue lavado con etanol (76%; 10 mM NH₄Ac) y secado a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN fue resuspendido (TE pH 8.0) y tratado con ARNasa y se midió su concentración en un fluorómetro (DyNA Quant™, Hoefer).

Análisis molecular mediante RAPD

- 1. Screening de partidores.** Se realizó un pre-screening con 40 partidores de RAPD de 10 mers (Operon Technologies, Alameda, California, CA), para seleccionar aquellos que presentaran el mayor nivel de polimorfismo y reproducibilidad.
- 2. Estudio de diversidad genética:** Se seleccionaron 20 partidores de las Series OPAB y OPAD, para realizar el análisis de 340 individuos de roble y 110 de raulí. Para determinar introgresión se analizaron 22 partidores de RAPD.
- 3. Ajustes de las condiciones de reacción y amplificación.** La reacción de amplificación del ADN se realizó primeramente en un volumen total de 25µl conteniendo: 10x buffer, 0,3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleótido, 0,2 µM de partidor, 1 unidad de *Taq* polimerasa. Durante este proceso se evaluaron tres concentraciones de ADN (5, 10 y 25 ng) y dos condiciones de reacción y amplificación.
- 4. Análisis de las condiciones de amplificación.** Fueron: **a)** 3 ciclos de 95°C por 1 min.; 37°C por 1 min.; 72°C por 1 min. 20 s; luego 37 ciclos de 94°C por 37 s; 40°C por 40; 72°C por 1 min. 20 s. y **b)** 35 ciclos de 92° por 15 s; 34° por 1 min.; 72° por 2 min.

Cuadro 1 - Material vegetal utilizado para los estudios de diversidad genética en roble y raulí, mediante RAPD

País	Macroclima	Región	Punto	Reg.	Prov.	Comuna	Lugar
Especie: <i>Nothofagus obliqua</i> (roble)							
CHILE	Centro	2-C	R. N. Los Ruiles	VII	Cauquenes	Cauquenes	Los Ruiles
			Quirihue	VIII	Ñuble	Quirihue	Quirihue
	Centro	3-C	Cayumanqui	VIII	Concepción	Quillón	Cerro Cayumanqui
			Curanilahue	VIII	Arauco	Curanilahue	San José de Colico
			L. Lanalhue	VIII	Arauco	Cañete	Cam. Cañete-Purén
			Pichipillahuén	IX	Malleco	Galvarino	Pichipillahuén
	Sur	4-C	Cuesta Lastarria	IX	Cautín	Loncoche	San Antonio
			Cruces	X	Valdivia	Valdivia	Sector Cayumapu
	Sur	5-C	Llancacura	X	Valdivia	La Unión	Trumao
			Purranque	X	Osorno	Purranque	Cam.Purranque-Frutillar
	Sur	6-D	Victoria	IX	Malleco	Victoria	Inspector Fernández
			Quepe	IX	Cautín	Freire	Quepe
	Sur	7-D	Malalcahuello	X	Valdivia	Lanco	Purulón
			Futroneo	X	Valdivia	Futroneo	Futroneo
			Rupanco	X	Osorno	P. Octay	Hacienda Rupanco
	Centro	8-A	Vilches	VII	Talca	San Clemente	Vilches
			Bullileo	VII	Linares	Parral	Bullileo
	Centro	9-A	R. Nac. Ñuble	VIII	Ñuble	Recinto	Las Trancas
			Ralco	VIII	Bio-Bio	Santa Bárbara	Camino Ralco-Pangue
			Recinto	VIII	Ñuble	Pinto	Cam.Pinto-Recinto km.10
			Sta. Bárbara	VIII	Bio-Bio	Santa Bárbara	Parcela 43
	Sur	11-A	L. Galletue	IX	Malleco	Melipeuco	Icalma
			Cunco	IX	Cautín	Cunco	Lomacura
			L. Colico	IX	Cautín	Cunco	Puerto Puma
			Melipeuco	IX	Cautín	Melipeuco	El Manzano
			Curarrehue	IX	Cautín	Curarrehue	Puesco
	Sur	13-A	Choshuenco	X	Valdivia	Panguipulli	Puerto Fuy
			Llifén	X	Valdivia	Futroneo	Llifén
ARGENTINA	Sur	13-A	Hua hum				
			Las Lagunas de Epulauquen				
			Quillén				
			Quillén 2				
			Quila Quina				
			Pilolín				
Especie: <i>Nothofagus alpina</i> (raulí)							
CHILE	Centro	3-C	Pichipillahuén	IX	Malleco	Galvarino	Pichipillahuén
	Sur	5-C	Las trancas	X	Valdivia	La Unión	Cam. Trumao-Hueicolla
			Huellusca	X	Osorno	Purranque	Huellusca
	Centro	8-A	Radal 7 Tazas	VII	Curicó	Molina	Radal
			Emb. Bullileo	VII	Linares	Parral	Bullileo
	Centro	9ª	Recinto	VIII	Ñuble	Pinto	Los Lleuques –Atacalco
			Sta. Bárbara	VIII	Bio-Bio	Santa Bárbara	El huachi
			Jauja	IX	Malleco	Collipulli	Jauja
	Sur	11- A	Malalcahuello	IX	Malleco	Curacautín	Malalcahuello
			Curarrehue	IX	Cautín	Curarrehue	Puesco
Sur	13-A	Releco	X	Valdivia	Panguipulli	Releco	

Cuadro 2 - Material vegetal utilizado para los estudios de introgresión genética en roble y raulí, mediante RAPD

Macroclima				
Población				
Centro				
Quepe	427-I		427-IV	427-V
Quepe	428-I	428-III		428-V
Sur				
Cunco	424-I	424-II	424-IV	
L. Colico	438-I	438-II	438-III	438-IV
Cuesta Lastarria	449-I	449-II		
Curarrehue		458-II	458-III	458-V
Llifén		505-II	505-IV	
Llancacura			517-III	517-IV
	525-I	525-II	525-III	525-IV
Rupanco	537-I		537-IV	
Purranque	550-I	550-II		550-V

Ambas condiciones de amplificación terminan con un período de extensión de 72°C por 10 min. y de refrigeración a 4° hasta realizar la electroforesis.

El criterio de selección de la concentración de ADN y condiciones de amplificación a usar en el estudio fueron la nitidez y reproducibilidad de los productos amplificados. Para este análisis se utilizó un termociclador de 96 muestras con tapa calefactora.

Electroforesis

Un total de 12 µl del producto de la amplificación se cargó en geles de agarosa (1,5%; 1X TAE). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 120 volts. En cada gel se incluyó un marcador estándar (Ladder de 123 bp) para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos. Posterior a la electroforesis, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta para su posterior evaluación.

RESULTADOS

Diversidad Genética

De los 40 partidores iniciales, se seleccionaron 20 para realizar el análisis de diversidad genética, basados en la reproducibilidad de los patrones obtenidos y la capacidad de discriminación entre especies y entre los individuos pertenecientes a la misma especie y población.

Los resultados obtenidos muestran la diferente capacidad de detección de poliformismo de algunos partidores (**Figura 1**). De los 20 partidores analizados, 17 detectaron bandas de tamaño específico para cada especie. Se observó además que en menor proporción ambas especies comparten bandas de idéntico tamaño molecular.

En roble el número de bandas amplificadas por partidor fluctuó entre 4 y 12. Para los 340 individuos de esta especie, se obtuvo un total de 158 bandas, de las cuales un 79% fueron polimórficas. Por otro lado, en raulí se obtuvo entre 4 y 14 bandas por partidor. Para los 110 individuos analizados de esta especie se obtuvo un total de 145 bandas, y un 56% de ellas detectaron polimorfismo.

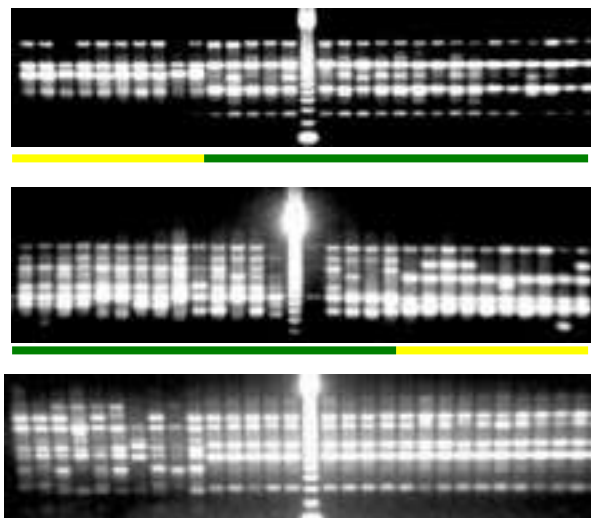


Figura 1. Poliformismo de tres partidores, bandas especie específicas y bandas de idéntico tamaño para roble y raulí

Indices de similitud genética de roble

Cuando el análisis de similitud genética se realizó con todos los individuos de roble, incluyendo la zona macroclimática centro y sur, los valores fluctuaron entre 0.73 y 0.82 y un promedio de 0.79 (**Cuadro 3**). Estos resultados indican que la diversidad genética de la especie es bastante uniforme a través del área de distribución geográfica. Estos niveles de diversidad son similares a los obtenidos en otros estudios realizados con RAPD en especies forestales de polinización cruzada.

Cuando se analizaron los datos de roble, por zona macroclimática (centro y sur) en forma separada, los valores de los coeficientes de similitud fueron similares a los obtenidos en la distribución geográfica total. En la macrozona centro, sólo para una población, Los ruiles, Cauquenes de la VII Región se obtuvo un promedio de 0.90, lo cual indica un menor grado de diversidad entre los individuos colectados en esta población (**Cuadro 4**). El resto de las poblaciones fluctuaron entre 0.72 y 0.88, con un promedio de 0.79. Para la macrozona sur los coeficientes de similitud fluctuaron entre 0.72 y 0.88, con un promedio idéntico a la macrozona centro de 0.79 (**Cuadro 5**).

Cuadro 3 - Índices de similitud de *Nothofagus obliqua* chilenas y argentinas determinados por RAPD. Promedio por población (10 individuos)

Población	Región	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
Los Rulles	VII-Cauquenes	0.8784																																		
Quirihue	VIII-Ñuble	0.78	0.85																																	
Cayumanqui	VIII-Concep.	0.80	0.79	0.88																																
Curanilahue	VIII-Arauco	0.77	0.78	0.79	0.85																															
L. Lanalhue	VIII-Arauco	0.77	0.80	0.80	0.80	0.87																														
Pichipillahuén	IX-Malleco	0.72	0.76	0.76	0.75	0.77	0.86																													
Victoria	IX-Malleco	0.79	0.79	0.80	0.79	0.80	0.75	0.86																												
Vilches	VII-Talca	0.78	0.78	0.79	0.78	0.78	0.73	0.78	0.86																											
Quepe	IX-Cautín	0.78	0.78	0.81	0.78	0.79	0.75	0.80	0.77	0.87																										
Bullileo	VII-Linares	0.75	0.74	0.76	0.75	0.76	0.73	0.76	0.75	0.77	0.86																									
R. N. Ñuble	VIII-Ñuble	0.76	0.77	0.78	0.75	0.75	0.74	0.77	0.75	0.76	0.76	0.83																								
Ralco	VIII-Bío-Bío	0.79	0.81	0.80	0.79	0.80	0.76	0.78	0.79	0.79	0.74	0.77	0.86																							
Recinto	VIII-Ñuble	0.78	0.80	0.81	0.80	0.80	0.77	0.81	0.80	0.79	0.77	0.79	0.80	0.88																						
Santa Bárbara	VIII-Bío-Bío	0.77	0.78	0.79	0.81	0.79	0.74	0.80	0.78	0.79	0.75	0.75	0.78	0.79	0.85																					
Cuesta Lastarria	IX-Cautín	0.78	0.77	0.79	0.79	0.78	0.74	0.81	0.78	0.80	0.76	0.77	0.79	0.80	0.79	0.85																				
Cruces	X-Valdivia	0.79	0.79	0.81	0.79	0.80	0.73	0.79	0.79	0.80	0.76	0.76	0.79	0.79	0.78	0.77	0.88																			
Llanacura	X-Valdivia	0.78	0.80	0.81	0.81	0.81	0.77	0.81	0.78	0.81	0.76	0.78	0.81	0.82	0.81	0.82	0.79	0.88																		
Purranque	X-Osorno	0.76	0.80	0.79	0.78	0.82	0.75	0.78	0.79	0.76	0.75	0.75	0.79	0.79	0.76	0.77	0.79	0.80	0.86																	
Malalhue	IX-Malleco	0.77	0.81	0.80	0.79	0.82	0.76	0.80	0.79	0.79	0.76	0.77	0.79	0.80	0.78	0.79	0.82	0.81	0.84	0.89																
Futrone	X-Valdivia	0.76	0.77	0.79	0.80	0.79	0.76	0.78	0.76	0.79	0.75	0.77	0.78	0.80	0.79	0.79	0.77	0.82	0.76	0.77	0.85															
Rupanco	X-Osorno	0.77	0.80	0.80	0.79	0.81	0.74	0.79	0.79	0.78	0.76	0.75	0.78	0.80	0.77	0.77	0.82	0.80	0.83	0.84	0.77	0.88														
Melipeuco	IX-Cautín	0.77	0.78	0.76	0.77	0.75	0.72	0.74	0.77	0.74	0.71	0.74	0.79	0.77	0.76	0.76	0.76	0.78	0.76	0.76	0.76	0.75	0.85													
L. Galletué	IX-Malleco	0.77	0.79	0.80	0.77	0.78	0.75	0.78	0.79	0.79	0.75	0.76	0.79	0.79	0.78	0.77	0.78	0.80	0.79	0.80	0.77	0.80	0.75	0.86												
Cunco	IX-Cautín	0.78	0.77	0.79	0.79	0.77	0.73	0.80	0.77	0.78	0.75	0.78	0.78	0.80	0.78	0.81	0.78	0.81	0.76	0.78	0.78	0.77	0.75	0.77	0.85											
L. Colico	IX-Cautín	0.79	0.80	0.80	0.79	0.80	0.74	0.80	0.79	0.79	0.77	0.76	0.80	0.80	0.79	0.79	0.80	0.80	0.80	0.81	0.77	0.80	0.76	0.80	0.78	0.87										
Curarrehue	IX-Cautín	0.77	0.77	0.78	0.77	0.78	0.74	0.78	0.77	0.77	0.75	0.77	0.77	0.78	0.78	0.78	0.80	0.78	0.78	0.80	0.77	0.79	0.77	0.77	0.76	0.80	0.86									
Choshuenco	X-Valdivia	0.79	0.78	0.79	0.79	0.79	0.73	0.80	0.78	0.80	0.74	0.76	0.80	0.79	0.80	0.79	0.80	0.81	0.78	0.80	0.79	0.78	0.78	0.78	0.79	0.80	0.78	0.86								
Lifén	X-Valdivia	0.81	0.81	0.80	0.79	0.80	0.75	0.80	0.80	0.79	0.76	0.78	0.82	0.80	0.79	0.80	0.80	0.80	0.81	0.82	0.78	0.79	0.79	0.79	0.80	0.81	0.80	0.81	0.88							
Huahum	Argentina	0.75	0.75	0.77	0.78	0.76	0.73	0.77	0.76	0.76	0.73	0.75	0.77	0.80	0.76	0.79	0.76	0.79	0.75	0.77	0.76	0.77	0.75	0.76	0.78	0.76	0.75	0.76	0.77	0.85						
Las lagunas	Argentina	0.73	0.75	0.75	0.76	0.73	0.73	0.75	0.76	0.75	0.74	0.75	0.75	0.77	0.76	0.76	0.75	0.77	0.72	0.73	0.76	0.74	0.74	0.74	0.76	0.74	0.74	0.74	0.75	0.77	0.82					
Quilén	Argentina	0.77	0.78	0.79	0.80	0.78	0.77	0.80	0.79	0.79	0.76	0.77	0.80	0.82	0.79	0.79	0.79	0.81	0.76	0.77	0.78	0.78	0.76	0.78	0.80	0.78	0.76	0.77	0.78	0.81	0.80	0.89				
Quilén 2	Argentina	0.78	0.80	0.81	0.81	0.79	0.78	0.81	0.80	0.79	0.76	0.77	0.81	0.83	0.80	0.80	0.80	0.82	0.79	0.80	0.78	0.81	0.77	0.79	0.81	0.80	0.77	0.79	0.80	0.82	0.79	0.85	0.89			
Quilaquina	Argentina	0.75	0.77	0.78	0.79	0.77	0.76	0.79	0.78	0.79	0.74	0.75	0.77	0.79	0.79	0.79	0.80	0.76	0.78	0.78	0.78	0.76	0.77	0.79	0.77	0.78	0.78	0.77	0.80	0.78	0.82	0.83	0.85			
Pilolín	Argentina	0.78	0.78	0.79	0.79	0.76	0.76	0.79	0.77	0.79	0.76	0.77	0.79	0.80	0.78	0.79	0.78	0.80	0.76	0.77	0.77	0.78	0.77	0.77	0.79	0.78	0.77	0.78	0.79	0.80	0.78	0.83	0.82	0.80	0.85	

Cuadro 4 - Índices de similitud de *Nothofagus obliqua* chilenas del macroclima centro determinados por RAPD. Promedio por población (10 individuos)

Población	Región	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Los Ruiles	VII-Cauquenes	0.878													
Quirihue	VIII-Ñuble	0.78	0.85												
Cayumanqui	VIII-Concep.	0.80	0.79	0.88											
Curanilahue	VIII-Arauco	0.77	0.78	0.79	0.85										
L. Lanalhue	VIII-Arauco	0.77	0.80	0.80	0.80	0.87									
Pichipillahuén	IX-Malleco	0.72	0.76	0.76	0.75	0.77	0.86								
Victoria	IX-Malleco	0.79	0.79	0.80	0.79	0.80	0.75	0.86							
Vilches	VII-Talca	0.78	0.78	0.79	0.78	0.78	0.73	0.78	0.86						
Quepe	IX-Cautín	0.78	0.78	0.81	0.78	0.79	0.75	0.80	0.77	0.87					
Bullileo	VII-Linares	0.75	0.74	0.76	0.75	0.76	0.73	0.76	0.75	0.77	0.86				
R. N. Ñuble	VIII-Ñuble	0.76	0.77	0.78	0.75	0.75	0.74	0.77	0.75	0.76	0.76	0.83			
Ralco	VIII-Bío-Bío	0.79	0.81	0.80	0.79	0.80	0.76	0.78	0.79	0.79	0.74	0.77	0.86		
Recinto	VIII-Ñuble	0.78	0.80	0.81	0.80	0.80	0.77	0.81	0.80	0.79	0.77	0.79	0.80	0.88	
Santa Bárbara	VIII-Bío-Bío	0.77	0.78	0.79	0.81	0.79	0.74	0.80	0.78	0.79	0.75	0.75	0.78	0.79	0.85

Cuadro 5 - Índices de similitud de *Nothofagus obliqua* chilenas y argentinas determinados por RAPD. Promedio por población (10 individuos)

Población	Región	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Cuesta Lastamía	IX-Cautín	0.85																			
Cruces	X-Valdivia	0.77	0.88																		
Llancacura	X-Valdivia	0.82	0.79	0.88																	
Puranque	X-Osorno	0.77	0.79	0.80	0.86																
Malalcahuello	IX-Malleco	0.79	0.82	0.81	0.84	0.89															
Futroneo	X-Valdivia	0.79	0.77	0.82	0.76	0.77	0.85														
Rupanco	X-Osorno	0.77	0.82	0.80	0.83	0.84	0.77	0.88													
Melipenco	IX-Cautín	0.76	0.76	0.78	0.76	0.76	0.76	0.75	0.85												
L.Galletué	IX-Malleco	0.77	0.78	0.80	0.79	0.80	0.77	0.80	0.75	0.86											
Cunco	IX-Cautín	0.81	0.78	0.81	0.76	0.78	0.78	0.77	0.75	0.77	0.85										
L. Colico	IX-Cautín	0.79	0.80	0.80	0.80	0.81	0.77	0.80	0.76	0.80	0.78	0.87									
Curarehue	IX-Cautín	0.78	0.80	0.78	0.78	0.80	0.77	0.79	0.77	0.77	0.76	0.80	0.86								
Choshuenco	X-Valdivia	0.79	0.80	0.81	0.78	0.80	0.79	0.78	0.78	0.78	0.79	0.80	0.78	0.86							
Llifén	X-Valdivia	0.80	0.80	0.80	0.81	0.82	0.78	0.79	0.79	0.79	0.80	0.81	0.80	0.81	0.88						
Huahum	Argentina	0.79	0.76	0.79	0.75	0.77	0.76	0.77	0.75	0.76	0.78	0.76	0.75	0.76	0.77	0.85					
Las lagunas	Argentina	0.76	0.75	0.77	0.72	0.73	0.76	0.74	0.74	0.74	0.76	0.74	0.74	0.74	0.75	0.77	0.82				
Quillén	Argentina	0.79	0.79	0.81	0.76	0.77	0.78	0.78	0.76	0.78	0.80	0.78	0.76	0.77	0.78	0.81	0.80	0.89			
Quillén 2	Argentina	0.80	0.80	0.82	0.79	0.80	0.78	0.81	0.77	0.79	0.81	0.80	0.77	0.79	0.80	0.82	0.79	0.85	0.89		
Quila Quina	Argentina	0.79	0.79	0.80	0.76	0.78	0.78	0.78	0.76	0.77	0.79	0.77	0.78	0.78	0.77	0.80	0.78	0.82	0.83	0.85	
Pilolín	Argentina	0.79	0.78	0.80	0.76	0.77	0.77	0.78	0.77	0.77	0.79	0.78	0.77	0.78	0.79	0.80	0.78	0.83	0.82	0.80	0.85

Agrupación de poblaciones de roble mediante análisis de RAPD

En el dendrograma generado por los coeficientes de similitud (Fig. no incluida) se apreció una distribución de los individuos, independiente a su origen geográfico. La agrupación de individuos de una misma población, y a una zona climática fue baja. Sin embargo, en el dendrograma que incluyó sólo las poblaciones de la zona macroclima centro, se observó una mayor tendencia a la agrupación de individuos pertenecientes a la misma procedencia (**Fig. 2**). Por ejemplo, Los Ruiles, Recinto, Cayumanqui, Lago Lanalhue, Quepe, Victoria, R. Nac. Ñuble, Bullileo y Pichipillahuén presentaron una mayor tendencia a agrupar los individuos pertenecientes a sus poblaciones.

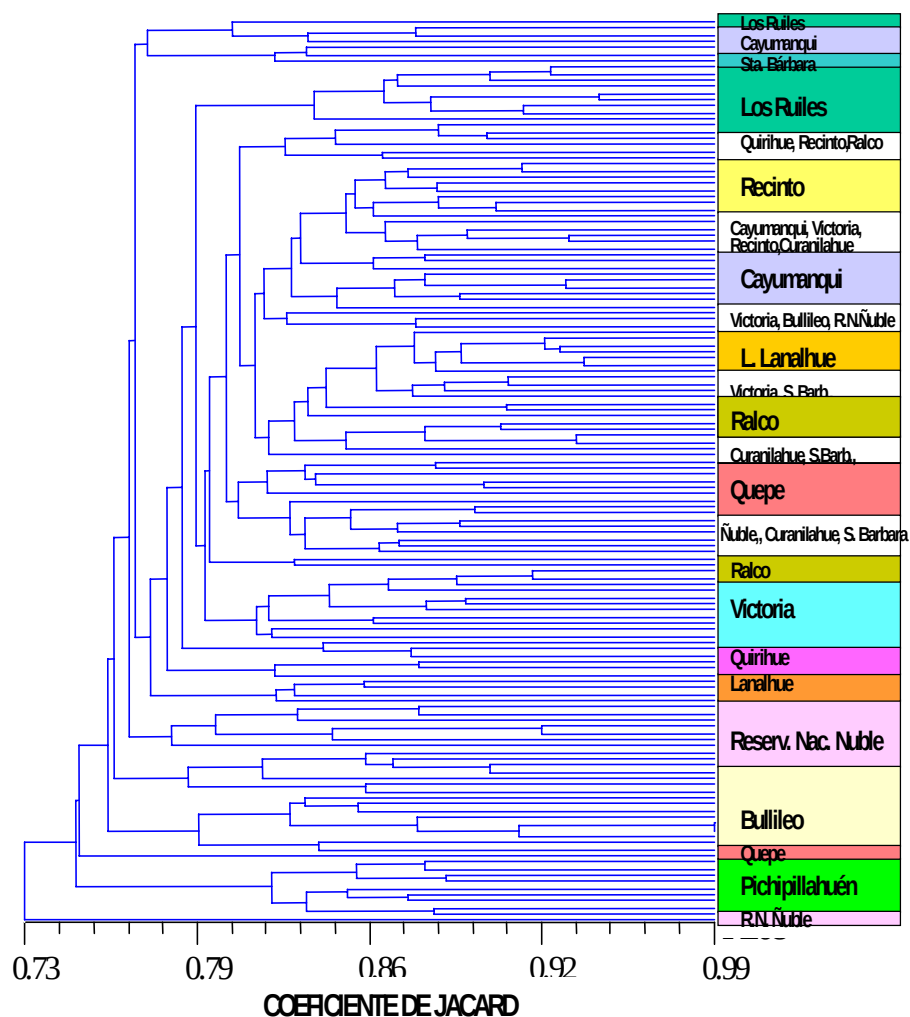
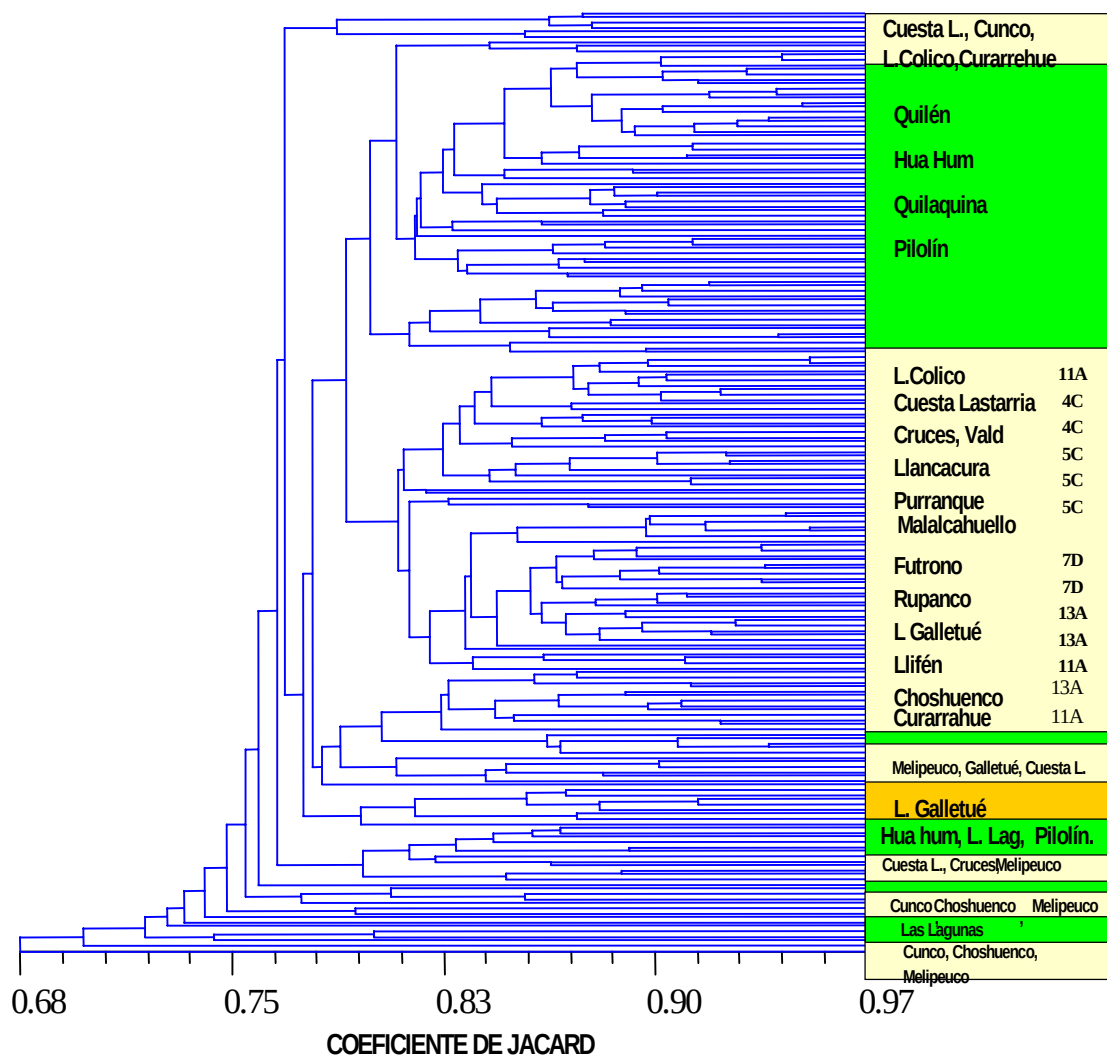


Figura 2 - Dendrograma de poblaciones de roble, pertenecientes al macroclima centro

Cuando el dendrograma incluyó sólo las poblaciones del macroclima sur, se observó una agrupación preferencial de las poblaciones provenientes de Argentina, en la parte superior del dendrograma. Sin embargo el nivel de diversidad genética dentro de este cluster fue similar a las otras agrupaciones formadas por las poblaciones de origen chileno.

Un grupo intermedio estuvo conformado por individuos de origen chileno, se observó algún grado de agrupamiento entre individuos de la misma población (**Fig. 3**). Un tercer grupo en la parte inferior del dendrograma estuvo integrado por roble proveniente de Argentina y en forma integrada se agrupó con roble de origen chileno.

Figura 3 - Dendrograma de poblaciones de roble, de origen chileno y argentino,



Indices de similitud genética de raulí

Cuando el análisis de similitud genética se realizó con todos los individuos de raulí, incluyendo la zona macroclimática centro y sur, los valores fluctuaron entre 0.78 y 0.83 y un promedio de 0.84 (**Cuadro 6**). Estos resultados indican que la diversidad genética de la especie es bastante uniforme a través del área de distribución geográfica. Estos niveles de diversidad son similares a los obtenidos en roble, con los mismos partidores de RAPD. Además están dentro de valores de similitud genética de otras especies de polinización cruzada.

Cuadro 6 - Índices de similitud genética entre poblaciones de *N. alpina* provenientes de las zonas macroclimáticas centro y sur de Chile

Macroárea	Procedencia	Población	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SUR	5C	Las trancas	1.00										
CENTRO	8A	E. Bullileo	0.79	1.00									
CENTRO	9A	Sta Bárbara	0.83	0.82	1.00								
CENTRO	9A	Jauja	0.79	0.83	0.80	1.00							
CENTRO	8A	Radal 7 tazas	0.80	0.80	0.80	0.78	1.00						
SUR	5C	Huellusca	0.80	0.82	0.81	0.79	0.86	1.00					
SUR	11A	Curarrehue	0.78	0.80	0.78	0.79	0.80	0.81	1.00				
SUR	13A	Releco	0.78	0.82	0.77	0.80	0.79	0.80	0.83	1.00			
SUR	11A	Malalcahuello	0.80	0.80	0.79	0.78	0.80	0.81	0.82	0.82	1.00		
CENTRO	3C	Pichipillahuén	0.82	0.80	0.83	0.79	0.81	0.81	0.78	0.80	0.79	1.00	
CENTRO	9A	Recinto	0.81	0.80	0.81	0.78	0.78	0.81	0.82	0.80	0.79	0.79	1.00

Cuando se analizaron los datos de raulí, separadamente para las zonas macroclimáticas centro y sur. Los valores de los coeficientes de similitud obtenidos en la distribución geográfica central fluctuaron entre 0.78 y 0.83, mientras que el promedio fue de 0.86 (**Cuadro 7**). Mientras que en la zona macroclimática sur, los coeficientes de similitud fluctuaron entre 0.78 y 0.83, con un promedio casi idéntico a la macrozona centro de 0.87 (**Cuadro 8**).

Cuadro 7 - Índices de similitud genética entre poblaciones de *N. alpina* provenientes de la zona macroclimática centro de Chile.

Macroárea	Procedencia	Población	1	2	3	4	5	6
CENTRO	9 ^a	Recinto, Ñuble	1.00					
CENTRO	3C	Pichipillahuén, Malleco	0.79	1.00				
CENTRO	8 ^a	Radal 7 tazas, Curicó	0.78	0.81	1.00			
CENTRO	8 ^a	Embalse Bullileo, Linares	0.80	0.80	0.80	1.00		
CENTRO	9 ^a	Santa Bárbara, Los Angeles	0.81	0.83	0.80	0.82	1.00	
CENTRO	9 ^a	Jauja, Malleco	0.78	0.79	0.78	0.83	0.80	1.00

Cuadro 8 - Índices de similitud genética entre poblaciones de *N. alpina* provenientes de la zona macroclimática sur de Chile.

Macroárea	Procedencia	Población	1	2	3	4	5
SUR	5C	Las trancas, Valdivia	1.00				
SUR	5C	Huellusca, Osorno	0.80	1.00			
SUR	11 ^a	Curarrehue, Cautín	0.78	0.81	1.00		
SUR	13 ^a	Releco, Valdivia	0.78	0.80	0.83	1.00	
SUR	11 ^a	Malalcahuello, Malleco	0.80	0.81	0.82	0.82	1.00

Agrupación de poblaciones de raulí mediante análisis de RAPD

En el dendrograma generado por los coeficientes de similitud de raulí provenientes de los macroclimas centro y sur (**Fig. 4**), se apreció una distribución, en los grupos inferiores del dendrograma, dependiente del origen geográfico. El grupo superior incluyó individuos de ambas zonas macroclimáticas.

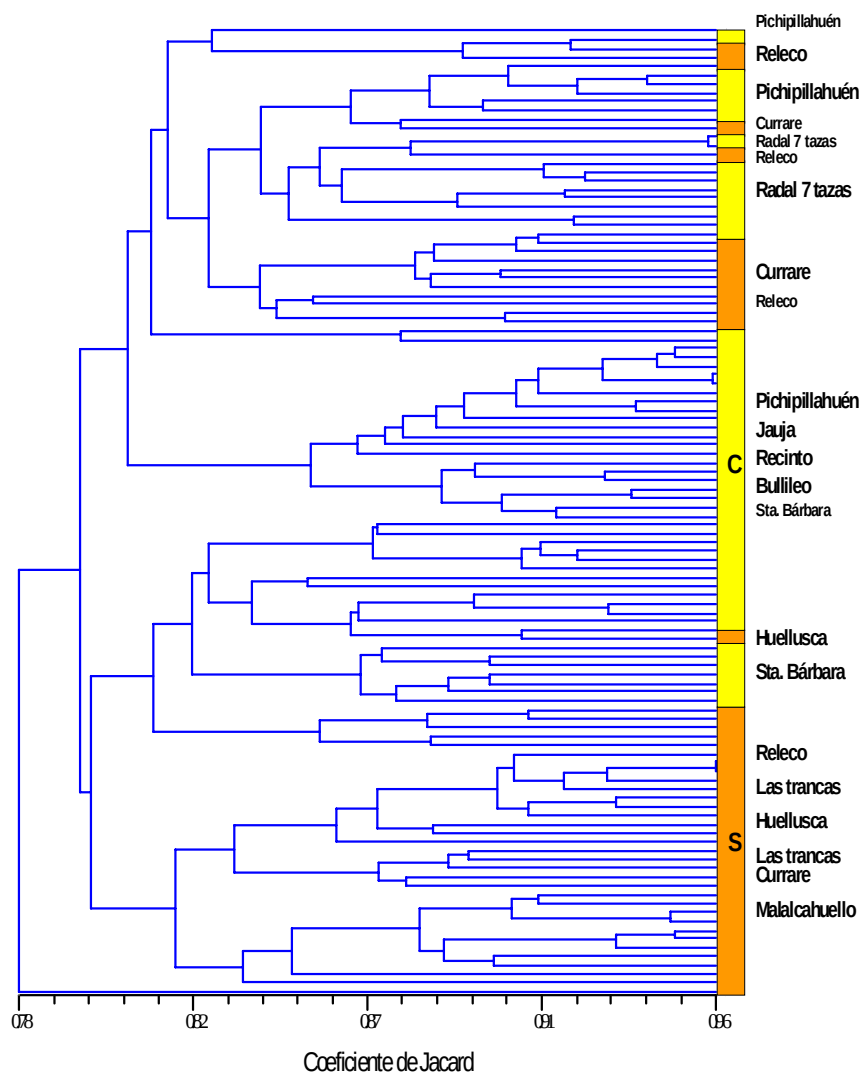


Figura 4 - Dendrograma de poblaciones de raulí chileno perteneciente al macroclima sur

Cuando el análisis de agrupamiento se realizó con los datos generados por las poblaciones de raulí del macroclima central, se observó una fuerte tendencia a que los individuos provenientes de una misma población se agruparan (**Fig. 5**). Por ejemplo, para las poblaciones Radal 7 tazas, los 10 individuos analizados se agruparon en un cluster, en la rama intermedia del dendrograma. Además, las poblaciones (puntos de muestreo) Radal 7 tazas y Embalse Bullileo, Jauja y Recinto, pertenecientes a la misma región de procedencia y zona macroclimática se agruparon en el mismo cluster. Estas procedencias involucran individuos de la región de muestreo andina (A). Pichipillahuén, procedencia de la cordillera de la costa se agrupó con Santa Bárbara de la región andina y situada ambas en la misma latitud.

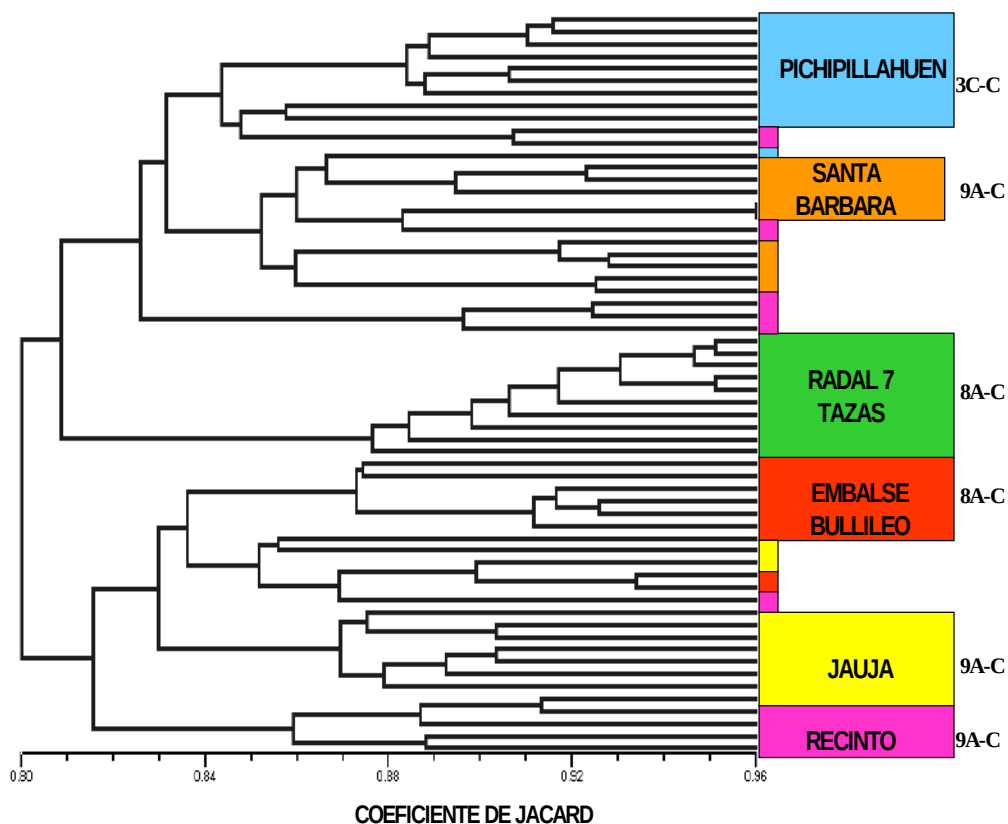


Figura 5 - Dendrograma de poblaciones de raulí chileno perteneciente al macroclima centro

Cuando el análisis de agrupamiento se realizó con los datos generados por las poblaciones de raulí del macroclima sur, se observó también una clara tendencia a que los individuos provenientes de una misma población se agruparan (**Fig. 6**). Por ejemplo, para las poblaciones Las Trancas, Rahue, Malalcahuello y Releco agruparon a la mayoría de los individuos analizados (10). Las otras poblaciones analizadas también agruparon sus individuos, entremezclando robles provenientes de otras poblaciones, ejemplo Curarrehue y Releco.

Se observa además una agrupación entre poblaciones provenientes de regiones geográficas continuas, como son: Curarrehue y Releco, de la región andina, 11A y 15A, respectivamente.

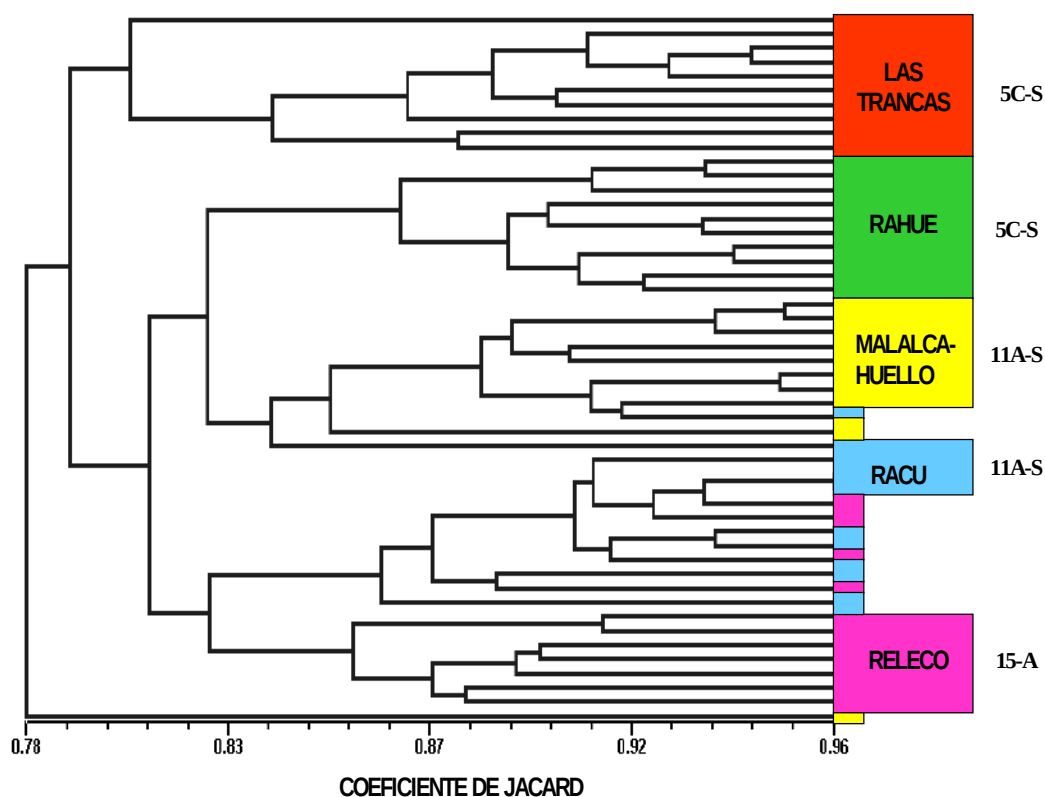


Figura 6 - Dendrograma de poblaciones de raulí chileno perteneciente al macroclima centro

Introgresión

Usando los partidores especie específicos para determinar y/o confirmar la presencia de híbridos naturales entre Roble y raulí, se amplificaron los híbridos colectados del huerto Huillilemu. Existe una alta correlación entre la identificación morfológica y la molecular determinada por los partidores de RAPD usados en este estudio (**Fig. 7**).

A nivel de las procedencias analizadas, se detectó un 66,7% de híbridos, mientras que a nivel de individuos se confirmó en un 34,5%.

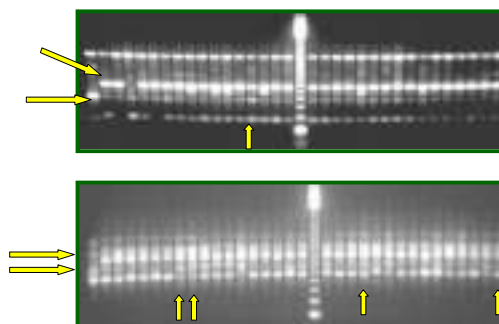


Figura 7 - Determinación de híbridos mediante partidores especie específicos

Uso de PCR-RFLP

El ADN citoplasmático es de herencia materna y ha permitido estudiar la organización genética de centros de diversidad, establecer relaciones entre los genotipos cultivados y sus materiales silvestres ancestrales. La conservación alta que presentan los organelos en la mayoría de los vegetales ha permitido diseñar partidores universales que amplifican regiones no codificadoras y que intercalan dos regiones codificadoras.

Estas regiones pueden ser estudiadas por secuenciación o digestión con un número de enzimas de restricción para determinar el número de polimorfismos (RFLP-PCR). Para estudiar la diversidad de las poblaciones clasificados en base a su fenotipo como híbridos entre roble-raulí, y la dirección de introgresión, se establecieron los parámetros de amplificación (PCR) y de restricción con enzimas de corte frecuente (RFLP). En el proyecto se analizaron 31 individuos provenientes de poblaciones híbridas. Sin embargo no fue posible determinar variabilidad ni dirección de introgresión, debido al monomorfismo presentado en las combinaciones generadas por lo 9 set de partidores y 8 enzimas de restricción utilizadas en el estudio.

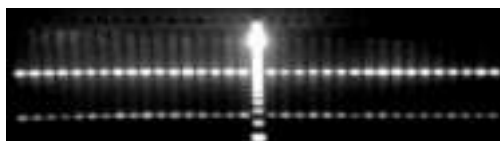


Figura 8 - Patrones monomórficos de PCR-RFLP obtenidos con la combinación del partidador de cloroplasto 4 y *Tha I*

DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DETECTADA CON MARCADORES DE ADN DE CLOROPLASTO

COMPONENTE ARGENTINO

Metodología

La metodología utilizada en las diferentes etapas del Proyecto se halla descripta en forma detallada en las publicaciones científicas, capítulos en libros técnicos y presentaciones a Congresos, resultado del presente estudio (**Anexo 1**).

1. RAULI

En base a un trabajo previo (Marchelli et al., 1998) se analizaron dos regiones polimórficas de ADN de cloroplasto en 20 poblaciones de Argentina y 11 de Chile. De estas poblaciones se analizaron plántulas recién germinadas o yemas. Al no encontrarse variación intrapoblacional en el trabajo previo, la muestra se estableció entre dos y cuatro individuos por población, en función de lo establecido por Pons & Petit (1995). Las combinaciones de primer/enzima que detectaron variación y fueron utilizadas son: DT/*TaqI* y FV/*TaqI* (**Fig. 1.1**).

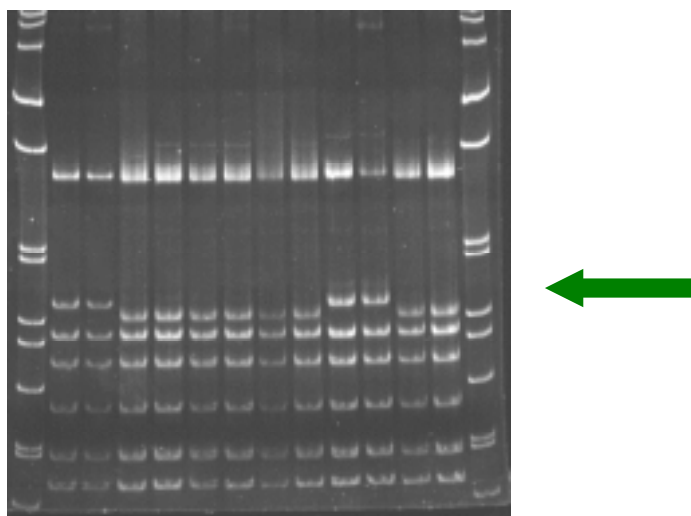


Figura 1.1 - Ejemplo de polimorfismo encontrado con el primer FV y la enzima *TaqI*

Se detectaron en total cinco haplotipos entre las poblaciones Argentinas y Chilenas (**Cuadro 1.1**). La distribución geográfica de los haplotipos presentó una marcada estructuración, separando aquellas poblaciones de la Cordillera de la Costa de las situadas en la Cordillera de los Andes. A su vez, entre las poblaciones de cada Cordillera se evidenció una diferenciación a nivel latitudinal (**Fig. 1.2**). Estos resultados sugieren la existencia de múltiples refugios para la especie durante las últimas glaciaciones. Por otro lado, la separación de la Costa y los Andes apoya la permanencia de la especie en refugios andinos, ubicados tanto en la ladera Este como en la Oeste.

Cuadro 1.1 - Descripción de los cinco haplotipos detectados en *Nothofagus nervosa* y poblaciones en los cuales se encontraron. Los fragmentos polimórficos se marcaron en orden decreciente de peso molecular.

Haplotipo	FV/TaqI	DT/TaqI	Poblaciones
I	3	2	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 Andes Sur
II	4	3	16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 Andes Norte
III	1	2	21 Andes Centro (Neltume)
IV	2	1	29 Costa Sur (Chol Chol)
V	4	2	30 Costa Norte (Nahuelbuta)

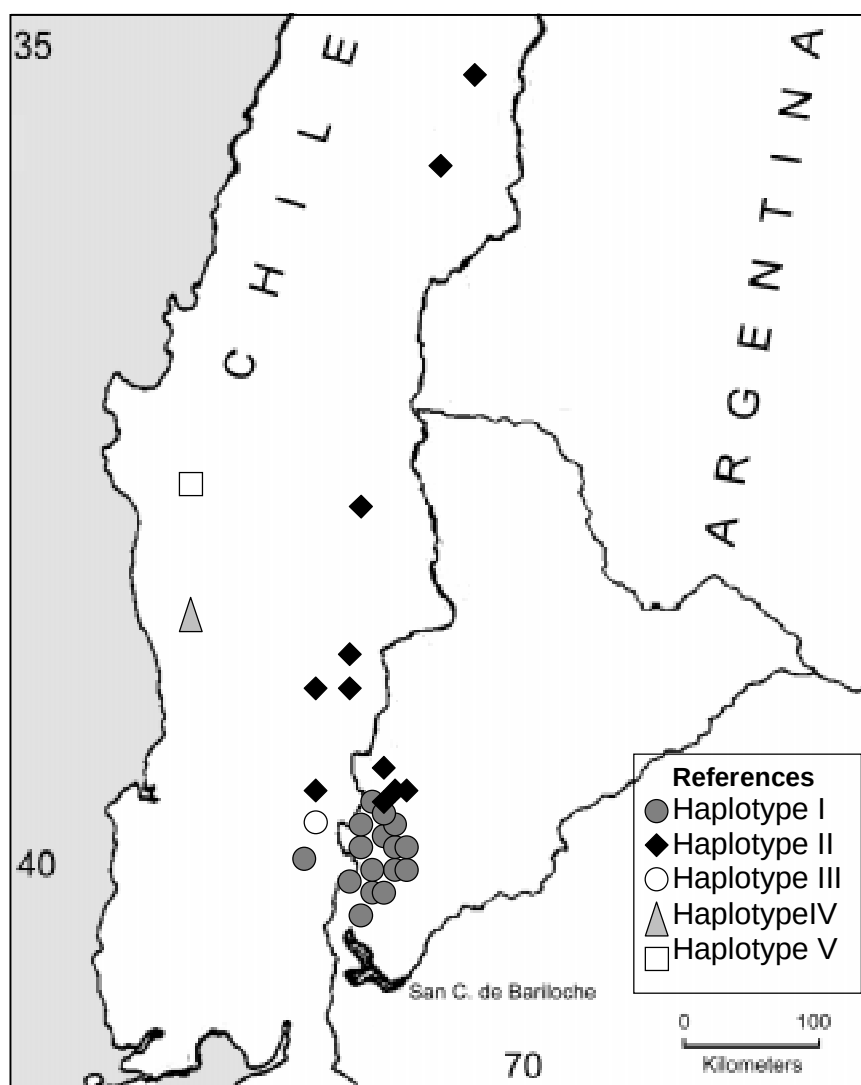


Figura 1.2 - Distribución geográfica de los haplotipos encontrados en poblaciones argentinas y chilenas de *Nothofagus nervosa*.

2. ROBLE

Para el estudio a través de cpADN se utilizó tejido foliar de plántulas obtenidas en vivero (invernáculo y cantero) para este fin. Para este análisis se evaluaron 10 individuos en dos poblaciones con el objetivo de verificar la posible existencia de variación intrapoblacional. Debido a que se comprobó la ausencia de variación intrapoblacional, el tamaño muestral se redujo a 5 individuos para el resto de las poblaciones (*ej. MÁTYÁS and SPERISEN, 2001*). Para este análisis se aplicó el método conocido como PCR-RFLP o CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) que consiste en la digestión del producto de amplificación con enzimas específicas de restricción para luego visualizarlo en gel de acrilamida con tinción con bromuro de etidio (*CERVERA et al., 2000*). El método, que cuenta con la ventaja de no demandar del previo conocimiento de la secuencia del ADN de la especie bajo estudio, utiliza primers universales. En este caso, se utiliza un set de primers desarrollado para la amplificación de regiones no codificantes de ADN de cloroplasto en plantas (*TABERLET et al., 1991; DEMESURE et al., 1995; DUMOLIN-LÁPEGUE et al., 1997*). Este análisis permitió realizar una diferenciación genética en las poblaciones analizadas a partir de haplotipos, que posibilita la inferencia de localización de posibles refugios glaciarios y reconstrucción de rutas migratorias de la especie luego de la retracción de los hielos.

Los resultados hallados a partir de este estudio se detallan en el **Cuadro 2.1**, en donde el número corresponde al nombre con el que se identificaron las bandas sobre el gel de acrilamida.

Tabla 2.1 - Haplotipos por población para las tres combinaciones primer/enzima

POBLACIÓN	Haplotipo		
	DT/Taq I	DT/HaeIII	FV/TaqI
Las Lagunas 13	2	2	
Quillén 6	3	1	4
Quillén 7	3	1	
Quillén 8	3	1	
Ñorquingo 9	3	1	
Ñorquingo 10	3	1	
Ñorquingo 11	3		
Pilolil 12	3	1	4
Lácar Yuco 2	2		
Lácar Nonthué 3	2	2	
Lácar Hua Hum 4	2	2	
Lácar Pío Protto 5	2	2	
Lácar Quila Quina 14	2	2	2
2 C (Cord. Costa)	3		
3 C (Cord. Costa)	3	1	
4 C (Cord. Costa)	3		
6 D (Valle Long.)	3	1	
8 A (Cord. Andes)	2		
9 A (Cord. Andes)	2		
11 A (Cord. Andes)	2	2	
13 A (Cord. Andes)	2		

En el **Cuadro 2.2** se resumen a nivel de cuenca (poblaciones argentinas) y región (poblaciones chilenas), los haplotipos encontrados.

Cuadro 2.2 - Haplotipos poblaciones *Nothofagus obliqua* por cuenca/región

Cuenca/Región	DT/TaqI	DT/HaeIII	FV/TaqI
EPULAFQUEN	2	2	
ÑORQUINCO	3	1	
PILOLIL	3		4
QUILLÉN	3	1	4
LÁCAR	2	2	2
CORD. COSTA	3	1	
VALLE MEDIO	3	1	
CORD. ANDES (Chile)	2	2	

Tanto las poblaciones de distribución argentina, como las de distribución chilena, presentaron, para las combinaciones primer/enzima DT/TaqI, DT/HaeIII y FV/TaqI, los mismos haplotipos descritos por Marchelli *et al.* (1998) para *Nothofagus nervosa*. Las poblaciones argentinas de la especie, al igual que las de *Nothofagus nervosa* mostraron un patrón de distribución latitudinal respecto al Volcán Lanín, excepto para Lagunas de Epulafquen. Las poblaciones chilenas presentaron un patrón de tipo longitudinal, asociado a la región geográfica de localización de las poblaciones. El análisis de las poblaciones en su conjunto a partir de los resultados hallados hasta el presente permitió observar que tanto las poblaciones chilenas de la Cordillera de los Andes (norte, centro y sur), como las de distribución sur en Argentina, presentaron el haplotipo que Marchelli nombra como sur en su estudio. Por otro lado, las poblaciones de la Cordillera de la Costa y Valle Longitudinal comparten haplotipo con las poblaciones de distribución norte en Argentina, excepción hecha para población Epulafquen. Estos resultados, con haplotipos compartidos por las distribuciones en cada país nos permiten inferir posibles refugios glaciares comunes, principalmente en lo que se refiere al haplotipo sur. Las poblaciones norte de Argentina pudieron haberse originado a partir de refugios de localización este, debido a la gran distancia respecto al Valle Medio y Cordillera de la Costa, junto a los resultados arrojados por el presente estudio a nivel isoenzimático. La **Figura 2.1** muestra en forma esquemática a distribución geográfica de los haplotipos hallados en las poblaciones analizadas.

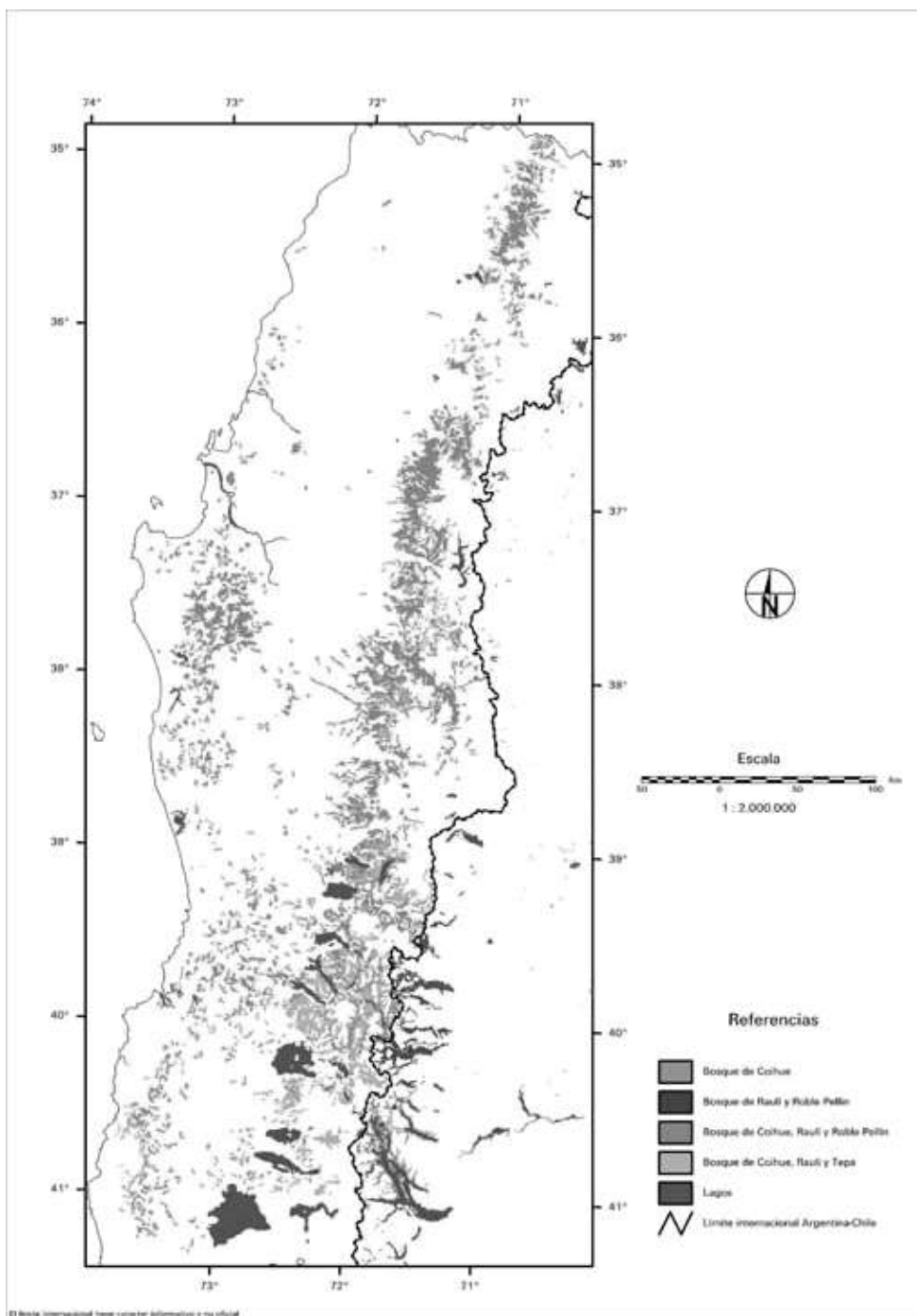


Figura 2.1 - Mapa distribución haplotipos *Nothofagus*

Referencias

Distribución haplotipos poblaciones *Nothofagus obliqua* combinación Primer-Enzima DT/TaqI
 banda 2: amarillo
 banda 3: marrón

CONSERVACIÓN DE SEMILLA DE MEDIOS HERMANOS Y ESTABLECIMIENTO DE ENSAYOS DE PROGENIE

INTRODUCCION

La diversidad genética es la piedra angular para la selección y el mejoramiento futuros y es, a la vez, fundamental para permitir a los árboles adaptarse a cambios climáticos o a nuevas plagas. Los productos aportados por los árboles apoyan la calidad de vida de millones de personas, por lo cual estos recursos genéticos deben ser reconocidos como un recurso natural que requiere ser conservado.

El método natural de conservación es el manejo sostenible de los bosques, en aquellos casos en que aún no han sido objeto de erosión genética. Como lo anterior no es la norma, ya que una gran parte de los bosques naturales se encuentran en estado avanzado de degradación, es necesario recurrir a medidas especiales de conservación. La aproximación preferida para la conservación de recursos genéticos forestales es, normalmente, mantener el pool genético en rodales vivientes, de modo que ellas puedan responder a cambios climáticos o del ambiente, en general, prosiguiendo el proceso evolutivo; lo anterior, en sus ecosistemas naturales, lo que constituye la conservación *in situ*.

Lamentablemente, no siempre es posible aplicar el método anterior. En muchos casos, las poblaciones naturales están bajo presión y existen probabilidades de que desaparezcan, debido a acciones antrópicas, preferentemente. En situaciones de alto riesgo para las poblaciones naturales, es preciso recurrir a la estrategia *ex situ*; dentro de esta opción, la mejor alternativa sería la realización de plantaciones a escala operacional, lo cual pondría a las especies así utilizadas en resguardo frente a una probable extinción. Pero no todas las especies suelen ser plantadas masivamente, ya que algunas sólo tienen valor de opción; por lo tanto, como una respuesta a este problema, que es de carácter mundial, se han desarrollado algunas estrategias, entre las cuales la conservación de germoplasma y el establecimiento de procedencias y/o progenies aparecen como las más probables de ser ejecutadas en Chile.

La conservación de germoplasma corresponde a preservación genética, en que se toman medidas anticipadamente, poniendo el recurso a cubierto de daño o peligro; en esta situación, no opera la evolución, por lo cual se acepta que no es un método muy apropiado para las especies forestales. Es por ello que no se ha empleado masivamente, aunque deberían hacerse esfuerzos a partir de ahora, en que se cuenta con predictores de longevidad para tales especies. Roble y raulí son especies de semillas ortodoxas que pueden secarse hasta contenidos de humedad tan bajos como 6% y almacenarse a –18°C por varias décadas en envases sellados. Ensayos realizados en Inglaterra (Gosling, com. pers.) indican que raulí, a 6% de contenido de humedad, almacenado a 2°C ha mantenido inalterable su viabilidad por 17 años. En el caso de roble, con 8,7% de contenido de humedad y almacenado a 2°C, han logrado el mismo nivel de éxito que en raulí, en un horizonte de 12 años.

Sin duda que el método más aconsejable en el caso de especies forestales es el establecimiento de unidades *ex situ*, entre las cuales los ensayos de progenies aparecen como las más importantes por la variada aplicación que ellos tienen. En efecto, al igual que en todos los cultivos, en especies forestales como roble y raulí el objetivo principal de estos ensayos es la determinación de parámetros genético-estadísticos como la heredabilidad y las aptitudes combinatorias, a la vez que permiten la selección genética “hacia atrás” y “hacia delante”, al ser considerados como poblaciones base en un

programa de mejoramiento genético. Pero, en el presente, tal vez un rol tan importante como el anterior, sea el de la conservación del material establecido, sobre todo si se realizan a partir de bases genéticas adecuadas, como un número mínimo de progenitores representados, una cantidad de medios hermanos que garantice selecciones futuras, y tal vez lo más importante, que se establezcan sobre diferentes tipos de condiciones ambientales emulando el sistema de mejora basado en poblaciones múltiples. En el caso de Chile, el esfuerzo más notable en esta área, antes del Proyecto FONTAGRO, es el ensayo de progenies de 27 medios hermanos de raulí, establecido al amparo del Proyecto FONDEF “Mejoramiento Genético para Especies de *Nothofagus* de Interés Económico”. Cada una de estas 27 madres está representada por 30 hijos (medios hermanos entre sí), en un diseño de bloques completos al azar, utilizando parcela de árbol individual, con 30 repeticiones.

Objetivos

1. Constituir una población base con estructura familiar conocida para efectuar las selecciones que darán origen a la siguiente generación de mejoramiento
2. Entregar información respecto al comportamiento diferencial que exhiban las distintas procedencias y progenies consideradas en la evaluación
3. Permitir la evaluación de parámetros genéticos que orienten la estrategia de mejoramiento genético de largo plazo
4. Entregar información del desempeño en terreno del material ensayado, el cual combinado con la información que se obtenga por los análisis moleculares permitirá una definición mas depurada de las regiones de procedencia y contribuir a un adecuado ordenamiento territorial y genético de este recurso en Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

La semilla de las poblaciones de roble y raulí fueron colectadas en las 14 zonas de procedencia de roble y en las siete zonas de procedencia de raulí. Esta actividad se realizó durante tres temporadas debido al añerismo y a la baja calidad de la semilla colectada, principalmente por problema de daño de insectos y bajo poder de germinación. La semilla colectada durante la temporada 1998/1999 y 1999/2000 fue destinada complemente a producir plantas para los ensayos de progenies y la semilla colectada el año 2002/2003 se almacenará en una cámara de frío para su conservación. En el año 2002/2003 se colectó semilla de una población por región de procedencia en roble (**Cuadro 1**) y raulí (**Cuadro 2**)

Cuadro 1 - Región de procedencia, población, número de árboles y semilla (g) por año de colecta de roble en Chile.

REGIÓN	Punto o población	1998/1999		1999/2000	
		N° árboles	Semilla (g)	N° árboles	Semilla (g)
1-C	1. Til-Til	10	320	7	771
	2. Lampa	0	0	10	565
	3. Alhue	7	22,5	7	629
2-C	4. Alto colorado	7	54	7	508
	5. R. N. Los Ruiles	10	118	7	542
	6.1 Ninhue	10	633	-	-
	6.2 Quirihue	11	446	-	-
3-C	7. Cayumanqui	10	195	7	212
	8. Curanilahue	10	167	7	316
	9. L. Lanalhue	10	264	-	-
	10. Pichipillahuén	10	482	-	-
4-C	11. Cuesta Lastarria	10	214	-	-
	12. Cruces	11	1552	-	-
5-C	13. Llancacura	10	1386	-	-
	14. Rio negro	10	3264	-	-
	15. Purranque	10	2708	-	-
6-D	16. Victoria	10	456	-	-
	17. Quepe	10	467	-	-
7-D	18. Malalhue	4	250	-	-
	19. Futrono	10	1130	-	-
	20. Rupanco	10	790	-	-
8-A	21. Sierras de Bellavista	7	78	7	1015
	22. Alto Lircay	10	116	6	292
	23. Altos de Vilches	10	167	-	-
	24. Vilches	10	142	1	45
	25. Bullileo	10	81	7	568
9-A	26. R. Nac. Ñuble	10	565	-	-
	27. Ralco	10	168	3	372
	28. Recinto	10	497	-	-
	29. Sta. Bárbara	10	517	-	-
10-A	30. Loncopué, Arg.	0	0	-	-
11-A	31. L. Galletue	9	116	-	-
	32. Cunco	10	473	-	-
	33. L. Colico	10	188	-	-
	34. Curarrehue	10	344	-	-
12-A	35. Paso Pino Hachado, Arg	0	0	-	-
	36. Aluminé, Arg.	0	0	-	-
13-A	37. Choshuenco	10	605	-	-
	38. Llifén	10	331	-	-
14-A	39. Lago Lacar, Arg.	0	0	-	-
	TOTAL	336	19.306	83	6.337

Cuadro 2 - Región de procedencia, población, número de árboles y semilla (g) por año de colecta de raulí en Chile

REGIÓN	Punto	1998/1999		1999/2000	
		N° árboles	Semilla (g)	N° árboles	Semilla (g)
3-C	1. Quebrada Bellavista	0	0		
	2. Cord. Nahuelbuta	10	107	7	149
	3. Pichipillahuén	10	130	2	102
5-C	4. Las trancas	10	287		
	5. Huellusca	10	244		
8-A	6. Radal 7 Tazas	10	115	2	98
	7. Vilches	10	63	1	78
	8. Emb. Bullileo	10	85		
9-A	9. Recinto	10	183		
	10. Sta. Bárbara	10	142	3	144
	11. Jauja	10	150	2	139
11-A	12. Malalcahuello	10	49	7	78
	13. Melipeuco	10	80	10	274
	14. Curarrehue	10	145		
13- A	15. Releco	10	213	2	133
	16. Neltume	1	35	9	143
	17. Arquihue	0	0	2	44
14-A	18. Lago Lacar, Arg.	0	0		
	TOTAL	131	2028	47	1.372

Las actividades de viverización, tratamientos germinativos, siembra y cuidados culturales de las plantas producidas bajo condiciones de invernadero, se desarrollaron bajo la metodología definida y aplicada por la Empresa Forestal Agrícola Monteágula S.A., en las especies de roble y raulí.

La época de siembra fue durante el mes de Septiembre del año 1999, para de esta forma obtener plantas a finales de Junio del año 2000, con un tamaño variable entre 35 y 60 cm. de altura, y un diámetro de cuello entre 4 y 8 mm. Debido a la gran cantidad de familias y progenies la siembra comenzó en la segunda semana de Septiembre de 1999, extendiéndose hasta la tercera semana de Octubre.

Con este material se establecieron cinco ensayos de raulí y tres de roble. Estos ensayos se establecieron en el patrimonio de Empresas forestales y en áreas administradas por la Corporación Nacional Forestal. En su instalación se utilizaron las técnicas silvícolas recomendadas en un diseño experimental de Bloques Completos al Azar, con parcelas de una planta (Single tree plot) y plantaciones en fajas para efectos de protección lateral. En el establecimiento de los ensayos participaron investigadores del INFOR, y la Universidad Austral de Chile con la colaboración de CONAF, y las Empresas Agrícola y Forestal Taquihue Ltda, Forestal Neltume Carranco S.A, JCE Chile S.A.; y COFOMAP dirigidos por el Dr. Roberto Ipinza.

RESULTADOS

Los ensayos de progenie de roble y raulí fueron ubicados en las regiones VIII y X (**Cuadro 3**).

Cuadro 3 - Ubicación geográfica de los ensayos de progenie de roble y raulí con la semilla colectada con financiamiento del proyecto

Especie	Predio	Empresa	Región	Provincia	Comuna
Roble	Remeco	For. Neltume Carranco S:A	X	Valdivia	Panguipulli
	Pumillahue	CONAF	X	Valdivia	Lanco
	Arquihue	Agrícola y Forestal Taquihue Ltda.	X	Valdivia	Futrono
Raulí	El Morro	JCE Chile Ltda	VIII	BioBio	Mulchén
	Remeco	For. Neltume Carranco S:A	X	Valdivia	Panguipulli
	Pilmaiquen	COFOMAP	X	Valdivia	Panguipulli
	Huillilemu	CONAF	X	Valdivia	Mariquina
	Arquihue	Agrícola y Forestal Taquihue Ltda.	X	Valdivia	Futrono

CONCLUSIONES

1. El proyecto proporcionó la semilla colectada en los años 1998/1999 y 1999/2000 para producir varios cientos de plantas, las que fueron empleadas para la plantación de diferentes ensayos de procedencia.
2. El financiamiento de las plantaciones fue obtenido de empresas públicas y privadas.
3. Se espera en el futuro utilizar este material genético para continuar con los estudios moleculares sobre diversidad genética de estas especies y su posible uso en mejoramiento genético.
4. La semilla colectada durante la temporada 2002/2003 se mantendrá en cámara fría con propósitos de conservación de estas especies. La colecta en esta temporada incluyó a una 11 poblaciones de roble y a seis procedencias de raulí. En el futuro se pretende aumentar el número de poblaciones bajo estas condiciones.

COMPONENTE ARGENTINO: BANCO DE SEMILLAS

RAULI

Previamente al inicio del proyecto se contaba con semilla proveniente de 29 poblaciones del área de distribución en Argentina. Durante el período de ejecución del proyecto se siguió recolectando en tres poblaciones. También se recolectaron semillas de árboles individuales pertenecientes a las zonas de Tromen (25 árboles), Lácar (20 árboles) y Bahía Azul (25 árboles).

Parte de la semilla se utilizó en los análisis de laboratorio, parte se sembró y parte se guardó en freezer a -20 °C como banco seminal. Las plantas obtenidas se instalaron en ensayos de progenies y procedencias, lo cual también representa un banco genético y posibilita estudios a futuro. Se cuenta con un total de cuatro ensayos, dos ubicados dentro del área natural de distribución del Raulí (Pucará, Yuco Alto) y dos por fuera de esta distribución, en el Campo Forestal del INTA en Trevelin y en propiedad privada próxima al Lago Meliquina.

Los **Cuadros 1 y 2** muestran la cantidad de semilla almacenada en freezer.

Cuadro 1 - Cantidad de semillas de poblaciones de Raulí almacenada en freezer

Población	Cantidad de semillas (g)
4	809
5	593
6	1652
16	1605
20	1029
21	1385
23	2360
24	951
26	685
27	1401
28	884
29	273
30	64
TOTAL	13.691

Cuadro 2 - Cantidad de semillas de individuos de Raulí pertenecientes a dos poblaciones almacenada en freezer

Individuo	Cantidad
T3	53
T8	14
T12	22
T13	14
T14	21
T16	68
T17	18
T18	40
T19	26
T21	45
T22	16
T26	31
T29	61
BA1	11
BA2	16
BA4	15
BA5	62
BA6	54
BA7	68
BA8	38
BA9	64
BA10	20
BA11	61
BA12	22
BA13	23
BA14	68
BA15	19
BA16	69
BA17	29
BA18	73
BA19	33
BA20	34
BA21	46
BA22	27
BA23	34
BA24	6
TOTAL	1.354

ROBLE

Se llevaron a cabo 3 cosechas sucesivas (años 2000, 2001, 2002) a lo largo de la duración del Proyecto en las 14 poblaciones de *Nothofagus obliqua* Roble Pellín, de distribución en Argentina. La metodología consistió en la colocación de redes a 1,5 m del suelo antes de la caída de los frutos (meses enero - febrero). Se colocaron 10 redes por población, y estimando un aporte por red de 5-6 árboles, se infiere que 50-60 árboles contribuyen en la producción por rodal. Los datos de cantidad de semilla en gramos por población, correspondientes a los años de cosecha 2000, 2001 y 2002 se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3 - Registro de semilla *Nothofagus obliqua* almacenada

Población	Semilla (g)
Bandurrias 1	2,00
Yuco 2	4618,81
Nonthué 3	688,86
Hua Hum 4	1595,78
Pío Protto 5	1287,46
Quillén 6 - Casa Guardaparque	248,93
Quillén 7 - Corral de Bueyes	61,17
Quillén 8 - Fonndo del Lago	58,15
Ñorquinco 9 - Pulmarí	246,82
Ñorquinco 10 - Oeste Secc.	199,56
Ñorquinco 11 - Chumpiru	91,91
Pilolil 12	1645,23
Las Lagunas 13	16
Quila Quina 14	97,46
TOTAL	10.858,14

El Banco de Semillas también incluye semilla de medio hermanos (semifratrias) de 38 árboles madre, pertenecientes a las poblaciones Quila Quina (cuenca Lago Lácar) y Pilolil (cuenca Río Aluminé). Parte de esta semilla fue utilizada en el análisis de control genético donde se confirmó el modo de herencia de los loci isoenzimáticos hallados y la relación inequívoca entre fenotipo y genotipo. La semilla correspondiente tanto a poblaciones como a familias de medio hermanos se conserva en cámara de frío (4°C), limpia y en envases plásticos para su utilización en el futuro. Como parte de la estrategia y política de trabajo de la Unidad de Genética Forestal de EEA, INTA Bariloche, se cuenta en vivero con dos ensayos de Progenie: Las Lagunas de Epulafquen, con 25 familias representadas y Quila Quina con 12 familias (tamaño de parcela: 20 individuos). Ambos ensayos se localizan en las instalaciones del vivero de la EEA, en cantero, dispuestos con un diseño de bloques al azar, que será mantenido cuando sean llevados a campo.

DESARROLLO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS

En INTA Bariloche durante los meses de abril y mayo de 2003 se llevó a cabo un intercambio científico en el marco del Convenio INRA - INTA, en el Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, Cestas, INRA. El objetivo de la estadía consistió en la identificación de SSRs polimórficos en *Nothofagus* a partir de una nueva batería de primers desarrollado para el género y primers desarrollados para *Quercus*, género emparentado. Se probaron 16 nuevos primers desarrollados para el género y 12 desarrollados para *Quercus robur* roble europeo por el Dr. Caron (sin publicar) y 6 desarrollados para *Quercus robur* (Kampfer *et al.*, 1998) y *Quercus petraea* (Steinkellner *et al.*, 1997) con técnica de gel de acrilamida con tinción con nitrato de plata; 16 SSRs marcados desarrollados para *Quercus rubra* Roble americano (Aldrich *et al.*, 2002) fueron analizados en secuenciador automático (DNA Sequencer, Model 4000). De los 50 SSRs probados, 8 resultaron polimórficos y se caracterizaron a través de los parámetros número de alelos y heterocigosis observada. Se realizó el control genético de 5 de los primers, confirmando de esta manera su modo de herencia codominante.

Investigación adicional o complementaria

- Los microsatélites son marcadores de gran utilidad para estudios de paternidad y flujo génico, debido a sus características de hipervariables y codominantes. De esta manera, posibilitarán el estudio de flujo génico en las poblaciones argentinas de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus nervosa* necesario para entender la estructura genética hallada a nivel de cuenca en este Proyecto, y que fue uno de los estímulos para la concreción del trabajo en Francia. Asimismo, posibilitarán la continuación de los estudios de hibridación interespecífica Roble - Raulí y su modelización, que se están llevando a cabo en nuestra Unidad de Genética Forestal del INTA EEA Bariloche.
- Sería muy importante ampliar el muestreo de las poblaciones chilenas para completar el análisis de la variación genética en cpDNA.
- En INIA Quilamapu, se utilizó la técnica de PCR-RFLP en forma adicional para la determinación de híbridos y la dirección de introgresión. Sería importante continuar con el uso de esta técnica ampliándola hacia el uso de marcadores de mitocondria y aumentando el número de enzimas de restricción (ver informe N°3).

En INIA Quilamapu, se estandarizó el uso de SSR en algunos materiales de roble y raulí chilenos. Con esta tecnología se estudió la transferibilidad y estabilidad de amplificación de 6 marcadores de *Quercus*. Los resultados preliminares indicaron la posibilidad de usar algunos de estos marcadores en estudios de variabilidad genética de *Nothofagus* (Ver informe N°3).

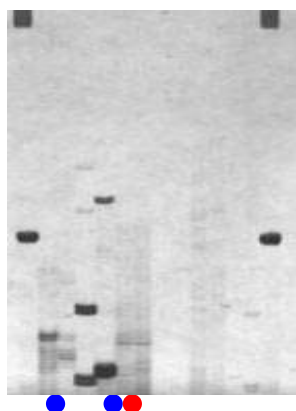


Figura 1. Amplificación de SSR provenientes de *Quercus* en roble (●) y raulí (●).

Estándar de
100 bp

IMPACTOS ESPERADOS

- **Manejo silvícola**

Actualmente, y a partir del presente trabajo se cuenta con las primeras herramientas necesarias para llevar a cabo un Programa de Conservación y Manejo de los bosques de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus nervosa* de Argentina y Chile, según criterios genéticos. Los conocimientos generados constituyen la base sobre la cual formular prescripciones de índole silvícola y de conservación, tan necesarias para la región. Por otro lado, también se cuenta ahora con elementos básicos sobre la influencia que podría tener el manejo silvícola en la dinámica poblacional. El caso concreto de la hibridación entre ambas especies es un punto muy importante a tener en cuenta al momento de manejar un bosque mixto. La alteración en la proporción de ambas especies favorece la hibridación, lo cual llevaría a una disminución en la capacidad reproductiva y de supervivencia de la población. Asimismo, la diferenciación entre poblaciones ubicadas dentro de una misma cuenca lacustre sugiere un flujo génico no muy extensivo que también debe ser tenido en cuenta al momento de diseñar un plan de manejo.

- **Conservación de los Recursos Genéticos Forestales**

Cambio de estatus dentro de una zona del Parque Nacional Lanín

La zona del Lago Lácar (Zona de Reserva de Raulí y Roble Pellín), Argentina, se encuentra actualmente bajo manejo silvícola. La gran diversidad y diferenciación genéticas con la presencia de alelos raros y exclusivos en la población Hua Hum, al Oeste de la cabecera del Lago Lácar llevaron a presentar un pedido de cambio de estatus de esta región ante la Administración de Parques Nacionales. Dicho pedido se encuentra actualmente en gestión en dicha institución suspendiéndose de hecho hasta la correspondiente resolución toda intervención silvícola en el área mencionada.

- **Fortalecimiento de las relaciones interinstitucionales**

En Argentina, el presente proyecto permitió fortalecer las relaciones inter-institucionales entre el INTA y la APN (Administración de Parques Nacionales), dado que se trabajó en conjunto con el Departamento de Silvicultura de dicha institución para la selección de las poblaciones y las tareas de recolección de semillas. En estas últimas tareas vale la pena destacar el trabajo realizado por el Cuerpo de Guardaparques de los Parques Nacionales Lanín y Nahuel Huapi.

En Chile, el proyecto fue un excelente mecanismo para lograr un mayor acercamiento con la empresa privada y con instituciones del sector público forestal como son CONAF, INFOR y Universitario (CEFOR). En este contexto el trabajo realizado con INTA, Bariloche fue también muy productivo.

- **Valorización del recurso forestal nativo**

Se logró una mayor valorización del recurso genético forestal nativo por parte de productores privados quienes se interesaron en la plantación de Raulí y Roble Pellín en sus propiedades.

En Chile, producto del acercamiento producido entre la empresa pública y privada se iniciará en corto plazo una serie de reuniones tendientes a planificar y priorizar actividades destinadas a continuar con la evaluación de estos recursos para su conservación, mejoramiento genético y aprovechamiento productivo.

- **Regulación de la cosecha de semilla.**

La instalación de rodales semilleros para ambas especies, únicos para especies nativas de la región, permite una regularización en la cosecha de semilla y la identificación de la procedencia de las plantaciones realizadas con ella.

- **Desarrollo de nuevas tecnologías para futuras líneas de investigación**

La ausencia de clusters definidos de poblaciones localizadas en una misma cuenca podría ser el resultado de un flujo génico no tan extensivo como se esperaba en base a la ubicación de las cuencas y dirección de los vientos predominantes en la región (oeste-este). Este resultado abre una nueva línea de investigación orientada a la búsqueda de las causas de un flujo génico de menor extensión en la región bajo estudio. Este fue uno de los motivos que nos impulsó a llevar adelante el trabajo en INRA, Francia de desarrollo y caracterización de marcadores SSRs (simple sequence repeats) para el género *Nothofagus*. Las características de hipervariables y codominantes revisten a los SSRs de gran utilidad en lo que respecta a estudios de flujo génico y paternidad. Esta sería una nueva línea de investigación que se abre, a nuestro entender, a partir del desarrollo del presente trabajo. También se incursionó en la aplicación de otros marcadores hipervariables, los ISSR, cuya aplicación abre también numerosas líneas de trabajo.

- **Teoría evolutiva**

Se reafirmó la teoría evolutiva postglacial de ambas especies, con la confirmación de la existencia de refugios glaciarios múltiples. Los resultados de ADN de cloroplasto e isoenzimas en ambas especies sugieren la permanencia de las mismas en refugios tanto costeros como en el sector andino. Más aún, la mayor diversidad genética observada hacia el este, en Argentina, apoyan fuertemente la hipótesis de refugios en dicha región. Esta conclusión se refuerza también con la presencia de alelos exclusivos en la población en la cabecera este de la cuenca del Lago Quillén. El fundamento teórico de esta conclusión reside en que una mayor distancia de colonización a partir del refugio se relaciona con una mayor probabilidad de pérdida de tipos genéticos (Comps *et al.*, 2001). Los resultados en lo que respecta a la historia evolutiva de la especie significan no sólo un aporte al conocimiento básico, sino que esta información en conjunto con la obtenida a partir de los estudios isoenzimáticos servirá de herramienta para la formulación de prescripciones silvícolas y de conservación.

Se generaron conocimientos tendientes a completar el modelo de hibridación entre las dos especies que fuera desarrollado por Gallo (2002). Este conocimiento es de fundamental importancia dado el rol central de la hibridación en procesos de especiación.

- **Formación de Recursos Humanos**

El proyecto contribuyó a la finalización de una tesis doctoral iniciada previamente y al inicio de dos tesis doctorales que se encuentran en desarrollo.

ACTIVIDADES DE COORDINACIÓN Y DIFUSIÓN

Reunión de Coordinación del proyecto *INIA Quilamapu. Chillán, Chile e INTA Bariloche*

Durante el mes junio del 2000 y mayo del 2002 se realizaron dos reuniones de Coordinación del proyecto en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional (CRI) Quilamapu, ubicado en la ciudad de Chillán, Chile y en el INTA Bariloche, Argentina.

Los *objetivos* de estas reuniones fueron:

- a) Reunir a todos los investigadores y profesionales participantes del proyecto para discutir los avances y fijar las estrategias de desarrollo futuro;
- b) Conocer las actividades de investigación que están realizando los investigadores participantes en *Nothofagus* y las políticas de conservación y/o manejo de bosque nativo que propician sus instituciones.

Principales resultados de la reunión de coordinación

A. Generales

Los resultados de la reunión fueron muy buenos ya que permitió conocer:

1. La investigación que está realizando el INTA e INIA en estas especies de *Nothofagus*
2. Conocer los resultados de los proyectos de mejoramiento genético que ha estado desarrollando el Instituto Forestal y el INTA, y algunas experiencias preliminares en la producción de plantas de roble y raulí
3. Conocer la política de conservación de recursos forestales que está proponiendo la Corporación Nacional Forestal (CONAF) para Chile.

B. Relacionados directamente con el proyecto

1. Discutir los avances realizados en la colecta de roble y raulí en Chile y Argentina
2. Revisar el avance actual y el desarrollo futuro de la Carta Gantt del proyecto
3. Acordar futuros compromisos de intercambio de metodologías, información técnica y material genético
4. Intercambiar ideas sobre futuros proyectos relacionados con esta materia

- Publicaciones enviadas a revistas científicas

MARCHELLI, P; GALLO, L A. The role of glaciation, fragmentation and hybridization in shaping the distribution of the genetic variation in a Patagonian southern beech. Enviado a Journal of Biogeography.

- Publicaciones de carácter científico en preparación

MARCHELLI, P; GALLO, L A. Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers.

AZPILICUETA, M.M; GALLO, L A. Genetic variation within and between populations of southern beech *Nothofagus obliqua* in Argentina.

- Presentaciones a Congresos

CREGO, M. P.; GALLO, L.A., 2002. Local dynamic of interspecific hybridization between two southern beeches (*Nothofagus* spp.). In: Abstracts of Dygen Conference "Dynamics and Conservation of Genetic Diversity in Forest Ecosystems", December 2-5, Strasbourg, France, page 108.

MARCHELLI, P.; AZPILICUETA, M.M.; GALLO, L., 2002. Joint analysis of post-glacial migration in two southern beeches (*Nothofagus* spp.). In: Abstracts of Dygen Conference "Dynamics and Conservation of Genetic Diversity in Forest Ecosystems", December 2-5, Strasbourg, France, page 157.

MARCHELLI, P.; GALLO, L.A., 2002. Patrones de diferentes niveles de variación genética en poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus nervosa*). En: Actas XXXI Congreso Argentino de Genética, La Plata, 17-20 de septiembre, pág. 136.

AZPILICUETA, M.M.; GALLO, L.A., 2002. Variación genética alozímica como herramienta de diagnóstico para la conservación e interpretación evolutiva de los bosques de *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. en Argentina. En: Actas XXXI Congreso Argentino de Genética, La Plata, 17-20 de septiembre, pág. 135.

CREGO, M.P.; GALLO, L. A., 2002. Variación temporal en la hibridación natural entre *Nothofagus nervosa* Raulí (Phil.) Dim. et. Mil. y *Nothofagus obliqua*, Roble Pellín (Mirb.) Oerst. En: Actas XXXI Congreso Argentino de Genética, La Plata, 17-20 de septiembre, pág. 136.

MARCHELLI, P.; GALLO, L.A., 2001. Variación temporal en el sistema de apareamiento de *Nothofagus nervosa*. En: Actas XXX Congreso Argentino de Genética, IV Jornadas Argentino Uruguayas de Genética, Mar del Plata, 16-19 de septiembre, pág. 146.

AZPILICUETA, M.M.; GALLO, L.A., 2001. Análisis de la variación genética en *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. a través de marcadores génicos isoenzimáticos. En: Actas XXX Congreso Argentino de Genética, IV Jornadas Argentino Uruguayas de Genética, Mar del Plata, 16-19 de septiembre, pág. 147.

- Participaciones en libros de carácter técnico

Donoso, C. , Gallo, L.A., Azpilicueta, M.M. y otros: Variación genética en Roble Pellín. Libro sobre variación genética de especies forestales nativas. Donoso, Ipinza, Gallo, Premoli, Eds. (En prensa).

Donoso, C. , Gallo, L.A., Marchelli, P y otros: Variación genética en Raulí. Libro sobre variación genética de especies forestales nativas. Donoso, Ipinza, Gallo, Premoli, Eds. (En prensa).

Paredes, M.; Becerra, V.; Gallo, L.; Moreno, G. 2000. Aplicaciones potenciales de la biotecnología al estudio de *Nothofagus* spp. En: R. Ipinza, B. Gutiérrez, V. Emhart (eds). Domesticación y mejora genética de roble y raulí. Universidad Austral/Instituto Forestal. pp. 419-434.

- Informes de solicitud de áreas protegidas

Informe Población Pilolil, *Nothofagus obliqua* elevado a la Cámara Legislativa de la Provincia del Neuquén, 15 abril de 2002.

Elevación de informe de solicitud de cambio de estatus de protección del área Hua Hum-Boquete, entre las cabeceras Oeste de los lagos Lácar y Lolog en función a los datos de diversidad genética obtenidos en el proyecto. Elevado el 6 de diciembre del 2002 con el N° 2518. Gestión en trámite.

- Asistencia a seminarios, simposium

Conservación de diversidad genética de los recursos forestales nativos: clave para el desarrollo sustentable.

Simposio Internacional Desarrollando el Eucalipto del Futuro organizado por la International Union of Forestry Research Organization (IUFRO), Valdivia, Chile.

Seminario Investigación y desarrollo en Biotecnología silvoagropecuaria: situación actual chilena. CONICYT-CORFO-FIA-MINECON, Santiago, Chile.

- Visita experto internacional a Chillán

Debido a la importancia del tema de propagación de plantas se invitó a un experto internacional en el tema para que nos asesorara en el desarrollo de las técnicas actuales y futuras en este tema. el experto internacional Dr. Dagoberto Castro visitó nuestro país, profesor de la Universidad Católica de Oriente, Río Negro (Antioquia), Colombia realizó en nuestro país *varias actividades*: **a)** asesoramiento en el laboratorio de biotecnología del CRI Quilamapu (INIA) en técnicas de propagación de plantas de especies nativas; **b)** conferencia sobre sistemas de propagación de plantas a una audiencia de 80 profesionales, técnicos y estudiantes forestales en la ciudad de Concepción, Chile; y **c)** visita a laboratorio de propagación de plantas a Forestal Mininco S.A.

Difusión del proyecto a autoridades y profesionales.

Durante el año se recibió un número importante de visitas: autoridades nacionales y profesionales nacionales y extranjeros al Laboratorio de Biotecnología, a quienes se les dio a conocer los objetivos y avance del proyecto.

Seminario Final del proyecto

El 25 de junio se realizó el Seminario final del proyecto en el INIA Quilamapu. A este seminario asistieron autoridades regionales y locales y 80 profesionales técnicos del sector público y privado. En el seminario se presentaron en la mañana: aspectos relacionados con el proyecto como son la importancia económica de las especies, situación silvícola de ellas, visión de la empresa privada y su visión hacia este recurso, conservación y mejoramiento genético de estas especies. En la tarde, se presentaron los aspectos más relevantes del proyecto como la colecta, y plantación de ensayos de progenie, estudios de variabilidad isoenzimática y molecular en las dos especies y un trabajo sobre introgresión entre roble y raulí. Se terminó esta actividad con un resumen y discusión de los aspectos más relevantes y algunas ideas de trabajo hacia el futuro.

BIBLIOGRAFIA

- BEAVER, J.A.; IEZZONI, A.F. ; RAMM, C.M. 1995. Isozyme diversity in sour, sweet, and ground cherry. *Theor Appl Genet* 90:847-852
- CERVERA, M. T.; PLOMION, C.; MALPICA, C. 2000. Molecular markers and genome mapping in woody plants. In: *Molecular Biology of Woody Plants*, Vol.1, 375-394. S M Jainard, S M Minocha Eds. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- COMPS B, GÖMÖRY D, LETOUZEY, J.; PETIT, J. R. 2001. Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics* 57: 389-397.
- DELMASTRO, R. 1997. Informe de genética forestal. Proyecto CONAF PNUD FAO. Facultad de Ingeniería Forestal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- DONOSO, C. 1979a. Variación y tipos de diferenciación en poblaciones de roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.). *Bosque* 3(1):1-14.
- DONOSO, C. 1994. Árboles Nativos de Chile. Guía de Reconocimiento. Marisa Cúneo Ediciones, Valdivia. 116 p.
- DONOSO, C.; CABELLO, A. 1978. Antecedentes fenológicos y de germinación de especies leñosas chilenas. *Ciencias Forestales* 1: 31-42.
- DONOSO, C.; MORALES, J.; ROMERO, M. 1990. Hibridación natural entre roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.) y raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst.) en bosques del sur de Chile. *Rev. Chilena de Hist. Nat.* 63:49-60
- DEMESURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R. J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129-131.
- DUMOLIN, S., DEMESURE, B.; PETIT, R. J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theor Appl Genet*, 91: 1253-1256.
- DUMOLIN-LÁPEGUE, S.; PEMONGE, M. H.; PETIT, R. J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Mol. Ecol.* 6: 393-397.
- GALLO L, MARCHELLI, P.; BREITEMBÜCHER, A. 1997. Morphological and allozymic evidence of natural hybridization between two Southern beeches (*Nothofagus spp*) and its relation to heterozygosity and height growth. *Forest Genetics* 4 (1): 15-23.
- GALLO, L.; MARCHELLI, P.; CREGO, P.; OUDKERK, O.; IZQUIERDO, F., BREITEMBUCHER, A.; GONZÁLEZ-PEÑALOZA, M.; CHAUCHARD, L.; MARESCA, L.; MELE, U. 2000. Distribución y variación genética en características seminales y adaptativas de poblaciones y progenies de raulí en Argentina. In: R. Ipinza, Gutiérrez, B., V. Emhart (eds). *Domesticación y mejora genética de roble y raulí*. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal. pp. 133-155.
- GREGORIUS, H. R. 1974. On the concept of genetic distance between populations based on gene frequencies. *IUFRO Meetings, Stockholm*, S.02.04.1-3: 17-26.

- GREGORIUS, H. R.; ROBERDS, J. H. 1986. Measurement of genetical differentiation among subpopulations. *Theor. Appl. Genet.* 71, 826-834.
- GURIES R.P. ; LEDIG, T. 1982. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill). *Evolution* 36:387
- HAASE, P. 1993. Isozyme studies of New Zealand *Nothofagus* species (southern beech) using leaf extracts. *Silvae Genetica* 42:46-51.
- IPINZA, R; GUTIÉRREZ, B.; MEDINA, A; MORENO, P.; EMHART, V. 2000. Análisis geográfico y genético de rasgos morfológicos de la semilla, germinación y crecimiento inicial en *N. alpina* y *N. obliqua*. En: Reunión Internacional "Modelos y Métodos Estadísticos Aplicados a Bosques Naturales". Valdivia, Chile.
- KAMPFER, S.; LEXER, C.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. 1998. Characterization of (GA)n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* 129: 183-186.
- KERTADIKARA, A.W.S. ; PRAT, D. 1995. Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f.) provenances. *Theor Appl Genet* 90:803-810
- LOUKAS, M.; VERGINI, Y. ; KRIMBAS, C.B. 1983. Isozyme variation and heterozygosity in *Pinus halepensis* L. *Biochemical Genetics*. 21: 497-509
- MARCHELLI, P.; GALLO, L.; SCHOLZ, F.; ZIEGENHAGEN, B. 1998. Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theor. Appl. Genet.* 97: 642-646.
- MARCHELLI, P.; GALLO, L. A. 1999. Annual and geographic variation in seed traits of Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. Et Mil.. *Forest Ecology and Management* 121: 239-250.
- MARCHELLI, P.; GALLO, L. A. (2000) Genetic analysis of isozyme variants in open pollinated families of Southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *Silvae Genetica*, 4: 90-98.
- MÁTYÁS, G.; SPERISEN, C. 2001. Chloroplast DNA polymorphisms provide evidence for postglacial re-colonisation of oaks (*Quercus spp.*) across the Swiss Alps. *Theor. Appl. Genet.* 102: 12-20.
- OUAZZANI, N. ; LUMARET, R. ; VILLEMUR, P. ; DI GIUSTO, F. 1993. Leaf isozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europea* L.) *J. Hered.* 94:34-42
- PINEDA, G. 2000. Variabilidad isoenzimática del huerto semillero clonal de *N. alpina*. In: R. Ipinza, Gutiérrez, B., V. Emhart (eds). Domesticación y mejora genética de roble y raulí. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal. pp. 95-119.
- STAVRAKAKIS, M.; LOUKAS, M. 1983. The between and within grape cultivars genetic variation. *Scientia Horticulturae* 19:421-334
- STEINKELLNER, H.; FLUCH, S.; TURETSCHKE, E.; LEXER, C.; STEIFF, R.; KREMER A.; BURG, K.; GLÖSSL, J. 1997. Identification and characterization of (GA/CT)n – microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Ecology* 33: 1093-1096.

- TABERLET, P.; GIELLY, L.; BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105-1109.
- TAKAHASHI, M.; TSUMURA, Y.; NAKAMURA, T. ; UCHIDA, K. ; OHBA, K. 1994. Allozyme variation of *Fagus crenata* in northeastern Japan. *Can.J.For.Res.* 24:1071-1074
- TANSKLEY, S.D. ; YOUNG, N.D. ; PAT, A.H. ; BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding- new tools for an old science. *Bio/Technology* 7 :257-254
- TIGERSTEDT, P.M.A. 1973. Studies on isozyme variation in marginal and central populations of *Picea abies*. *Hereditas* 75:47
- VERGARA, R.; IPINZA, R.; DONOSO, C.; GROSSE, H. 1998. Definición de zonas de procedencias de roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.) y raulí (*Nothofagus alpina* (Poep. et Endl.) Oerst.). En: Primer Congreso Latinoamericano IUFRO, "El Manejo Sustentable de los Recursos Forestales, Desafío del siglo XXI". Valdivia 22 al 28 de noviembre de 1998.
- VERGARA, R.; BOHLE, K. 2000. Estado actual del recurso forestal de N. alpina y N. obliqua en Chile. In: R. Ipinza, Gutiérrez, B., V. Emhart (eds). Domesticación y mejora genética de roble y raulí. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal. pp. 43-52.
- WELSH, J. ; McLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18 :7213-7218
- WILLIAMS, J.G.K. ; KUBELIK, A.R. ; LIVAK, K.J. ; RAFALSKI, J.A. ; TINGEY S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res* 18 : 6531-6535
- ZOBEL, B y TALBERT, J. 1984. Applied forest tree improvement. John Willey and Sons, Inc., New York. 505 p.

ANEXOS

Enviado a J. of Biogeography

The role of glaciation, fragmentation and hybridization in shaping the distribution
of the genetic variation in a Patagonian southern beech.

Marchelli, P.¹ and Gallo, L. A.*

Unidad de Genética Forestal, INTA EEA Bariloche, CC 277, 8400 Bariloche, Rio
Negro, Argentina.

¹CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas).

* Correspondence author.

Correspondence author

Leonardo Gallo

Unidad de Genética Forestal

INTA EEA Bariloche

CC 277

(8400) Bariloche

Argentina

Email: lgallo@bariloche.inta.gov.ar

Running title: Evolutionary processes in *Nothofagus nervosa*.

Abstract

Aim The present study aims to find out the relative importance of glaciations, fragmentation and hybridization in shaping the distribution patterns of the genetic variation in *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Topographic diversity of southern Andes could have provided a wide range of microhabitats favourable for woody taxa during glacial period. If re-colonization took place from numerous refugia, then the distribution of the genetic variation should be associated with such refugia and the followed migratory paths. On the other hand, the current distribution range of *N. nervosa* is fragmented along the valleys of lake watersheds within which strong winds in west-east direction occurs throughout pollination and seed fall seasons. If unidirectional gene flow is extensive, then homogenization of the genetic variation among populations within each watershed should be expected with a latitudinal trend in the distribution of the genetic variation. Finally, natural hybridization occurs between *N. nervosa* and *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. If hybridization is extensive, an increase in the genetic diversity due to introgression is expected in the sympatric areas.

Location The study was carried out in north-western Patagonia, Argentina. Twenty populations covering the entire distribution range of *N. nervosa* in Argentina were analysed. For comparison purposes, three populations from Chile were also included.

Methods Eight isozyme gene markers previously determined were scored in at least 100 seeds per population. Two of these markers present species-specific alleles that allow the identification of hybrid seeds. Diversity and differentiation parameters were calculated and analysed considering the proposed hypotheses. Cluster analysis and correlation between genetic and geographic distances were done.

Results Levels of genetic variation were relatively high given the small distribution range of the species in Argentina ($A_L = 3.38$; $v = 1.29$; $H_s = 16\%$; $H_t = 18\%$; $\delta = 4.7\%$).

($F_{ST} = 5.2\%$). Genetic and geographic distances were not correlated and cluster analysis did not reveal any association of populations and watersheds. Moreover, intra-watershed differences among populations were observed. Hotspots of diversity with rare and private alleles were observed among western populations. Furthermore, hybrid seeds were found almost exclusively among eastern populations.

Main conclusions A longitudinal trend in the distribution pattern of the genetic variation was evident, with presence of rare and private alleles to the west and hybridization to the east. The high level of diversity to the west could be related with location of glacial refugia. Even more, given the unidirectional winds (west to east), the higher diversity to the west also reflects low levels of gene flow. Then glaciations and hybridization could be thought as the main factors shaping the distribution of the genetic variation in *N. nervosa*.

Keywords glacial history, evolutionary processes, allozymes, gene flow, geographic variation, *Nothofagus nervosa*, Fagaceae.

Introduction

The distribution pattern of the genetic variation in long-lived species is a combination of both, historical and current processes. The drastic reduction of forests lands in southern South America during Quaternary ages ought to glacial advances could be considered as the major catastrophic event suffered by native species. More recently, fragmentation of natural habitats due to man activities and climatic change is also altering the level and distribution of genetic variation. *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. (= *N. alpina*) (Lennon et al., 1987) is an important component of Southamerican *Nothofagus* that is under conservation and management in Argentina. In addition to the effect of glaciations during the Pleistocene, other factors could be shaping the distribution of its genetic variation, namely fragmentation of its distribution range and hybridization with another *Nothofagus* species (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.).

Nothofagus nervosa has a small distribution range in Argentina (from 39° 25' S to 40° 35' S) restricted to the valleys of the lakes of glacial origin which run transversal to the Andes in a west-east direction. During the Pleistocene the current distribution range was covered by glacial. However, east of the Andes, the glaciers took the form of huge lobes descending from the mountains and mainly following the valleys of the modern lakes (Flint & Fidalgo, 1964). Moreover, it was suggested that the topographic diversity of the region could have provided a wide range of microhabitats favourable for woody taxa (Markgraf et al., 1995). In this concern, the possibility of numerous refugia for southern south American species was suggested in several palynological (e.g. Markgraf et al., 1995; Villagran et al., 1995; Heusser et al., 1996; Bianchi, 1999) and genetic studies (Marchelli et al., 1998; Allnutt et al., 1999; Premoli et al., 2000; Premoli et al., 2002; Pastorino & Gallo, 2002; Bekessy et al., 2002). The re-colonisation of pre-

glaciated areas from different refugia might have given rise to a geographic distribution of the genetic variation related with the location of such ice-age refugia and the subsequent migratory paths. A reduction of the genetic diversity associated with longer migration distances is expected due to the effect of repeated founder events (Hewitt, 2000). The refugial populations usually harbour higher allelic richness specially reflected by low-frequency variants which are more sensitive to be lost during migration (Cwynar & MacDonald, 1987; Konnert & Bergmann, 1995; Leonardi & Menozzi, 1995; Ledig, 2000; Comps et al., 2001). According to this, our first hypothesis is that the distribution of the genetic variation would show no systematic pattern but one related with the migratory paths, with higher genetic diversity in the vicinity of the most probable glacial refugia.

Geographic range has been described as one of the main factors influencing distribution and levels of genetic variation in plant species (Hamrick et al., 1992). However, the topography of the environment and the degree of fragmentation often play a more important role. Mountain landscapes usually provide a wide extent of microhabitats where altitude determines niche separation. Moreover, in this kind of environment barriers to extensive gene flow can increase genetic differentiation among neighbouring populations. The geographic range of *Nothofagus nervosa* is fragmented along the valleys of the different lake watershed of glacial origin. Within these valleys (transversal to the Andes Mountains) strong winds in a west-east direction prevail both during pollination and seed fall seasons (70 % and 58 % of total winds respectively). Thus, a hypothesis of unidirectional gene flow among populations from each watershed could be proposed, with populations from the west acting as gene flow "sinks". An extensive gene flow would produce a homogenisation of the genetic variation within watersheds. Although this was not revealed in a previous study, where high intra-

glaciated areas from different refugia might have given rise to a geographic distribution of the genetic variation related with the location of such ice-age refugia and the subsequent migratory paths. A reduction of the genetic diversity associated with longer migration distances is expected due to the effect of repeated founder events (Hewitt, 2000). The refugial populations usually harbour higher allelic richness specially reflected by low-frequency variants which are more sensitive to be lost during migration (Cwynar & MacDonald, 1987; Konnert & Bergmann, 1995; Leonardi & Menozzi, 1995; Ledig, 2000; Comps et al., 2001). According to this, our first hypothesis is that the distribution of the genetic variation would show no systematic pattern but one related with the migratory paths, with higher genetic diversity in the vicinity of the most probable glacial refugia.

Geographic range has been described as one of the main factors influencing distribution and levels of genetic variation in plant species (Hamrick et al., 1992). However, the topography of the environment and the degree of fragmentation often play a more important role. Mountain landscapes usually provide a wide extent of microhabitats where altitude determines niche separation. Moreover, in this kind of environment barriers to extensive gene flow can increase genetic differentiation among neighbouring populations. The geographic range of *Nothofagus nervosa* is fragmented along the valleys of the different lake watershed of glacial origin. Within these valleys (transversal to the Andes Mountains) strong winds in a west-east direction prevail both during pollination and seed fall seasons (70 % and 58 % of total winds respectively). Thus, a hypothesis of unidirectional gene flow among populations from each watershed could be proposed, with populations from the west acting as gene flow "sinks". An extensive gene flow would produce a homogenisation of the genetic variation within watersheds. Although this was not revealed in a previous study, where high intra-

watershed differentiation was observed among the extreme populations (Marchelli & Gallo, 2001), the analysis of more populations located in between could show a tendency in this feature. Since the watersheds are separated in a latitudinal orientation, it could be proposed as second hypothesis that, if gene flow is extensive, then an overall differentiation among watersheds in a latitudinal trend would be expected.

Natural hybridization between *N. nervosa* and *N. obliqua* was described upon morphological evidence (Donoso et al., 1990; Gallo, 1995) and lately confirmed through species-specific gene markers (Gallo et al., 1997; Gallo et al., 2000). Both species coexists in some of the watersheds, and form mixed forest in the junction of their altitudinal distributions. Sympatric areas include both Lácar and Quilén watersheds. Especially in the former, mixed 1:1 forests occur at an altitude of 800 m asl, with predominance of *nervosa* at higher altitudes and *obliqua* at lower ones. In other watershed (Lolog lake watershed) *N. obliqua* and intermediate individuals between both species were found scattered among pure *N. nervosa* forests in Bahía del Melón, on the southern shore of the lake. The increase of intraspecific genetic diversity is one of the evolutionary consequences that hybridization may have (Anderson, 1948; Stebbins, 1959). Moreover, introgression of *N. obliqua* into the gene pool of *N. nervosa* was reported (Gallo et al., 1997; Gallo, 2002). Thus, if hybridization is extensive a higher degree of genetic diversity due to the presence of "*obliqua* alleles" in the sympatric areas should be expected.

The present study aims to find out the relative importance of the above mentioned processes in determining the distribution patterns of the genetic variation in *N. nervosa*. In summary, we will evaluate the "glaciation", "fragmentation" and "hybridization" hypotheses presented above. If glaciation was the main acting force then we expect genetic variation to be associated with number and location of possible

refugia. On the other hand, if fragmentation is playing the main role and gene flow is extensive, a latitudinal trend with differences among watersheds is foreseen. Finally, if hybridization is the most important factor a higher diversity in the sympatric areas will probably arise.

Materials and Methods

Plant material and sampled populations

Bulk seed collection was done by putting nets below the canopy at about 1.5 m above the ground between 1994 and 1997 in twenty populations throughout the entire range of *Nothofagus nervosa* in Argentina (Table 1). Nets were distributed along each population (2-3 ha; each) in order to capture seeds from at least forty seed-producer trees. Between two to six populations from each of six different watersheds were collected (except from the southern most watershed where seeds from an isolated population were collected). Populations were designed with a letter indicating the watershed to which they belong to and a number within watershed. The periodic seed-production observed in this species suggests that a better representation of all genotypes must be expected in mast years (Marchelli & Gallo, 1999). So a minimum of 100 seeds from the corresponding more abundant seed-production-year were analysed in each population: populations E1, G1, G2 and G3 (year 1995); populations L2, L3, L4, L5 (year 1996); populations H1, H2, L1, L6, C1, C2, C3, C4, C5, T1, T2, T3 (year 1997).

Three populations from Chile were included in the analyses. This number is not representative of the species in Chile and was included only for comparison purposes. The three populations (Table 1) cover the distribution range and were collected in the frame of the Project FONDEF D96/1052 (Universidad Austral de Chile, Instituto Forestal). One hundred seeds coming from 10 individual trees were analysed.

Seeds were kept at 4 °C until electrophoresis analyses

Isozyme electrophoresis

Genetic variation was investigated through isozyme gene markers. The vegetative extraction buffer I from Cheliak & Pitel (1984) was employed to extract proteins from embryo tissue. Eight polymorphic isozyme loci previously determined (*Mdh-B*, *Mdh-C*, *Idh-A*, *Adh-A*, *Goi-A*, *Goi-B*, *Goi-C* and *Pgi-B*) were scored in embryo tissue under the same electrophoresis conditions, buffer systems and enzyme designation described in Marchelli & Gallo (2000). Two of the analysed loci (*Adh-A* and *Pgi-B*) have species-specific alleles that allow the detection of hybrids between *Nothofagus nervosa* and *N. obliqua* (Gallo et al., 1997; Marchelli & Gallo, 2000).

Measurement of genetic variation

A locus was considered polymorphic when more than one variant was observed, whatever its frequency (Berg & Hamrick, 1997). Since the determination of gene markers requests the presence of phenotypic variants, the eight analysed loci are polymorphic at the species level, although not always at the population level. So in each population proportion of polymorphic loci (P) was calculated. Within population genetic variation was estimated by the mean number of alleles per locus (A_i), the genic diversity (v) (i.e. effective number of alleles; Gregorius, 1978) and the observed and expected heterozygosities (H_o and H_e respectively; Nei, 1973). Differences in allele frequencies among populations were statistically tested by means of a Chi-squared goodness of fit test ($\alpha = 0.05$). Genetic distances between populations were estimated using Gregorius' (1974) genetic distance. The amount of genetic differentiation for a given population (D_j), measured as the distance of each population from its complement

(remaining pooled populations) and the mean level of differentiation among populations (δ), were estimated for each locus and the gene pool according to Gregorius & Roberds (1986). For comparison purposes, F_{ST} values (Wright, 1978) were also calculated. A dendrogram was constructed according to the UPGMA method using the SAS statistic program (SAS, 1989-1996). The different genetic parameters were calculated using GSED (Genetic Structures from Electrophoresis Data, Gillet, 1994) and POPGENE (Yeh & Boyle, 1997). Differences among pair-wise distances were tested using GDA_NT (Genetic Data Analysis and Numerical Tests, B. Degen, unpublished) ($\alpha = 0.05$) with 500 permutations.

Correlation between geographic and genetic distances was analysed by a Mantel test (Mantel, 1967) using GENETPOP (Raymond & Rousset, 1995).

The distribution pattern of the genetic variation was analysed both along the entire geographic range of the species in Argentina and at the watershed scale. In the latter case variation among populations within watershed was estimated.

Results

Levels of genetic variation

Five of the analysed loci were polymorphic in all populations (*Mdh-B*, *Idh-A*, *Got-A*, *Got-B* and *Got-C*). Proportion of polymorphic loci range between 62.5% and 100%, all loci being polymorphic in those populations where hybrids occurred (Table 1). Rare alleles ($p < 0.05$) were detected in most of the loci in several populations. Besides, private alleles were observed in some populations: *Got-C*-3 in population E1 ($p=0.029$), *Got-B*-5 in population C5 ($p=0.005$), *Got-B*-6 in population L5 ($p=0.103$) and *Got-C*-4 also in population L5 ($p=0.108$). Apart from the species-specific alleles in *Adh-A* and *Pgi-B*, other alleles apparently coming from *N. obliquus* were found in *Mdh-B*, *Mdh-C*

and *Gat-A*. Mean number of alleles per locus (A_L) range between 1.75 and 2.75 among the populations and the species mean was 3.38. Genic diversity (ν) was 1.29 for the species, ranging between 1.13 and 1.32 among populations (Table 1), indicating the existence of minor polymorphism in most cases, with one common allele and one or more alleles in low frequency.

Mean observed heterozygosity among the eight loci was 16% although this value was highly variable being *Mdh-B* and *Gat-A* the most polymorphic ones. Gene pool heterozygosity was also variable among populations, even between those belonging to the same watershed (Table 1). Except for the more polymorphic loci (*Mdh-B* and *Gat-A*) in some populations, expected heterozygosity (H_e) values were not significantly different from the observed ones, indicating Hardy-Weinberg structure. Mean expected heterozygosity was 18%.

Allele frequencies were significantly different among populations for all analysed loci ($\alpha=0.05$). Genetic distances ranged between 0.017 and 0.152, being in most cases significantly different, even among geographically neighbour populations (Table 2).

Genetic differentiation of each population from its complement (remaining populations) (D_i) for the gene pool ranged between 2.4% and 8.1%, being populations H2, L5, G3 and T3 the most differentiated ones (Fig. 1). The mean level of genetic differentiation (δ) among the 20 populations was 4.7% ($F_{ST}=5.2\%$).

The three Chilean populations included in the analysis showed 100% of polymorphic loci, but mean number of alleles per locus for the species was lower than among Argentinean populations ($A_L=2.38$). Genic diversity was similar ($\nu=1.24$) and mean observed and expected heterozygosity lower than in Argentina ($H_o=14\%$ and $H_e=15\%$). Allele frequencies were significantly different ($\alpha=0.05$) in only four of the

eight analysed loci (*Mdh-B*, *Mdh-C*, *Got-A* and *Pgi-B*). Pair-wise genetic distances were significantly different (Table 2) and the mean level of genetic differentiation (δ) was 5.7% ($F_{ST} = 6.4\%$), being the coastal population the more differentiated one ($\delta = 7\%$).

Geographic distribution of the genetic variation

Cluster analysis showed no geographic association among populations, clustering together both neighbour populations (e.g. N° 27 and 28) and very distant ones (e.g. N° 1 and 21) (Fig. 2). Moreover, Mantel test did not reveal any association between geographic and genetic distances ($P > 0.05$).

Intra-watershed differences among populations were observed. Heterogeneity in allele frequencies ($\alpha = 0.05$) were observed in three loci within Hermoso and Tromen Lake watersheds, in six loci within Lolog and Huechulafquen Lake watersheds and in all loci in Lácar Lake watershed. Similarly, genetic distances were significantly different and genetic differentiation among populations was high. In three of the five watersheds mean genetic differentiation (δ) was even higher than among the 20 populations (Table 3).

Analysing the geographic location of private and rare alleles, a distribution pattern seems evident. These alleles were mainly observed among the western populations, highlighting as hot spots populations L5, G3 and C5 (Table 1, Fig. 3). Populations L2 and L3 also had a high mean number of alleles per locus, but this was related to the hybridization with *Nothofagus obliqua* (see below). Two private alleles were found in a relatively high frequency (*Got-B-6*=0.103 and *Got-C-4*=0.108) in population L5. These alleles were only observed again in one seed from population L4 (distant 16 km in the wind direction) in a year of low seed production (Marchelli & Gallo, unpublished data). Rare alleles were usually detected in very low frequency ($p <$

L2

0.01). However, *Mdh-C'-2* was an exception reaching frequencies of 3% in two populations (L6 and C5) located to the western side of the distribution range.

Hybrid seeds were observed among populations of Lácar and Lolog Lake watersheds, and to a lesser extent in Tromen-Quillén watershed. Among Lácar Lake populations, the highest proportion of hybrid seeds were found in the eastern most population (L2) and in the one situated at the lowest altitude (L3, in the area dominated by *N. obliqua*). Besides, a high proportion of hybrids for the enzyme loci *Ach* was observed in population G1, in the eastern shore of Lolog Lake watershed (Table 1, Fig. 3).

Hybridization was also detected in the three Chilean populations, being higher in Mallalcahuello (Andes-North) and Nahuelbuta (Coast) (Table 1). Instead, the occurrence of rare and private alleles was only evidenced in Neltume (Andes-South) (Table 1), where an exclusive allele in *Gat-A* was also observed.

Discussion

Distribution patterns of the genetic variation

The distribution of the genetic variation in *Nothofagus nervosa* followed mainly a longitudinal trend. The most variable populations were those located on the western area of the range with the occurrence of rare and private alleles. Moreover, the longitudinal difference was stressed by the presence of hybrids almost exclusively to the east. The west – east pattern was also reflected in the high level of differentiation among populations within watersheds, suggesting that the unidirectional gene flow is not extensive. Under high levels of gene flow (through unidirectional wind pollination) the private alleles detected in relatively high frequency in population L5 (in the west) should have been found among eastern populations from the same watershed. These

alleles were only observed in one seed in the nearest downwind population, situated at about 16 km to the east, but from a year of low seed production (Marchelli & Gallo, unpublished data). Considering both the mast year and the low-seed production year, we have 200 seeds analysed from this population, but only one bearing the private alleles from the west. This highly supports the idea of not extensive gene flow. In addition, the absence of a relationship between genetic and geographic distances could be more related to the history of the populations instead of being a recent process like gene flow, as was the case in *Quercus petraea* (Le Corre et al., 1997). Therefore this contradicts the hypothesis of a latitudinal trend in the genetic variation due to the effect of fragmentation and gene flow. Instead, the higher diversity observed to the west with the presence of rare and private alleles might be related to the location of glacial refugia.

The absence of the high frequency private alleles in downwind populations not only reflects low levels of modern gene flow. It could also be indicating differences in the post-glacial migration among genotypes and/or in their post-glacial establishment. The absence of the private alleles in downwind populations could be due to a random sorting of the dispersed individuals during post-glacial migration. The current pattern could be explained if these genotypes had a low frequency before postglacial migration and were not dispersed after glacial retreat, remaining in the area nearby the refugia. Alternatively, the effect of selection during establishment could have played a role in favouring some genotypes and eliminating others. Although the latter hypothesis can not be excluded, the former seems more plausible given the rather similar climatic and environmental conditions observed especially in the neighbouring populations.

The overall pattern of genetic variation observed suggests that hybridization and glaciation could be stated as the main factors shaping the distribution of the genetic variation in *Nothofagus nervosa*. In the following sections we will discuss the possible

location of glacial refugia and the possible causes for the occurrence of hybridization exclusively to the east.

Quaternary glaciations and possible refugia

Pollen records suggest that deciduous taxa from the southern South American temperate forests survive the glaciations in refugia located in three main regions: the Nahuelbuta Mountains (in coastal Chile, at 37° 40' S), the Central Valley (in Chile) and both slopes of the Andes Mountains at latitudes north of 39° S (Heusser, 1984; Villagrán, 1991).

Chloroplast DNA markers revealed the existence of two haplotypes with a clear geographic distribution among populations of *N. nervosa* from Argentina (Marchelli et al., 1998). Haplotype I was distributed among southern populations while haplotype II was only found in the northern group (Tromén-Quillén watershed). These results led to the hypothesis of the existence of at least two different glacial refugia from which populations from Argentina spread out. Owing to the low level of polymorphism detected with this kind of markers, further speculations on the possible location of refugia were not evaluated. However, although uniparentally inherited markers are the most suitable for phylogeographic studies, the combination with nuclear markers (e.g. allozymes) might help in finding the most variable regions which are supposed to be the source for postglacial migration.

Obliqua-type pollen traces (which includes *N. nervosa* and *N. obliqua*) from the late glacial period (12,500 - 9,500 BP) were found at Rucafancu (39° 30' S) on the Andes Mountains. Forest expansion from this locality to the south after ice retreat was proposed (Villagrán, 1991). The northern group of populations in Argentina, bearing haplotype II could have been originated from this northern refugium. However, the

question remains about the origin of the southern group. This group could have expanded from an ice-free area situated either on Central Chile (west of the Andes) or in Argentina, on the eastern slope of the Andes.

Allozyme variation revealed high mean number of alleles per locus (A_L) and presence of rare and private alleles mainly among the western populations of Argentina. The two most variable populations were L5, situated in the western shore of Lácar Lake watershed, and G3, in the western shore of Lolog Lake watershed. Both populations showed the highest mean number of alleles per locus (A_L) and also the highest genetic diversity (ν) and heterozygosity. Moreover, these populations showed higher levels of variation than the one situated at similar latitudes in Chile (NE). Given the reduction in allelic richness expected in long-distance migration events (Cwynar & MacDonald, 1987; Hewitt, 2000; Comps et al., 2001) our results call for an eastern ice-age refugium. This suggestion would also be supported by preliminary chloroplast DNA results (Marchelli & Gallo, unpublished data). Due to the complex topography of this region, high mountains in an orientation transverse to the Andes could have offered a barrier to ice expansion. In this sense, the high elevations (more than 1,700 m) standing north of Lácar Lake (near populations L5 and G3) could have blocked ice expansion leaving a small ice-free patch in the north-eastern slope. The location of a refugium in this place could explain the high variation detected in these populations.

In southern South America, mid latitudes ($36^\circ - 44^\circ$ S) were characterised by the smallest amplitude of climatic change and westerly stormtracks allowed the persistence of forest vegetation throughout glacial times (Markgraf et al., 1995). Even so, palynological evidences for the survival of the warm temperate rain forest in the eastern slope of the Andes were not found. The probable small number of individuals and very restricted areas might discourage its presence in the pollen rain (Markgraf et al., 1996).

Besides, the rapid and simultaneous expansion of forest taxa after ice retreat on both slopes of the Andes Mountains is not consistent with pollen records to the east (Markgraf et al., 1996).

Several studies on genetic diversity of native species support the location of refugia in southern and eastern localities, in places where no-palynological confirmation is available. This was the case in *Fitzroya cupressoides* (Allnutt et al., 1999; Premoli et al., 2000), in *Astrocedrus chilensis* (Pastorino & Gallo, 2002), in *Aruncaria araucana* (Bekessy et al., 2002) and in *Pilgerodendron uviferum* (Premoli et al., 2002).

In conclusion, based on previous chloroplast results and on the levels of allozyme variation detected in the present study, we propose the existence of two glacial refugia from which Argentinean populations spread out: a northern refugium in the region of Rucañancu (39° 30' S, west of the Andes) and a southern refugium in the vicinities of populations L5 and G3 (40° 9' S, east of the Andes).

Hybridization

The occurrence of hybridization introduces another source of genetic variation, and could be thought as a way to maintain high levels of genetic variation at an intrageneric scale (Gallo, 2002). The introgression of *N. obliqua* into the gene pool of *N. nervosa* increases the genetic diversity of those populations of *N. nervosa* where hybridization occurs. The finding that this process is taking place mainly in the eastern range of the distribution area deserves some attention.

For hybridization to occur premating barriers must have been broke. In the case of the present two species, prezygotic barriers were proposed as being mainly due to pollen competition (Gallo, 2002). In its lower altitudinal range *N. nervosa* occurs ecologically in sympatry with *N. obliqua*. If flowering phenology coincides for both

species, then inter-specific pollen competition determines the extent of hybrid zygotes formed. This is the case of population L3, from Lácar Lake watershed, which is situated at a very low altitude (630 m asl) in the predominant area of *N. obliqua*. The presence of isolated *N. nervosa* trees surrounded by *N. obliqua* is commonly observed. The low proportion of con-specific pollen could be favouring the inter-specific pollination.

The other two populations where hybridization rates were high (L2 and G1) are both located to the eastern edge of the distribution range. Population L2 is characterized by a mixed forest with equal proportions of both species and the area of population G1 is mainly a "pure" *N. nervosa* area. This suggests that pollen competition should not be the reason for the levels of hybridization. So the question remains on why the proportion of hybrids is higher in these regions.

A distinction between these two populations should be made regarding the hybridisation dynamics. Population L2 shows mainly F_1 generation hybrids, since the majority of the seeds had heterozygous genotypes for both markers. Instead, in population G1 all hybrids showed heterozygous genotypes just for one marker (*Adh*), being "*nervosa* type" for the other (*Pgi*). These seeds had probably arisen from backcrosses between F_1 hybrids and *N. nervosa*. The low representation of *N. obliqua* in the pollen cloud since it is present only as scattered individuals to the west supports this idea. Furthermore, the existence of phenotypically intermediate individuals (possible F_1 adult trees) was corroborated in the field. Backcrosses between F_1 hybrids and one or both parental species are more common than the formation of F_2 hybrids due to the lowered pollen fertility in F_1 hybrids (Rieseberg & Carney, 1998).

Climatic differences among western and eastern areas exist and could be influencing the formation of hybrids to the east. The whole region is characterized by a strong west-east gradient in annual precipitation levels due to the rain-shadow effect of

the Andes Mountains. Although *N. nervosa* does not extend its distribution range into the most arid region (the Patagonian steppe) the difference in precipitation levels between western and eastern populations is about 2000 mm (from 3500 mm in western areas to 1500 mm in the eastern edge). The drier conditions to the east could be affecting flowering phenology allowing the overlapping between both species. It could be possible that drier habitats are more suitable for the establishment of hybrids and then natural selection could be favouring the hybridization process to the east. However, we can not further speculate on this matter since we are analysing the seed generation. Notwithstanding, the occurrence of backcrosses in the eastern populations suggests that F_1 hybrids were established in this area and are fertile. Hence, at least no selection is acting against them and their absence to the west could be due to the lack of a proper habitat. West – east differences not only relay in the drier conditions to the east, but also in the habitat alteration during past decades. Disturbances create a wide range of habitats that could be exploited by the different hybrid genotypes (Anderson, 1948). Besides, disturbances also lead to the breakdown of premating reproductive barriers, thus increasing hybridization frequencies (Rieseberg & Carney, 1998). During the huge exploitation of these forests in the first half of XX century, the eastern shores of the lakes were more accessible due to the existence of routes, and then it is possible that the effect of exploitation was more intense in these areas. Furthermore, the selective exploitation of these two species in the past could have favoured the hybridization since *N. nervosa* was preferentially extracted. Then, the alteration in the proportion of both species could have favour interspecific pollen competition (Gallo 2002).

Conclusions

Post glacial migration routes from different refugia and hybridization with *Nothofagus obliqua* are proposed as the main processes that have shaped and are still shaping the distribution pattern of the genetic variation among populations of *N. nervosa* in Argentina. Instead, fragmentation in the distribution range could be not so important given the probably low levels of gene flow among populations within watersheds.

Acknowledgements

We would like to thank the Forest Rangers and the Sylvicultural Department of Lanin National Park for their invaluable field work. We would also like to thank Lucas Oudkerk for field assistance. Helpful comments of two anonymous reviewers on a previous version are greatly acknowledged. This work was partially financed by different projects from the following institutions: INTA, APN, SAGPyA-BIRF, IFS, FONTAGRO.

References

- Allnutt TR, Newton AC, Lara A, Premoli AC, Armesto JJ, Vergara S & Gardner M (1999) Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Molecular Biology*, **8**, 975-987.
- Anderson, E (1948) Hybridization of the habitat. *Evolution*, **2**, 1-9.
- Bekessy SA, Allnutt TR, Premoli AC, Lara A, Ennos RA, Burgin MA, Cortes M & Newton AC (2002) Genetic variation in the monkey puzzle tree (*Araucaria araucana* (Molina) K.Koch), detected using RAPDs. *Heredity*, **88**, 243-249.

- Berg EE & Hamrick JL (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research*, **27**: 415-424
- Bianchi MM (1999) Registros polínicos de la transición Glacial-Postglacial en el Parque Nacional Nahuel Huapi, noroeste de Patagonia, Argentina. *Asociación Paleontológica Argentina, Publicación especial* 6: 43-48.
- Cheliak WM & Pitel JA (1984) Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service, Agriculture Canada. Information Report PI-X-42.
- Comps B, Gömöry D, Letouzey J, Thiebaut B & Petit RJ (2001) Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics*, **157**: 389-397
- Cwynar, LC & MacDonald, GM (1987) Geographical variation of lodgepole pine in relation to population history. *The American Naturalist*, **129**: 463-469.
- Donoso C, Morales J & Romero M (1990) Hibridación natural entre roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb) Oerst.) y rauli (*N. alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst.) en bosques del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **63**: 49-60
- Flint RF & Fidalgo F (1964) Glacial geology of the East flank of the Argentine Andes between Latitude 39°10'S and Latitude 41°20'S. *Geological Society of America Bulletin*, **75**: 335-352
- Gallo LA (1995) Supuestos híbridos interespecíficos en progenies de Rauli. Actas XXVI Congreso Argentino de Genética, Bariloche, Argentina: 34

- Gallo LA (2002) Modelling natural inter-specific hybridization between two mountain southern beeches (*Nothofagus* spp). Symposium "Modelling and experimental research on genetic processes in tropical and temperate forests". French Guiana, September 2000
- Gallo LA, Marchelli P & Breitenbucher A (1997) Morphological and allozymic evidence of natural hybridization between two southern beeches (*Nothofagus* spp.) and its relation to heterozygosity and height growth. *Forest Genetics*, **4**: 15-23
- Gallo LA, Marchelli P & Crego, P (2000) Hybridization dynamic between two southern beeches (*Nothofagus* spp.). XXI IUFRO World Congress, Kuala Lumpur, Malaysia. Abstracts book, Vol. 2: 43-44
- Gillet E (1994) Genetic Structures from Electrophoresis Data. version 1.0
- Gregorius HR (1974) On the concept of genetic distance between populations based on gene frequencies. IUFRO Meeting, Stockholm, S.02.04.1-3: 17-26
- Gregorius HR (1978) The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Mathematical Biosciences*, **41**: 253-271
- Gregorius HR & Roberds JH (1986) Measurement of genetical differentiation among subpopulations. *Theoretical and Applied Genetics*, **71**: 826-834
- Hamrick JL, Godt MJW & Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, **6**: 95-124
- Heusser CJ (1984) Late-glacial-Holocene climate of Lake District of Chile. *Quaternary Research*, **22**: 77-90

- Heusser CJ, Lowell TV, Heusser LE, Hauser A & Björn G (1996) Full-glacial-late-glacial paleoclimate of the Southern Andes: evidence from pollen, beetle and glacial records. *Journal of Quaternary Science*, **11**: 173-184
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**: 907-913.
- Konnert M & Bergmann F (1995) The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution*, **196**: 19-30.
- Le Corre V, Dumolin-Lapègue S & Kremer A (1997) Genetic variation at allozyme and RAPD locus in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Molecular Ecology*, **6**: 1-11
- Ledig FT (2000) Founder effects and the genetic structure of coulter pine. *The Journal of Heredity*, **91**: 307-315.
- Lennon JA, Martin ES, Stevens RA & Wigston DL (1987) *Nothofagus nervosa* (Phil) Dim et Mil.-The correct name for rauli, Chilean southern beech, (*N. Procera*). *Arboricultural Journal*, **11**: 323-332
- Leonardi, S & Menozzi, P (1995) Genetic variability of *Fagus sylvatica* L. in Italy: the role of postglacial recolonization. *Heredity*, **75**: 35-44
- Mantel NA (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**: 209-220
- Marchelli P, Gallo LA, Scholz F & Ziegenhagen B (1998) Chloroplast DNA markers revealed a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus*

- nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**, 642-646
- Marchelli P & Gallo LA (1999) Annual and geographic variation in seed traits of Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *Forest Ecology and Management*, **121**, 239-250
- Marchelli P & Gallo LA (2000) Genetic analysis of isozyme variants in open pollinated families of Southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *Silvae Genetica*, **4**, 90-98
- Marchelli P & Gallo LA (2001) Genetic diversity and differentiation in a southern beech subjected to introgressive hybridization. *Heredity*, **87**, 284-293
- Markgraf V, McGlone M & Hope G (1995) Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems- a southern perspective. *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 143-147
- Markgraf V, Romero EJ & Villagran C (1996) History and Paleoecology of South American *Nothofagus* forests. In TT Veblen, Hill RS & J Read (Eds.) *The ecology and biogeography of Nothofagus forests*. Yale University Press, New Haven & London: 354-386
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **70**, 3321-3323
- Pastorino, MJ & Gallo, LA (2002) Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis* a cypress native to the Andean-Patagonian Forest. *Journal of Biogeography*, **29**, 1167-1178

- Premoli AC, Souto CP, Rovere AE, Allnutt TR & Newton AC (2002) Patterns of isozyme variation as indicators of biogeographic history in *Podocarpus neriifolius* (D. Don) Florin. *Diversity and Distribution* **8**: 57-66
- Premoli AC, Kitzberger T & Veblen TT (2000) Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography*, **27**: 251-260
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995) GENEPOP: Population Genetics Software for exact tests and ecumenicism. *The Journal of Heredity*, **86**: 248-249
- Rieseberg, L.H. and Carney, S.E. (1998) Plant Hybridization. Tansley Review No 102. *New Phytologist*, **140**: 599-624
- SAS (1999) Language guide for personal computers. SAS Institute Inc.
- Stebbins, GL (1959) The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society*, **103**: 231-251
- Villagran C (1991) Historia de los bosques templados del sur de Chile durante el Tardiglacial y Postglacial. *Revista Chilena de Historia Natural*, **64**: 447-460
- Villagran C, Moreno P & Villa R (1995) Antecedentes palinológicos acerca de la historia cuaternaria de los bosques chilenos. In Armesto JJ, C Villagran & M Kalin Arroyo (Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 51-70
- Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations. Vol. 4 Variability within and among natural populations*. The University of Chicago Press, Chicago: 580 pp

25

Yeh F & Boyle T (1997) POPGENE: Microsoft Window-based Software for Population Genetics Analysis. Version 1.2

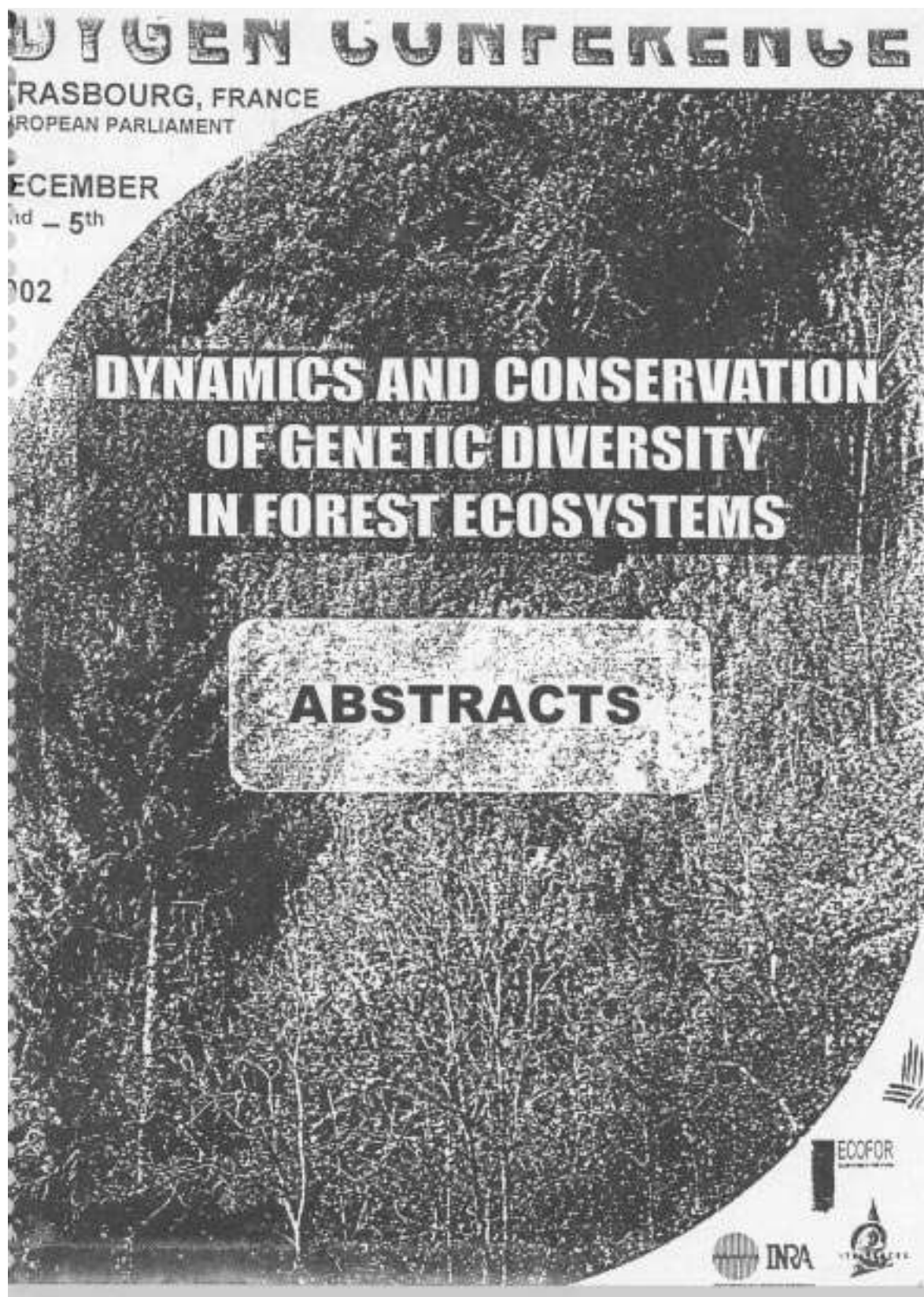
Table 1. Geographic location, designation and genetic diversity measures of *Neofagus nervosa* populations. N : mean number of seeds analysed per population, P : percent of morphic loci, A_{O} : mean number of alleles per locus, H_{O} and H_{E} : observed and expected heterozygosity (Nei, 1973), % Hybrids: percent of seeds with a hybrid genotype for each of the two specific markers.

Population Code	Population name	Watershed	Latitude	Longitude	N	P	A_{O}	v	H_{O}	H_{E}	% Hybrids
E1	Espejo chico	Espejo	40° 35'	71° 41'	115.3	75.0	1.88	1.20	0.16	0.16	0.8
H1	Pudú-Pudú	Hermoso	40° 22'	71° 28'	100.6	62.5	1.75	1.23	0.20	0.20	0
H2	Pentecosta Raül	Hermoso	40° 21'	71° 32'	115.6	75.0	1.88	1.13	0.11	0.11	0
L1	L. Escondido	Lácar	40° 11'	71° 33'	110.4	87.5	1.88	1.16	0.13	0.13	1.4
L2	Barroerras	Lácar	40° 09'	71° 21'	111.4	100	2.38	1.21	0.17	0.17	5.2
L3	Chidisk	Lácar	40° 09'	71° 29'	112.1	100	2.25	1.18	0.14	0.14	4.3
L4	Quilantahué	Lácar	40° 08'	71° 29'	112.2	62.5	1.75	1.23	0.16	0.16	0
L5	Hua Huan	Lácar	40° 10'	71° 40'	112.3	100	2.75	1.32	0.23	0.23	0.8
L6	L. Querú	Lácar	40° 10'	71° 46'	110.1	75.0	1.75	1.23	0.18	0.18	0
G1	Puerto Arturo	Lolog	40° 01'	71° 23'	110.8	75.0	1.88	1.15	0.14	0.14	4.5
G2	Playa Bonita	Lolog	40° 01'	71° 34'	113.3	62.5	1.75	1.18	0.13	0.13	0
G3	Boquete	Lolog	40° 01'	71° 35'	115.4	100	2.38	1.25	0.23	0.23	0.8
C1	Curruhue Grande	Curruhue	39° 51'	71° 29'	119.3	62.5	1.75	1.18	0.13	0.13	0
C2	Las Terras	Curruhue	39° 50'	71° 36'	118.6	75.0	1.88	1.23	0.16	0.16	0.8
C3	Puerto Canas	Curruhue	39° 47'	71° 30'	125.6	62.5	1.75	1.16	0.13	0.13	0
C4	Epulafquen Fondo	Curruhue	39° 48'	71° 36'	127.1	75.0	2.13	1.23	0.18	0.18	0
C5	Lanín	Curruhue	39° 42'	71° 34'	113.8	75.0	2.00	1.17	0.13	0.13	0
T1	Rio Turbio	Tromen	39° 36'	71° 20'	119.8	87.5	2.13	1.23	0.16	0.16	1.5
T2	Seccional	Tromen	39° 34'	71° 26'	109.6	62.5	1.75	1.22	0.15	0.15	0
T3	Rincón del Pá-Pul	Tromen	39° 25'	71° 23'	104.3	75.0	1.88	1.25	0.18	0.18	0.9
Mean							1.98	1.21	0.16		
St dev.							0.25	0.04	0.03		
NE	Neñame	Chile-Andes	39° 40'	71° 38'	108.4	100	2.25	1.17	0.15	0.15	0.9
MA	Mallabacalín	Chile-Andes	38° 43'	71° 55'	100.9	100	2.13	1.15	0.13	0.13	1.9
NA	Nahuelbuta	Chile-Coast	37° 40'	73° 15'	100.8	100	2.00	1.19	0.15	0.15	2.0
Mean							2.13	1.17	0.14		
St dev.							0.13	0.02	0.01		

Table 3: Genetic differentiation (δ) among populations within watersheds for the eight analysed loci and the gene pool.

Watershed	δ								
	<i>Mdh-B</i>	<i>Mdh-C</i>	<i>Ldh</i>	<i>Adh</i>	<i>Gpi-A</i>	<i>Gpi-B</i>	<i>Gpi-C</i>	<i>Pgi</i>	Pool
Hermoso (2)	2,8	0,4	25,4	0,0	43,5	2,6	1,8	0,0	9,6
Lácar (6)	9,1	1,8	4,2	1,2	5,6	8,2	8,4	1,5	5,0
Lolog (3)	18,4	0,5	13,1	1,3	7,8	3,9	4,0	0,3	6,2
Huechulafquen (3)	12,9	1,2	3,2	0,0	7,2	3,4	3,1	0,2	3,9
Tromen -Quilén (3)	16,3	0,5	3,6	0,0	5,9	3,3	3,2	0,4	4,2

Number in brackets denote number of analysed populations.



PA2-3 Crego, María Paula¹; Gallo, Leonardo Ariel^{1*};

¹INTA EEA Bariloche, Paraje Valleverde CC277, San Carlos de Bariloche (8400), Río Negro, Argentina

* indicates the presenting author(s)

LOCAL DYNAMIC OF INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION BETWEEN TWO SOUTHERN BEECHES (NOTHOFAGUS SPP.)

Natural hybridization constitutes one of the main sources of intra-generic genetic variation in forest tree species. The lack of species-specific genetic markers has been an important obstacle to study this evolutionary process and to understand its general and local dynamic. *Nothofagus nervosa* and *Nothofagus obliqua* are two sympatric southern beeches, native to southern South American temperate forests that hybridize naturally and for which two independent specific allozyme marker loci have been determined allowing the identification of F1 and backcrosses-hybrids. The main hybridization direction with *N. nervosa* acting as mother tree could be also verified. Although the general process has been already studied many aspects of local temporal and spatial dynamics of the inter specific hybridization are still unknown. Three adult trees of *N. nervosa* within *N. obliqua* forest, almost totally isolated from other co specific trees and with different sympatry degree were selected. Genotypes of them and of the up to 100 m surrounding saplings (84, 129, 64) were determined. In two of the mother trees, seeds from two and three consecutive harvest years were also genetically identified. Significant differences resulted from the comparison among the genotypic structures of the three groups of saplings analyzed, particular in the proportions of the respective F1-hybrids (8.33, 1.55, 0.00). Also the proportion of hybrid seeds varied between both mother trees analyzed and among harvest years within each tree (e.g. 77-22%). The proportion of hybrids detected in the seed of all harvest years was bigger than that of the hybrid saplings from the corresponding mother tree. This difference is bigger in the case of F1-hybrids (up to ten times) than for the backcrosses-hybrids. These results indicates that the realization of natural hybridization at individual level between these *Nothofagus* spp. depends greatly on the particular site conditions of the respective *N. nervosa* mother tree (e.g. sympatry degree) and the climatic conditions of the corresponding year. Natural selection against F1-hybrids is much more greater than against backcrosses-hybrids confirming the general prediction previously postulated in the proposed hybridization model.

PA4-8 MARCHELLI, PAULA^{1*}; AZPILICUETA, MARÍA MARTA¹; GALLO, LEONARDO ARIEL¹;

¹INTA EEA BARILOCHE, CC 277, BARILOCHE, 8400, ARGENTINA

* indicates the presenting author(s)

JOINT ANALYSIS OF POST-GLACIAL MIGRATION IN TWO SOUTHERN BEECHES (NOTHOFAGUS SPP.)

The genus *Nothofagus* is the principal component of southern South America Temperate Forest, which lies on both sides of the Andes Cordillera (Chile and Argentina). The modern distribution area of these forests was highly affected during Quaternary ages by glacial movement and climatic changes. As opposite to what happened in the Northern Hemisphere, glaciation in the South left many ice-free areas, where glacial refuges could have been located. Assuming a common life history, joint analysis of two inter-fertile important species, *Nothofagus nervosa* and *Nothofagus obliqua*, was carried out. Chloroplast DNA genetic markers were detected in 25 and 10 populations respectively using two primers (trnD-trnT and trnF-trnV) and two restriction enzymes through a PCR-RFLP technique. Five haplotypes were observed in both species from the three primer-enzyme combinations analysed. The geographic distribution of these haplotypes was highly structured independently of the species. In the sympatric areas on the eastern slope of the Andes the same two haplotypes were observed in both species defining two clearly separated geographic groups. Haplotype IV was present in only one population of *N. nervosa* from Chile located between the two groups. Two Pacific coastal populations of *N. nervosa* had each a different haplotype (haplotypes III and V) which in turn were not found among the other populations. These results suggest the existence of multiple common ice age refugia where both species survived the glacial period. Moreover, the extant populations in Argentina and those from the Andes in Chile are not the result of a post-glacial migration from coastal refuges as proposed in previous palynological studies. In the southern group only one population located west of the Andes showed the same haplotype than those to the east. Given the larger distribution of haplotype I in Argentina, we suggest that some of the glacial refugia must have been situated east of the Andes. Since most frequent haplotypes are shared by both species a long term hybridisation and introgression process could be assumed.

ISSN: BAG 1666-0390

BAG

REVISTA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENETICA / JOURNAL OF THE ARGENTINE SOCIETY OF GENETICS

JOURNAL OF

BASIC & APPLIED GENETICS

(Formerly MENDELIANA)

ACTAS

XXXI CONGRESO ARGENTINO DE GENETICA

La Plata, 17 - 20 Septiembre de 2002

RESUMENES

CONFERENCIAS

SIMPOSIOS

CURSOS

TALLERES

COMUNICACIONES LIBRES

VOLUME XV
(SUPPLEMENT)

SEPTEMBER 2002

BUENOS AIRES
ARGENTINA

GPE 1P

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD Y DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE *Avena barbata* MEDIANTE ISOENZIMAS, RAPD E ISSR

*Guma, Irma Rosana¹ y García, Pedro². ¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, CC 276 (7620) Balneario. ²Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, (24071) León, España. e-mail: rosanaguma@yahoo.com.ar; degpgg@unileon.es.

Avena barbata es una gramínea tetraploide anual, predominantemente autógama, originaria del Mediterráneo y naturalizada en distintas regiones de Argentina, para la que se han descrito ecotipos caracterizados por combinaciones multilocus específicas para loci isoenzimáticos.

Con el objetivo de comparar los resultados del análisis de isoenzimas y de marcadores de ADN para el estudio de la variabilidad y la estructura genética, se evaluaron 12 poblaciones mediante 9 sistemas isoenzimáticos y marcadores RAPD e ISSR obtenidos utilizando 10 y 5 oligonucleótidos respectivamente. La similitud entre las poblaciones se estimó mediante el índice de Hedrick y la estructura genética fue analizada usando los parámetros propuestos por Nei.

Los marcadores RAPD e ISSR fueron más polimórficos, permitiendo detectar variación en poblaciones monomórficas para isoenzimas. Proporcionaron el mismo tipo de información en cuanto al polimorfismo y a las relaciones entre las poblaciones, pero la correlación entre los resultados obtenidos con marcadores de ADN e isoenzimas fue baja.

La distribución de la variación dependió del marcador utilizado, para loci isoenzimáticos la mayor contribución a la variabilidad total correspondió a la variación interpoblacional y para RAPD e ISSR a la intrapoblacional. Por ello, para estudiar la estructura genética de las poblaciones deberían usarse diferentes tipos de marcadores.

GPE 2

DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE VARIETADES DE *Acacia caven* (FABACEAE), MEDIANTE LA TÉCNICA DE RAPD

Carolina L. Pomeri*, Paola V. Cavia, Juan C. Vilardi, Beatriz O. Saidman. Depto. Ecología, Genética y Evolución, Fac. Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1428 Buenos Aires. vilardi@bg.fcen.uba.ar

Acacia caven (Ser. Gumíferas), conocida como churqui o caven, tiene una amplia distribución en áreas áridas y semáridas de la Argentina. Cumple un importante papel ecológico y tiene diversos usos para las economías regionales. Para esta especie se han descrito en ella cuatro variedades en función de la morfología del fruto. En este trabajo se analizó la diferenciación genética entre 5 poblaciones naturales argentinas de 2 variedades (*A. Caven* var. *caven* y *A. Caven* var. *dehiscens*) por medio de la técnica de RAPD. Con 3 cebadores arbitrarios se detectaron 25 bandas, que presentaron alta variabilidad dentro ($H = 0.20-0.35$) y entre ($F_{ST} = 0.32$) poblaciones. Las relaciones fenéticas entre ellas se analizaron por medio de un fenograma (Neighbor Joining) a partir de las distancias genéticas de Nei. Contrariamente a lo esperado, en el mismo no se agruparon las poblaciones pertenecientes a una misma variedad. De acuerdo con la prueba de Mantel, las matrices de distancias genéticas y geográficas están altamente correlacionadas ($P < 0$). Los resultados obtenidos sugieren un escaso intercambio genético entre las poblaciones analizadas ($N_m = 0.53$) y que la diferenciación genética entre las mismas puede explicarse mejor por un modelo de aislamiento por distancia que por criterios taxonómicos.

GPE 3

P

VARIACIÓN GENÉTICA ALOZÍMICA COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO PARA LA CONSERVACIÓN E INTERPRETACIÓN EVOLUTIVA DE LOS BOSQUES DE *Nothofagus obliqua* (MIRB.) OERST. EN ARGENTINA

Azpilicueta, M. M.*; Gallo L. A. Unidad de Genética Forestal, INTA EEA Bariloche, CC 277, 8400 Bariloche, Río Negro, Argentina. e-mail: mmazpilicueta@bariloche.inta.gov.ar

Para establecer pautas regionales de conservación y manejo en los bosques de *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. "Roble Pellín" es necesario conocer el grado y patrón de distribución de su variación genética. A partir de 6 loci marcadores isoenzimáticos (Skdh - Idh-B - Adh - Pgm-A - Got-B y Got-C) se llevó a cabo un estudio de variación genética en 14 poblaciones argentinas de esta especie. Los resultados hallados muestran que las poblaciones ubicadas al este de la distribución presentan los mayores valores de multiplicidad (A_p) y diversidad alélica (v) para el pool génico así como la presencia exclusiva de cuatro alelos raras. Esto no coincide con el patrón de distribución geográfica fragmentada de la especie que sugeriría "a priori" una mayor variación en sentido latitudinal. La

conservación debería pues orientarse hacia aquellas poblaciones de mayor nivel de variación genética dentro de cada cuenca. Los resultados abren un nuevo interrogante en cuanto al origen de las poblaciones de Roble Pellín en Argentina, ya que la hipótesis tradicional de refugios glaciares ubicados al oeste de la distribución, sobre la Cordillera de los Andes no explicaría lo observado en el presente estudio.

GPE 4

EFFECTO DE LA DERIVA GENÉTICA EN POBLACIONES MARGINALES AISLADAS DE "CIPRÉS DE LA CORDILLERA" (*Austrocedrus chilensis* (D.DON) PIC. SER ET BIZZARRI)

Pastorino, Mario* y Gallo, Leonardo. Unidad de Genética Forestal - INTA EEA Bariloche - CC277 (8400) Bariloche. e-mail: mpastorino@bariloche.inta.gov.ar - lgallo@bariloche.inta.gov.ar

La fragmentación y el aislamiento caracterizan a las poblaciones más orientales de *Austrocedrus chilensis*, constituidas por pequeños bosquetes ubicados en la cumbre de cerros rocosos en una matriz general de estepa.

La unidireccionalidad del vector de polinización (viento) y el reducido número de individuos permiten suponer que bosquetes vecinos sean genéticamente disímiles pese a que su cercanía presupone una presión de selección semejante y una historia de vida común.

Para probar esta hipótesis se cosecharon árboles individuales de dos bosquetes compuestos por unos 150 individuos adultos cada uno separados por una distancia de 1.200 m, situados a 70 km al este de Bariloche (41° 13' S, 70° 42' W). A través del análisis electroforético de endospermas se genotipificaron los árboles madres en base a 12 marcadores isoenzimáticos.

La distancia genética entre estas dos poblaciones vecinas ($d_g = 0,126$) resultó ser muy alta en referencia a las calculadas entre poblaciones geográficamente distantes. Incluso, alelos frecuentes en una población no fueron encontrados en la otra (tal es el caso de Mdh2-72, Got1-97y Got3-50). Se concluye que en *Austrocedrus chilensis* la deriva genética combinada con una alta restricción al flujo génico interpoblacional puede conducir a niveles de diferenciación elevados entre poblaciones esteparias vecinas.

GPE 5P

VARIACIÓN TEMPORAL EN LA HIBRIDACIÓN NATURAL ENTRE *Nothofagus nervosa*, RAULÍ (PHIL.) DIM. ET. MIL. Y *Nothofagus obliqua*, ROBLE PELLÍN (MIRB.) OERST.

Crego, María Paula*; Gallo, Leonardo Ariel. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Bariloche, e-mail: pcrego@bariloche.inta.gov.ar

El estudio de la existencia de variación temporal en el sistema de apareamiento permitiría comprender mejor la dinámica del proceso de hibridación natural entre Raulí y Roble pellín.

Con tres marcadores génicos isoenzimáticos, dos especie específicos, se analizó la progenie natural en por lo menos dos años, de tres árboles de Raulí (árboles madre) rodeados completamente por árboles de Roble pellín.

Con marcadores génicos isoenzimáticos fue posible monitorear la proporción de híbridos en muestras de semillas de los árboles madre. Todas las progenies mostraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los distintos años en al menos 1 locus. Los parámetros genéticos diversidad y diferenciación variaron según el año analizado, y las distancias genéticas entre los distintos años oscilaron entre 0,03 a 0,28. Las frecuencias alélicas fueron también significativamente diferentes al ser analizadas las progenies de los tres árboles para un mismo año, lo cual indica variación espacial entre los individuos analizados. Dicha variación estaría también indicada por la diferente proporción de híbridos encontrada entre éstos tres individuos. Estos resultados confirman la existencia de variación temporal en el sistema de apareamiento y que ésta afecta la proporción de híbridos generados en cada año y consecuentemente su reclutamiento posterior en el bosque.

GPE 6

PATRONES DE DIFERENTES NIVELES DE VARIACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE RAULÍ (*NOTHOFAGUS NERVOSA*)

Paula Marchelli* y Leonardo Gallo**. Unidad de Genética Forestal-INTA EEA Bariloche. CC 277, 8400 Bariloche. *CONICET- **INTA. e-mail: lgallo@bariloche.inta.gov.ar

La distribución natural del Raulí, *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil., en Argentina es reducida y se halla fragmentada sobre un paisaje montañoso. Está restringida a las cuencas lacustres que se extienden en general en sentido Oeste-Este, y sujeta a la unidireccionalidad de los fuertes vientos en el mismo sentido lo que sugiere "a priori" una fuerte

variación genética en sentido latitudinal. En 20 poblaciones de esta especie se analizaron características seminales, isoenzimáticas y de ADN de cloroplasto y se interpretó los patrones de variación encontrados con los probables procesos genéticos y evolutivos que los originaron.

La variación detectada es considerablemente alta tanto a nivel espacial cuanto temporal. Se encontró una contundente diferenciación genética latitudinal en el genoma cloroplástico y en menor medida en el peso de las semillas. Los marcadores génicos isoenzimáticos variaron también en sentido longitudinal. El análisis conjunto sugiere la ocurrencia de refugios interglaciales sobre la vertiente oriental de la Cordillera de los Andes, la existencia de un flujo génico unidireccional y la gran importancia del proceso de hibridación natural con *N. obliqua*. Estos resultados son importantes en la conservación y utilización de los recursos genéticos de esta especie.

GPE 7

P

ESTUDIO DE LA AGRESIVIDAD EN POBLACIONES Y CLONES DE SCHIZAPHIS GRAMINUM (RONDANI) (HEMIPTERA: APHIDIDAE), RECOLECTADOS EN ARGENTINA Y CHILE

*Kahan, Andrea Edith¹, Prado, Ernesto² y Castro, Ana María³ ¹Curso de Zoología Agrícola, CONICET y Curso de Genética, Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 119 CC 31 CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina. ²INTA La Plata, Santiago, Chile. e-mail: akahan@correa.agro.unlp.edu.ar

Schizaphis graminum (Rondani), es una plaga cosmopolita de gran importancia económica que produce alteraciones permanentes en las plantas. Posee biotipos adaptados a alimentarse en distintas especies o variedades de una misma especie hospedera, manifestando diferente grado de virulencia. La variación en su agresividad, determina la intensidad de daño, que se explica por aumento del número de copias de genes involucrados en la interacción con sus hospedantes.

El objetivo de este trabajo es determinar la variabilidad genética y heredabilidad de la agresividad de *S. graminum*, mediante la inhibición en el Crecimiento Recto del Coleoptilo, de un huésped susceptible. Se analizaron 43 clones seleccionados de seis poblaciones argentinas y una chilena, criados bajo condiciones naturales en La Plata. Se calcularon las tasas de crecimiento en las plantas testigos e infestadas por

los distintos clones. El efecto ambiental se estimó a partir de la variación en el crecimiento de los coleoptilos testigos. La varianza genética total (VG) resultó muy alta y la heredabilidad (H) fue significativamente elevada ($H=0.9574$). La población Malargüe resultó tener la máxima VG ($H=0.968$), y Tucumán la mínima VG ($H=0.894$). Estos parámetros permitirían establecer que la agresividad estaría genéticamente determinada, con una amplia variabilidad dentro y entre las poblaciones del áfido.

GPE 8

P

ESTUDIOS DE ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA MOSCA DEL MEDITERRÁNEO (CERATITIS CAPITATA WIED.) EN ARGENTINA, CON RAPD

Petit Marty, Natalia¹; Lanzavecchia, Silvia¹; Vilardi, Juan C.²; Cladera, Jorge L.³ y Zandomeni, Rubén¹. ¹Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CNIA, INTA, De Los Rostros y Las Cabañas s/n (1712), Castellar, Buenos Aires; ²Instituto de Genética "El Favre", CNIA, INTA, Castellar, Buenos Aires; ³Depto. de Ecología, Genética y Evolución, FCEyN, UBA. e-mail: *npetit@cnia.inta.gov.ar

Ceratitis capitata Wied. (Diptera: Tephritidae) es una especie de amplia dispersión mundial que infesta una gran variedad de frutales, produciendo daños económicos importantes en los cultivos. En Argentina existen programas regionales de erradicación de esta plaga, y se han obtenido reducciones poblacionales significativas por medio de la Técnica del Insecto Estéril. Mediante la caracterización molecular de las poblaciones de *C. capitata* en Argentina se busca determinar el origen geográfico de nuevas infestaciones en zonas libres o en vías de erradicación. Con el fin de detectar diferencias entre las poblaciones y estudiar la estructura poblacional de la plaga en el país, el ADN de 280 moscas de 40 sitios de muestreo (pertenecientes a 16 provincias) fue amplificado mediante la técnica de RAPD, con 11 primers (productores de patrones de bandas polimórficos para la especie). Sobre los resultados del cálculo del índice F_{st} por locus ("bandas"), se definieron 35 loci ($F_{st} > 0.05$, $P < 0.05$, $N_m < 4.5$), representados por bandas bien diferenciadas y repetibles. En la evaluación de las diferencias entre poblaciones dentro de regiones y entre regiones, se detectaron 9 grupos de poblaciones que se diferencian significativamente con 11 de los 35 loci estudiados ($F_{st} = 0.307$, $F_{ec} = 0.088$, $F_{ct} = 0.241$; $P < 0.01$).

ISSN: BAG 1666-0390

BAG

REVISTA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENETICA / JOURNAL OF THE ARGENTINE SOCIETY OF GENETICS

JOURNAL OF

BASIC & APPLIED GENETICS

(Formerly MENDELIANA)

ACTAS

XXX CONGRESO ARGENTINO DE GENETICA

IV JORNADAS ARGENTINO URUGUAYAS DE GENETICA

Mar del Plata, 16 - 19 Septiembre de 2001

RESUMENES

CONFERENCIAS

SIMPOSIOS

MESAS REDONDAS

COMUNICACIONES LIBRES

VOLUME XIV
NUMBER 2 (SUPPLEMENT)

SEPTEMBER 2001

BUENOS AIRES
ARGENTINA

de los cuales 199 fueron polimórficos. El dendrograma obtenido mostró que las poblaciones de la misma especie se agrupaban formando grupos con altos coeficientes de similitud. El análisis de coordenadas principales mostró dos subgrupos claramente diferenciados: 1) *B. bidensata* y sus posibles ancestros *B. darwini* y *B. linearifolia*, los cuales conformarían un complejo híbrido homogámico y 2) *B. basifolia*, *B. heterophylla* y *B. parvifolia*, los cuales conformarían un complejo híbrido poliploide. Se encontró una congruencia significativa ($P < 0.01$) entre las clasificaciones de poblaciones a partir de las bandas de AFLP, datos morfológicos (0.5484) y bandas de proteínas seriales totales (0.4184).

GPE30

ESTUDIOS PARALELOS DE VARIACIÓN CLINAL EN RAZAS NATIVAS DE MAÍZ (*Zea mays*): FRECUENCIA DE CROMOSOMAS B Y Loci MICROSATELITES

Lia, Verónica Viviana ^{1,2}, Confalonieri Viviana Andrea ^{1,2}, Naranjo, Carlos Alberto ^{1,3} & Poggio, Lidia ^{1,2,3}. ¹ Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³ CIGEN (CONICET-CIC-UNLP). Verolia@ig.fcen.uba.ar

El género *Zea* presenta variación intra e interespecífica en el contenido de ADN. La diferencia en la cantidad de heterocromatina y/o presencia de cromosomas B contribuyen a esta variación. El estudio de razas nativas ubicadas a lo largo de un gradiente altitudinal reveló la existencia de una correlación negativa entre número de knobs y altitud y entre knobs y Bs, lo cual sugiere que dichas secuencias heterocromáticas podrían tener significado adaptativo. Con el objeto de analizar la dinámica poblacional sobre la clina y poner a prueba el valor selectivo de las mencionadas variables se estudió la diversidad genética en 5 loci microsateélites independientes. El número máximo de alelos por locus fue 5 y la heterocigosis esperada osciló entre 0.285 y 0.512, siendo la población de mayor altura la menos variable, probablemente debido a su condición marginal. En los loci polimórficos (4/5) entre 1 y 2 alelos exhibieron variación clinal en sus frecuencias. Los valores de distancia genética de Nei sugieren una tendencia al aumento de la diferenciación entre poblaciones altitudinalmente más alejadas. Se discute el flujo génico observado en relación con los procesos evolutivos que manifestarían la variación clinal a nivel molecular y cromosómico.

GPE31

VARIABILIDAD MOLECULAR DEL ESPACIADOR INTRAGENICO RIBOSOMICO ITS1 EN EL GÉNERO *Merluccius* spp.

Montse, P.¹, Trucco, M.L.², Presa, P.¹ y Leira-Samartín, F.². ¹ Universidad de Vigo, Facultad de Ciencias, Ingeniería Genética, 36200, Vigo, Spain. ² Universidad Nacional de Mar del Plata, Genética-FCEyN 7600, Mar del Plata, Argentina. ³ ANFACO-CECOPECA, Área de Biotecnología, Microbiología y Tuxinas, Marcosende, 3631B, Vigo, Spain. montse@uvigo.es; trucco@mdp.edu.ar; presa@uvigo.es; leira@anfaco.es

La filogenia molecular del género *Merluccius* es útil para explicar la dinámica de sus pesquerías y para diseñar técnicas de control comercial. Las relaciones filogenéticas entre los taxones americanos, y el grado de aislamiento entre especies no están claros. A partir de la secuencia del espaciador ribosómico ITS1, hemos analizado distintos parámetros de su variación racientífica y filogenética. Las especies *M. merluccius*, *M. australis*, *M. hubbsi* y *M. bilinearis* se diferencian en %GC (60.1, 62.1, 63.4 y 61.6) y en ph de longitud (553, 535, 529 y 536) respectivamente, y en la distribución nucleotídica. Las mayores distancias genéticas se observan entre *M. hubbsi* y *M. merluccius* (0.067) y las mínimas entre *M. australis* y *M. hubbsi* (0.027). La reconstrucción filogenética sustenta dos agrupamientos, el Euro-Africano (Atlántico Oriental) y el Americano (Atlántico Occidental y Pacífico), y sitúa a *M. bilinearis* como especie ancestral Americana, de acuerdo con datos previos de mtDNA y aloenzimas. El estudio de la filogenia interna del género *Merluccius* es aplicable a la explotación y conservación de las pesquerías. El análisis de la secuencia del ITS1 permitirá el desarrollo de una técnica de diagnóstico genético de productos comerciales de merluces, basada en la restricción de sitios específicos.

Este estudio está financiado por la XUNTA DE GALICIA (PGIDT00MAR02E), INIA (RZ00/020) y la beca predoctoral del Ministerio Español de Ciencia y Tecnología de MP (MT99/236122076).

GPE32

VARIACIÓN TEMPORAL EN EL SISTEMA DE APAREAMIENTO DE *Nothofagus nervosa*

Marchelli, P.¹ y Gallo, L.A. Unidad de Genética Forestal, INTA EEA Bariloche, CC 277 (8400) San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina. Email: pmarchelli@bariloche.inta.gov.ar; lgallo@bariloche.inta.gov.ar

La variación temporal en el sistema de apareamiento en una población de una especie longeva puede influir en su desarrollo evolutivo a través de cambios estructurales en la composición genética de su descendencia. Cuantificar dicha variación es de fundamental importancia antes de realizar generalizaciones sobre su diversidad y diferenciación genéticas y su potencialidad evolutiva.

En *Nothofagus nervosa*, Raulí, especie arbórea nativa de los Bosques Andino-Patagónicos, la periodicidad verificada en la producción de semillas sugiere diferencias anuales en el número efectivo de la población parental lo que implicaría variación temporal en el sistema de apareamiento.

Para poner a prueba esta hipótesis, se analizó la estructura genética de las semillas producidas por nueve poblaciones de Raulí, en dos años distintos, mediante la utilización de ocho marcadores genéticos isoenzimáticos previamente determinados.

Todas las poblaciones mostraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de los distintos años en al menos un locus. A su vez, los parámetros genéticos de diversidad y diferenciación calculados también variaron según el año analizado, siendo las distancias genéticas significativamente distintas entre años y la diversidad mayor en los años de mayor producción seminal.

Los resultados resaltan la variación temporal en el sistema de apareamiento y la importancia de utilizar semillas de un año de producción abundante en estudios de caracterización genética de una especie.

GPE33

P

- **ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. A TRAVÉS DE MARCADORES GÉNICOS ISOENZIMÁTICOS** Azpilicueta, María Marta*; Gallo, Leonardo Ariel. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Bariloche. E-mail: mmazpilicueta@bariloche.inta.gov.ar

La realización de estudios de genética poblacional confiables exige la utilización de marcadores genéticos. Solo con ellos es posible analizar los patrones de variación genética e inferir los procesos evolutivos presentes y pasados que forman la base de conocimiento para la implementación de programas de conservación y mejoramiento.

En angiospermas arbóreas longevas el análisis cuantitativo de la segregación de marcadores codominantes como las isoenzimas requería de la complicada reali-

zación de cruzamientos controlados. En el presente estudio de caracterización genética de *Nothofagus obliqua*, Roble Pellín, a través de marcadores isoenzimáticos y de ADN de cloroplasto, se realiza la determinación previa de los marcadores genéticos isoenzimáticos a través del método de Gilles y Hamester (1989), que permite trabajar con familias de medios hermanos.

De los 12 sistemas isoenzimáticos analizados hasta la fecha, siete presentaron polimorfismo. El análisis realizado muestra ya en esta primera etapa la producción de semilla con fenotipo híbrido entre Roble y Raulí (*N. nervosa*) en poblaciones marginales de la primera especie. La independencia en la segregación de alelos especie-específico determinados anteriormente y la ocurrencia de individuos adultos híbridos en una población aislada de Roble sin presencia de Raulí, sugiere un proceso de intragénesis de larga data.

GPEM

P

ESTUDIO DE RELACIONES FILOGENÉTICAS EN VECTORES DE *Trypanosoma cruzi* MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN DE GENES MITOCONDRIALES

Maura Laura Valeria y Graciela Beatriz Alicia*. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, CC 35 SUC. 16, 5016 Córdoba, hgarcia@biomed.uncor.edu

Con el propósito de estudiar las relaciones filogenéticas de insectos de la subfamilia Triatominae, se analizaron veinticinco especies. Quince del género *Triatoma* pertenecientes al complejo *infestans* (*T. infestans*, *T. guayanae*, *T. ovalis*, *T. platensis*, *T. brasiliensis*, *T. rubicincta*, *T. vitticeps*, *T. delongi*, *T. maculata*, *T. patagonica*, *T. maroccanensis*, *T. pseudomaculata*, *T. tibiamaculata*, *T. williamsi* y *T. garcinbesi*), seis miembros del mismo género pero de diferentes complejos (*T. circummaculata*, *T. dimidiata*, *T. protracta*, *T. mazzottii*, *T. pallidipennis* y *T. rubida*) y como posibles extragrupos para el análisis se utilizaron cuatro especies de distintos géneros. Se secuenciaron fragmentos de ADN mitocondrial de los genes ribosomales 12S y 16S en cada una de esas 25 especies y del gen Citocromo Oxidasa I en 9 de ellas.

Todos los árboles filogenéticos obtenidos, a partir del análisis individual y combinado de genes, revelaron una estrecha relación entre: a) *T. pseudomaculata* y *T. maculata*; b) *T. yordana*, *T. garcinbesi* y *T. maroccanensis*; c) *T. infestans*, *T. platensis* y *T.*



EEA Bariloche

Dr. Leonardo Gallo, Unidad de Genética Forestal,
C.C. 277, 8400 Bariloche, Patagonia, Argentina.
TEL.: 0024 (02944) 422731 / 425862 / 425863.
FAX: 0054 (02944) 424091
e-mail: lgallo@bariloche.inta.gov.ar

San Carlos de Bariloche, 15 de abril de 2002.

Informe "Población Pilo-III"

La especie leñosa *Nothofagus obliqua*, conocida por su nombre vulgar como Roble Pellín constituye en Sudamérica y junto a otras especies del mismo género, los bosques templados de *Nothofagus*. La distribución del Roble Pellín en nuestro país se caracteriza por ser de tipo fragmentada, con una extensión latitudinal que abarca los 36° 49' S en Las Lagunas de Epulafquen hasta los 40° 10' en Quila Quina, cuenca del Lago Lácar. Esta especie ha sido sobre explotada en el pasado debido a su alto valor maderero, por lo que sus bosques se hallan en un grave peligro de extinción, como también de pérdida de diversidad genética, característica clave para la supervivencia de estas masas boscosas.

Dentro de la distribución de esta especie en nuestro país, existe una población muy particular localizada a orillas del Río Aluminé, en la Provincia de Neuquén, que hemos denominado Población Pilo-III. Esta población, que se ubica dentro de la propiedad Estancia Las Breñas. Su posición geográfica tomada por GPS corresponde a 39° 30' 05" latitud sur y 70° 57' 44" de longitud oeste. Se adjunta un Mapa de la distribución natural de Roble Pellín y Raulí, donde se identifica la ubicación de la población Pilo-III.

Entre las particularidades de esta población se destacan las siguientes:

- Es la población de Roble que se introduce más hacia la estepa, de manera tal que se localiza en la zona conocida como de ecotono.
- Si bien el rango de precipitaciones de crecimiento del Roble Pellín es de 1200 a 3500 mm anuales en Argentina, esta masa boscosa de Pilo-III se ubica dentro de la isoyetas de 800 y 1000 mm respectivamente, por lo que se diferencia notablemente en este sentido del resto de las poblaciones de Roble.
- El grado de aislamiento geográfico que presenta es muy alto, ya que se ubica a 27,3 km de la población de Roble más cercana.
- Recientes estudios genéticos realizados en el Laboratorio de Marcación Molecular de INTA EEA-Bariloche, han demostrado que esta población presenta además una estructura genética diferente a la del resto. Particularmente interesante resulta la presencia de individuos híbridos con Raulí.

Sobre la base de todo lo expuesto consideramos que la población en cuestión o parte de ella amerita ser considerada como Área Protegida para preservar la diversidad genética que la caracteriza y las particularidades ecológicas que la destacan.

Sin más, aprovechamos la oportunidad para saludarlos muy atentamente.

Ing. Fial. María Marta Azpilicueta
Dr. Leonardo Gallo

Unidad de Genética Forestal
INTA EEA Bariloche

