



**Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche**

**“Biología reproductiva de *Nothofagus*, con  
especial referencia *N. obliqua* (Mirb.) Oerst.  
(roble pellín) y *N. nervosa* (Phil.) Krasser (raulí)”**

**Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en  
Biología**

**Tesista:** Lic. Cristian Daniel Torres

**Director:** Dr. Javier Guido Puntieri

**Octubre 2012**

## Resumen

*Nothofagus obliqua* y *N. nervosa* son dos especies de los bosques templados de Sudamérica de principal interés ecológico y económico. El conocimiento de la biología reproductiva de estas especies es relevante desde puntos de vista práctico y teórico, aunque el mismo es todavía escaso. En el presente trabajo se plantea, para ambas especies mencionadas, relacionar la producción de flores y semillas con sus parámetros arquitecturales básicos e indagar acerca de los aspectos que condicionan la producción de semillas viables. Particularmente, se propuso analizar: la distribución de las flores en el sistema de ejes y su relación con la producción de semillas viables, la periodicidad de producción de flores, la fenología floral, los grados de auto-incompatibilidad y auto-interferencia, y la compatibilidad inter-específica en ambos sentidos de cruzamiento.

(Cap. II) Para ambas especies, se compararon las producciones de flores y semillas viables entre brotes anuales de tamaños contrastantes y correspondientes a distintas categorías de ejes. Para brotes anuales derivados de ramas principales, secundarias y cortas se evaluaron los números de nudos, inflorescencias estaminadas, inflorescencias pistiladas y yemas axilares, y la viabilidad de las semillas producidas. El número de flores de cada tipo se relacionó positivamente con el número de nudos de los brotes. Brotes largos tienen proporcionalmente más inflorescencias pistiladas que brotes cortos. Las tres categorías de ejes producen ambos tipos de flores en proporción directa con el tamaño de sus brotes, pero brotes de ramas principales presentan más yemas axilares vegetativas que brotes de ramas secundarias y cortas. Para *N. obliqua*, el porcentaje de viabilidad de las semillas derivadas de ramas secundarias resultó algo menor que el de las derivadas de ramas principales y cortas, quizá por ser menor la probabilidad de polinización cruzada en las primeras.

(Cap. III) En ejemplares juveniles-adultos de *N. obliqua* se evaluó la viabilidad de semillas en relación a la posición de las flores en los brotes anuales y a la altura de las ramas floríferas. La posición de las flores pistiladas dentro del brote florífero no afecta su probabilidad de generación de semillas viables. Sí se observan notables diferencias en el porcentaje de semillas viables entre ramas altas y ramas bajas. Estas diferencias no estarían relacionadas con aspectos morfológicos de los brotes, sino con diferencias en las probabilidades de polinización. Asimismo, existen grandes diferencias inter-individuales en la producción de semillas viables.

(Cap. IV) En ramas principales de ambas especies se realizaron análisis retrospectivos mediante la identificación de cicatrices de flores y estructuras vegetativas sobres los ejes, para observar la variación inter-anual en la producción de flores. En dichas ramas, años de alta y baja producción de flores son más frecuentes que años de producción intermedia. En años de alta floración, entre 30 y 55% de los nudos de los brotes son floríferos mientras que en años de baja floración menos del 5% de los nudos son floríferos. La periodicidad de floración varió entre individuos, observándose ejemplares con producción de flores intermedia o alta en años sucesivos y ejemplares con un año de floración intermedia o alta precedido y seguido por años de producción

muy baja o nula. La variación inter-anual de la producción de inflorescencias estaminadas y pistiladas fue muy similar en *N. obliqua*, y algo mayor para las inflorescencias pistiladas en *N. nervosa*; esto último puede relacionarse con el mayor costo meristemático que representan las flores pistiladas en *N. nervosa*. La producción de flores en los brotes del eje principal de las ramas se relacionó positivamente con la producción de flores de los brotes laterales. El grado de similitud en la producción de flores entre los brotes del eje principal y los de los brotes laterales varió en relación al tamaño de los primeros.

(Cap. V) La fenología floral en *Nothofagus* ha sido poco estudiada hasta el momento, desconociéndose aspectos básicos tales como el período de receptividad de las flores pistiladas. Utilizando ramas floríferas de *N. obliqua* colocadas en hidroponia, se aplicaron polinizaciones manuales en distintos momentos a partir de la antesis (momento a partir del cual los estigmas quedan expuestos a la llegada de polen) a fin de determinar el período de receptividad de estas flores. Posteriormente se analizó la germinación de los granos de polen en los estigmas. En ejemplares de vivero de *N. obliqua*, *N. nervosa* e híbridos entre ambas especies, se realizaron observaciones fenológicas determinando fases de maduración de las flores estaminadas y los momentos de antesis de las flores pistiladas. Utilizando ramas en hidroponia se evaluó el efecto de la temperatura y la humedad sobre la velocidad de maduración de las flores estaminadas. Las flores pistiladas de *N. obliqua* estarían receptivas desde el momento en que la hoja tectriz permite la exposición de los estigmas (antesis), pudiendo mantenerse receptivas hasta por 15 días. Existiría un período de máxima receptividad entre tres y seis días después de la antesis. A partir del despliegue de las flores estaminadas hasta la liberación de polen transcurrieron aproximadamente 30 días. En cada árbol, la antesis de la mayoría de las flores pistiladas antecedió al momento de liberación de polen. La humedad y temperatura tienen efectos significativos y antagónicos sobre la velocidad de maduración de estas flores. En los brotes anuales existiría alta probabilidad de solapamiento entre la liberación de polen y la receptividad de las flores pistiladas.

(Cap. VI) Las especies aquí estudiadas son auto-incompatibles. Asimismo existe cierto grado de compatibilidad inter-específica, evidenciado por la presencia de híbridos en poblaciones naturales. Poco se conoce sobre los mecanismos de auto-incompatibilidad, el grado de interferencia sobre la polinización cruzada y el grado de compatibilidad inter-específica en ambos sentidos de cruzamiento. En ejemplares *N. obliqua* y *N. nervosa*, se analizaron estos aspectos mediante polinizaciones manuales y evaluaciones de la germinación del polen en los estigmas y la viabilidad de las semillas producidas. Se confirmó la alta auto-incompatibilidad, la cual se expresó a nivel de los estigmas, evitando la germinación del polen. La auto-polinización interfiere sobre la polinización cruzada en caso de precederla, mayormente en *N. nervosa*. Se observó cierto grado de inter-fertilidad entre ambas especies, aunque hubo importantes variaciones inter-individuales en este sentido. La mayor proporción de semillas viables se observó mediante polinización cruzada, reforzando la hipótesis que sostiene que la limitación polínica es la principal determinante de la viabilidad de semillas en poblaciones naturales.

## **Abstract**

*Nothofagus obliqua* and *N. nervosa* are two species from the temperate forests of South America, of ecological and economical interest. Knowledge about the reproductive biology of these species, which is necessary from both practical and theoretical perspectives, is still scarce. The present work was aimed at relating the basic architectural features of *N. obliqua* and *N. nervosa* with the production of flowers and seeds and inquiring about the factors conditioning viable seeds production. Particularly, we planned to analyze: the distribution of flowers within tree crowns and its relationship with the production of viable seeds, inter-annual variations in flower production, flowering phenology, and the degree of self-incompatibility, self-interference and inter-specific compatibility between *N. obliqua* and *N. nervosa* (in both crossing directions)

(Cap. II) For both species the productions of flowers and viable seeds were compared among annual shoots of contrasting size and derived from axes of different categories. For annual shoots derived from main branches, secondary branches and twigs, the numbers of nodes, staminate inflorescences, pistillate inflorescences and axillary buds, as well the viability of the produced seeds were evaluated. The number of each kind of inflorescence was positively related with the number of nodes of the annual shoot. Long shoots produce proportionally more pistillate inflorescences than short shoots. The three axis categories produce both types of inflorescences in direct proportion with the size of their shoots, whereas main branch shoots produce more axillary buds than shoots derived from secondary branches and twigs. For *N. obliqua* seeds derived from secondary branches present a lower percentage of viability than seeds derived from main branches and twigs, perhaps due to a lower probability of cross pollen reception in flowers arising from secondary branches.

(Cap. III) For young-adult *N. obliqua* trees, seed viability was compared among flowers at different positions within the annual shoot and between flowers located in low and high branches. The position of pistillate flowers in the annual shoot did not affect the production of viable seeds. The percentage of viable seed production was notably higher at low than at high branches. Such differences would not be related with morphological features of shoots but with differences in the probabilities of cross-pollen receipt. Large inter-individual differences on viable seed production were also detected.

(Cap. IV) In main branches of both species, retrospective analyses were performed by identifying scars left by flowers and vegetative structures on shoot stems, in order to assess the inter-annual variation of flower production. For those branches, years of high and low flower production are more frequent than years of intermediate production. In those years of high flower production, among 30 to 55% of shoot nodes are floriferous whereas in years of low flower production, less than 5% of shoot nodes are floriferous. The periodicity of flower production was variable among co-specific trees, with some trees with high or intermediate flower production producing in consecutive years and others in which one year of high or intermediate flower production was preceded and followed by years of low or null flower production. Inter-annual variation was similar for the productions of staminate and pistillate inflorescences for *N.*



*obliqua*, whereas, in the case of *N. nervosa* the production of pistillate inflorescences varied more sharply than that in staminate inflorescences; the latter result could be related with the higher meristematic costs associated with the production of pistillate inflorescences for *N. nervosa*. Flower production in shoots of the main axis of branches was positively correlated with flower production of lateral shoots. The size of the shoots of the main axis was related with the degree of similarity between flower production in such shoots and lateral shoots.

(Cap. V) Flowering phenology of *Nothofagus* has been poorly studied so far, and some basic aspects such as the period of receptivity of pistillate flowers are still unknown. On hydroponically kept reproductive shoots of *N. obliqua*, manual pollinations were performed at different times from anthesis (time when the stigma becomes accessible to pollen after the unfolding of the subtending leaf) in order to assess the period of stigmatic receptivity. Then pollen germination on the stigmas was quantified. For *N. obliqua*, *N. nervosa* and inter-specific hybrid trees growing in a common garden, flower phenologies were observed in order to identify phenophases of staminate flowers and the time of anthesis of pistillate flowers. The effects of temperature and air humidity on the ripening rate of staminate flowers were assessed on hydroponically kept reproductive branches. Pistillate flowers of *N. obliqua* are receptive at the time when the subtending leaf allows stigmatic exposure (considered as anthesis time in these flowers) and could keep some degree of receptivity as far as 15 days after anthesis. A peak in receptivity was observed between three and six days after anthesis. The ripening of staminate flowers, from the time when they become evident during bud-break, and pollen release, lasted about one month. Within a tree and within a shoot, most pistillate flowers had reached anthesis at the time of pollen release. Humidity and temperature have both significant and opposite effects on the ripening rate of staminate flowers. The results suggest a high probability of overlapping between the periods of pollen release and stigma receptivity at annual shoot level.

(Cap. VI) Both studied species are described as self-incompatible, whereas the presence of inter-specific hybrids in natural populations evidences certain degree of inter-specific compatibility between them. Little is known about the mechanisms involved on self-incompatibility, the degree of interference caused by self-pollination on cross-pollination and the degree of inter-specific compatibility in both crossing directions. These items were studied for *N. obliqua* and *N. nervosa* trees by applying manual pollination and evaluating pollen germination on the stigmas and the production of viable seeds. A high level of self-incompatibility was confirmed for both species, as evidenced by the low rates of self-pollen germination on the stigmas. Self-interference was observed when self-pollination was applied prior cross-pollination. Such a pattern was more notable for *N. nervosa*. Certain degree of inter-fertility was observed between both species although high inter-individual variation was evidenced. A high proportion of viable seeds was obtained by manual inter-specific cross-pollination, reinforcing the hypothesis that pollen limitation would be the main factor affecting the production of viable seeds in natural populations.

# ÍNDICE GENERAL

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Capítulo I: Introducción General.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. La polinización en especies arbóreas anemófilas .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.2. Arquitectura y biología reproductiva .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>1.3. Las especies estudiadas .....</b>   | <b>10</b> |
| 1.3.1. Relevancia de los <i>Nothofagus</i> .....  | 10        |
| 1.3.2. Las poblaciones sudamericanas de <i>N. obliqua</i> y <i>N. nervosa</i> .....   | 15        |
| 1.3.3. Arquitectura de <i>Nothofagus</i> .....  | 16        |
| 1.3.4. Biología reproductiva de <i>Nothofagus</i> .....   | 18        |
| <b>Objetivos.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>Capítulo II: Producción de flores y semillas en relación a la posición arquitectural y el tamaño de los brotes floríferos en <i>N. obliqua</i> y <i>N. nervosa</i>.....</b>    | <b>25</b> |
| <b>Introducción .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>Materiales y Métodos .....</b>   | <b>27</b> |
| <i>Sitio y especies estudiadas</i> .....  | 27        |
| <i>Análisis de la distribución de las flores</i> .....  | 28        |
| <i>Análisis de datos</i> .....  | 30        |
| <b>Resultados.....</b>  | <b>35</b> |
| <i>Diferencias entre categorías de ejes</i> .....   | 35        |
| <i>Distribución de las flores y los brotes floríferos</i> .....   | 36        |
| <i>Producción de semillas viables</i> .....   | 44        |
| <b>Discusión .....</b>  | <b>45</b> |
| <i>Distribución de las flores y los brotes florales</i> .....   | 45        |
| <i>Número de flores en relación con el tamaño de los brotes y la categoría de ejes</i> .....  | 46        |
| <i>Funciones vegetativa y reproductiva en ejes de <i>Nothofagus</i></i> .....   | 48        |
| <i>Viabilidad de semillas en relación a las categorías de ejes</i> .....  | 50        |
| <i>Conclusiones</i> .....   | 51        |
| <b>Capítulo III: Producción de semillas en <i>N. obliqua</i> relacionada con la posición de las flores en el brote portador y la posición del brote florífero en la copa.....</b> | <b>52</b> |
| <b>Introducción .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>Materiales y Métodos .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>Resultados.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>Discusión.....</b>   | <b>65</b> |
| <i>Conclusiones</i> .....   | 70        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Capítulo IV: Variaciones inter-anales en la producción de flores en ramas principales de <i>N. obliqua</i> y <i>N. nervosa</i> .....</b>                  | <b>71</b>  |
| <b>Introducción .....</b>  | <b>71</b>  |
| <b>Materiales y Métodos .....</b>  | <b>76</b>  |
| <b>Resultados.....</b>   | <b>82</b>  |
| <b>Discusión .....</b>   | <b>89</b>  |
| <i>Conclusiones .....</i>  | <i>96</i>  |
| <b>Capítulo V: Fenología floral de brotes anuales de <i>N. obliqua</i>, <i>N. nervosa</i> e híbridos inter-específicos .....</b>                             | <b>99</b>  |
| <b>Introducción .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>Materiales y Métodos .....</b>  | <b>101</b> |
| <i>Receptividad de los estigmas .....</i>  | <i>102</i> |
| <i>Fenología de los brotes reproductivos.....</i>  | <i>105</i> |
| <i>Efectos de las condiciones ambientales sobre la velocidad de maduración de las flores estaminadas.....</i>  | <i>107</i> |
| <b>Resultados.....</b>   | <b>108</b> |
| <i>Receptividad de las flores pistiladas .....</i>   | <i>108</i> |
| <i>Fenología floral.....</i>   | <i>110</i> |
| <i>Efectos de las condiciones ambientales sobre la velocidad de maduración de las flores estaminadas.....</i>  | <i>116</i> |
| <b>Discusión .....</b>   | <b>121</b> |
| <i>Periodo de receptividad de los estigmas en <i>N. obliqua</i> .....</i>  | <i>121</i> |
| <i>Fenología de los brotes florales.....</i>   | <i>124</i> |
| <i>Efecto de las condiciones ambientales.....</i>  | <i>127</i> |
| <i>Conclusiones .....</i>  | <i>129</i> |
| <b>Capítulo VI: Cruzamientos controlados en <i>N. obliqua</i> y <i>N. nervosa</i>: análisis de auto-interferencia y compatibilidad inter-específica.....</b> | <b>131</b> |
| <b>Introducción .....</b>  | <b>131</b> |
| <b>Materiales y Métodos .....</b>  | <b>133</b> |
| <b>Resultados.....</b>   | <b>135</b> |
| <i>Germinación de granos de polen en las flores.....</i>   | <i>135</i> |
| <i>Viabilidad de semillas.....</i>   | <i>137</i> |
| <b>Discusión .....</b>   | <b>140</b> |
| <i>Conclusiones .....</i>  | <i>145</i> |
| <b>Conclusiones, Interrogantes y Perspectivas .....</b>  | <b>146</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>   | <b>149</b> |
| <b>Agradecimientos .....</b>   | <b>167</b> |

## **Capítulo I: Introducción General**

### **1.1. La polinización en especies arbóreas anemófilas**

La transferencia de polen hacia las superficies estigmáticas, o polinización, es un proceso clave en el ciclo de vida de las plantas con flores; del éxito de este fenómeno dependen en gran medida la regeneración y el flujo génico de sus poblaciones (Lee 1988; Campbell & Waser 1989; Fenster 1991; William & Adam 1994; Barrett 1998; Knapp et al. 2001; Aizen & Harder 2007). Como consecuencia de las presiones selectivas asociadas a la liberación, transferencia y recepción de polen, muchas de las características morfológicas y químicas de las flores están íntimamente relacionadas con el tipo de polinización. Existe una gran variedad de estrategias de polinización, aunque la gran mayoría se incluye en uno de dos tipos básicos: polinización mediada por animales (zoofilia) y polinización mediada por corrientes de aire (anemofilia; William & Adam 1994; Ackerman 2000; Leins & Erbar 2010). La idea más aceptada en la actualidad es que, en las angiospermas, la anemofilia ha evolucionado a partir de zoofilia, posiblemente en circunstancias en las que este último tipo de polinización resultaba desventajoso (Cox & Grubb 1991). La amplia variedad de familias botánicas que presentan polinización anemófila y la distribución geográfica de esas familias indican que este tipo de polinización evolucionó independientemente en distintos linajes (Ackerman 2000; Friedman & Barrett 2008). Estudios filogenéticos sugieren que la evolución de la anemofilia en las Angiospermas ha ocurrido en asociación con la presencia de flores unisexuales aperiántadas y/o poco vistosas, flores pistiladas pequeñas carentes de néctar, con pocos óvulos y con estigmas prominentes, y flores estaminadas con estambres péndulos (Friedman & Barrett 2008; Leins & Erbar 2010). En las especies anemófilas, la liberación, transporte e intercambio de polen entre individuos co-específicos se relaciona directamente con las condiciones atmosféricas y con la densidad y cercanía de individuos compatibles de la misma especie (Ackerman 2000; Knapp 2001; Rizzi-Longo et

al. 2005). La anemofilia se asocia a la producción de grandes cantidades de polen lo que compensa la aleatoriedad de su transporte por corrientes de aire (Tormo et al. 1996). Gran parte de las especies anemófilas son auto-incompatibles, por lo que es común encontrar adaptaciones que favorecen la separación de las funciones masculina y femenina, evitándose de esta forma la auto-polinización<sup>1</sup> y promoviéndose el entrecruzamiento (Lloyd & Webb 1986; Webb & Lloyd 1986; Ackerman 2000). Es común que las especies anemófilas sean diclino-monoicas (con flores unisexuales en individuos que producen flores estaminadas y pistiladas) o dioicas (con individuos que producen un solo tipo de flor).

La gran mayoría de las especies arbóreas anemófilas son monoicas y auto-incompatibles (Steiner & Gregorius 1999; Pound et al. 2002; Allen & Hiscock 2008). La presencia de ambas funciones en un mismo pie conlleva el riesgo de que el polen de la misma planta interfiera sobre la polinización cruzada (por polen compatible de la misma especie), ya sea físicamente, causando la inactivación de los estigmas, o fertilizando los óvulos dando lugar a un embrión abortivo. En las especies auto-incompatibles es común la presencia de barreras que tienden a disminuir las probabilidades de auto-polinización, y que pueden estar asociadas a los momentos de maduración de estambres y carpelos y/o a la distribución espacial de ambos tipos de órganos (Lloyd & Webb 1986; Webb & Lloyd 1986; Normand et al. 2002; Barrett 2003). El desfase entre los momentos de liberación de polen y de receptividad de los estigmas a nivel intra-individual (o intra-floral en las especies con flores perfectas) se conoce como dicogamia (Webb & Lloyd 1986; Barrett 1998, 2003; Bai et al. 2006). Muchas especies monoicas presentan algún grado de dicogamia, pudiendo diferenciarse distintos tipos en relación al orden de maduración de estambres y carpelos (protandria y protoginia), al grado de separación temporal entre la maduración de ambos tipos de órganos (completa o incompleta), a las unidades florales involucradas (intra-floral o inter-floral

---

<sup>1</sup> En este trabajo, al estudiarse especies diclino-monoicas, por claridad el término auto-polinización será utilizado para referirse a la polinización de una flor con polen de la misma planta, sin diferenciarse los términos auto-polinización y geitonogamia.

dependiendo de la presencia de flores perfectas o unisexuales respectivamente), y al grado de sincronía en la maduración de estambres y carpelos de las distintas flores de una misma planta (Lloyd & Webb 1986). Por otra parte, la separación espacial de estambres y carpelos de una misma planta se conoce como hercogamia (Webb & Lloyd 1986; Barrett 1998, 2003; Cesaro et al. 2004). El grado de hercogamia varía entre especies, desde el distanciamiento entre estambres y estigmas en especies con flores perfectas, hasta la separación completa de las funciones masculina y femenina en flores especializadas.

Por lo tanto, la dinámica de polinización de una especie determinada guarda estrecha relación con la distribución temporal y espacial de sus flores. Abordar estos aspectos de la biología reproductiva de las plantas, sumándolos a conocimientos sobre las relaciones de compatibilidad intra-individual, intra-específica e inter-específica, permite una mejor comprensión de las variables que condicionan la producción de semillas en una especie determinada. Los estudios referidos a la distribución temporal de las fases estaminada y pistilada de plantas de una especie implican seguimientos fenológicos precisos de las flores que permitan registrar los momentos de liberación de polen y de receptividad de los estigmas. En el caso de las especies arbóreas se incorpora a esta problemática la complejidad arquitectural, que implica que el conocimiento de la distribución espacial de estambres y estigmas requiera del análisis no sólo de la morfología y el desarrollo de las flores, sino también de la distribución de los ejes floríferos en la arquitectura del árbol y de la disposición de las flores en dichos ejes.

Entre las especies de Angiospermas arbóreas de zonas templadas y frías son comunes aquellas con flores pequeñas y agrupadas en inflorescencias densas (Ackerman 2000). Un gran conjunto de especies con estas características se suele incluir en el orden Fagales (Takhtajan 1997), el cual abarca numerosas especies diclino-monoicas con polinización anemófila. En éstas, como en otras especies arbóreas anemófilas, las flores suelen encontrarse en la periferia de la copa y se desarrollan con antelación a las hojas correspondientes al mismo período de crecimiento, lo que facilita la



dispersión del polen (Waller 1988; Williams & Adam 1994; Ackerman 2000). La distribución de las flores a lo largo de los ejes sólo ha sido estudiada para algunas de las especies del orden Fagales y, en general, en forma cualitativa (e.g. Kaul 1986; Puntieri et al. 2009). Es sabido que en algunas especies de los géneros *Betula* (abedules; Ishihara & Kikuzawa 2004), *Juglans* (nogales; Sabatier et al. 1998) y *Quercus* (roble; Kaul & Abbe 1984), las flores estaminadas y pistiladas se desarrollan sobre diferentes ejes. Para la mayoría de estas especies no se dispone de información precisa acerca de los tiempos de antesis y sus relaciones con la localización de las flores. Las diferencias de localización entre las flores pistiladas y las estaminadas a lo largo de los ejes pueden determinar diferencias en los tiempos de maduración entre ambos tipos florales y afectar tanto la dispersión del polen como sus probabilidades de alcanzar los estigmas. Tales diferencias afectarían las tasas de autopolinización y de polinización cruzada en particular en aquellas especies en las cuales las flores se disponen en inflorescencias paucifloras (que, en contraste con las inflorescencias plurifloras, presentan períodos de desarrollo cortos), como ocurre en las del género *Nothofagus*.

### 1.2. Arquitectura y biología reproductiva

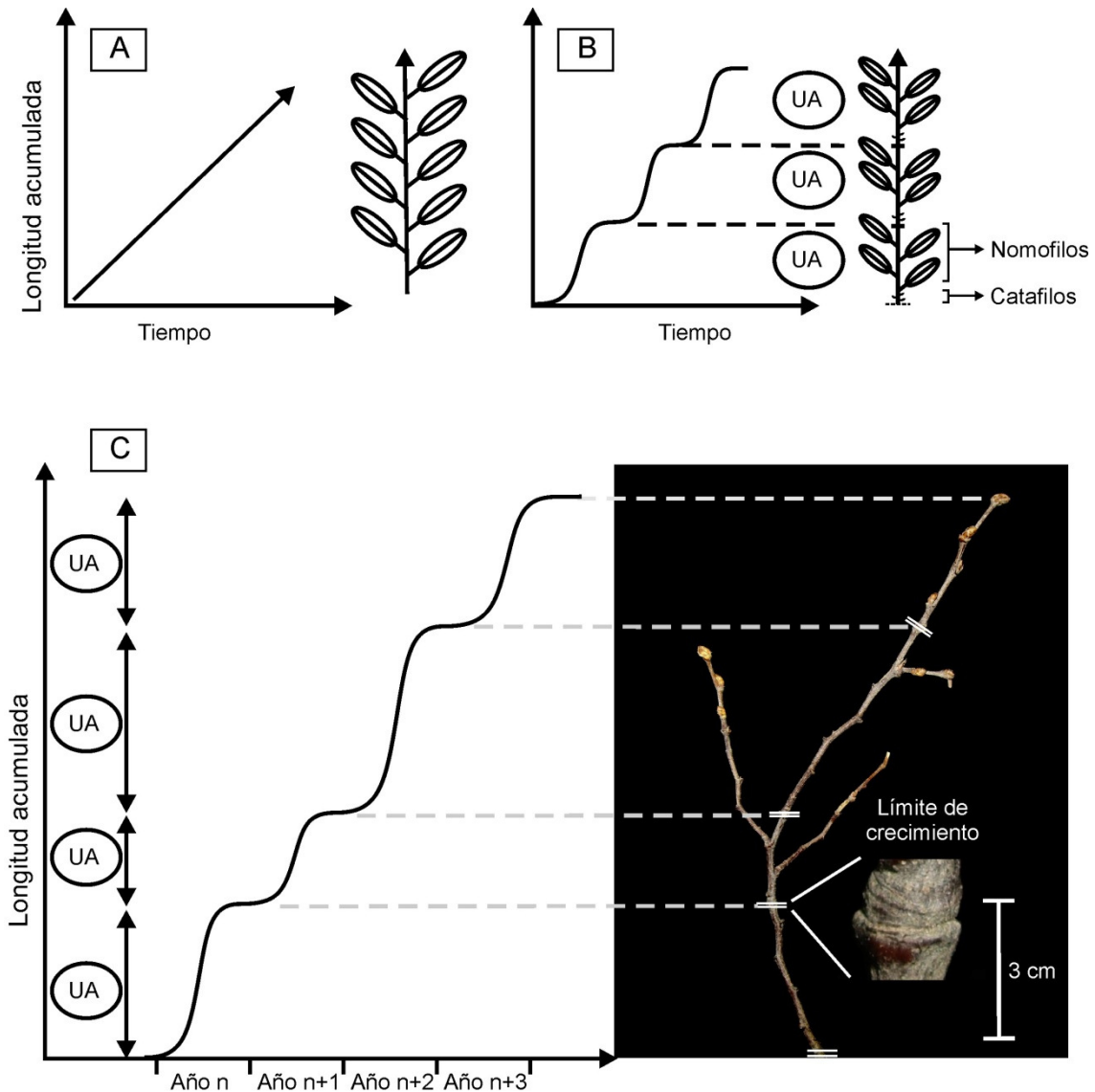
Puede argumentarse que la distribución de las flores en las plantas es el resultado de un conjunto de factores asociados al costo de la floración/fructificación en términos de recursos y meristemas, y a la dinámica de polinización (Waller 1988; Karlsson & Méndez 2005). Sin embargo, la distribución de las flores en la copa de los árboles se ha estudiado en pocas ocasiones. Esta deficiencia se debe, en parte, a la falta de adopción de criterios que permitan la evaluación de la morfología y la distribución espacial de los ejes florales. Los estudios referidos a la descripción de la estructura, crecimiento y disposición de los ejes que componen un árbol son relativamente recientes y han progresado notablemente a partir de los trabajos de F. Hallé, R. Oldeman y P. Tomlinson en las décadas de 1960 y 1970 (Hallé & Oldeman 1970; Hallé et al. 1978). Estos estudios, que incorporaron nociones básicas de descripción de la morfología de las plantas, permitieron desarrollar los

conceptos que dan sustento a la disciplina integradora denominada "Arquitectura Vegetal". Esta disciplina es reconocida actualmente como una rama de la Morfología Vegetal que estudia de manera particular el resultado estructural de la interacción entre procesos endógenos y factores ambientales (Barthélémy & Caraglio 2007).

Debido a que las plantas se construyen en forma modular, el estudio de su arquitectura debe abordarse desde distintas escalas de análisis. El sistema caulinar de cada planta se compone de ejes, constituidos por secuencias de nudos y entrenudos que siguen, en su conjunto, un desarrollo aproximadamente rectilíneo. La caracterización de los ejes de una especie particular incluye aspectos relacionados con: (a) el crecimiento primario (diferenciación de órganos a partir de meristemas y alargamiento de esos órganos), (b) la ramificación, (c) la sexualidad, (d) la orientación espacial y (e) la topología.

(a) Respecto de la dinámica de crecimiento primario de los ejes, se diferencian dos patrones básicos: crecimiento continuo y crecimiento rítmico (Fig. I.1A, B; Hallé & Martin 1968; Hallé et al. 1978). El crecimiento continuo, es común en especies de climas tropicales y se caracteriza porque los ejes crecen siempre que las condiciones ambientales lo permitan, sin que ocurran detenciones endógenas del crecimiento (Fig. I.1A). En la mayoría de las plantas de climas templados el crecimiento longitudinal de los ejes tiene lugar en forma rítmica, respondiendo a la alternancia de fases de actividad y fases de reposo de sus meristemas apicales. Por esta razón es frecuente reconocer, en cada eje, unidades estructurales resultantes de esa alternancia de fases, que se denominan unidades de alargamiento (UA; Fig. I.1B, C). Dado que los ejes de plantas de zonas templadas comúnmente crecen mediante el alargamiento de una de estas unidades por año, es común que para las plantas leñosas de esas regiones se emplee la expresión "brote anual" en referencia a esas unidades. Según el número de UA producidas por año se distinguen el crecimiento monocíclico (una UA por año; Fig. I.1C) y el crecimiento policíclico (dos o más UA por año; Thiébaud et al. 1981; Cabanettes et al. 1995; Caraglio & Barthélémy 1997; Collet et al. 1997). Es decir que, en las especies con

crecimiento monocíclico, un brote anual es definido como la porción de un eje desarrollada en una estación de crecimiento. El desarrollo de la estructura tridimensional de estas especies depende de la diferenciación y el alargamiento de sus UA. Por lo tanto, cualquier estudio arquitectural demanda, en primera instancia, la descripción de la forma en que se desarrollan las UA. Otros aspectos que deben considerarse en la descripción del crecimiento primario de las UA son la persistencia del meristema apical y la relación entre el momento en que sus órganos se diferencian a partir de un meristema y el momento en que esos órganos completan su desarrollo (es decir, se alargan). En cuanto al primer aspecto, se distinguen ejes con crecimiento determinado, en los cuales el meristema apical pierde su funcionalidad o muere luego de la extensión del eje, y ejes con crecimiento indeterminado, en los cuales el meristema apical persiste indefinidamente. Los nudos y entrenudos que componen una UA pueden diferenciarse durante una etapa y alargarse posteriormente, en cuyo caso se los considera órganos preformados, o diferenciarse y alargarse simultáneamente, considerándose los órganos neoformados. Así, un brote anual puede constituirse exclusivamente de órganos preformados o de órganos neoformados, o estar integrado por ambos tipos de órganos (Puntieri et al. 2002, 2007; Barthélémy & Caraglio 2007).



**Figura I.1:** Patrones de crecimiento primario; (A) crecimiento continuo y (B) crecimiento rítmico. (C) Ejemplo de una sucesión de unidades de alargamiento (UA) en una especie de crecimiento rítmico y monocíclico.

El crecimiento longitudinal de los ejes determina su capacidad exploratoria. Por otra parte, el aprovechamiento del espacio circundante de los ejes depende de su expansión lateral, la cual es función del proceso de ramificación (Puntieri et al. 1998; Barthélémy & Caraglio 2007).

(b) La ramificación de los ejes se describe según el tipo de meristema de origen, el momento en que ocurre, el tipo de crecimiento del eje portador y las posiciones en las que se desarrolla la ramificación. Las ramas se originan

mayormente a partir de meristemas laterales ubicados en las axilas de las hojas. Esta ramificación puede ocurrir en forma simultánea con el alargamiento del eje portador (ramificación inmediata o siléptica) o puede ocurrir en forma diferida. En este último caso, el meristema axilar pasa por un período de reposo antes del alargamiento de la rama. Cuando el eje ramificado presenta crecimiento determinado, se dice que la ramificación es simpodial y se contrapone a la ramificación monopodial, en la cual el eje ramificado presenta crecimiento indeterminado (Barthélémy et al. 2007). Por otra parte, la ramificación se clasifica según la posición de las ramas en el brote portador y la posición de las ramas relativa a otras ramas.

(c) La sexualidad implica, simplemente, si el eje porta o no estructuras reproductivas, el tipo de estructuras que son portadas (productoras de sacos polínicos y/o de óvulos) y en qué posiciones se desarrollan esas estructuras en el eje (axilares o terminales).

(d) La orientación espacial de un eje se describe, tradicionalmente, como ortotrópica, cuando el eje crece verticalmente y presenta simetría radial, es decir sus hojas se disponen en forma espiralada, opuesta o verticilada. Por otro lado, la orientación se describe como plagiotrópica cuando el eje se dispone en forma inclinada u horizontal y con simetría bilateral como consecuencia de la disposición dística de las hojas. Dado que ortotropía y plagiotropía se definen por la convergencia de dos caracteres que con frecuencia no se presentan combinados (por ejemplo ejes verticales con simetría bilateral), suele preferirse describir la orientación de los ejes como vertical, inclinada y horizontal (Barthélémy & Caraglio 2007).

(e) La topología indica la ubicación de un eje en una planta. El contexto topológico permite considerar las variaciones en la estructura de los brotes relacionadas con su ubicación espacial en la estructura general de la planta.

A partir del análisis de estas características, es posible determinar el grado de diferenciación de los ejes de las plantas. En cada especie vegetal es común que los ejes que integran la copa de una planta se diferencien entre sí en su morfología, lo cual se ha vinculado con atributos funcionales (Barthélémy & Caraglio 2007). Trabajos recientes se refieren a los tipos de ejes que es

posible identificar en un individuo como categorías de ejes (por ej. Heuret et al. 2003; Stecconi et al. 2010). A lo largo de la ontogenia de una planta, es posible identificar ejes que difieren estructural y funcionalmente, en mayor o menor medida dependiendo de la especie en cuestión (Tomlinson 1978; Barthélémy et al. 1999; Grosfeld 1999; Puntieri et al. 2003; Stecconi 2006; Puntieri & Ghirardi 2010). En términos generales, las características que diferencian a las distintas categorías de ejes se asocian con el grado de diferenciación o “edad fisiológica” de los meristemas que originan los ejes. Por ejemplo, cuando un meristema es capaz de producir una variedad nula o baja de ejes laterales, como en el caso de las ramas cortas que no se ramifican (como los braquiblastos de *Pinus* spp.; Kozłowski 1971) o que producen solamente otras ramas cortas (por ej. en *Fagus sylvatica*; Nicolini & Chanson 1999), se considera que éste ha alcanzado un alto grado de diferenciación o que se encuentra fisiológicamente envejecido. Por el contrario, meristemas poco diferenciados o fisiológicamente jóvenes dan lugar a ejes de crecimiento vigoroso y gran capacidad de ramificación. El número de categorías de ejes y el grado de especialización de las mismas es variable entre especies. Cuando en un árbol es posible identificar todas las categorías de eje que éste puede expresar, lo cual es una característica específica, se dice que el mismo ha completado su *unidad arquitectural* (Barthélémy & Caraglio 2007). A lo largo de la ontogenia en muchas especies suelen ocurrir duplicaciones parciales o totales de la unidad arquitectural, las cuales son conocidas como *reiteraciones*.

Los criterios que se han adoptado en los estudios arquitecturales para distinguir las categorías de ejes en una determinada especie se basan, principalmente, en atributos vegetativos. Aspectos reproductivos son observados sólo en forma cualitativa, y la presencia de flores es considerada una etapa morfogénica altamente avanzada o de elevada edad fisiológica de los meristemas (Barthélémy 1988). Este criterio resulta apropiado en aquellas especies en las cuales la producción de flores está restringida a una categoría de ejes en particular. Por ejemplo, en la especie patagónica *Araucaria araucana*, pueden distinguirse tres categorías de ejes: el tronco y dos categorías de ramas, y sólo las ramas más diferenciadas desarrollan



estructuras reproductivas (Grosfeld et al. 1999). De la misma manera, en *Cedrus atlantica* la producción de estructuras reproductivas sólo ocurre en las ramas más diferenciadas, poco longevas y no ramificadas (Sabatier & Barthélémy 1999). Sin embargo, en muchas especies arbóreas, la presencia de flores no está restringida a una sola categoría de ejes (Puntieri et al. 2009). En tales casos, es posible que existan diferencias cuantitativas en la expresión de la sexualidad de las distintas categorías de ejes, en relación con sus distintos grados de diferenciación (Suzuki 2000). El análisis de las diferencias cuantitativas en la producción de flores de distintas categorías de ejes permite conocer patrones de distribución de las flores en la copa.

La distribución de estructuras reproductivas en las distintas categorías de ejes que componen la copa depende de un conjunto complejo de factores. Por esto, en las especies arbóreas resulta de gran interés integrar el estudio de algunos aspectos de su ecología reproductiva adoptando criterios arquitecturales. Considerando los aspectos antes mencionados, la caracterización arquitectural de una especie determinada brinda un marco de referencia a partir del cual es posible analizar y comparar distintas características de los ejes, tanto vegetativas como reproductivas. Dentro de un contexto arquitectural conocido, para una especie determinada es posible abordar el análisis de la distribución de las flores, lo cual, hasta el momento, se ha realizado para pocas especies (Ishihara & Kikuzawa 2004). Estudios de este tipo serían de gran utilidad en la comprensión de la biología reproductiva de las especies arbóreas. La distribución de las flores podría tener incidencia en la dinámica de polinización y la producción de semillas viables, así como también sobre los costos reproductivos y, asociado a esto, sobre las variaciones inter-anales en la producción de flores que exhiben varias especies arbóreas anemófilas.

### 1.3. Las especies estudiadas

#### 1.3.1. Relevancia de los *Nothofagus*

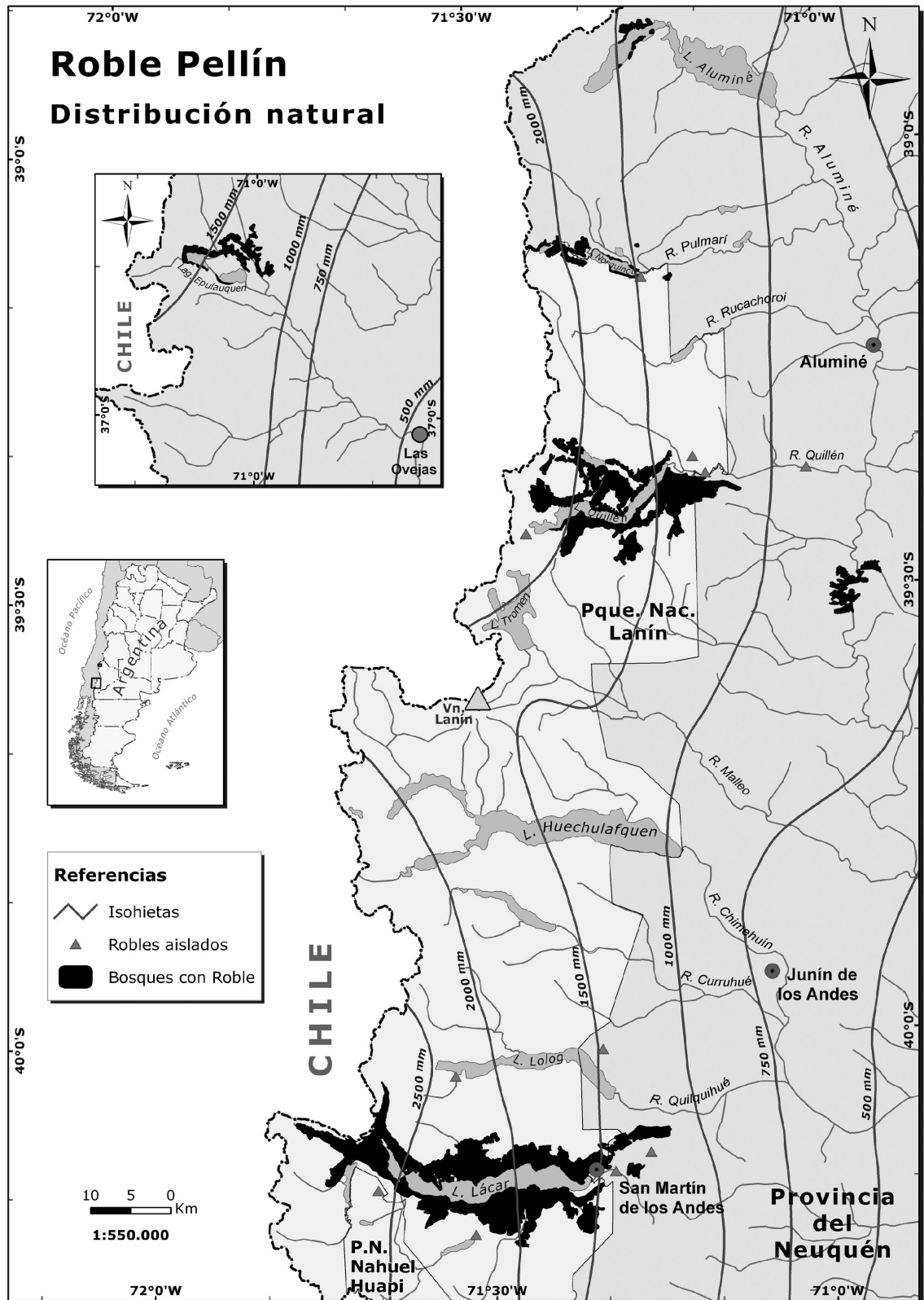
El género *Nothofagus* incluye 35 especies arbóreas distribuidas en los bosques templados del Hemisferio Sur. Actualmente se reconocen 9 especies en

Sudamérica, 4 en Nueva Zelanda, 2 en Australia, 2 en Tasmania, 14 en Nueva Guinea y 5 en Nueva Caledonia. Antiguamente se incluía a los *Nothofagus* dentro de la familia Fagaceae aunque estudios posteriores sugirieron separarlos en la familia monogénica Nothofagaceae, dentro de la cual se distinguen cuatro subgéneros: *Nothofagus*, *Fuscospora*, *Lophozonia* y *Brassospora* (Hill 1992; Hill & Jordan 1993; Manos 1997). Excepto el último, los demás subgéneros están representados en Sudamérica. Seis especies, 4 del subgénero *Nothofagus* y 2 de *Lophozonia*, habitan en Argentina (Donoso 1987).

Los *Nothofagus* han sido foco de distintas áreas de estudio debido a su importancia ecológica, evolutiva y económica. Estas especies son actual e históricamente un componente de principal importancia de los bosques templados del Hemisferio Sur (por ej. Ramirez 1987; Veblen 1996; Read et al. 2010), donde ocupan amplios rangos latitudinal y altitudinal, por lo que están presentes en diversos ambientes (Donoso 1987; Veblen 1996). Por su historia evolutiva y vasto registro fósil, este género ha sido considerado una pieza clave para reconstruir la historia biogeográfica de los bosques del Hemisferio Sur (Swenson et al. 2000, 2001; Moreira Muñoz 2004). La distribución geográfica de las especies de *Nothofagus* y las relaciones filogenéticas entre las mismas se han estudiado a fin de comprender fenómenos de dispersión y especiación transoceánica (Manos 1997). Por muchos años han existido controversias respecto del origen y diversificación de estas especies, centradas en las hipótesis de vicarianza y dispersión transoceánica como posibles explicaciones de sus distribuciones actuales (Heads 1985; Linder & Crisp 1995; Manos 1997; Moreira Muñoz 2004). Si bien por algunos años la hipótesis de vicarianza ha sido la más aceptada, estudios realizados con técnicas moleculares modernas sostienen que la distribución actual de las especies de *Nothofagus* es producto no sólo de la deriva continental, sino también de fenómenos de dispersión a larga distancia (Knapp et al. 1995). Por otra parte, la gran importancia económica de los *Nothofagus* ha estimulado su estudio con fines productivos. Muchas de estas especies producen madera de alta calidad, siendo de las mejores entre las especies forestales de los bosques templados de Sudamérica

(Tortorelli 2009). Esto ha impulsado cultivos con el objetivo de analizar su potencial como especies forestales (Stewart 1979; Tuley 1980; Destremau 1988).

*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst y *N. nervosa* (Phil.) Krasser (= *N. alpina* (Poepp et Endl.) Oerst.), ambas incluidas en el subgénero *Lophozonia*, son dos de las especies de *Nothofagus* con mayor potencial productivo, debido a su rápido crecimiento y a la buena calidad de su madera (Lebedeff 1942; Tuley 1980; Destremau 1988). Ambas especies están mayormente distribuidas en Chile, mientras que sus distribuciones en Argentina son menores y muy fragmentadas (Fig. I.2). Estudios recientes han demostrado que las poblaciones ubicadas en Argentina serían de gran importancia en términos de biodiversidad, puesto que algunas de ellas presentan alta diversidad genética (Marchelli & Gallo 2004, 2006; Azpilicueta et al. 2009). En Chile, *Nothofagus obliqua* habita entre los 33° y los 41° 30' S, ocupando la Cordillera de la Costa y la Depresión Central, así como la vertiente oeste de la Cordillera de los Andes (Donoso et al. 2004). En Argentina, esta especie está presente en una superficie de 33.859 ha, ocupando un rango latitudinal comprendido entre los 36° 48'S, en las lagunas de Epulafquen en el norte de la provincia de Neuquén, y los 40° 14' S, en la cuenca del lago Lácar (Gallo et al. 2000; Sabatier et al. 2011; Fig. I.2). En Argentina esta especie se distribuye entre 630 y 1200 m s.n.m., con mayor abundancia por debajo de los 800 m s.n.m. (Sabatier et al. 2011). *Nothofagus nervosa* se encuentra en Chile entre los 35°58' y 41°15' S. Su área de distribución en Argentina comprende 79.636 ha ubicadas entre los 39° 21' y los 40° 35' S y distribución altitudinal comprende, aproximadamente, entre 800 y 1.350 m s.n.m. (Sabatier et al 2011; Fig. I.2). En Argentina, las distribuciones de *N. obliqua* y *N. nervosa* se superponen en unas 18.000 ha. Debido a las diferencias en la distribución altitudinal entre ambas especies, poblaciones mixtas ocurren en los límites altitudinales superior e inferior de *N. obliqua* y *N. nervosa* respectivamente (Donoso et al. 2004). En las áreas de simpatria se han encontrado híbridos naturales entre estas dos especies, los cuales han sido caracterizados mediante la utilización de marcadores genéticos iso-enzimáticos (Gallo et al. 1997).



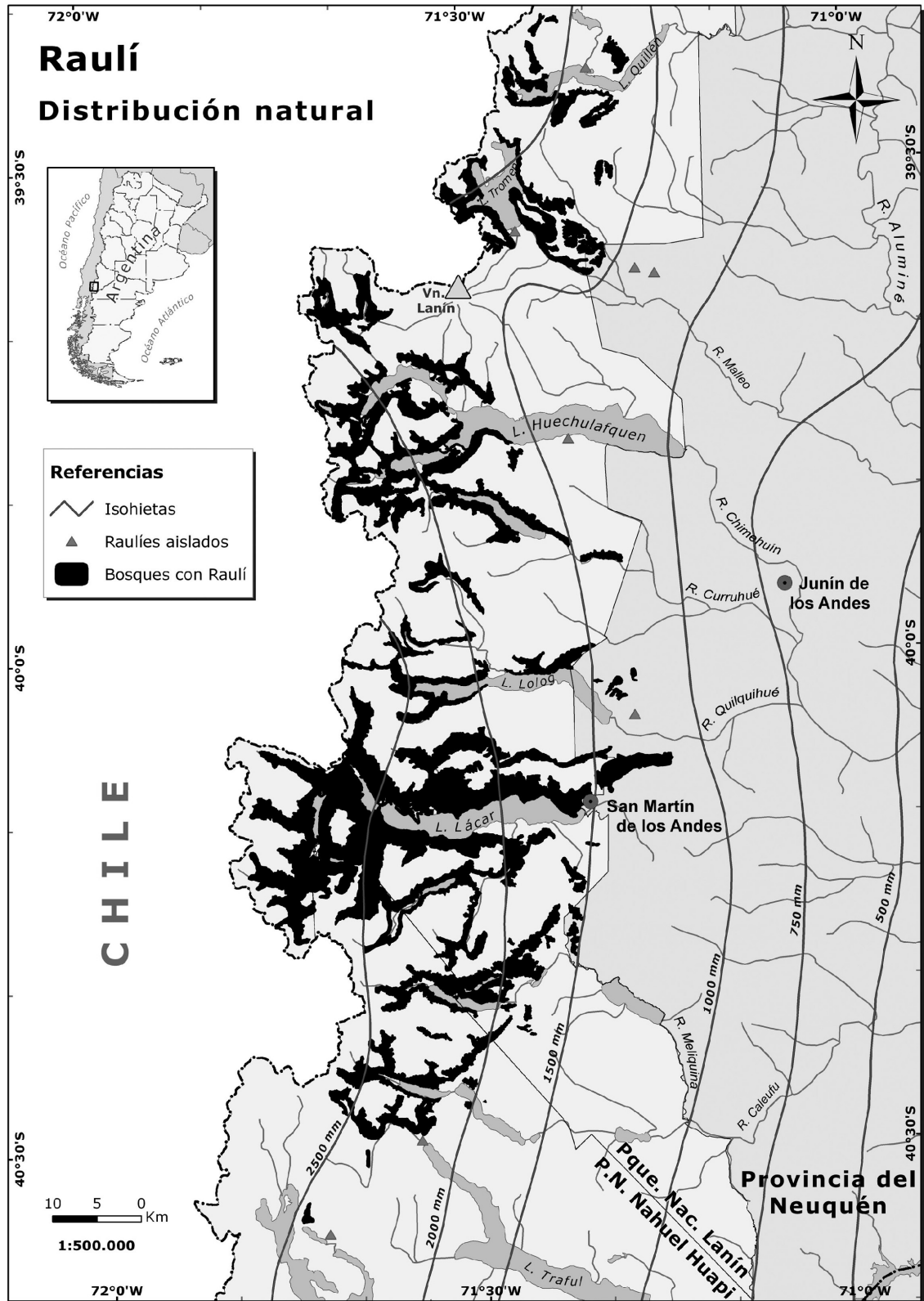


Figura I.2: Áreas de distribución natural de *N. obliqua* (roble pellín) y *N. nervosa* (raulí) en territorio Argentino (extraído de Sabatier et al. 2011).

### 1.3.2. Las poblaciones sudamericanas de *N. obliqua* y *N. nervosa*

Históricamente, la actividad antrópica ha afectado seriamente a las poblaciones naturales de *Nothofagus* de Sudamérica, principalmente en Chile (Ormazábal & Benoit 1987; Gutiérrez 2003). La pérdida de miles de hectáreas de bosques de *Nothofagus* se ha debido principalmente a la tala para uso maderero, a la quema de bosques para la expansión del territorio agrícola-ganadero y a la sustitución del bosque nativo por especies forestales exóticas. La explotación de las especies de *Nothofagus* ha afectado tanto la extensión de sus poblaciones, como su diversidad y calidad genética, ya que por muchos años se realizaron extracciones selectivas de los individuos fenotípicamente más útiles para la extracción de madera (Lebedeff 1942; Ormazábal & Benoit 1987).

*Nothofagus obliqua* y *N. nervosa* han sido de las especies más explotadas en esta región debido a que su madera está entre las mejores de los bosques Andino-Patagónicos (Loewe et al. 1998a, b; Donoso et al. 2006). En Argentina y Chile se han impulsado, desde hace más de 15 años, programas de conservación y uso de los recursos genéticos de *N. nervosa* y *N. obliqua* (Gallo 1993). Numerosos ensayos genéticos han sido instalados a campo con los objetivos de estudiar las variaciones intra-específicas asociadas a la distribución geográfica y de seleccionar procedencias, familias e individuos con fines de recuperación ecosistémica y de producción de madera, de modo de disminuir la presión sobre el bosque nativo (ej. Ipinza et al. 2000; Gallo et al. 2000). Si bien se han producido importantes avances en aspectos genéticos, arquitecturales y ecológicos de *Nothofagus* (Gallo et al. 1997; Puntieri et al. 1998; Barthélémy et al. 1999; Stecconi et al. 2000; Gallo 2004; Marchelli & Gallo 2004; Donoso 2006; Puntieri et al. 2006, entre otros), pocos estudios se enfocaron en su biología reproductiva (Riveros et al. 1995a, b; Báez et al. 2002). El progreso de los programas de manejo y conservación demanda, entre otras cosas, el avance en el conocimiento teórico y experimental de ciertos aspectos de la biología reproductiva de estas especies que aún se desconocen. Asimismo, los estudios en esta temática son necesarios a fin de comprender los procesos que condicionan la producción de semillas viables en



poblaciones naturales, a menudo muy escasa (Riveros et al. 1995b; Bahamonde et al. 2001)

### 1.3.3. *Arquitectura de Nothofagus*

En los últimos años se han realizado varios estudios referidos a la arquitectura de las especies sudamericanas de *Nothofagus*. Los mismos han avanzado sobre la descripción de la morfología y modo de desarrollo de las unidades estructurales, la caracterización de las categorías de ejes que integran la copa y los cambios en la morfología y el crecimiento que ocurren a lo largo de la vida de los individuos (Barthélémy et al. 1999; Puntieri et al. 2002, 2003; Guédon et al. 2006; Puntieri & Ghirardi 2010; Stecconi 2010). Los brotes anuales de *Nothofagus* presentan, en su porción más proximal, varios entrenudos cortos cuyos nudos respectivos portan catafilos (hojas no fotosintéticas); esta porción es útil como marcador de límites del crecimiento anual. Distalmente respecto de esa porción hay otra constituida por entrenudos largos y nudos portadores de hojas fotosintéticas o nomofilos (Barthélémy et al. 1999). Estos brotes se componen de una unidad de alargamiento, es decir, presentan crecimiento monocíclico (Puntieri et al. 1998; Stecconi et al. 2000; Torres et al. 2009). Los brotes anuales en *Nothofagus* se constituyen mayormente de órganos preformados aunque es común que los brotes vigorosos desarrollen órganos neoformados hacia el final de la estación de crecimiento (Puntieri et al. 1998, 2000; Guédon et al. 2006). El número de órganos preformados en la yema varía según un gradiente creciente desde yemas proximales a yemas distales sobre el mismo brote portador, es decir, yemas ubicadas distalmente presentan más órganos preformados que las yemas ubicadas en posiciones más proximales (Souza et al. 2000). En el caso de los brotes floríferos, las flores se desarrollan en la axila de catafilos o nomofilos preformados (Puntieri et al. 2009). La floración en estas especies se relaciona con el inicio del período de crecimiento, en plena brotación (Rusch 1993).

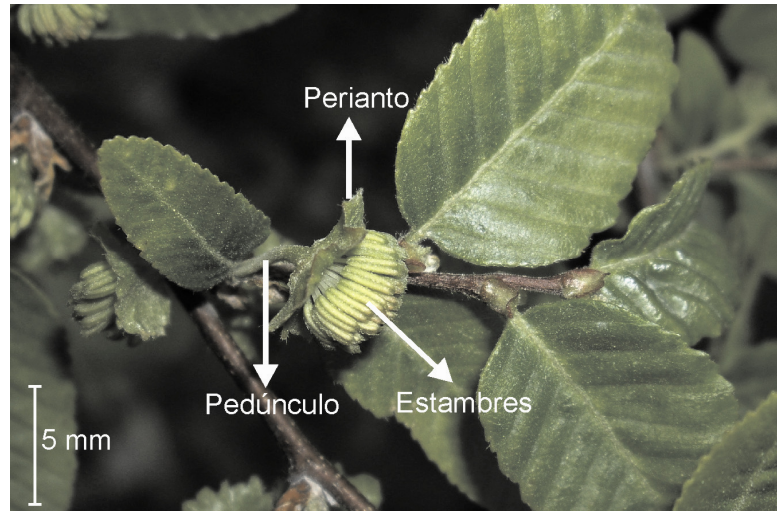
La ramificación de los ejes en *Nothofagus* se describe, principalmente, como diferida en un año, es decir que las ramas de un eje se inician en el

período de crecimiento siguiente a aquel en el que se desarrolló el brote que las porta (Barthélémy et al. 1999). Sin embargo, puede ocurrir que un brote se ramifique durante su alargamiento, algo relativamente frecuente en el tronco de ejemplares juveniles (Barthélémy et al. 1999). En la ramificación diferida de los *Nothofagus* es posible observar un aumento de vigor de las ramas desde las posiciones proximales a las distales del brote portador (Souza et al. 2000; Stecconi et al. 2000; Puntieri et al. 1998, 2003; Puntieri & Ghirardi 2010). De este gradiente deriva la diferenciación de distintas categorías de ejes, claramente evidentes en los ejemplares juveniles-adultos, a saber: (1) el tronco, (2) las ramas principales, (3) las ramas secundarias y (4) las ramas cortas, (Barthélémy et al. 1999; Puntieri et al. 2003; ver Fig. II.1). Los brotes derivados de las diferentes categorías de ejes difieren principalmente en cuanto a su longitud, diámetro y número de hojas, y a su capacidad de producir órganos neoformados (Puntieri et al. 2003; Guédon et al. 2006). Estas características se consideran asociadas al nivel de diferenciación del eje involucrado. Siguiendo este concepto, las ramas principales se encuentran en un nivel de diferenciación bajo (poco diferenciadas) y las ramas cortas en un nivel de diferenciación alto (muy diferenciadas). Si bien en los *Nothofagus* los brotes de ramas principales, secundarias y cortas pueden producir ambos tipos de flores, las diferencias antes mencionadas entre los distintos ejes podrían relacionarse con el desarrollo tanto cualitativo como cuantitativo, de flores y de semillas. Hasta el momento, no se han realizado comparaciones de la capacidad de producción de flores entre ejes de diferentes categorías para las especies de *Nothofagus*.

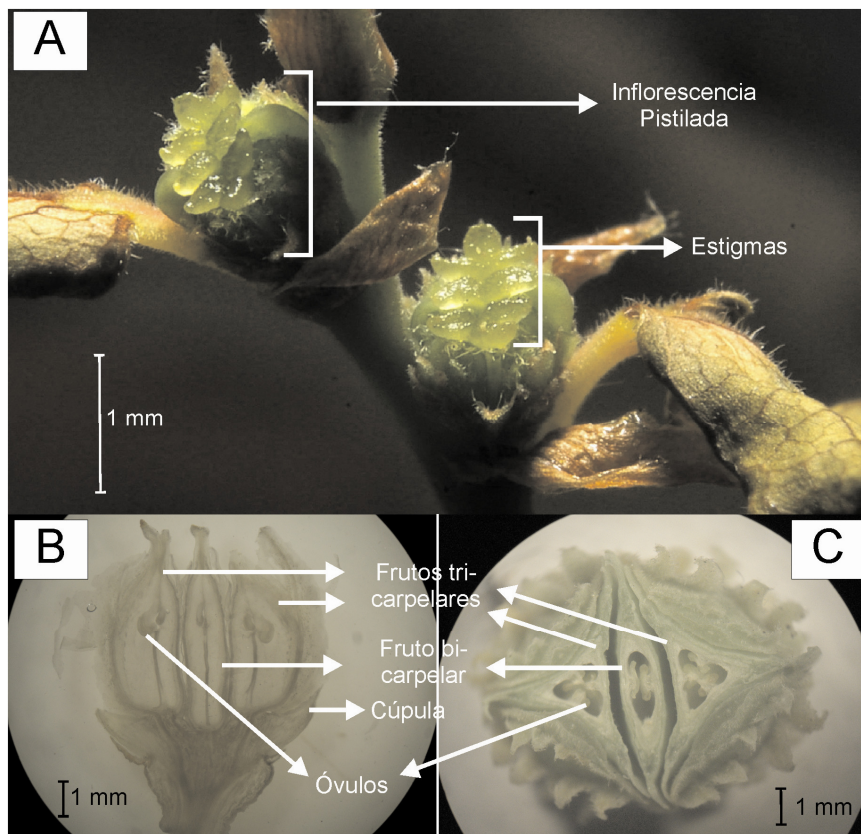
Los conocimientos citados anteriormente brindan un marco apropiado para estudiar la distribución de las flores a distintas escalas de análisis. A partir de la identificación de los límites de crecimiento anual y de las distintas categorías de ejes, es posible analizar los patrones de ubicación de las flores en las ramas y las variaciones inter-anales en la producción de cada tipo de flor.

#### 1.3.4. Biología reproductiva de *Nothofagus*

*Nothofagus obliqua* y *N. nervosa*, como el resto de las especies del género, son diclino-monoicas. Debido a que años de alta producción de flores en estas especies ocurren luego de uno o varios años de producción baja, su floración suele describirse como cíclica (Marchelli & Gallo 1999; Ipinza & Espejo 2000; Donoso et al. 2004). En *N. obliqua* y *N. nervosa* las flores estaminadas se reúnen en inflorescencias 1- a 3-floras; en otras especies del mismo género el número de flores por inflorescencia puede ser mayor (Holden & McPherson 1982; Correa 1984; Rozefelds & Drinnan 1998). Estas flores poseen numerosos estambres exertos a la madurez y están cubiertas por un perianto poco vistoso (Fig. I.3; Picca 1998). Las flores pistiladas son de tamaño pequeño (menos de 1 mm de diámetro) y aperiantadas, y poseen estigmas sésiles. En la mayoría de los *Nothofagus* sudamericanos, estas flores se reúnen en inflorescencias 3-floras. La flor central de cada inflorescencia es 2-carpelar y las dos laterales 3-carpelares (Fig. I.4; Correa 1984; Picca 1998). En concordancia, la flor central presenta dos y las laterales tres lóculos bi-ovulados, aunque sólo un óvulo por flor se desarrolla como semilla, por lo que los frutos son uni-seminados (Poole 1952). Hasta el momento no he encontrado información acerca de si el óvulo que se desarrolla como semilla es el primero en ser fertilizado o no. Al igual que en la familia Fagaceae, las inflorescencias de los *Nothofagus* se caracterizan por presentar una cúpula persistente y lignificada a la madurez, la cual sería de origen caulinar (Picca 1998; Rozefelds & Drinnan 2002). En el caso de *N. obliqua* y *N. nervosa*, la cúpula se compone de cuatro valvas, las cuales se abren a la madurez permitiendo la liberación de los frutos.

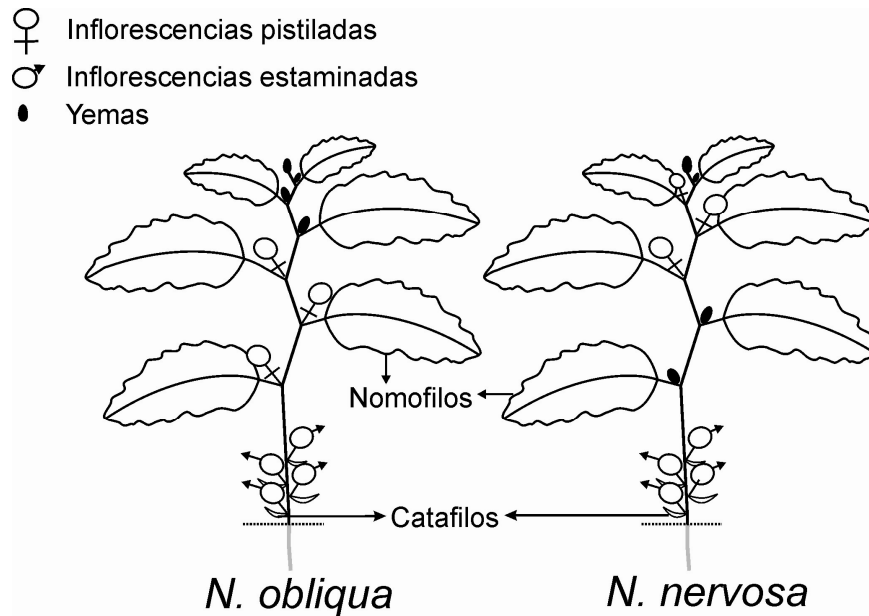


**Figura I.3:** Aspecto general de una inflorescencia estaminada de *Nothofagus nervosa*.



**Figura I.4:** Inflorescencias pistiladas de *Nothofagus*: (A) aspecto general de la inflorescencia y los estigmas; (B) corte longitudinal; (C) corte transversal.

En los *Nothofagus*, las inflorescencias estaminadas y pistiladas se desarrollan en brotes anuales que comúnmente portan ambos tipos de flores (Puntieri et al. 2009). Las inflorescencias estaminadas se ubican en nudos proximales del brote anual, en las axilas de catafilos o nomofilos. Las inflorescencias femeninas ocupan nudos distales con respecto a aquellos en los que se desarrollan inflorescencias estaminadas, en las axilas de nomofilos. En *N. obliqua*, es común que los nudos portadores de inflorescencias estaminadas y pistiladas sean consecutivos en el brote anual, mientras que en *N. nervosa*, se presentan, en promedio, 4 a 5 nudos desprovistos de flores (cada uno con una yema axilar) entre ambos tipos de inflorescencias (Fig. I.4; Puntieri et al. 2009). Brotes unisexuales son poco frecuentes en estas especies, y en éstos la disposición de cada tipo de inflorescencia mantiene el mismo patrón observado en los brotes que portan ambos tipos florales. Se han encontrado, en los brotes floríferos, variaciones en el número de nudos con inflorescencias estaminadas de entre 0 y 8 para *N. nervosa* y de entre 0 y 12 en *N. obliqua*, y variaciones en el número de nudos con inflorescencias pistiladas de entre 0 y 9 para ambas especies (Puntieri et al. 2009). Hasta el momento se desconoce cómo es el patrón de distribución en los árboles de los brotes con diferentes niveles de floración. Para el trabajo citado, los brotes floríferos analizados fueron tomados al azar, sin considerar categorías de ejes. Si se toman en cuenta los parámetros de organización de la arquitectura de cada especie, sería posible explicar las variaciones mencionadas en la distribución de las flores.



**Figura I.4:** Brotes floríferos de *N. obliqua* y *N. nervosa*, indicando la distribución de ambos tipos de inflorescencias en las dos especies.

La producción de flores y semillas en *Nothofagus* presenta alta variación interanual, observándose años de alta, moderada y baja producción de semillas (Ipinza & Espejo 2000; Donoso 2004; Burgos et al. 2008), lo cual es común en especies arbóreas de climas templados (Manson et al. 1974; Nilsson & Wästljung 1987; Smith 1990; Schauber 2002; Buonaccorsi 2003; Mooney 2011). La evolución de la producción cíclica de flores se ha explicado mediante diferentes hipótesis basadas en la disponibilidad de recursos, eficiencia de la polinización, saciedad de predadores y aprovechamiento de años con condiciones ambientales favorables, entre otros factores (Kelly 1994; Herrera et al. 1998; Schauber 2002). No obstante, la explicación más satisfactoria hasta el momento plantea, para las especies anemófilas, que años de producción masiva de flores favorecen el intercambio polínico y la fertilización de óvulos (Smith et al. 1990; Kelly 1994; Kelly et al. 2001). En el caso de los *Nothofagus*, al igual que en especies emparentadas, esta hipótesis es apoyada por el hecho que en los años de floración masiva, la proporción de semillas viables es mayor que en los años de floración moderada o baja (Nilsson & Wästljung 1987; Marchelli & Gallo 1999). Estudiando distintas poblaciones de *N. nervosa* se ha



estimado que ocurre un pico de alta producción de semillas cada dos años (Marchelli & Gallo 1999). Esta periodicidad de dos años en la producción de semillas se ha observado en la mayoría de las especies sudamericanas de *Nothofagus*, excepto en *N. obliqua*, que presentaría una periodicidad de tres años (Donoso 2006). Algunas observaciones realizadas por Marchelli y Gallo (1999) sugieren que la calidad del sitio podría influir en la periodicidad de la producción de semillas. Sin embargo, la variación en la producción de flores en *Nothofagus* se ha cuantificado mayormente a escala poblacional y sólo en base a la recolección de semillas. Las variaciones inter-anales en la producción de cada tipo de flor no se han estudiado a nivel individual hasta el momento.

Al igual que la mayoría de las especies arbóreas anemófilas, los *Nothofagus* presentan alto grado de auto-incompatibilidad (Clausen 1966; Riveros et al. 1995a; Yacine & Bouras 1997; Steiner & Gregorius 1999). Para varias especies sudamericanas, incluida *N. obliqua*, se ha cuantificado el porcentaje de semillas viables luego de aplicar auto-polinización manual, encontrándose valores notablemente bajos (Riveros et al. 1995b). Sin embargo no se han realizado estudios detallados que permitan estimar la probabilidad de auto-polinización tomando en cuenta los momentos de liberación de polen y receptividad de los estigmas en el mismo individuo. Esto se debe, en principio, a que el pequeño tamaño de las flores pistiladas en *Nothofagus* dificulta la estimación del período de receptividad de las mismas. Por otra parte, tampoco se ha evaluado el grado de interferencia debida a la auto-polinización ni el nivel al cual actúan las barreras de auto-incompatibilidad. De modo que no es posible estimar en qué medida la demostrada auto-incompatibilidad afecta a la producción de semillas en poblaciones naturales.

La hibridación entre *N. obliqua* y *N. nervosa* se ha documentado en numerosas ocasiones, destacándose que los híbridos podrían presentar buenas aptitudes desde el punto de vista forestal (Stewart 1979; Tuley 1980; Donoso et al. 1990; Gallo et al. 1997). Observaciones a campo sugieren que dicha hibridación ocurre, en las poblaciones naturales, principalmente en la dirección *N. nervosa* x *N. obliqua*, es decir que la primera especie actúa como receptora y la segunda como dadora de polen (Gallo et al. 1997; Gallo 2004).

El grado de compatibilidad en ambos sentidos de cruzamiento no ha sido estudiado experimentalmente hasta el momento.

El conocimiento de la biología reproductiva de las especies de *Nothofagus* es de cabal importancia para la preservación y la selección artificial de estas especies con fines forestales. Sin embargo, los estudios que abordan esta temática son escasos. Trabajos recientes abarcan determinados aspectos relacionados con la reproducción tales como la fenología (Rusch 1993; Prémoli et al. 2007). Los estudios más específicos acerca de la biología reproductiva de *Nothofagus* se han realizado en Chile (Riveros et al. 1995a, b). Sin embargo, la fenología floral ha sido poco detallada, realizándose a escala poblacional y careciendo de la delimitación del período de receptividad de las flores pistiladas. Por lo tanto las etapas de maduración tanto de las flores pistiladas como de las estaminadas no han sido descritas en trabajos científicos. La distribución de las flores estaminadas y pistiladas, un aspecto igualmente básico y relevante en la biología reproductiva de estas especies, se ha estudiado sólo en forma parcial (Hoffmann & Alliende 1982; Correa 1984). La contribución más reciente en este sentido ha permitido modelizar las distribuciones de los tipos florales de *N. nervosa* y *N. obliqua* a nivel de brote anual pero no a nivel de ejes o de individuos ni a lo largo de la ontogenia (Puntieri et al. 2009).

Un mejor conocimiento de aspectos básicos de la biología floral de las especies de *Nothofagus* permitiría explicar fenómenos de gran interés científico que hasta el momento se encuentran insuficientemente comprendidos. Entre éstos se encuentran las variaciones inter-anales e inter-individuales en la producción de flores y semillas y el desarrollo de ejemplares híbridos entre dos especies. Tampoco es posible, a partir de la información disponible, conocer si la separación fenológica de los dos tipos florales a nivel intra-individual es total o parcial (dicogamia total o parcial, Lloyd y Webb 1986) y si las distancias temporales y espaciales entre ambos tipos florales a nivel individual inciden en el desarrollo de semillas viables (Ipinza & Espejo 2000). Entre los conocimientos básicos que deben mejorarse se incluyen: el momento y duración de la receptividad de las flores pistiladas y los factores intrínsecos a la

floración que determinan la cantidad de semillas viables (como contrapartida, se conocen mejor los factores extrínsecos que inciden en este aspecto, como el daño causado por insectos; Carrillo & Cerda 1987; Loewe et al. 1998a, b; Gallo et al. 2000). Estudios que contribuyan a esclarecer esta problemática serían, además, importantes para entender el mecanismo de transferencia de polen entre poblaciones y entre especies, y para ajustar técnicas para el cruzamiento controlado de individuos con el objetivo de seleccionar características genéticas deseables (incluyendo la generación de ejemplares híbridos).

### Objetivos

Sobre la base de las consideraciones expuestas, el presente trabajo se plantea abordar los siguientes aspectos relativos a la biología reproductiva de *N. nervosa* y *N. obliqua*: (a) la distribución de las inflorescencias estaminadas y pistiladas en las ramas; (b) la viabilidad de semillas en base a su posición en la rama y en el árbol; (c) la variación inter-anual en la producción de flores; (d) los momentos de anthesis de cada tipo de flor y el grado de solapamiento de los mismos a nivel de un brote anual y de un individuo; (e) el grado de interferencia por auto-polinización; (f) las barreras que condicionan la auto-polinización y el cruzamiento entre individuos de diferentes especies; (g) el grado de relación entre los aspectos anteriores y la baja producción de semillas viables. Asimismo, este estudio pretende aportar pautas básicas que ayuden a la comprensión del mecanismo de transferencia de polen intra- e inter-específico para *N. nervosa* y *N. obliqua*.

## **Capítulo II: Producción de flores y semillas en relación a la posición arquitectural y el tamaño de los brotes floríferos en *N. obliqua* y *N. nervosa***

### **Introducción**

En la mayoría de las especies arbóreas, la copa consiste en un sistema de ramificación jerárquico con diferentes categorías de ejes definidas por características topológicas, morfológicas, anatómicas, fisiológicas y funcionales (Tomlinson 1978; Barthélémy et al. 1999; Puntieri et al. 2003; Puntieri & Ghirardi 2010). Se considera que el grado de diferenciación de los ejes aumenta desde los ejes más vigorosos, tales como el tronco y las ramas principales, a los ejes menos vigorosos, como los braquiblastos y los ejes reproductivos (Barthélémy & Caraglio 2007). En muchas especies, las estructuras reproductivas se desarrollan en una categoría de ejes particular, la cual, por lo tanto, se considera como la categoría de ejes más diferenciada de la especie en cuestión (Grosfeld et al. 1999; Suzuki 2000; Ishihara & Kikuzawa 2004; Normand et al. 2009). Esta afirmación puede ser una simplificación excesiva en el caso de las especies arbóreas que presentan estructuras reproductivas en ejes de diversas localizaciones topológicas (por ej. *Nothofagus*; Puntieri et al. 2009).

Tanto el crecimiento de la planta como la producción de flores implican demandas de recursos y meristemas, por lo cual el desarrollo de cada función puede afectar a la otra a nivel del individuo o de los ejes (Suzuki 2001; Kawamura & Takeda 2006; Normand et al. 2009). La distribución de las flores no sólo está condicionada por su costo fisiológico y meristemático, sino que también respondería a procesos de selección tendientes a asegurar la polinización cruzada y evitar la auto-polinización (Lovett Doust & Lovett Doust 1988; Dai & Galloway 2011). El éxito reproductivo depende en gran medida de la distribución espacial y temporal de las flores estaminadas y pistiladas, lo cual incide sobre el flujo de polen y, por lo tanto, sobre las probabilidades a alo- y auto-polinización (Lloyd & Webb 1986; Webb & Lloyd 1986). En las especies

arbóreas anemófilas con flores unisexuales, el éxito reproductivo está condicionado por la relación entre las distribuciones de las flores estaminadas y pistiladas en la arquitectura de la copa y la dispersión del polen por efecto de las corrientes de aire.

En árboles juveniles-adultos de *Nothofagus*, se han caracterizado tres categorías de ejes que se originan del tronco o eje principal (Barthélémy et al. 1999; Puntieri et al. 2003; Stecconi 2006; Fig. II.1). Tales categorías de ejes difieren respecto a su posición y grado de diferenciación (el último definido por el vigor y capacidad de ramificación de los ejes, Cap. I). De tales categorías, los ejes menos diferenciados son las ramas principales, las cuales derivan directamente del tronco y se encargan del crecimiento lateral de la copa (Fig. II.1). Las más diferenciadas son las ramas cortas, que derivan de cualquier tipo de eje y no alcanzan la periferia de la copa. Las ramas secundarias son intermedias en cuanto a su diferenciación y topología entre las ramas principales y las ramas cortas. Las tres categorías de ejes derivadas del tronco difieren en cuanto al tamaño de sus brotes anuales (considerando un brote anual como la porción de eje alargada en una estación de crecimiento): ramas principales > ramas secundarias > ramas cortas. No obstante la edad de los árboles y de los ejes, así como también las condiciones ambientales, pueden añadir variación en las características de los brotes de cada categoría de ejes (Puntieri & Ghirardi 2010). Como consecuencia, la información topológica permite una identificación más precisa de las distintas categorías.

En *Nothofagus*, las inflorescencias estaminadas y pistiladas se desarrollan en posiciones laterales de los brotes anuales en los cuales también se desarrollan hojas verdes (nomofilos) y yemas axilares. Generalmente, los brotes floríferos de *Nothofagus* desarrollan ambos tipos de flores, aunque el número de inflorescencias por brote es muy variable, incluso a nivel intra-individual (Puntieri et al. 2009). Hasta el momento, se desconoce si dichas variaciones están relacionadas con el tamaño y/o la posición de los brotes. Asimismo, también se desconoce si el tamaño y la posición de los brotes pueden afectar sus probabilidades de producción de semillas viables.

En especies arbóreas se ha demostrado que el grado de diferenciación de un eje determinado está positivamente relacionado con su capacidad de producir flores (Barthélémy & Caraglio 2007). Considerando el gradiente de diferenciación de ejes descrito para *Nothofagus*, podría hipotetizarse que el número relativo de estructuras reproductivas por brote anual debería incrementarse siguiendo el gradiente: ramas principales < ramas secundarias < ramas cortas. En contraste, considerando que las probabilidades de captura de polen exógeno serían mayores en la periferia de la copa que en el centro de la misma, sería esperable que los brotes floríferos de las ramas principales -que integran la periferia de la copa (Steconci et al. 2010)- produzcan proporcionalmente más flores pistiladas que los brotes de las demás categorías de ejes, menos periféricas. Asimismo, sería esperable una mayor producción de semillas viables en brotes ubicados en ejes periféricos (ramas principales) que en ejes menos periféricos (ramas secundarias y cortas). En este trabajo se ponen a prueba estas ideas para *N. obliqua* y *N. nervosa*.

## **Materiales y Métodos**

### *Sitio y especies estudiadas*

Como se mencionó en el capítulo I, en estas especies de *Nothofagus* las flores estaminadas y pistiladas se agrupan en inflorescencias unisexuales paucifloras, en brotes que, mayormente, portan ambos tipos de inflorescencias (Puntieri et al. 2009). Las inflorescencias estaminadas ocupan nudos proximales del brote anual, mientras que las inflorescencias pistiladas ocupan nudos más distales. En un brote anual, los nudos que portan inflorescencias estaminadas y pistiladas son mayormente consecutivos en *N. obliqua*, mientras que están separados por uno o más nudos desprovistos de inflorescencias en *N. nervosa* (Puntieri et al. 2009). De la axila de cada uno de los nomofilos en los que no se desarrollan inflorescencias, comúnmente derivan yemas con la capacidad de producir nuevos brotes.

Se seleccionaron 25 ejemplares reproductivos de *N. obliqua* y 15 de *N. nervosa*. De los ejemplares de la primera especie, 18 se ubican en una población natural cercana al lago Lácar (Parque Nacional Lanín; 40° 09' S, 71° 20'-71° 33' O; 670-840 m s.n.m.) y los demás individuos están en parques urbanos en San Carlos de Bariloche (41° 08' S, 71° 10' O; 878 m s.n.m.). Con respecto a *N. nervosa*, ocho ejemplares se ubican en una población natural cercana al lago Lolog (Parque Nacional Lanín; 40° 00' S, 71° 22' O; 930 m s.n.m.), y los demás se ubican en parques urbanos en San Carlos de Bariloche y El Bolsón (41° 58' S, 71° 32' O; 305 m s.n.m.). Los árboles seleccionados presentaban ramas accesibles (a 2-3 metros de altura desde el suelo). En base a observaciones de la arquitectura de los árboles, se estimó que la edad de los mismos variaba entre 25 y 120 años. Debido a que resulta dificultoso encontrar en un mismo año árboles adultos con ramas floríferas, se decidió no limitar la selección de individuos en base a su edad y ubicación.

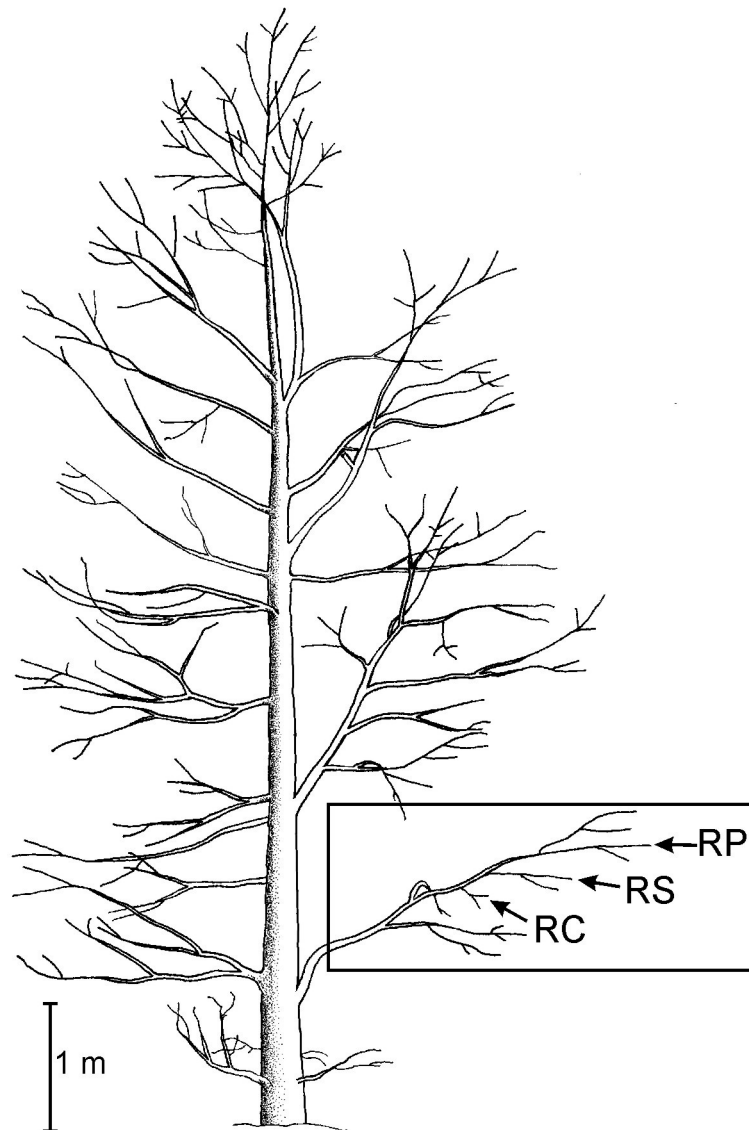
#### *Análisis de la distribución de las inflorescencias*

Para cada árbol se seleccionaron, al final de la estación de crecimiento 2008-2009, brotes floríferos correspondientes a las tres categorías de ejes que derivan del tronco, es decir, ramas principales, secundarias y cortas (Fig. II.1). Estas tres categorías de ejes se diferenciaron en base a su posición topológica en la copa: las ramas principales constituyen la periferia de la copa, las ramas secundarias derivan lateralmente de las ramas principales y las ramas cortas derivan de ramas principales o secundarias en zonas más cercanas del centro de la copa. Los límites entre brotes alargados en distintas estaciones de crecimiento se identificaron mediante marcadores morfológicos (Barthélémy et al. 1999). Para cada categoría se extrajo un brote alargado durante la estación 2007-2008, de aquí en adelante llamado *brote portador*. Al momento del muestreo, cada brote portador presentaba, a su vez, brotes floríferos alargados en la estación 2008-2009, los cuales serán llamados *brotos anuales* (Fig. II.2). La extracción de los brotes se realizó en febrero de 2009 antes de la apertura de las cúpulas. De los brotes portadores extraídos se cuantificó el número de brotes anuales producidos, y de cada brote anual se registró el número de

nudos y la producción axilar de cada nudo. Las producciones axilares diferenciadas fueron: flor estaminada, flor pistilada y yema axilar. No se consideraron nudos en los que se observaron estructuras abortivas (su porcentaje de ocurrencia fue cercano al 1%). Debido a que las inflorescencias estaminadas caen luego de la liberación de polen, su presencia en los brotes se determinó por la identificación de las cicatrices dejadas por esas inflorescencias sobre el tallo.

Para los árboles ubicados en las poblaciones naturales, se extrajeron los frutos producidos por cada brote y se determinó la viabilidad de las semillas mediante el corte de los frutos y la observación de la presencia de embrión. Respecto a los árboles urbanos sólo se realizaron los análisis cuantitativos antes mencionados y no se estimó la viabilidad de semillas producidas por cada categoría de eje debido a que los mismos están aislados de árboles co-específicos y las condiciones de polinización de los mismos no son representativas de lo que ocurre en condiciones naturales.





**Figura II.1:** Esquema de un ejemplar *N. obliqua* (aproximadamente de 25 años) en el que se indican las tres categorías de ejes consideradas en este estudio: rama principal (RP), rama secundaria (RS) y rama corta (RC).

#### *Análisis de datos*

A fin de estimar las diferencias morfológicas entre las distintas categorías de ejes, se compararon los brotes portadores seleccionados de cada categoría respecto a (A) el número de brotes anuales producidos y (B) el número de nudos promedio de los brotes anuales producidos. Dichas comparaciones se realizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía. Cuando se

encontraron diferencias significativas entre categorías de ejes, se realizaron comparaciones *a posteriori* de Tukey-Kramer (Sokal & Rohlf 1981). El efecto del sitio de crecimiento de los árboles no se evaluó ya que ni las zonas urbanas ni los bosques naturales se consideran ambientes homogéneos. Por otra parte, las edades de los árboles dentro de cada sitio fueron muy variables, y el origen geográfico de la mayoría de los árboles urbanos no se conocía, por lo que no se consideró apropiado combinar los árboles en base a los sitios de muestreo.

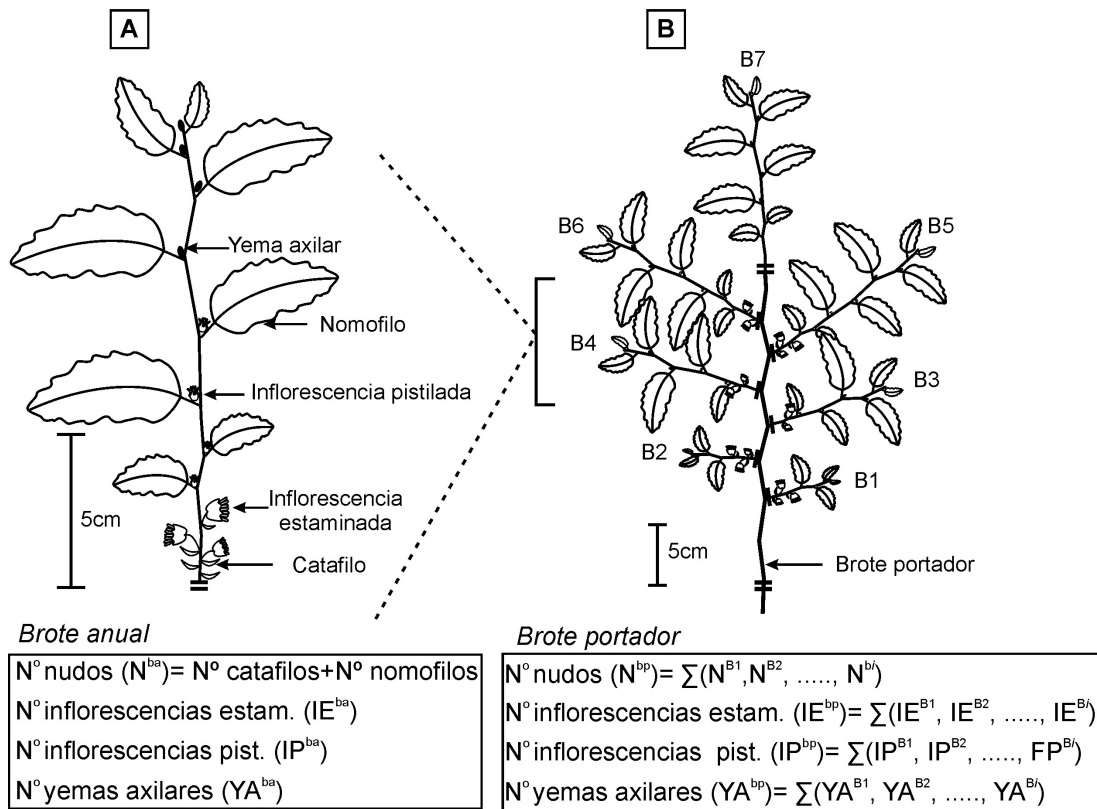
En *Nothofagus* spp. comúnmente se establece un gradiente de tamaño entre los brotes anuales derivados de un mismo brote portador: el tamaño de esos brotes anuales decrece desde aquellos ubicados en posiciones distales del brote portador hacia los brotes anuales ubicados en posiciones proximales (Puntieri et al. 2003). A fin de considerar esta variación estructural entre los brotes anuales derivados de un mismo brote portador, la producción de inflorescencias estaminadas, pistiladas y yemas axilares se evaluó en dos niveles de análisis: (A) brote anual y (B) brote portador (Fig. II.2).

(A) *Brotos anuales*. Los brotes anuales de cada especie fueron agrupados en categorías de tamaño en base a la distribución de frecuencias del número de nudos en cada especie. Para *N. obliqua*, se agruparon los brotes con 8 a 10 nudos, 11 a 12 nudos, 13 a 14 nudos y  $\geq 15$  nudos. En el caso de *N. nervosa*, se agruparon los brotes con 8 a 13 nudos, 14 a 16 nudos y  $\geq 17$ . Para cada categoría de ejes y tamaño de los brotes, se estimó el porcentaje de brotes que produjeron ambos tipos de inflorescencias (brotes bisexuales, BB), sólo inflorescencias estaminadas (brotes estaminados, BE), sólo inflorescencias pistiladas (brotes pistilados, BP) y sólo estructuras vegetativas (brotes vegetativos, BV). En el caso de *N. nervosa*, se comparó la proporción de BB, BE, BP y BV entre las tres categorías de ejes y entre las categorías de tamaño de los brotes anuales mediante pruebas de  $Ch^2$  (Sokal & Rohlf 1981). Para *N. obliqua*, debido a que no todas las categorías de ejes y de tamaños de brotes presentaron BP y BV, no se incluyeron este tipo de brotes en las pruebas  $Ch^2$ . En los análisis detallados a continuación no se consideraron los brotes que no presentaron ningún tipo de flor. Se realizaron regresiones lineales simples con los datos transformados logarítmicamente

(base 10), relacionando el número de nudos de los brotes anuales ( $N^{ba}$ ; variable independiente) con el número de inflorescencias estaminadas ( $IE^{ba}$ ) y el número de inflorescencias pistiladas ( $IP^{ba}$ ; variables dependientes). En ambas especies, el número de yemas axilares por brote ( $YA^{ba}$ ) presentó una distribución de frecuencias desviada de la normalidad aún luego de transformar los datos, por lo que la relación entre  $N^{ba}$  y  $YA^{ba}$  se estimó mediante análisis de correlación no paramétrico de Spearman ( $\rho$ ). Entre las tres categorías de ejes se compararon  $IE^{ba}$  y  $IP^{ba}$  mediante un análisis de covarianza (ANCOVA; Zar 1984, p. 213), incluyendo a la categoría de eje como factor principal, a los individuos como factor aleatorio, a la interacción entre el factor principal y el factor aleatorio y a  $N^{ba}$  como covariable. Cuando la interacción entre factor principal y el factor aleatorio fue significativa (prueba de Fisher;  $p < 0,05$ ), no se realizaron más análisis. De lo contrario se aplicó un nuevo ANCOVA sin incluir la interacción entre ambos factores en el modelo. La interacción entre el factor principal y la covariable se probó con anterioridad y se excluyó del modelo debido a que no fue significativa. Cuando fue necesario, se aplicó la transformación logarítmica a las variables a fin de cumplir con los supuestos de normalidad y/u homogeneidad de varianzas del modelo de ANCOVA. Debido a que los datos del número de yemas axilares ( $YA^{ba}$ ) no presentaron distribución normal, las categorías de ejes se compararon, respecto de esta variable, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En este último análisis, al no poder incluir la covariable, la comparación se hizo considerando el número relativo de yemas axilares (i.e  $YA^{ba}/N^{ba}$ ), a fin de analizar el efecto de la categoría de ejes excluyendo el efecto del tamaño de los brotes.

(B) *Brotes portadores*. Para cada brote portador se calcularon, sumando los valores de todos los brotes anuales derivados del mismo, los números totales de nudos ( $N^{bp}$ ), de inflorescencias estaminadas ( $IE^{bp}$ ), de inflorescencias pistiladas ( $IP^{bp}$ ) y de yemas axilares ( $YA^{bp}$ ; Fig. 2-II). Se realizaron regresiones lineales relacionando  $N^{bp}$  (variable independiente) con  $IE^{bp}$  y  $IP^{bp}$  (variables dependientes), luego de la transformación logarítmica de todas las variables. Debido a que los datos relacionados con  $YA^{bp}$  no presentaron distribución normal, la relación entre  $YA^{bp}$  y  $N^{bp}$  se evaluó mediante

un análisis de correlación de Spearman ( $\rho$ ). Se compararon las categorías de ejes respecto de la producción de ambos tipos de inflorescencias ( $IE^{bp}$  y  $IP^{bp}$ ) con un ANCOVA, incluyendo a la categoría de ejes como factor principal, a los individuos como factor aleatorio y a  $N^{bp}$  como covariable. En dicho análisis no se consideró la interacción entre factor principal y factor aleatorio debido a que sólo se utilizó un brote portador por categoría de eje por árbol (ver ANOVA de dos vías sin réplicas, Zar 1984, p. 218). La interacción entre el factor principal y la covariable se probó previamente sin encontrarse significancia, por lo que no se incluyó dicha interacción en el modelo. Las variables  $IE^{bp}$ ,  $IP^{bp}$  y  $N^{bp}$  fueron transformadas para cumplir con el supuesto de normalidad del modelo. La producción de yemas axilares ( $YA^{bp}$ ) se comparó entre categorías de ejes en términos relativos ( $YA^{bp}/N^{bp}$ ) mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.



**Figura II.2:** (A) Brote anual con inflorescencias estaminadas, pistiladas y yemas axilares y (B) brote portador con los brotes anuales derivados del mismo (B1-B7). Las líneas paralelas indican los límites de crecimiento inter-anual del brote portador y las líneas gruesas el límite proximal de los brotes anuales derivados del portador. Los paneles inferiores muestran los datos registrados para cada brote anual y para cada brote portador.

Considerando sólo los árboles ubicados en poblaciones naturales, se comparó el porcentaje de semillas viables entre las tres categorías de ejes mediante una prueba de  $Ch^2$ .

Para todos los análisis estadísticos realizados se adoptó un nivel de significancia del 5%.

## Resultados

### *Diferencias entre categorías de ejes*

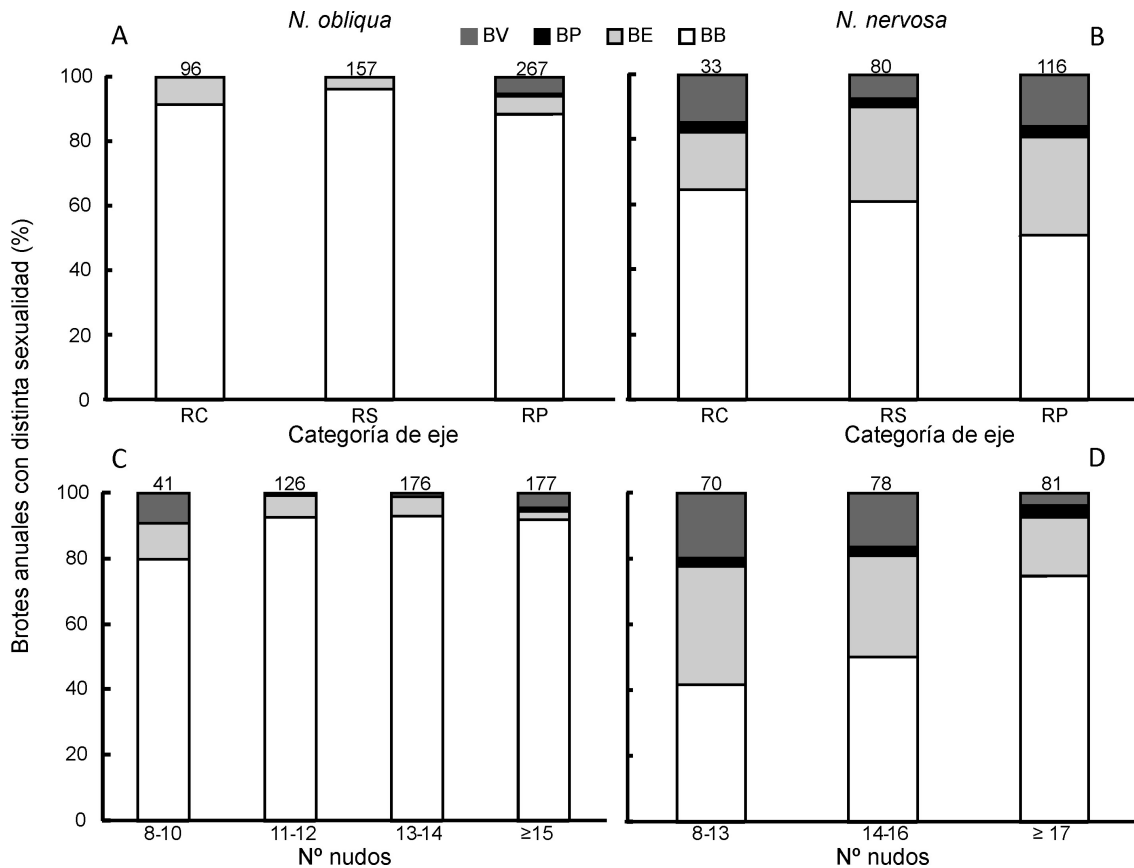
En ambas especies, los brotes portadores derivados de ramas principales, secundarias y cortas difirieron respecto al número de brotes anuales derivados de los mismos y respecto al número de nudos promedio de dichos brotes (Tabla II.1). Los brotes portadores derivados de ramas principales presentaron más brotes anuales que los derivados de ramas secundarias los cuales, a su vez, presentaron más brotes anuales que los brotes portadores de ramas cortas. El número de nudos promedio de los brotes anuales fue también mayor en aquellos derivados de ramas principales que en los derivados de las demás categorías de eje en *N. obliqua*. En el caso de *N. nervosa*, el número de nudos promedio fue similar en los brotes anuales derivados de ramas principales y secundarias, y mayor a lo observado para ramas cortas (Tabla II.1).

**Tabla II.1. Promedio (error estándar entre paréntesis) y comparaciones entre categorías de ejes mediante análisis de varianza (prueba *F* de Fisher y probabilidad de error, *p*) del número de brotes anuales y del número de nudos por brote anual de ramas principales (RP), ramas secundarias (RS) y ramas cortas (RC) de *N. obliqua* y *N. nervosa*. Letras de los superíndices diferentes indican diferencias significativas entre pares de medias según la prueba de Tukey-Kramer.**

| <i>N. obliqua</i> (n=75)    | RP                          | RS                          | RC                          | <i>F</i> | <i>p</i> |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|----------|
| Nº de brotes anuales        | 14,5 <sup>A</sup><br>(1,20) | 7,4 <sup>B</sup><br>(0,81)  | 4,1 <sup>C</sup><br>(0,41)  | 36,5     | <0,001   |
| Nº de nudos por brote anual | 14,7 <sup>A</sup><br>(0,46) | 13,0 <sup>B</sup><br>(0,27) | 11,7 <sup>C</sup><br>(0,28) | 18,4     | <0,001   |
| <i>N. nervosa</i> (n=44)    |                             |                             |                             |          |          |
| Nº de brotes anuales        | 8,1 <sup>A</sup><br>(0,87)  | 5,5 <sup>B</sup><br>(0,73)  | 2,5 <sup>C</sup><br>(0,27)  | 16,5     | <0,001   |
| Nº de nudos por brote anual | 16,6 <sup>A</sup><br>(0,72) | 15,3 <sup>A</sup><br>(0,73) | 12,7 <sup>B</sup><br>(0,67) | 7,9      | 0,001    |

*Distribución de las inflorescencias y los brotes floríferos*Brotes anuales

En ambas especies, los brotes con inflorescencias estaminadas y pistiladas (BB) fueron más frecuentes que los brotes estaminados (BE), pistilados (BP) y vegetativos (BV), mientras que los BE fueron más frecuentes que los BP y los BV (Fig. II.3). Las proporciones de BB, BE, BP y BV en *N. nervosa*, y la proporción de BB y BE en *N. obliqua*, no variaron significativamente entre categorías de ejes ( $Ch^2 = 5,9$ , g.l.= 6,  $p = 0,430$ ;  $Ch^2 = 2,3$ , g.l.= 2,  $p = 0,316$ , respectivamente; Fig. II.3A, B). En *N. obliqua*, sólo las ramas principales presentaron BV, y la proporción de BB y BE no se relacionó con el tamaño de los brotes ( $Ch^2 = 5,2$ , g.l.= 3,  $p = 0,160$ ; Fig. II.3C). Para *N. nervosa*, la proporción de BB fue mayor y la BE y BV menor entre los brotes largos que entre los brotes cortos y de tamaño intermedio ( $Ch^2 = 22,6$ , g.l.= 6,  $p < 0,001$ ); la proporción de BP no varió en relación al tamaño de los brotes (Fig. II.3D).



**Figura II.3:** Porcentajes de brotes que desarrollaron sólo inflorescencias estaminadas (BE), sólo inflorescencias pistiladas (BP), ambos tipos de inflorescencias (BB) y sólo estructuras vegetativas (BV) para las diferentes categorías de ejes (A,B) y los diferentes tamaños de brotes (C, D) para *N. obliqua* (A, C) y *N. nervosa* (B, D). En la parte superior de las barras se indica el número de brotes en cada categorías de ejes y cada categoría de tamaños. Ver códigos de los ejes en la Figura 1.

En ambas especies se observó una relación positiva entre el número de nudos de los brotes ( $N^{ba}$ ) y el número de inflorescencias pistiladas ( $IP^{ba}$ ), mientras que sólo en *N. obliqua* la variable  $N^{ba}$  también se relacionó positivamente con el número de inflorescencias estaminadas ( $IE^{ba}$ ; Tabla II.2; Fig. II.4A, B). En ambas especies se observó un mayor aumento  $IP^{ba}$  con el aumento de  $N^{ba}$ , con respecto a lo observado en relación a  $IE^{ba}$  (Tabla II.2). Se encontró una correlación positiva entre el número de yemas axilares ( $YA^{ba}$ ) y el número de nudos de los brotes ( $N^{ba}$ ) tanto en *N. obliqua* ( $\rho = 0,65$ ,  $p < 0,001$ ) como en *N. nervosa* ( $\rho = 0,22$ ,  $p < 0,001$ ; Fig. II.5E, F). En ambas especies, las distintas categorías de ejes no se diferenciaron significativamente respecto a  $IE^{ba}$  y  $IP^{ba}$



(Tabla II.3, Fig. II.5A-D). El factor aleatorio (variación individual) contribuyó significativamente a la variación de  $IE^{ba}$  y  $IP^{ba}$  en ambas especies, mientras que la interacción entre los factores principal (categoría de ejes) y aleatorio tuvo un efecto significativo sólo en *N. obliqua* (Tabla II.3). El número relativo de yemas axilares ( $YA^{ba}/N^{ba}$ ) decreció desde las ramas principales a las ramas cortas en ambas especies (prueba de Kruskal-Wallis:  $H= 47,2$ ;  $p < 0,001$ ).

### Brotos portadores

Tanto en *N. obliqua* como en *N. nervosa*, las sumas de inflorescencias estaminadas y pistiladas derivadas de los brotes anuales de cada portador ( $IE^{bp}$  y  $IP^{bp}$ ) se relacionaron positivamente con la suma del número de nudos de esos brotes ( $N^{bp}$ ; Tabla II.2; Fig. II.4C, D). Los coeficientes de regresión indican un aumento no proporcional de las inflorescencias estaminadas con el número de nudos para ambas especies y de las pistiladas para *N. nervosa* (Tabla II.2). En *N. obliqua*, el incremento del número de inflorescencias pistiladas con respecto al número de nudos fue aproximadamente proporcional (Tabla II.2). La correlación entre la suma del número de yemas axilares ( $YA^{bp}$ ) y la suma del número de nudos ( $N^{bp}$ ) fue significativa tanto para *N. obliqua* ( $\rho = 0,92$ ,  $p < 0,001$ ) como para *N. nervosa* ( $\rho = 0,91$ ,  $p < 0,001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre categorías de ejes respecto a  $IE^{bp}$  y  $IP^{bp}$  para ninguna de las dos especies (Tabla II.4; Fig. II.6). Sólo se observó una contribución significativa del factor aleatorio sobre la variable  $IP^{bp}$  en *N. nervosa* (Tabla II.4). El número relativo de yemas axilares ( $YA^{bp}/N^{bp}$ ) fue mayor en las ramas principales que en las ramas secundarias y cortas en ambas especies (Kruskal-Wallis: *N. obliqua*  $H = 23,0$ ,  $p < 0,001$ , *N. nervosa*  $H = 15,8$ ,  $p = 0,004$ ; Fig. II.6). En este sentido, no hubo diferencias entre ramas secundarias y cortas en *N. obliqua*, mientras que en *N. nervosa* las ramas secundarias presentaron mayor cantidad relativa de yemas axilares que las ramas cortas (Fig. II.6).

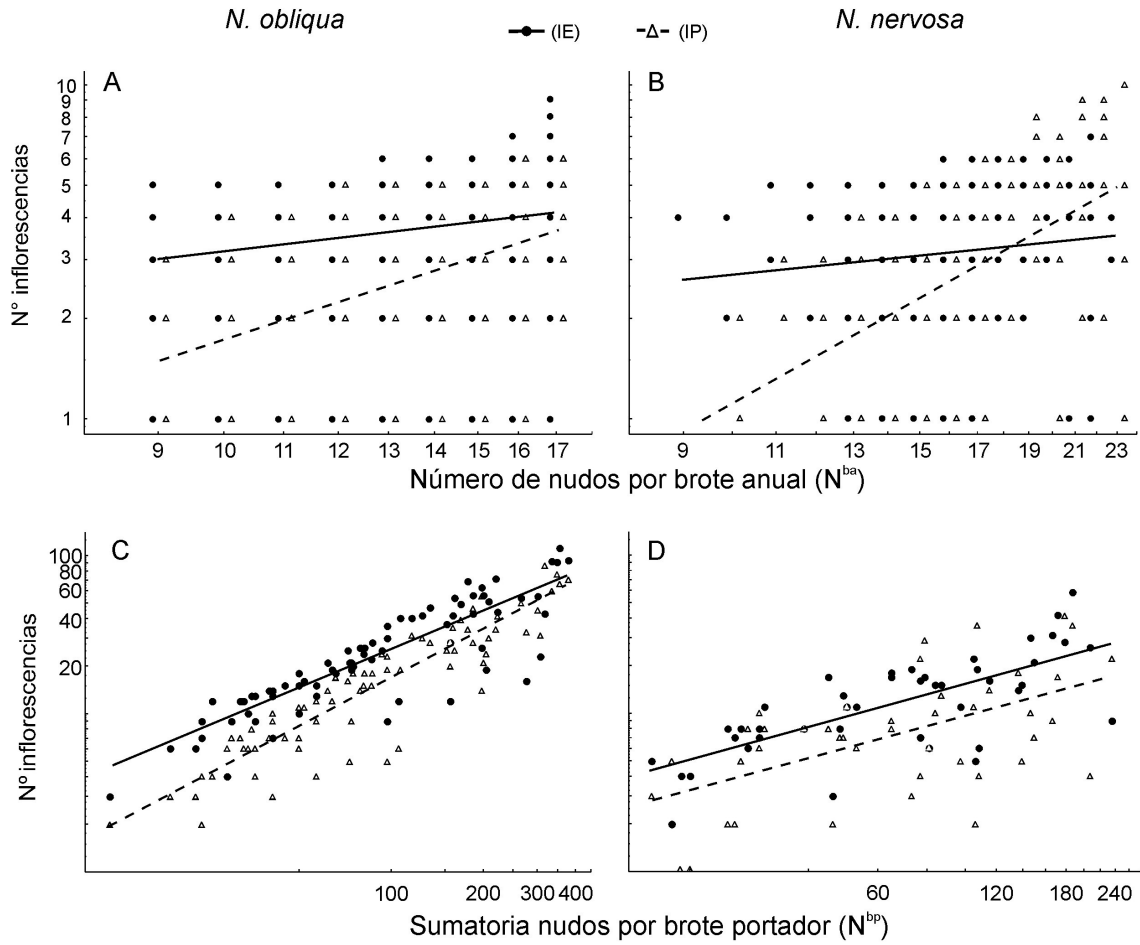
Tabla II.2. Coeficientes de regresión lineal ( $b$ ) y sus límites de confianza del 95% (LC) inferior y superior para las regresiones entre el número de nudos ( $N$ ; variable independiente) y los números de inflorescencias estaminadas (IE) y pistiladas (IP) de brotes anuales ( $^{ba}$ ) y de brotes portadores ( $^{bp}$ ) de *N. obliqua* y *N. nervosa*. Todas las variables fueron transformadas a logaritmo. Se indican el número de brotes ( $n$ ), la probabilidad de error ( $p$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de cada regresión.

#### Brotes anuales

| especie                          | Regresión            | $b$              | -95% LC | +95% LC | $p$    | $R^2$ (%) |
|----------------------------------|----------------------|------------------|---------|---------|--------|-----------|
| <i>N. obliqua</i><br>( $n=490$ ) | $N^{ba}$ - $IE^{ba}$ | 0,50             | 0,31    | 0,79    | <0,001 | 5,2       |
|                                  | $N^{ba}$ - $IP^{ba}$ | 1,42             | 1,21    | 1,63    | <0,001 | 26,9      |
| <i>N. nervosa</i><br>( $n=133$ ) | $N^{ba}$ - $IE^{ba}$ | No significativo |         |         |        |           |
|                                  | $N^{ba}$ - $IP^{ba}$ | 1,79             | 1,35    | 2,23    | <0,001 | 32,7      |

#### Brotes portadores

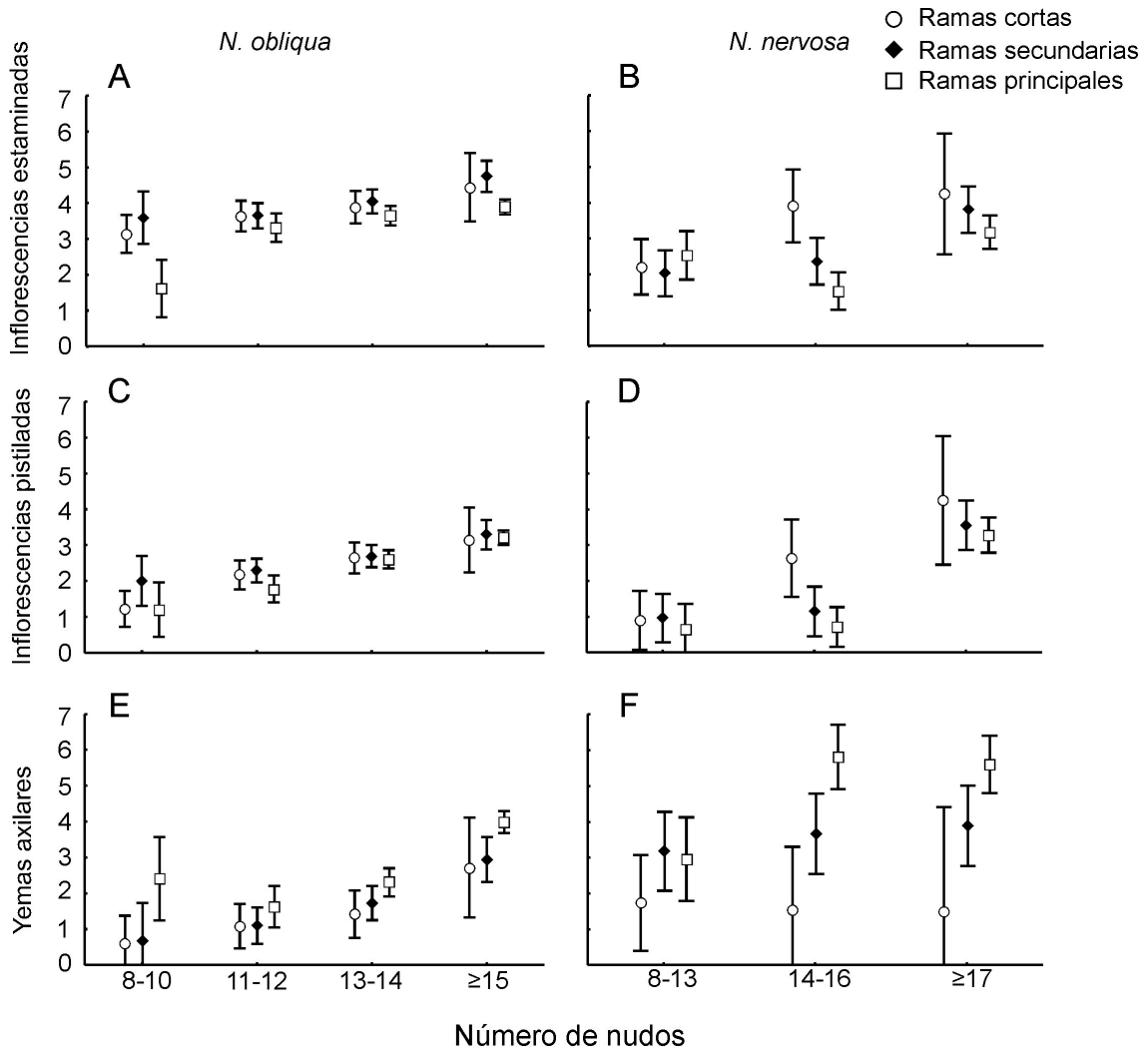
|                                 |                      |      |      |      |        |      |
|---------------------------------|----------------------|------|------|------|--------|------|
| <i>N. obliqua</i><br>( $n=75$ ) | $N^{bp}$ - $IE^{bp}$ | 0,83 | 0,73 | 0,93 | <0,001 | 76,4 |
|                                 | $N^{bp}$ - $IP^{bp}$ | 1,01 | 0,90 | 1,12 | <0,001 | 83,7 |
| <i>N. nervosa</i><br>( $n=44$ ) | $N^{bp}$ - $IE^{bp}$ | 0,69 | 0,48 | 0,90 | <0,001 | 51,7 |
|                                 | $N^{bp}$ - $IP^{bp}$ | 0,68 | 0,37 | 0,99 | <0,001 | 32,1 |



**Figura II.4:** Relación entre el número de nudos ( $N$ ) y los números de inflorescencias estaminadas (IE) y pistiladas (IP) para brotes anuales (A, B) y brotes portadores (C, D) de *N. obliqua* y *N. nervosa*. Ambos ejes se presentan en escala logarítmica. Ver detalles de las regresiones en Tabla II.2.

**Tabla II.3. Resultados del análisis de covarianza (ANCOVA) de dos vías comparando categorías de ejes (factor principal) respecto a la producción de inflorescencias estaminadas ( $IE^{ba}$ ) y pistiladas ( $IP^{ba}$ ) de brotes anuales. En el modelo se incluyen la variación inter-individual (factor aleatorio), el número de nudos de los brotes (covariable) y la interacción entre el factor principal y el factor aleatorio. Se indica el coeficiente de determinación  $R^2$  (%) asociado a cada ANCOVA.**

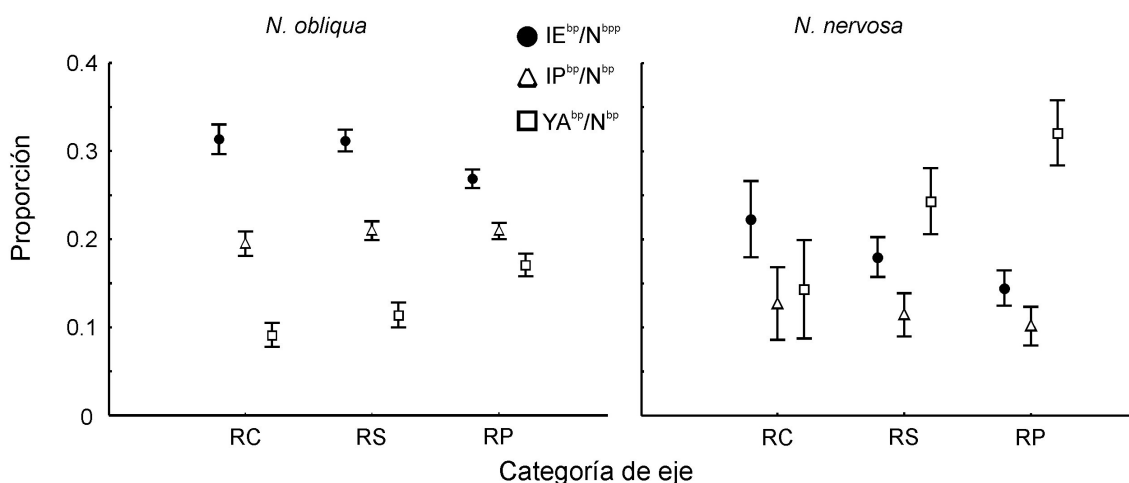
|                              | Categoría de ejes |          | Individuo |          | Número de nudos ( $N^{ba}$ ) |          | Categoría de ejes x Individuo |              |       |
|------------------------------|-------------------|----------|-----------|----------|------------------------------|----------|-------------------------------|--------------|-------|
|                              | <i>F</i>          | <i>p</i> | <i>F</i>  | <i>p</i> | <i>F</i>                     | <i>p</i> | <i>F</i>                      | <i>p</i>     | $R^2$ |
| <i>N. obliqua</i>            |                   |          |           |          |                              |          |                               |              |       |
| $IE^{ba}$<br>(n=590)         | 1,86              | 0,167    | 25,31     | <0,001   | 69,4                         | <0,001   | 2,31                          | <0,001       | 72,5  |
| $IP^{ba}$<br>(n=563)         | 1,36              | 0,267    | 5,58      | <0,001   | 58,03                        | <0,001   | 1,62                          | <b>0,008</b> | 51,1  |
| <i>N. nervosa</i>            |                   |          |           |          |                              |          |                               |              |       |
| Log ( $IE^{ba}$ )<br>(n=199) | 2,18              | 0,116    | 10,09     | <0,001   | 0,23                         | 0,631    | -                             | -            | 49,5  |
| Log ( $IP^{ba}$ )<br>(n=140) | 0,72              | 0,987    | 5,62      | <0,001   | 33,24                        | <0,001   | -                             | -            | 61,1  |



**Figura II.5:** Promedio e intervalo de confianza del 95% de los números de inflorescencias estaminadas (A, B), inflorescencias pistiladas (C, D) y yemas axilares (E, F) para brotes anuales de *N. obliqua* y *N. nervosa* de diferente tamaño y derivados de las tres categorías de ejes (RP: ramas principales; RS: ramas secundarias y RC: ramas cortas).

**Tabla II.4. Resultados del ANCOVA mediante el cual se analizó el efecto de las categorías de ejes (factor principal), los individuos (factor aleatorio) y la suma del número de nudos de los brotes anuales derivados de cada brote portador ( $N^{bp}$ ) sobre la producción de total de inflorescencias estaminadas ( $IE^{bp}$ ) y pistiladas ( $IP^{bp}$ ) de cada portador. Se indica el coeficiente de determinación  $R^2$  (%) asociado al ANCOVA.**

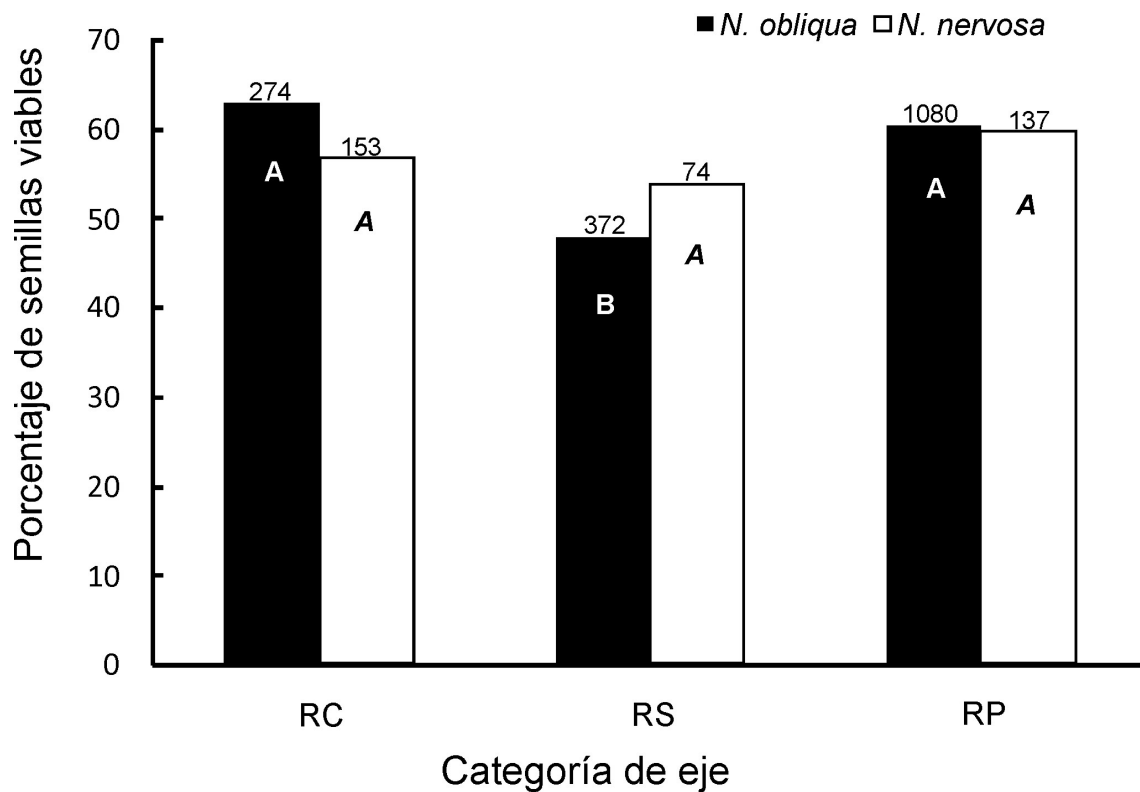
|                          | Categoría de ejes |       | Individuo |              | Log ( $N^{bp}$ ) |              | $R^2$ |
|--------------------------|-------------------|-------|-----------|--------------|------------------|--------------|-------|
|                          | F                 | p     | F         | p            | F                | p            |       |
| <i>N. obliqua</i> (n=75) |                   |       |           |              |                  |              |       |
| Log ( $IE^{bp}$ )        | 1,27              | 0,289 | 1,40      | 0,157        | 214,3            | <0,001       | 95,3  |
| Log ( $IP^{bp}$ )        | 0,98              | 0,381 | 1,04      | 0,440        | 131,1            | <0,001       | 94,8  |
| <i>N. nervosa</i> (n=44) |                   |       |           |              |                  |              |       |
| Log ( $IE^{bp}$ )        | 1,70              | 0,190 | 1,81      | 0,092        | 41,6             | <0,001       | 87,0  |
| Log ( $IP^{bp}$ )        | 0,95              | 0,398 | 2,96      | <b>0,008</b> | 10,9             | <b>0,003</b> | 79,9  |



**Figura II.6:** Promedio e intervalo de confianza del 95% de los números relativos de inflorescencias estaminadas ( $IE^{bp}/N^{bp}$ ), inflorescencias pistiladas ( $IP^{bp}/N^{bp}$ ) y yemas axilares ( $YA^{bp}/N^{bp}$ ) por brote portador para ramas principales (RP), secundarias (RS) y cortas (RC).

*Producción de semillas viables*

En el caso de *N. obliqua*, la proporción de semillas viables fue significativamente menor en las ramas secundarias que en las ramas principales y cortas ( $Ch^2 = 20,9$ , g.l.= 2,  $p < 0,001$ ; Fig. II.7). Por el contrario, en *N. nervosa*, la proporción de semillas viables no presentó diferencias significativas entre categorías de eje ( $Ch^2 = 0,7$ , g.l.= 2,  $p = 0,707$ ; Fig. II.7).



**Figura II.7:** Porcentaje de semillas viables de polinización abierta derivadas de ramas principales (RP), secundarias (RS) y cortas (RC) de *N. obliqua* (barras negras) y *N. nervosa* (barras blancas). El número de semillas analizadas se indica en la parte superior de las barras. Las letras indican diferencias significativas entre categorías de ejes dentro de cada especie (prueba  $Ch^2$ ).

## Discusión

### *Distribución de las inflorescencias y los brotes florales*

Para *N. obliqua* y *N. nervosa*, las tres categorías de ejes definidas topológicamente en este estudio se diferenciaron claramente respecto a sus características vegetativas (Tabla II.1). Por otra parte, estas categorías de ejes presentaron proporciones similares de brotes bisexuales, estaminados y pistilados, lo que implica que entre las mismas no habría una diferenciación cualitativa respecto a la producción de flores (Fig. II.3A, B). La sexualidad de los brotes anuales se relacionó con su tamaño en *N. nervosa*: los brotes estaminados fueron comúnmente brotes cortos o de tamaño intermedio, mientras que los brotes bisexuales fueron mayormente brotes largos (Fig. II.3D). En otras palabras, los brotes floríferos largos de *N. nervosa* tienen mayor probabilidad de producir inflorescencias pistiladas que los brotes cortos y de tamaño intermedio. Probablemente, la posición más distal que ocupan las inflorescencias pistiladas en los brotes de *N. nervosa* con respecto a las de *N. obliqua* (Puntieri et al. 2009) implica que en la primera especie sea necesaria la producción de mayor cantidad de nudos en los brotes para producir inflorescencias pistiladas. Sin embargo, la gran variación de tamaños de brotes observada dentro de cada categoría de ejes podría determinar que no se observaran diferencias entre las distintas categorías respecto de la presencia de brotes estaminados, pistilados y bisexuales.

Al igual que en *Nothofagus*, especies de la familia emparentada Fagaceae, presentan flores estaminadas y pistiladas en los mismos brotes, en inflorescencias bisexuales o unisexuales (Kaul 1986; Nicolini 1997; Gleissner 1999). Hasta el momento no existen trabajos disponibles en los que se evalúen variaciones cuantitativas o cualitativas en la producción de flores entre categorías de ejes en especies de Fagáceas (ver Comps et al. 1994). En especies relacionadas, como las de los géneros *Betula* y *Alnus* (Betulaceae), las flores estaminadas y pistiladas se desarrollan en brotes distintos (Ishihara & Kikuzawa 2009). Al menos en *Betula*, los brotes reproductivos con flores estaminadas y los brotes reproductivos con flores pistiladas no siempre derivan de los mismos ejes (Ishihara & Kikuzawa 2004), lo que sugiere que la



diferenciación reproductiva entre los ejes y los patrones de distribución de las flores en la copa son más notables que en el género *Nothofagus*.

*Número de inflorescencias en relación con el tamaño de los brotes y la categoría de ejes*

En el presente estudio se comparó la producción cuantitativa de inflorescencias entre categorías de ejes y entre tamaños de brotes a dos niveles: brote anual y brote portador (incluyendo todos los brotes derivados de los mismos). El número de inflorescencias pistiladas por brote anual aumentó más que proporcionalmente con el número de nudos de los mismos (Tabla II.2). El número de inflorescencias estaminadas no varió con el número de nudos de los brotes anuales en *N. nervosa*, observándose una leve relación positiva en *N. obliqua* (Tabla II.2). Estos resultados implican que, en estas especies, la sección de los brotes reproductivos de la cual se generan inflorescencias estaminadas estaría más precisamente delimitada que la sección de la que se generan inflorescencias pistiladas, lo cual concuerda con resultados previos (Puntieri et al. 2009). Como consecuencia, mientras mayor cantidad de nudos tenga el brote reproductivo, más prevalencia tendrá su función femenina. La tendencia de las especies de *Nothofagus* a desarrollar brotes más largos en posiciones distales de los brotes portadores (Puntieri et al. 2003), sugiere que las inflorescencias pistiladas estarían más concentradas en brotes ubicados en posiciones distales en el brote portador (tal como se ha observado en *Quercus* spp.; Kaul 1986). Sin embargo, la producción relativa de inflorescencias pistiladas fue similar entre los brotes derivados de categorías de ejes de distinta ubicación en la copa. Esto último no apoya la idea planteada en la introducción de una mayor proporción de inflorescencias pistiladas en la periferia de la copa. En otras palabras, puede esperarse cierta tendencia a una mayor concentración de inflorescencias pistiladas en brotes periféricos, aunque dicha tendencia no estaría condicionada por aspectos topológicos (de ubicación de los brotes en la rama) sino por la relación entre el tamaño de los brotes y la producción de estas inflorescencias.

El análisis de la producción de inflorescencias a nivel de los brotes portadores mostró, para ambas especies, un incremento del número de inflorescencias estaminadas proporcionalmente menor al incremento del número de nudos (Tabla II.2). Lo mismo pudo observarse para las inflorescencias pistiladas en *N. nervosa*. En contraste, para brotes portadores de *N. obliqua*, el incremento en el número de inflorescencias pistiladas fue proporcional al incremento en el número de nudos. Para estas especies, la disponibilidad de meristemas se relaciona positivamente con la suma de inflorescencias de todos los brotes anuales derivados de cada portador, lo cual también se ha visto en otras especies (Lehtilä & Larsson 2005). No obstante, la producción de inflorescencias estaminadas en ambas especies y de inflorescencias pistiladas en *N. nervosa*, se volvería proporcionalmente menos importante a medida que aumenta el número total de nudos derivados de cada portador. Similarmente a lo que se observó a nivel de brote anual, las categorías de ejes de las que derivaron los brotes portadores no variaron respecto a la producción de flores (Tabla II.4).

Considerando los resultados obtenidos, se puede concluir que la producción de flores en *N. nervosa* y *N. obliqua* estaría determinada principalmente por el tamaño de los brotes y no por la categoría de ejes de la que derivan los mismos. El tamaño de los brotes se relaciona con el número de meristemas asignados para la producción de inflorescencias estaminadas y pistiladas, lo cual es más notable a nivel de los brotes anuales que a nivel de los brotes portadores. Es de destacar que el factor "individuo" contribuyó significativamente a la variación en el número de inflorescencias pistiladas por brote portador en *N. nervosa* (Tabla II. 3). Este componente individual de la variación en el número de inflorescencias podría vincularse a diferencias genéticas, de estadio ontogenético entre los ejemplares muestreados, o bien a diferencias ambientales dadas por la ubicación de cada ejemplar. La posible implicancia de estos factores en la producción de flores debería ser estudiada en poblaciones constituidas por ejemplares de la misma edad y de origen conocido, ubicados en un ambiente homogéneo.

*Funciones vegetativa y reproductiva en ejes de Nothofagus*

La producción de flores en especies arbóreas implica el desarrollo de ejes y/o brotes con diferentes grados de especialización dependiendo de las especies (Bell 1991; Suzuki 2000, 2001; Normand et al. 2009). La producción de flores en ejes especializados permite separar las funciones reproductivas en espacio y tiempo (por ej. en *Betula* spp. y *Alnus* spp.; Caesar & Macdonald 1983; Ishihara & Kikuzawa 2009) y concentrar la demanda de recursos y meristemas asociada a la producción de flores. En *Nothofagus*, las flores se desarrollan en brotes que cumplen tanto funciones vegetativas como reproductivas (al igual que en *Fagus* spp.; Comps et al. 1994). En estos árboles, las flores y las hojas se desarrollan simultáneamente y, según los resultados de este trabajo, el número de órganos reproductivos de los brotes está positivamente relacionado con el número de nudos (catafilos + nomofilos) de los mismos, como ocurre en otras especies (Normand et al. 2009; Sánchez-Humanes et al. 2011). Las inflorescencias pistiladas de *Nothofagus* son de tamaño muy pequeño, por lo cual podría asumirse que su interferencia sobre las funciones vegetativas debería ser poco relevante en términos de asignación de biomasa, por lo menos antes del desarrollo de los frutos y semillas. De acuerdo con el presente estudio, la producción de flores representaría, principalmente, un costo en términos de meristemas, afectando la capacidad futura de ramificación del eje. Debido a que las inflorescencias estaminadas y pistiladas ocupan distintas posiciones en el brote anual (Puntieri et al. 2009), sus efectos sobre la ramificación ulterior de los brotes serían distintos. Las inflorescencias pistiladas ocupan nudos de posición intermedia a distal; nudos de similar posición en brotes vegetativos desarrollan ramas al año siguiente del alargamiento del brote portador. Por lo tanto, el desarrollo de inflorescencias pistiladas afecta directamente la ramificación del brote en el año siguiente a la producción de flores. Si se considera el gradiente acrópeto de aumento del tamaño de las ramas que caracteriza a estas especies, el hecho de que las inflorescencias pistiladas se ubiquen en nudos más distales en *N. nervosa* que en *N. obliqua* (Puntieri et al. 2009) determina que el costo de esa floración, en términos de crecimiento futuro, sea mayor en la primera especie. El costo meristemático de

las inflorescencias estaminadas sería a largo plazo, debido a que éstas ocupan nudos proximales en los cuales se desarrollan, en brotes vegetativos, yemas latentes que pueden dar lugar a ramas varios años después de la extensión del brote portador (Barthélemy et al. 1999). En base a los resultados obtenidos, la mayor restricción para la futura ramificación de los ejes se produce en los brotes floríferos cortos, en los cuales quedan pocos o ningún meristema vegetativo después de la floración (ver Figs. II.5E, F y II.6). Por el contrario, los brotes florales largos producen, en proporción, mayor cantidad de yemas axilares, por lo que mantienen un mayor potencial de ramificación que los brotes cortos.

Las especies arbóreas anemófilas comúnmente producen grandes cantidades de flores, lo cual aumentaría la eficacia de la polinización mediada por viento. En estas especies, la localización de las flores en la periferia de la copa aumentaría las probabilidades de polinización cruzada (Lovett Doust & Lovett Doust 1988; Ipinza & Espejo 2000). Estas especies suelen presentar flores pistiladas agrupadas en inflorescencias conspicuas, con estigmas prominentes y/o ubicadas en ejes especializados, tal como se observa en los géneros *Betula* y *Quercus* (Kaul & Abbe 1984; Kaul 1986; Ishihara & Kikuzawa 2004; Leins & Erbar 2010). En especies anemófilas caducifolias, es frecuente que la antesis de las flores preceda al desarrollo vegetativo estacional (William & Adam 1994). En comparación con otras especies anemófilas emparentadas (como muchas de las especies de las familias Fagaceae Betulaceae y Juglandaceae), los *Nothofagus* parecerían tener un menor nivel de adecuación morfológica para la polinización anemófila, considerado que presentan flores pistiladas muy pequeñas y con estigmas sésiles poco desarrollados, las cuales, a su vez, se agrupan en inflorescencias sésiles o cortamente pedunculadas. Asimismo, la simultaneidad temporal entre el despliegue estacional de las hojas y la antesis de las flores en *Nothofagus* podría implicar la obstrucción del flujo de polen por parte de las hojas. Estas características estructurales desfavorables, a primera vista, para la polinización anemófila, podrían ser compensadas por la producción de flores en brotes de tamaños variados y ubicados en distintas categorías de ejes, como se observó en este estudio.

Como consecuencia de la amplia distribución de flores se verificaría una reducción en la capacidad de ramificación de los ejes en el año siguiente. En este contexto, podría plantearse si la producción masiva de flores en forma periódica habría evolucionado como un sistema de regulación que les permitiría a las especies perennes mantener un equilibrio entre las funciones vegetativa y reproductiva (Obeso 2002); las distribuciones de las flores y de las estructuras vegetativas (yemas) estarían involucradas en ese sistema de regulación. La mayor cantidad de yemas axilares detectada en ramas principales con respecto a ramas secundarias y cortas, compensa parte los costos meristemáticos asociados a la producción de flores y asegura la expansión lateral de dichos ejes en los años siguientes a la floración.

#### *Viabilidad de semillas en relación a las categorías de ejes*

Al menos en *N. obliqua*, la proporción de semillas viables varió entre las distintas categorías de ejes. En la introducción se había planteado la hipótesis de que los brotes ubicados en la periferia de la copa presentarían mayor proporción de semillas viables debido a su mayor probabilidad de captura de polen. Esta hipótesis no fue confirmada por los resultados. Si bien no se observaron diferencias notables, los brotes derivados de ramas principales (los más periféricos) y los derivados de ramas cortas (los menos periféricos) produjeron, proporcionalmente, mayor cantidad de semillas viables que los brotes derivados de ramas secundarias (de posición intermedia). El hecho de no encontrar diferencias entre las dos categorías más contrastantes topológica y morfológicamente (ramas principales y cortas), sugiere que la producción de semillas viables en estas especies no estaría afectada por aspectos funcionales de los brotes floríferos. Asimismo, la idea de que la disponibilidad de recursos no sería un limitante importante de la viabilidad de las semillas es apoyada por el hecho de que, por causas que se desconocen, en *Nothofagus* los frutos se desarrollan independientemente de la presencia de embrión (Riveros et al. 1995b).

El menor porcentaje de semillas viables observado en brotes de ramas secundarias de *N. obliqua* puede ser explicado en base a las condiciones de

polinización. En *N. obliqua* y *N. nervosa*, la liberación de polen ocurre luego de la expansión de las hojas, lo que puede significar una barrera física para el flujo de polen. Es posible que esta interferencia sea mayor en zonas intermedias de la copa, en donde se ubican las ramas secundarias. Cerca del tronco, la interferencia generada por las hojas sería menor debido a que los brotes de ramas cortas producen pocas hojas y ramas. El flujo de polen se ha estudiado a escala individual y poblacional (Riveros et al. 1995a; Knapp et al. 2001), pero hasta el momento no se han realizado, en mi conocimiento, estudios que cuantifiquen el flujo de polen en distintos sectores de la copa en estas especies. En el caso de *N. nervosa*, no se observaron diferencias estadísticas entre categorías de ejes en cuanto a la viabilidad de las semillas, pero gráficamente se encontró una tendencia similar a la observada en *N. obliqua* (Fig. II.7).

### *Conclusiones*

En *N. obliqua* y *N. nervosa* se desarrollan brotes floríferos a partir de ramas principales, secundarias y cortas, los cuales portan, a menudo, ambos tipos de flores. En el caso de *N. nervosa*, la mayoría de los brotes floríferos que portan sólo inflorescencias estaminadas son brotes cortos o de tamaño intermedio, mientras que la mayoría de los brotes largos son bisexuales. Las diferencias cuantitativas en la producción de flores entre distintas categorías de ejes están dadas, principalmente, por las diferencias de tamaño de los brotes producidos por cada categoría. Los brotes floríferos de ramas principales producen, proporcionalmente, mayor cantidad de yemas axilares que los brotes de ramas secundarias y ramas cortas. La proporción de semillas viables parece ser menor en ramas secundarias que en ramas principales y cortas.

## **Capítulo III: Producción de semillas en *N. obliqua* relacionada con la posición de las flores en el brote portador y la posición del brote florífero en la copa**

### **Introducción**

En muchas especies vegetales es común que la producción de semillas represente una proporción baja del número de óvulos producidos por planta (Stephenson 1981; Lee 1988). En general, se considera que la fracción de óvulos que se desarrollan como semillas está limitada por la cantidad, calidad y origen del polen recibido, la disponibilidad de recursos para la producción de frutos y semillas, el daño causado por herbívoros y patógenos y/o por las condiciones ambientales (Lee 1988; Knight et al. 2005; Aizen & Harder 2007). En muchas especies, la producción de semillas viables en un año determinado, puede exhibir alto grado de variación intra-individual (Stephenson 1981; Lee 1988). Numerosos estudios, realizados mayormente en plantas herbáceas, señalan que dicha variación se debe a la distribución heterogénea de recursos hacia las flores (Lee 1988; Navarro 1996; Diggle 1995, 2003; Kliber & Eckert 2004; Cao et al. 2011). El papel de la efectividad de la polinización sobre la producción de semillas viables se ha comprobado, sobre todo, en especies diclinas y en especies monoclinales auto-incompatibles, las cuales dependen de la llegada de polen externo a cada flor para la producción de semillas (Nilsson & Wästljung 1987; Smith et al. 1988; William & Adam 1994; Riveros et al. 1995*b*; Dudash 1997; Knapp et al. 2001; Waites & Ågren 2006). No obstante, existen pocos registros disponibles en los que se evalúe la asociación entre las variaciones intra-individuales en la viabilidad de las semillas y las probabilidades de polinización con polen de la misma o de otras plantas co-específicas (Smith 1988; Navarro 1997).

Los factores que condicionan la viabilidad de las semillas pueden tener distinto grado de influencia dependiendo de la ubicación espacial de las flores. Esto se refleja en las variaciones en la producción de semillas viables asociadas a la posición de las flores, por ejemplo, en una inflorescencia o en un

brote (Diggle 2003). En varios casos se ha encontrado que, dentro de una inflorescencia, las flores basales producen más semillas que las distales (Diggle 1995; Cao et al. 2011). Diggle (1995) menciona que existe mayor aborto de óvulos en los frutos distales como consecuencia de la asignación prioritaria de recursos hacia las flores proximales, lo cual puede vincularse a su posición y/o a su maduración más temprana. Patrones similares pueden observarse entre inflorescencias de un mismo brote, como es el ejemplo de *Anthyllis vulneraria*, especie en la que el peso de las semillas varía según la posición de la inflorescencia en el brote florífero, lo cual se relacionaría con la distribución de recursos hacia las flores dentro del brote (Navarro 1996). Así como la disponibilidad de recursos puede limitar diferencialmente la viabilidad de las semillas de flores de una misma inflorescencia o brote, lo mismo puede ocurrir con otros factores limitantes como la llegada de polen con capacidad para fertilizar los óvulos. Por ejemplo, en la hierba *Silene acutifolia*, flores de distinta ubicación en la inflorescencia tienen distintas probabilidades de autopolinización, lo que repercute en el porcentaje de germinación de las semillas (Buide 2004). No obstante, en especies arbóreas existen pocos registros publicados en los que se haya abordado esta problemática desde una escala de análisis mayor a la de brote o inflorescencia.

En las especies arbóreas anemófilas, la complejidad estructural de la copa puede determinar que la ubicación de las flores condicione tanto la liberación y recepción de polen, como la provisión de recursos. Esto explicaría que, en estas especies, las flores se dispongan en la periferia de la copa, facilitándose el acceso de las corrientes de aire (Waller 1988). En este contexto, es posible pensar que existan diferencias en la producción de semillas derivadas de flores ubicadas en distintas posiciones dentro de la copa. Sin embargo, esto se ha evaluado para pocas especies hasta el momento (Smith et al. 1988). Asimismo, en la copa de los árboles conviven ramas de diferente edad y, por lo tanto, diferente vigor. Por ejemplo, en árboles adultos no reiterados (ver concepto de reiteración en Cap. I), las ramas ubicadas en zonas bajas de la copa suelen ser de mayor edad y, por lo tanto, se encuentran en una fase ontogenética más avanzada que las ramas altas. Esto podría



implicar una mejor provisión de recursos a las flores ubicadas en ramas altas determinando una mayor producción de semillas viables en dichas ramas.

De acuerdo con varios estudios previos (incluido el capítulo VI de esta tesis), las especies de *Nothofagus* son auto-incompatibles. En poblaciones naturales de *Nothofagus* es común que una proporción alta de los frutos se encuentren desprovistos de semilla o presenten una semilla vana (o sea, carente de embrión; Manson 1974; Ledgard & Cath 1983; Prémoli 1991; Martínez-Pastur et al. 1994; Riveros et al. 1995; Bahamonde et al. 2011). Si bien los daños causados por insectos son parcialmente responsables del bajo nivel de viabilidad de estas semillas (Carrillo & Cerda 1987; Marchelli & Gallo 1999; Burgos et al. 2008), también se observan numerosas semillas vanas no dañadas. En *Nothofagus*, los frutos y las cúpulas leñosas asociadas se desarrollan independientemente de la ocurrencia de fertilización, lo que implica la inversión de recursos para la formación del conjunto que forman la cúpula y los frutos que ésta encierra, aún cuando los mismos no incluyen semillas viables (Poole 1950). Teniendo esto en consideración, es posible pensar que la baja proporción de semillas viables (por brevedad y considerando que los frutos son uni-seminados, en lo sucesivo se utilizarán los términos fruto y semilla como sinónimo) observada en estas especies no se deba a limitaciones en términos de recursos y que otros aspectos, tales como la disponibilidad de polen compatible, podrían estar involucrados (por ej. Nilsson & Wastljung 1987; Smith et al. 1988; Knight et al. 2005; Aizen & Harder 2007). A partir de evaluaciones del número de semillas producidas y la viabilidad de las mismas en poblaciones de *Nothofagus*, se han encontrado variaciones importantes entre años y entre sitios (Marchelli & Gallo 1999; Monks & Kelly 2006; Bahamonde et al. 2011). No obstante, el grado de variación intra-individual en dichas variables ha sido menos estudiado. En el capítulo II se observó que brotes floríferos derivados de distintas categorías de ejes pueden presentar distinta proporción de semillas viables, lo cual fue atribuido, tentativamente, a las probabilidades diferenciales de recibir polen por parte de flores localizadas en ejes más cercanos o más alejados del tronco principal. Considerando dichos resultados, es necesario profundizar los estudios sobre la relación entre la

posición de las flores y su producción de semillas viables, lo que aportaría en la comprensión de los factores que determinan el éxito de la reproducción de estas especies en condiciones naturales. Dos de los posibles efectos posicionales que aún no han sido evaluados son: (1) el relacionado con la posición de las flores en el brote anual y (2) el relacionado con la altura del brote florífero en la copa del árbol. Los brotes floríferos de *N. obliqua* pueden presentar entre una y 12 inflorescencias pistiladas, las cuales se ubican, muy a menudo, en nudos consecutivos y distales respecto de aquellos en los que se desarrollan las inflorescencias estaminadas (Puntieri et al. 2009). Debido a que el gradiente de alargamiento de los nudos de un mismo brote va desde el extremo proximal hacia el extremo distal, los estigmas de las flores pistiladas también quedarían expuestos a la polinización en forma secuencial, lo que podría determinar distintas probabilidades de auto-polinización según la posición de la flor pistilada en el brote que la porta (Puntieri et al. 2009). Por otro lado, a nivel de la copa del árbol, es posible que flores pistiladas ubicadas en ramas desarrolladas a distintas alturas reciban polen en diferentes cantidades y/o de distintos orígenes. Por ejemplo, puede pensarse que ramas bajas están más expuestas a recibir polen del mismo árbol, como producto de la liberación de polen de las ramas superiores. Por otra parte, modelos de dispersión de polen en especies anemófilas resaltan la importancia de considerar diferencias en la distribución vertical del polen debido, por ejemplo, a que la vegetación del sotobosque puede actuar como barrera (Millerón et al. 2012). De existir diferencias cuantitativas y cualitativas en las probabilidades de polinización entre flores ubicadas a distintas alturas, éstas deberían reflejarse en la proporción de semillas viables que derivarían de esas flores.

En el capítulo II se analizó la viabilidad de las semillas en relación a la posición de los brotes floríferos con respecto al tronco o eje principal, tomando ramas bajas. Este capítulo tiene como objetivo evaluar la producción de semillas viables en relación a la posición de las flores pistiladas en los brotes anuales y a la altura de las ramas en la copa del árbol. Se plantean como hipótesis: (A) que la viabilidad de las semillas difiere entre cúpulas en distintas posiciones en el brote anual como consecuencia de distintas probabilidades de

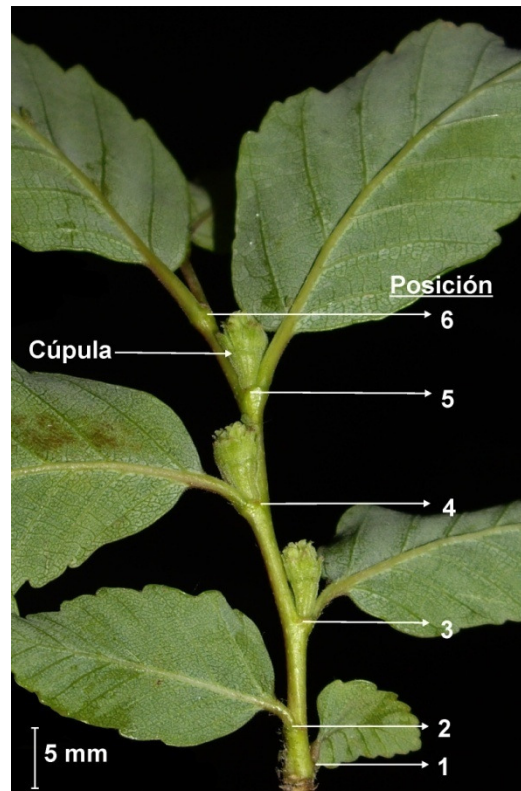
auto-polinización con polen de la misma planta, y (B) que ramas ubicadas a mayor altura en la copa de un árbol tendrán mayor probabilidad de recibir polen de otros árboles que ramas ubicadas a menor altura del mismo árbol (que recibirían mayor cantidad de polen del mismo árbol), por lo cual las ramas bajas presentarán menor proporción de semillas viables que las ramas altas.

### **Materiales y Métodos**

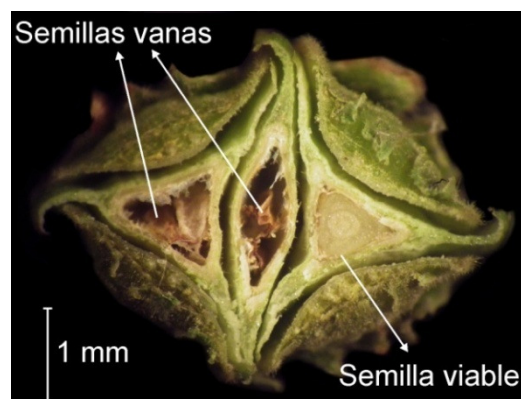
En febrero de 2012, antes de la apertura de las cúpulas y la consecuente liberación de los frutos, se seleccionaron 10 ejemplares adultos de *N. obliqua* de una población natural ubicada en el Parque Nacional Lanín (rango latitudinal: 40° 09' 08"- 40° 08' 58" S; rango longitudinal: 71° 29' 44"-71° 33' 56" O; rango altitudinal: 678-916 m s.n.m.). La distancia máxima entre dos de los árboles seleccionados fue de 5,5 km. La muestra utilizada estuvo limitada por la disponibilidad de ejemplares de tamaños similares y con presencia de cúpulas desarrolladas en la estación de crecimiento 2011-2012. Los árboles seleccionados tenían, aproximadamente, entre 20 y 35 años de edad (determinada a partir del conteo de unidades de alargamiento de las ramas bajas), presentaban un diámetro basal medio de 30,4 cm (DE= 7,3 cm) y una altura aproximada de entre 15 y 20 m. Todos los árboles se encontraban en zonas abiertas lo que permitió contar con ramas floríferas a distintas alturas. No se utilizaron ejemplares de la especie *N. nervosa* debido a que, los ejemplares florecidos observados en el año de estudio eran de edades muy heterogéneas y avanzadas. De cada árbol se seleccionaron dos ramas principales portadoras de brotes floríferos, las cuales difirieron en la altura sobre el suelo a la que se encontraban sus brotes florales: la rama baja presentó sus brotes florales a 2,3 m ( $\pm 0,7$ ) de altura promedio sobre el suelo y la rama alta los presentó a 6,2 m ( $\pm 0,3$ ) de altura promedio. Debido a que las ramas se desarrollaron de forma aproximadamente horizontal, las alturas mencionadas se relacionaron directamente con las alturas sobre el tronco a las cuales derivaron las ramas principales seleccionadas; las ramas bajas se iniciaron a partir del tronco varios años antes que las ramas altas del mismo árbol. Dentro de cada árbol, las ramas alta y baja presentaban la misma orientación respecto del norte. De

cada rama se cortaron 30 brotes florales; se seleccionaron los brotes con mayor cantidad de cúpulas (el 93% de los brotes elegidos presentaban entre 3 y 8 cúpulas). Los brotes se seleccionaron de la zona más periférica de cada rama. Los brotes se colocaron en bolsas plásticas herméticamente cerradas y se trasladaron al laboratorio en una heladera portátil ( $<10^{\circ}\text{C}$ ), lo cual posibilitó que las cúpulas permanecieran cerradas y que los frutos no fuesen liberados de los brotes.

A fin de caracterizar el tamaño de los brotes florales se registraron, para cada uno, el diámetro basal del tallo, el número de nomofilos y el número de cúpulas. El diámetro basal se midió justo por encima de las cicatrices dejadas por los catafilos más basales, siguiendo el ejemplo de otros estudios sobre especies de *Nothofagus* (por ej. Puntieri et al. 2003, 2007; Stecconi et al. 2010). En base a estudios sobre otras especies, se consideró que el diámetro del tallo es una variable relacionada con la superficie de tejidos de conducción del tallo y, en consecuencia, con la capacidad de un eje de incorporar recursos (Puntieri et al. 2007; Yoshimura 2011). El número de nomofilos de un brote, por otro lado, determina la capacidad fotosintética de un brote. De manera que, a fin de comparar las capacidades relativas de los brotes de generar y atraer recursos se calcularon, para cada brote, las relaciones: (A) diámetro/ $n^{\circ}$  de nomofilos, (B) diámetro/ $n^{\circ}$  de cúpulas y (C)  $n^{\circ}$  de nomofilos/ $n^{\circ}$  de cúpulas. Se registraron la posición ordinal de cada cúpula en el brote y la posición en la copa (baja o alta) de la rama correspondiente. La posición de las cúpulas en el brote florífero se determinó tomando como referencia el nomofilo más proximal (Fig. III.1). Las cúpulas fueron cortadas transversalmente con una hoja de afeitar y se consideró la presencia de tejido de reserva de color blanco en el embrión como evidencia de la viabilidad de cada una de las tres semillas de cada cúpula (Fig. III.2). Las cúpulas con defectos de desarrollo o que presentaban daños visibles causada por insectos fueron descartadas.



**Figura III.1:** Brote florífero de *N. obliqua* en el cual están numerados en forma consecutiva los nudos portadores de nomófilos; se observan cúpulas en los nudos 3, 4 y 5.



**Figura III.2:** corte transversal de cúpula indicando la viabilidad de las semillas

### *Análisis de datos*

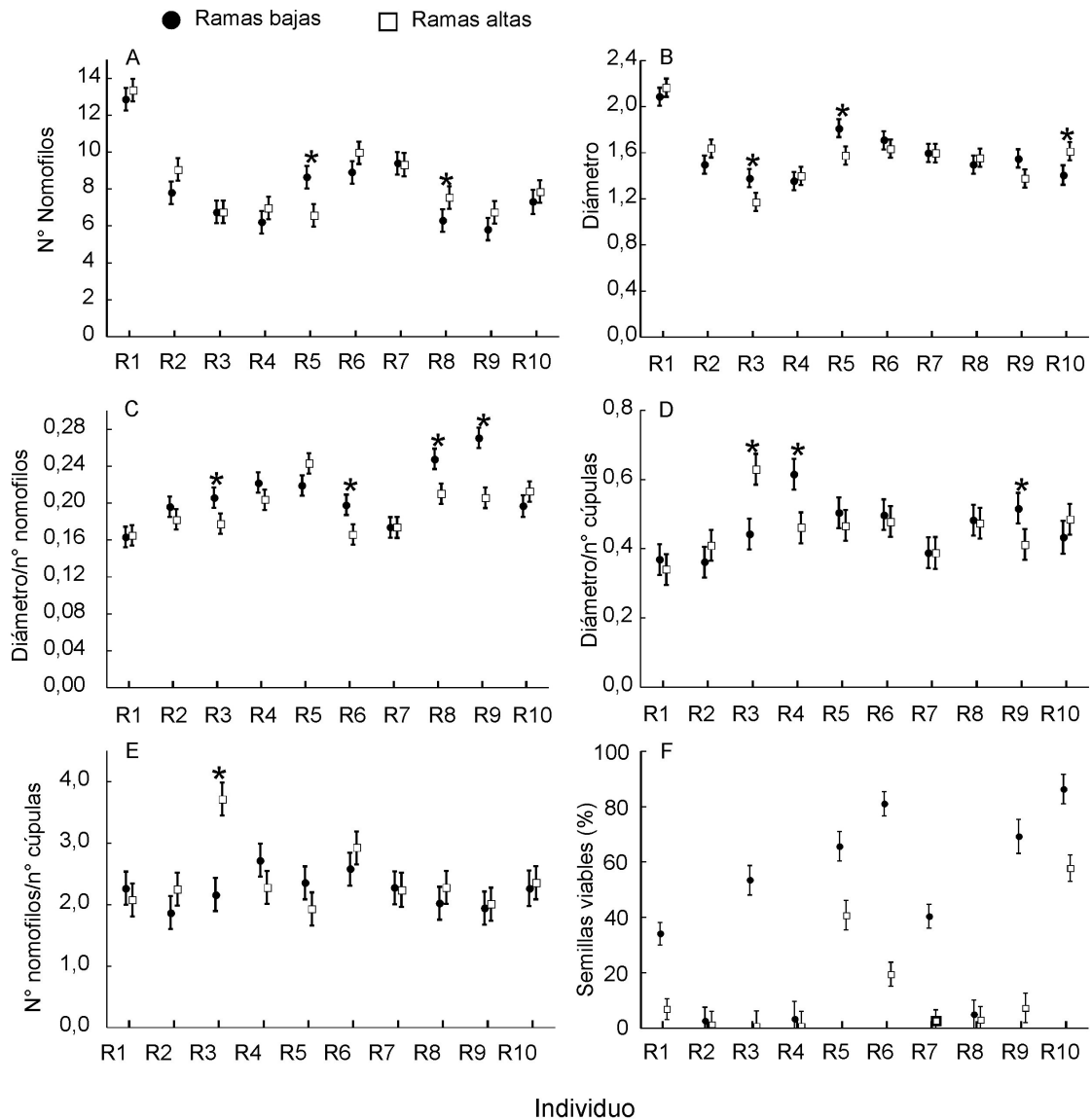
Se compararon los brotes de ramas altas y bajas respecto al número de nomofilos, al diámetro basal y a las relaciones diámetro/nº de nomofilos, diámetro/nº de cúpulas y nº de nomofilos/nº de cúpulas. Para cada variable se aplicó un ANDEVA de dos vías, incluyendo a la altura de la rama como factor principal y al individuo como factor aleatorio. Debido a que los datos originales no cumplieron con los supuestos de normalidad, se aplicó la transformación logarítmica (base 10) de los mismos. Cuando hubo efecto significativo de alguno de los factores y/o de la interacción entre los mismos, se aplicaron pruebas *a posteriori* de Tukey-Kramer.

Entre ramas altas y ramas bajas se comparó el número total de semillas (vanas y con embrión) producidas, para lo cual se aplicó un ANCOVA con la altura de las ramas como factor principal. En dicho análisis se incluyó la suma del número de nomofilos de todos los brotes extraídos de cada rama como covariable, ya que anteriormente se observó una relación lineal y positiva entre el número de nomofilos de los brotes y el número de inflorescencias pistiladas producidas (ver Capítulo II). A fin de describir las relaciones entre el tamaño de los brotes y la cantidad de cúpulas producidas se probaron ajustes lineales y sigmoideos relacionando el número de nomofilos del brote o el diámetro del tallo del brote con el número de cúpulas producidas. No obstante, para el rango de datos obtenidos, no se encontraron diferencias notables entre ambos modelos, por lo cual la relación entre el número de cúpulas y las variables morfológicas de los brotes (número de nomofilos y diámetro) se analizó mediante una regresión lineal. Para cada árbol se comparó la proporción de semillas viables entre cúpulas de distinta posición en el brote anual, mediante pruebas de  $Ch^2$ . En estas comparaciones, las ramas alta y baja se analizaron separadamente. Por otra parte, se comparó la proporción de semillas viables entre las ramas alta y baja de cada árbol a través de pruebas de  $Ch^2$ . Por último, se calcularon coeficientes de correlación de Spearman entre cada una de las variables morfológicas de los brotes (número de nudos y diámetro) y la proporción de semillas viables. Para todas las pruebas estadísticas utilizadas se adoptó un nivel de significancia del 5%.

## Resultados

La morfología de los brotes anuales difirió entre rama alta y rama baja sólo en algunos individuos, siendo significativa la interacción entre el factor fijo (altura de la rama) y el factor aleatorio (individuo) sobre el diámetro ( $F= 8,1$ ;  $p< 0,001$ ), el número de nomofilos ( $F= 7,0$ ;  $p< 0,001$ ), y las relaciones diámetro/nº de nomofilos ( $F= 9,5$ ;  $p< 0,001$ ), diámetro/nº de cúpulas ( $F= 7,6$ ;  $p<0,001$ ) y nº nomofilos/nº de cúpulas ( $F= 8,8$ ;  $p< 0,001$ ; Fig. III.3). Respecto al número de nomofilos de los brotes de las ramas alta y baja, sólo se encontraron diferencias significativas en dos individuos, con resultados opuestos entre los mismos (Fig. III.3A). En cuanto al diámetro, tres individuos mostraron valores significativamente diferentes entre los brotes derivados de ramas de distinta altura; en dos de los árboles el diámetro de los brotes de la rama baja fue mayor, mientras que en el árbol restante se observó lo contrario (Fig. III.3B). En cuatro individuos los brotes de la rama baja presentaron mayor relación diámetro/nº de nomofilos (Fig. III.3C), mientras que la relación diámetro/nº de cúpulas varió entre brotes de la rama alta y la rama baja en tres individuos, entre los cuales no hubo un patrón de diferenciación constante (Fig. III.3D). La relación nº de nomofilos/nº de cúpulas fue, en general, constante en los brotes de cada individuo, aunque en un caso se encontraron diferencias significativas, con valores mayores en los brotes de la rama alta (Fig. III.3E).

Todos los brotes analizados presentaron cúpulas a partir del tercer nomofilo (contado desde el extremo proximal del brote portador). Se analizaron en total 3186 semillas derivadas de ramas bajas y 3117 derivadas de ramas altas. La proporción de semillas viables difirió notablemente entre los árboles seleccionados (Fig. III.3F). En términos generales, cúpulas de distinta posición en el brote no mostraron diferencias en la proporción de semillas viables (Tabla III.1). Sólo en uno de los ejemplares se observó un porcentaje de viabilidad significativamente menor en las semillas derivadas de las cúpulas más proximales (ubicadas en posición 3) de los brotes ubicados en la rama baja, que en las cúpulas de las demás posiciones de esos brotes (Tabla III.1).



**Figura III.3:** Para brotes de la rama alta y la baja en cada individuo, promedio ( $\pm$  intervalo de confianza del 95%) de número de nomofilos (A), diámetro (B), relaciones diámetro/nº de nomofilos (C), diámetro/nº de cúpulas (D), y nº de nomofilos/nº de cúpulas (E), y porcentaje de semillas viables (F). Los asteriscos indican deferencias significativas entre las ramas alta y baja del mismo individuo (ver comparaciones estadísticas del gráfico F en Tabla III.2).



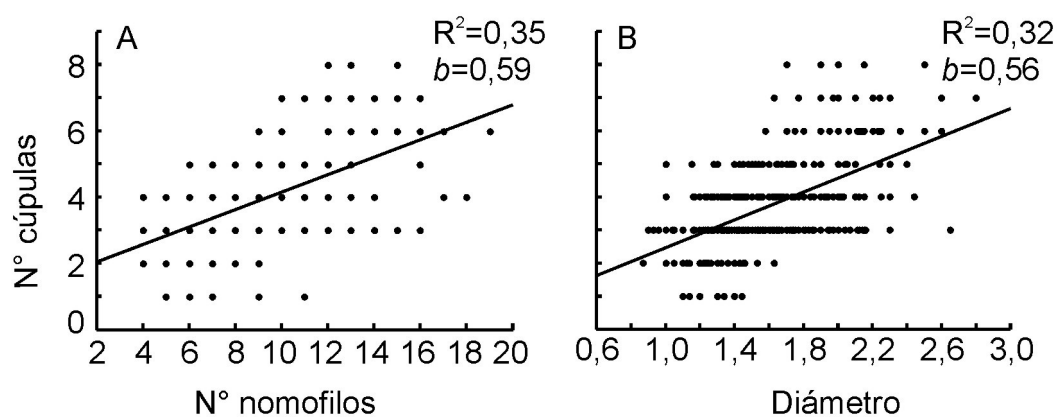
**Tabla III.1. Resultados de las comparaciones de las proporciones de semillas viables derivadas de cúpulas de distinta ubicación en el brote portador para cada individuo (1-10) y posición de los brotes (Alta o Baja). Se indican los valores del estadístico de  $Chi^2$ , la probabilidad de error ( $p$ ) y el número de grados de libertad (g.l.). Una diferencia significativa entre semillas de diferente ubicación en el brote portador se registró solamente para ramas bajas del árbol 6 (negritas).**

| Individuo | Rama | $Chi^2$     | $p$         | g.l. |
|-----------|------|-------------|-------------|------|
| 1         | Alta | 5,1         | 0,65        | 7    |
|           | Baja | 1,8         | 0,93        | 6    |
| 2         | Alta | 2,0         | 0,74        | 4    |
|           | Baja | 6,4         | 0,17        | 4    |
| 3         | Alta | 0,4         | 0,81        | 2    |
|           | Baja | 3,7         | 0,29        | 3    |
| 4         | Alta | 1,4         | 0,49        | 2    |
|           | Baja | 4,3         | 0,12        | 2    |
| 5         | Alta | 0,7         | 0,72        | 2    |
|           | Baja | 2,8         | 0,28        | 3    |
| 6         | Alta | 1,8         | 0,87        | 5    |
|           | Baja | <b>13,5</b> | <b>0,02</b> | 5    |
| 7         | Alta | 6,8         | 0,34        | 6    |
|           | Baja | 7,1         | 0,22        | 5    |
| 8         | Alta | 0,2         | 1,00        | 4    |
|           | Baja | 1,4         | 0,71        | 3    |
| 9         | Alta | 4,9         | 0,18        | 3    |
|           | Baja | 0,7         | 0,72        | 2    |
| 10        | Alta | 5,5         | 0,23        | 4    |
|           | Baja | 1,8         | 0,62        | 3    |

El ANCOVA no mostró una variación significativa en el número total de semillas entre ramas bajas y ramas altas ( $F= 1,7$ ;  $p= 0,23$ ), mientras que sí hubo un efecto significativo de la covariable, es decir de la suma de los nomofilos de todos los brotes de cada rama ( $F= 67,7$ ;  $p< 0,001$ ). El número de cúpulas producidas por brote presentó una relación positiva con el número de nomofilos ( $F= 312,3$ ;  $p< 0,001$ ; Fig. III.4A) y el diámetro de los mismos ( $F= 274,8$ ;  $p< 0,001$ ; Fig. III.4B). Por otra parte, en nueve de los diez individuos estudiados, la proporción de semillas viables fue mayor en las ramas bajas que en las ramas altas, siendo esta diferencia más notable en aquellos individuos que produjeron mayor cantidad de semillas viables (Fig. III.3F; Tabla III.2). La proporción de semillas viables producidas por un brote no tuvo correlación con el número de nomofilos del mismo ( $p= 0,7$ ), mientras que se observó una correlación positiva con el diámetro ( $\rho= 0,2$ ;  $p< 0,001$ ).

**Tabla III.2. Números totales de semillas con embrión (viabiles; +) y sin embrión (-) y porcentaje de frutos con embrión (%+) para cada individuo, y comparación, por individuo, entre brotes de las ramas altas y bajas en cuanto a la proporción de semillas con embrión.**

| Individuo | Bajas |     |      | Altas |     |      | $Ch^2$ | $p$    |
|-----------|-------|-----|------|-------|-----|------|--------|--------|
|           | +     | -   | %+   | +     | -   | %+   |        |        |
| 1         | 172   | 347 | 33,1 | 37    | 521 | 6,6  | 120,8  | <0,001 |
| 2         | 12    | 366 | 3,2  | 4     | 365 | 1,1  | 3,9    | 0,04   |
| 3         | 128   | 133 | 49,0 | 2     | 145 | 1,4  | 98,5   | <0,001 |
| 4         | 8     | 202 | 3,8  | 2     | 235 | 0,8  | 4,5    | 0,03   |
| 5         | 214   | 110 | 66,1 | 115   | 146 | 44,1 | 28,4   | <0,001 |
| 6         | 256   | 47  | 84,5 | 61    | 239 | 20,3 | 248,8  | <0,001 |
| 7         | 165   | 216 | 43,3 | 9     | 336 | 2,6  | 164,6  | <0,001 |
| 8         | 13    | 266 | 4,7  | 9     | 297 | 2,9  | 1,2    | 0,28   |
| 9         | 187   | 83  | 69,3 | 21    | 273 | 7,1  | 233,3  | <0,001 |
| 10        | 225   | 36  | 86,2 | 179   | 121 | 59,7 | 48,8   | <0,001 |



**Figura III.4:** Regresión lineal entre el número de cúpulas y (A) el número de nomofilos o (B) el diámetro de los brotes floríferos.

## Discusión

En poblaciones naturales de *Nothofagus* ocurren altas variaciones inter-  
anuales e inter-poblacionales en la cantidad y calidad de las semillas  
producidas (Marchelli & Gallo 1999). En este trabajo se observaron, para una  
misma población y año de estudio, notables diferencias inter-individuales en la  
viabilidad de las semillas de *N. obliqua* (evaluada a partir de la presencia o no  
de embrión dentro de la semilla). También se registraron diferencias de  
viabilidad dentro de cada árbol, según la posición de las flores pistiladas. El  
número de semillas obtenidas de los 60 brotes extraídos de cada individuo  
varió entre 408 y 1077, mientras que la viabilidad de las mismas fluctuó,  
aproximadamente, entre 2%, para el árbol con menor porcentaje de viabilidad,  
y 70% para el árbol con mayor porcentaje de viabilidad. Generalmente, la  
fracción de semillas viables que produce un individuo está condicionada por  
aspectos tales como la disponibilidad de recursos, la proporción de flores  
polinizadas y óvulos fertilizados, las condiciones ambientales y los ataques de  
patógenos o herbívoros (Stephenson 1981; Nilsson & Wästljung 1987; Yasaka  
et al. 2003; Nagamitsu et al. 2006). Los efectos de estos factores pueden variar  
entre poblaciones de una misma especie, entre individuos de una misma  
población y entre flores de un mismo individuo. Es posible pensar que tanto los  
efectos ambientales bióticos como los abióticos constituyan, principalmente,  
fuentes de variación a escalas inter-anual y/o inter-poblacional. El presente  
estudio destaca las variaciones inter- e intra-individuales en la producción de  
semillas viables dentro de un rango geográfico acotado y en un mismo año;  
tales variaciones podrían tener relación con aspectos fisiológicos y/o de  
polinización. Las diferencias observadas entre los distintos árboles incluidos en  
este estudio en cuanto a la viabilidad de las semillas podrían explicarse en  
cierta medida por diferencias en la disponibilidad de recursos, considerando  
que el diámetro basal de los brotes mostró una relación directa, aunque baja,  
con la producción de semillas viables. Se ha demostrado para algunas  
especies leñosas que el diámetro del tallo se vincula con el desarrollo de los  
tejidos de conducción (Nicolini & Chanson 1999; Yoshimura 2011), por lo cual  
en brotes de mayor diámetro sería posible un mejor abastecimiento de recursos

para las semillas en desarrollo. No obstante, gran parte de la variación en la proporción de semillas viables no es explicada por la morfología de los brotes. Considerando que la polinización puede ser una de las principales limitantes de la producción de semillas (Aizen & Harder 2007), es posible pensar que los resultados observados guarden estrecha relación con la cantidad y calidad de polen recibido por las flores. Esto se ha evidenciado para varias especies arbóreas anemófilas, incluyendo *Nothofagus*, en las cuales la aplicación de polinización cruzada manual aumentó notablemente la cantidad de semillas viables respecto a la polinización natural (Riveros et al. 1995b; Nagamitsu et al. 2006), y en otras en que la producción de semillas viables varió en relación a la cercanía y cantidad de individuos co-específicos (Regal 1982; Smith et al. 1988; Nilsson & Wastljung 1987; Knapp et al. 2001; Sork et al. 2002). Si bien ninguno de los individuos aquí utilizados estaba aislado, heterogeneidades en la presencia de flores en los árboles vecinos y en la dirección predominante de las corrientes de aire durante el período de polinización podrían explicar las variaciones inter-individuales observadas. Cabe mencionar que, en experimentos sobre *N. obliqua* y *N. nervosa*, se observaron variaciones inter-individuales en la producción de semillas viables incluso luego de la aplicación de polinización cruzada manual (ver capítulo VI). Esto sugiere que las diferencias entre individuos de la misma especie en la viabilidad de las semillas producidas no sólo se deberían a diferencias en la cantidad y calidad de polen recibido, sino que podrían estar asociados a efectos genéticos (por ej. compatibilidad genética entre el individuo donante de polen y el receptor).

La posición de las cúpulas en los brotes anuales no se relacionó significativamente con la viabilidad de las semillas, excepto en una de las ramas de un individuo. En *N. obliqua* es común que, al momento de maduración de las flores estaminadas, parte o la totalidad de las flores pistiladas del mismo árbol se encuentren expuestas a la llegada de polen (ver Capítulo V). Por otra parte, el período de receptividad de las flores pistiladas se iniciaría a partir de su anthesis (cuando quedan expuestos los estigmas al desplegarse la hoja tectriz) y duraría entre 10 y 15 días, con un máximo de receptividad entre 3 y 6 días después de la anthesis (Capítulo V). En base a

estos datos, es posible pensar que las flores pistiladas de distintas posiciones en el brote tendrían distintos grados de solapamiento con la liberación de polen del mismo árbol. El desfase temporal en la maduración de las flores de un mismo brote floral o de una misma inflorescencia, puede determinar distintas probabilidades de auto-polinización que se traducen en la viabilidad de las semillas producidas (Buide 2004). Considerando la alta auto-incompatibilidad de *N. obliqua* (Riveros et al. 1995b) y el hecho de que los brotes floríferos muestreados en el presente estudio presentaran hasta 8 inflorescencias pistiladas, se esperaba encontrar diferencias en la viabilidad de las semillas producidas en cúpulas de distinta posición como producto de distintas probabilidades de auto-polinización. Sin embargo esto no fue observado, lo cual sugiere dos interpretaciones: o bien (a) que la auto-polinización no implica un alto nivel de auto-interferencia en esta especie (ver capítulo VI) o (b) que no se produjo un alto grado de solapamiento entre la liberación de polen y la receptividad de las flores pistiladas en cada árbol en el año de estudio. Esta última explicación se sustentaría en posibles efectos ambientales (temperatura, humedad) sobre el momento de liberación de polen (Bhattacharya & Datta 1992; Ackerman 2000; capítulo V).

La producción total de semillas entre ramas altas y bajas no difirió en términos cuantitativos. Por otra parte, sólo en algunos ejemplares se encontraron diferencias en cuanto a la morfología de los brotes de ramas ubicadas a distintas alturas, sin observarse un patrón constante. En la mayoría de los individuos, las relaciones diámetro/ $n^{\circ}$  de nomofilos y diámetro/ $n^{\circ}$  de cúpulas, que dan idea del área de transporte de recursos por hoja y por cúpula respectivamente, no difirieron estadísticamente entre ramas altas y bajas. El tamaño de los brotes, estimado a partir del número de nomofilos y del diámetro, se relacionó linealmente con su capacidad de producción de cúpulas, lo cual confirma los resultados presentados en el capítulo II. Sin embargo la viabilidad de las semillas no mostró relación con el número de nomofilos de los brotes y se observó una leve relación positiva con el diámetro. Es decir que el vigor de los brotes debe variar entre valores bien determinados (aproximadamente 11 y 19 nomofilos y 1,7 y 2,8 mm de diámetro basal) para que la producción de

semillas sea alta, pero esto no significará necesariamente que la calidad de las mismas será alta.

La viabilidad de las semillas fue mayor en brotes de la rama baja que en brotes de la rama alta en nueve de los 10 árboles muestreados, siendo la magnitud de esta diferencia variable entre individuos. Debido a que las ramas bajas son de mayor edad y, por lo tanto, se encuentran en una fase ontogenética más avanzada que las ramas altas, sería esperable que la provisión de recursos hacia las flores fuese menos eficiente en las primeras. Sin embargo, en cada individuo, las diferencias entre la rama alta y baja respecto a la viabilidad de las semillas no se asociaron a una diferenciación morfológica de los brotes, lo que sugiere que los resultados observados no se relacionan estrechamente con diferencias en la provisión de recursos a las mismas. Esto indica que el resultado obtenido se asociaría, principalmente, a distintas probabilidades de llegada de polen procedente de otros árboles. En la introducción se planteó la hipótesis de que ramas bajas serían más propensas a auto-polinización al recibir polen de las ramas superiores, y que esto se traduciría en una menor producción de semillas viables en estas ramas. Esta hipótesis se sustenta en resultados de otros estudios; por ejemplo, en *Pinus contorta* se encontró una correlación positiva entre el número de semillas vacías de un individuo y las probabilidades de auto-polinización, las cuales aumentan a medida que disminuye la densidad poblacional y aumenta la producción de polen del individuo (Smith et al. 1988). En ese mismo trabajo, se observó mayor producción de semillas viables en conos de ramas altas que en conos de ramas bajas. Sin embargo, los resultados de este trabajo no confirman la hipótesis planteada, observándose resultados opuestos a los esperados. Si bien, la obtención de datos de una sola población en una estación de crecimiento impide plantear la generalización del patrón observado, datos tomados con posterioridad a la escritura de esta tesis (en la misma población y en una población diferente a la aquí presentada) son consistentes con los anteriormente mencionados (datos no mostrados). Los resultados obtenidos podrían relacionarse con una mayor densidad de polen en sectores de baja altitud de la copa. En *N. obliqua* las flores se desarrollan sobre brotes

con diferentes características y de ubicaciones variadas (Capítulo II). Teniendo en cuenta que, para árboles de *Nothofagus* relativamente jóvenes (como los aquí estudiados), el número de brotes de una rama aumenta en forma exponencial con la edad de la rama (Barthélémy et al. 1999; Puntieri et al. 2003), podría pensarse que el número de flores también aumentaría de la misma manera. De ser así, esto determinaría mayor liberación de polen en ramas bajas (de mayor edad) que en ramas altas (más jóvenes), lo que implicaría mayor flujo de polen en zonas bajas de la copa. Asimismo, el flujo de polen en las zonas bajas de la copa podría incluir, no sólo el polen liberado directamente de los árboles, sino también por el polen depositado en el suelo y la vegetación (incluidas las mismas hojas de *N. obliqua*) y removido por las corrientes de aire. Por otra parte, las propiedades aerodinámicas y el peso de los granos de polen también podrían condicionar la distribución vertical de la nube de polen (Niklas 1985). Estudios futuros, incluyendo aplicación de polinizaciones manuales serían útiles para confirmar si las diferencias observadas entre ramas y bajas se explican solamente por diferencias en la provisión de polen. No debería descartarse, además, que hubiera diferencias entre ramas altas y bajas respecto de la acumulación de mutaciones somáticas (carga genética) que pudieran afectar a las células que dan origen a los óvulos (Klekowski & Godfrey 1989), e incidir diferencialmente en la producción de semillas viables (Wiens et al. 1989). No obstante, considerando la corta distancia cronológica entre las ramas altas y bajas consideradas, no resulta sencillo hipotetizar sobre cuáles serían más propensas a presentar deficiencias en la producción de semillas viables debidas a mayor acumulación de mutaciones somáticas.

En forma general, a partir de los resultados obtenidos es posible pensar que las limitaciones en la polinización cruzada inciden significativamente sobre la elevada proporción de frutos vacíos que suele producirse en las poblaciones naturales de *N. obliqua*. Esto también ha sido confirmado en géneros emparentadas como *Quercus*, *Fagus* y *Betula* (Nilsson & Wästljung 1987; Knapp et al. 2001; Nagamitsu et al. 2006) y en otros géneros como *Pinus* (Smith et al. 1988; Chanyenga et al. 2011). En principio, la misma conclusión



podría aplicarse a otras especies de *Nothofagus*, lo cual también es sugerido por estudios de polinización manual (Riveros et al. 1995b; Capítulo VI). Actualmente no se cuenta con huertos semilleros de especies de *Nothofagus* en Argentina, por lo cual la recolección de semillas para la producción de árboles en viveros es todavía realizada en poblaciones naturales. Sin embargo, pocos estudios previos aportan información relacionada con la calidad de semillas en poblaciones naturales de estas especies (Marchelli et al. 2012).

### *Conclusiones*

En árboles adultos no reiterados de *N. obliqua*, la producción de semillas viables es mayor en flores ubicadas en zonas bajas de la copa. El diámetro de los brotes floríferos tiene una relación menor, aunque significativamente positiva, en tanto que la posición de las flores pistiladas a lo largo de los brotes floríferos suele no afectar en forma significativa el desarrollo de semillas viables. Las limitaciones en la producción de semillas viables son muy variables entre individuos y pueden ser heterogéneas incluso dentro de un mismo árbol. El presente estudio aporta una herramienta útil para la recolección de semillas para programas de manejo y conservación.

## **Capítulo IV: Variaciones inter-anales en la producción de flores en ramas principales de *N. obliqua* y *N. nervosa***

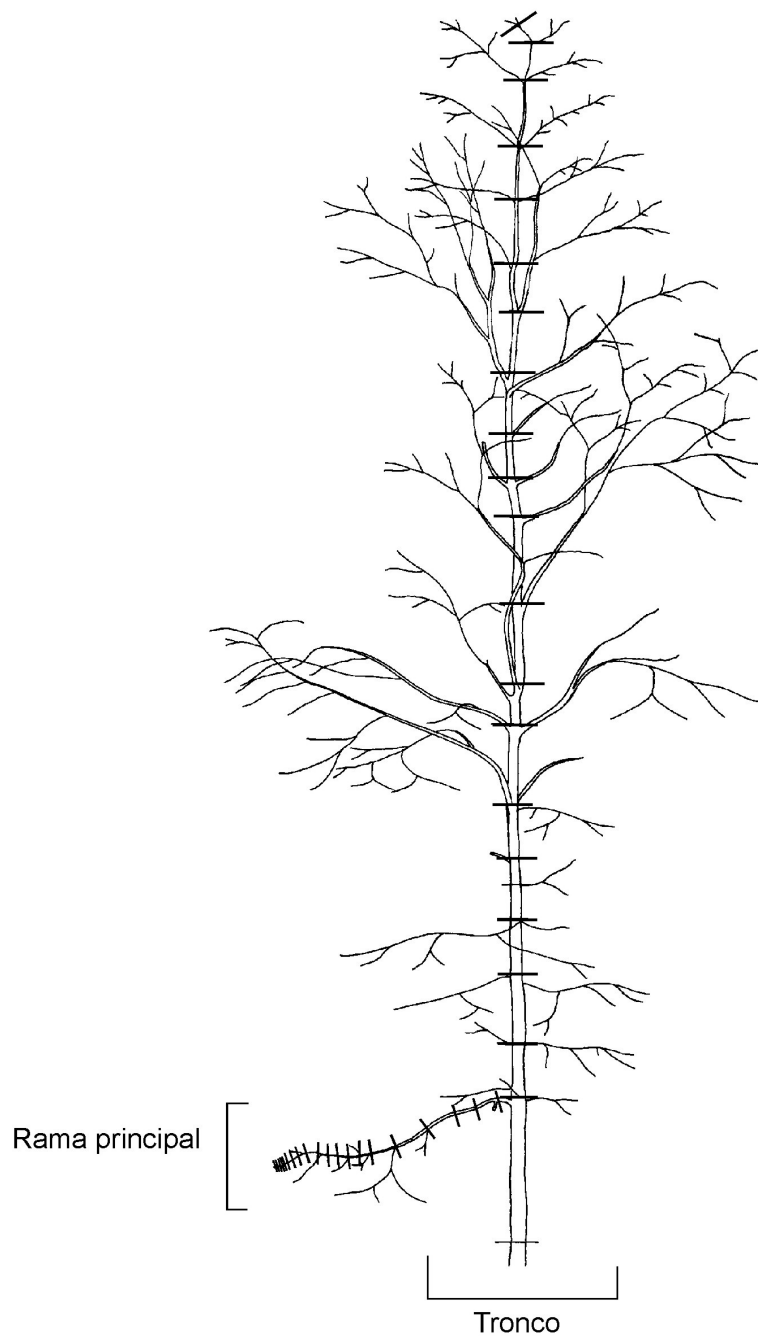
### **Introducción**

En numerosas especies arbóreas, sobre todo anemófilas, la producción de flores es variable de año a año (Kelly 1994; Herrera et al. 1998; Monks & Kelly 2006). Las variaciones inter-anales en la producción floral se han estudiado, principalmente, a escala poblacional y en forma indirecta, es decir, mediante la cuantificación de la producción de semillas. A partir de tales observaciones han surgido varias explicaciones acerca del valor adaptativo de la producción variable de flores. Las más aceptadas relacionan este patrón con beneficios a escala de población, tales como la optimización de la polinización anemófila y la dispersión de semillas, o la disminución de las pérdidas de semillas por causa de los predadores (Janzen 1971; Smith et al. 1990; Koenig et al. 1994; Kelly et al. 2001; Kon et al. 2005; Monks & Kelly 2006). No obstante son poco frecuentes los estudios que permiten relacionar los factores limitantes de la producción de flores a escala individual con la periodicidad de floración (Sork et al. 1993). Entre tales aspectos pueden mencionarse, como los de mayor relevancia, el ambiente, la disponibilidad de recursos, la disponibilidad meristemática y el estado ontogenético de la planta (Sork et al. 1993; Obeso 2002; Lehtilä & Larsson 2005; Monks & Kelly 2006). Para estudiar estos aspectos no es suficiente con cuantificar solamente la producción de semillas ya que de esta forma no se consideran las flores pistiladas abortadas ni la producción de flores estaminadas (en especies diclino-monoicas), que pueden ser componentes importantes del costo de la reproducción. Dentro de este costo se incluyen los meristemas axilares asignados a la producción de flores y que, por lo tanto, no contribuyen en el crecimiento vegetativo de la planta. Los estudios que han abordado esta temática a nivel individual, mediante el conteo directo de las flores son escasos (McCarthy & Quinn 1989). Estudios de este tipo son importantes para profundizar en el conocimiento de las causas funcionales y estructurales de las variaciones intra-específicas en la producción de semillas.

El estudio de las variaciones en la producción de flores a escala individual en especies arbóreas plantea la dificultad de la complejidad arquitectural de la copa, compuesta por gran cantidad de ejes, a menudo heterogéneos en cuanto a su morfología y diferenciación. Cuando un árbol alcanza su *unidad arquitectural* la copa está compuesta por ejes que difieren morfológica y funcionalmente (Barthélémy et al. 2007). Dentro del sistema de ramificación de los árboles pueden distinguirse ejes con distinto grado de diferenciación, también denominados **categorías de ejes**. En árboles en los que los ejes desarrollan una estructura marcadamente jerárquica (por ej. *Nothofagus*; Barthélémy et al. 1999), el tronco es el eje menos diferenciado, compuesto por brotes de gran vigor, con crecimiento en dirección vertical y con gran capacidad de ramificación (Tomlinson 1978; Puntieri et al. 2003). La presencia de estructuras reproductivas se asocia a ejes con mayor grado de diferenciación. Dependiendo de las especies, la sexualidad puede ocurrir sólo en los ejes más diferenciados (ramas cortas; Grosfeld et al. 1999; Sabatier & Barthélémy 1999), o en varias categorías de ejes (Puntieri et al. 2009; Capítulo II).

El grado de diferenciación de un eje depende de aspectos topológicos y temporales. La posición en la que se origina un eje a partir de su brote portador, y la posición de este último en el sistema de ramas, se asocia directamente con su grado de diferenciación. Por otra parte, los ejes de mayor longevidad como el tronco y las ramas principales, atraviesan una serie de etapas ontogenéticas, a través de las cuales sus brotes se hacen progresivamente más cortos y más diferenciados (Passo et al. 2002; Taugordeau et al. 2012; Fig. IV.1). En los *Nothofagus*, pueden desarrollarse flores a partir de cualquier categoría de ejes excepto el tronco (Capítulo II). En estas especies, la observación de la producción de flores a lo largo del tiempo en ramas principales resulta de interés considerando que estas ramas atraviesan una serie de etapas ontogenéticas que reproducen, al menos parcialmente, lo que ocurre a nivel del árbol entero. Por lo tanto, la periodicidad observada en ramas principales puede ser una buena referencia de la periodicidad individual en la producción de flores. Por otra parte, los brotes del

eje principal de las ramas principales persisten por muchos años, por lo que la observación de la producción de flores en secuencias temporales es útil para conocer la asociación entre la producción de flores y la expresión del gradiente morfogénico de las ramas. En la fase juvenil-adulta de los árboles de *Nothofagus*, a medida que las ramas principales envejecen, sus brotes son cada vez menos vigorosos y más diferenciados (Fig. IV.1), por lo que es posible pensar que la producción de flores se torne, en términos relativos, progresivamente mayor y más similar a lo que ocurre en las ramas laterales.



**Figura IV.1:** Esquema de un ejemplar juvenil-adulto (de alrededor de 25 años) de *Nothofagus pumilio*. Las líneas paralelas sobre el tronco y una rama principal indican límites de crecimiento inter-anual (límite entre brotes anuales sucesivos). La línea inferior representa el nivel del suelo.

Para *Nothofagus*, existen numerosos reportes que indican grandes variaciones inter-anuales en la producción de semillas, con años de alta, intermedia y baja producción (Marchelli & Gallo 1999; Schaubert et al. 2002;

Ipinza & Espejo 2000; Donoso et al. 2004; Monks & Kelly 2006). Algunos de estos estudios sugieren que dicho patrón se asocia, principalmente, a un aumento en la polinización cruzada en los años de floración masiva, lo que resulta en mayor producción de semillas viables (Marchelli & Gallo 1999; Kelly et al. 2001; Monks & Kelly 2006). Sin embargo, no existen cuantificaciones directas de las producciones de flores estaminadas y pistiladas, lo cual daría datos más precisos acerca de su variación y del costo meristemático asociado a años con distintas intensidades de floración. Por otra parte, si bien se conoce que los brotes anuales de *Nothofagus* comúnmente producen ambos tipos de flores (ver capítulo II), el grado de concordancia de la variación inter-anual en la producción de cada tipo de flor se desconoce hasta el momento.

En los casos de *N. obliqua* y *N. nervosa*, observaciones realizadas sobre poblaciones naturales y experimentales indican que años de buena producción de semillas ocurren cada tres y dos años, respectivamente (Marchelli & Gallo 1999; Donoso et al. 2006a, b). Asimismo, en algunas poblaciones de *N. nervosa* se han observado producciones de semillas más o menos constantes de año a año (Marchelli & Gallo 1999). Sin embargo, no existen estudios a escala individual que cuantifiquen las variaciones en la producción de cada tipo de flor. Considerando que en *Nothofagus* todas las categorías de ramas derivadas del tronco producen flores (Capítulo II), en estas especies las ramas principales representan una unidad de estudio útil ya que las mismas abarcan a todas las demás categorías de ramas. El análisis de la periodicidad de floración a lo largo de una rama principal podría aportar al conocimiento de la periodicidad y el grado de variación inter-anual en la producción de flores, a la vez que ayudarían a conocer en qué medida influye la intensidad de floración en el crecimiento ulterior de la planta. En base a lo antes mencionado, los objetivos del presente trabajo son los siguientes: (A) conocer, en ramas principales de *N. obliqua* y *N. nervosa*, el costo meristemático de años con distinta intensidad de floración, (B) observar qué periodicidad existe en estas ramas en la producción de flores estaminadas y pistiladas (C) analizar el grado de concordancia entre la variación inter-anual en las producciones de flores estaminadas y pistiladas, y (D) analizar comparativamente la producción de

flores en los brotes del eje principal de ramas principales y los brotes laterales. Para cumplir con estos objetivos se plantea cuantificar, a partir de análisis retrospectivos, la producción de flores en años sucesivos por parte de ramas principales de *N. obliqua* y *N. nervosa*.

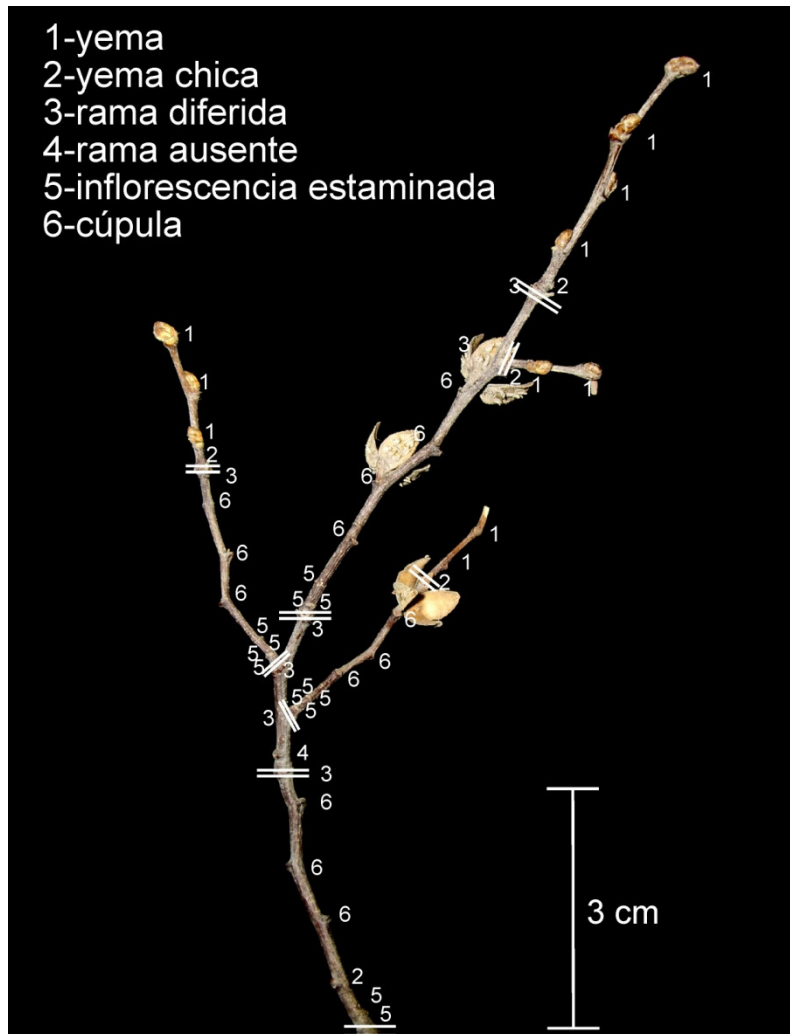
### **Materiales y Métodos**

Se seleccionaron individuos maduros de *N. obliqua* y *N. nervosa*, de cada uno de los cuales se cortó una rama principal baja (2-3 m de altura desde el suelo). De la primera especie se utilizaron 12 árboles, seis de ellos pertenecientes a una población natural del Parque Nacional Lanín (40° 09' S, 71° 31' O; 687m s.n.m.) y el resto ubicados en zonas urbanizadas de San Carlos de Bariloche (41° 08' S, 71° 10' O; 878 m s.n.m.) y El Bolsón (41° 58' S, 71° 32' O; 305 m s.n.m.). De *N. nervosa* se utilizaron siete ejemplares, cuatro ubicados en las cercanías del lago Lolog, en el Parque Nacional Lanín (40° 00' S, 71° 22' O; 930 m s.n.m.), y los tres restantes en zonas urbanas de San Carlos de Bariloche.

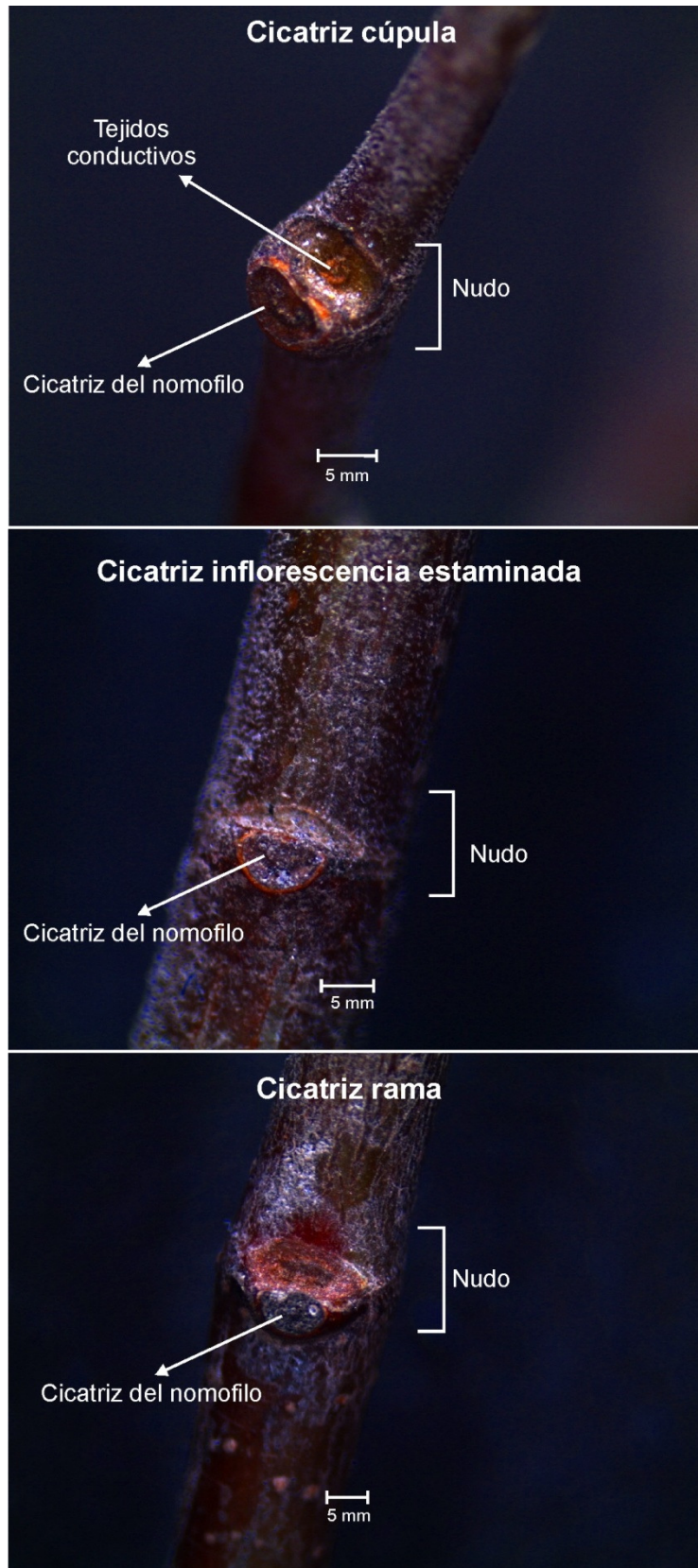
En base a la observación de los límites inter-anales de crecimiento (empleando marcadores conocidos para estas y otras especies de *Nothofagus*; Barthélémy et al. 1999), se identificó, para cada rama, el año de alargamiento de cada uno de sus brotes anuales. A partir de los brotes alargados en la estación 2008-2009, para cada rama se realizó un análisis retrospectivo, registrándose la longitud y el número de nudos (a partir del conteo de las hojas o de las cicatrices dejadas por las hojas en la superficie del tallo) de cada brote anual y la producción axilar de cada nudo. Las posibles producciones axilares fueron: (1) yema grande (se trata de yemas que, en base a estudios anteriores, brotan en la estación de crecimiento siguiente a la de su formación), (2) yema chica (son yemas que no brotan sino hasta varios años después de su formación, a menudo como respuesta a daños en el eje portador; C. Torres y J. Puntieri, datos no publicados), (3) rama, (4) estructura vegetativa (yema o rama) desarrollada pero caída antes del muestreo, (5) inflorescencia estaminada y (6) inflorescencia pistilada (Fig. IV.2). Las estructuras producidas en cada nudo en brotes de 2 ó más años se determinaron mediante la identificación de las cicatrices dejadas por cada estructura en el tallo del brote

(Fig. IV.3). El análisis retrospectivo de la producción axilar se hizo en tantos años como fuera posible identificar las cicatrices de las distintas estructuras, lo cual dependió del grado de crecimiento secundario de los brotes. De esta manera pudo determinarse la producción axilar a lo largo de 4-5 años, según el ejemplar. En base a observaciones previas, se determinó que las cicatrices dejadas por las flores estaminadas luego de su caída son poco profundas, angostas y de forma elíptica. En *Nothofagus*, se ha verificado que las inflorescencias pistiladas llevan al desarrollo de frutos y cúpulas independientemente de que se haya producido la fertilización de los óvulos (Riveros et al. 1995b). Por esta razón, las cicatrices dejadas por las cúpulas luego de su caída pueden emplearse como indicadores relativamente precisas de la presencia de flores pistiladas. Las cicatrices dejadas por las cúpulas son profundas y anchas, y en el centro de ellas se destaca la cicatriz circular, saliente y más oscura, dejada por los tejidos de conducción (Fig. IV.3). Las cicatrices que dejan las ramas caídas son de forma similar a las dejadas por las cúpulas, aunque presentan borde más redondeado y no sobresalen los tejidos conductivos (Fig. IV.3).





**Figura IV.2:** Ejemplo simplificado del análisis realizado en una secuencia de cuatro años de una rama de *N. obliqua*. Las líneas paralelas indican límites de crecimiento inter-anual.



**Figura IV.3:** Cicatrices de estructuras florales (cúpula e inflorescencia estaminada) y de rama sobre tallos de *Nothofagus*.

### *Análisis de datos*

Para cada árbol se calculó el número total de inflorescencias estaminadas y pistiladas producidas en cada año (incluyendo todos los brotes de ese año) y se dividió dicho valor por el número de nudos totales (sumatoria de los nudos de todos los brotes de ese año). Dicho cociente representa el **número relativo** de inflorescencias producidas en cada año y es una estimación del costo reproductivo en términos de la proporción de meristemas axilares asignados a la producción de flores (y que, por lo tanto, no pueden ser asignados al desarrollo vegetativo). Para cada especie se graficaron las distribuciones de frecuencias de los números relativos de inflorescencias estaminadas, pistiladas e inflorescencias totales producidas por ejemplar y por año. Esto permite observar el rango de variación de la producción relativa de flores en cada especie y la forma en que la misma varía, es decir, si fluctúa alrededor de un valor medio o si existe otro tipo de tendencia (Herrera et al. 1998). En los gráficos mencionados no se incluyó el brote más antiguo observado en cada rama (correspondiente con el eje principal de la rama; ver brote año X0 en fig. IV.4). Para observar los patrones de periodicidad en la producción de flores a nivel individual, para cada árbol se graficó la variación inter-anual del número relativo de inflorescencias. En los mismos gráficos se incluyó la longitud del brote del eje principal del año correspondiente para la rama analizada, a fin de determinar si existe algún grado de relación entre la producción relativa de flores y la tendencia ontogenética en el tamaño del eje principal de la rama.

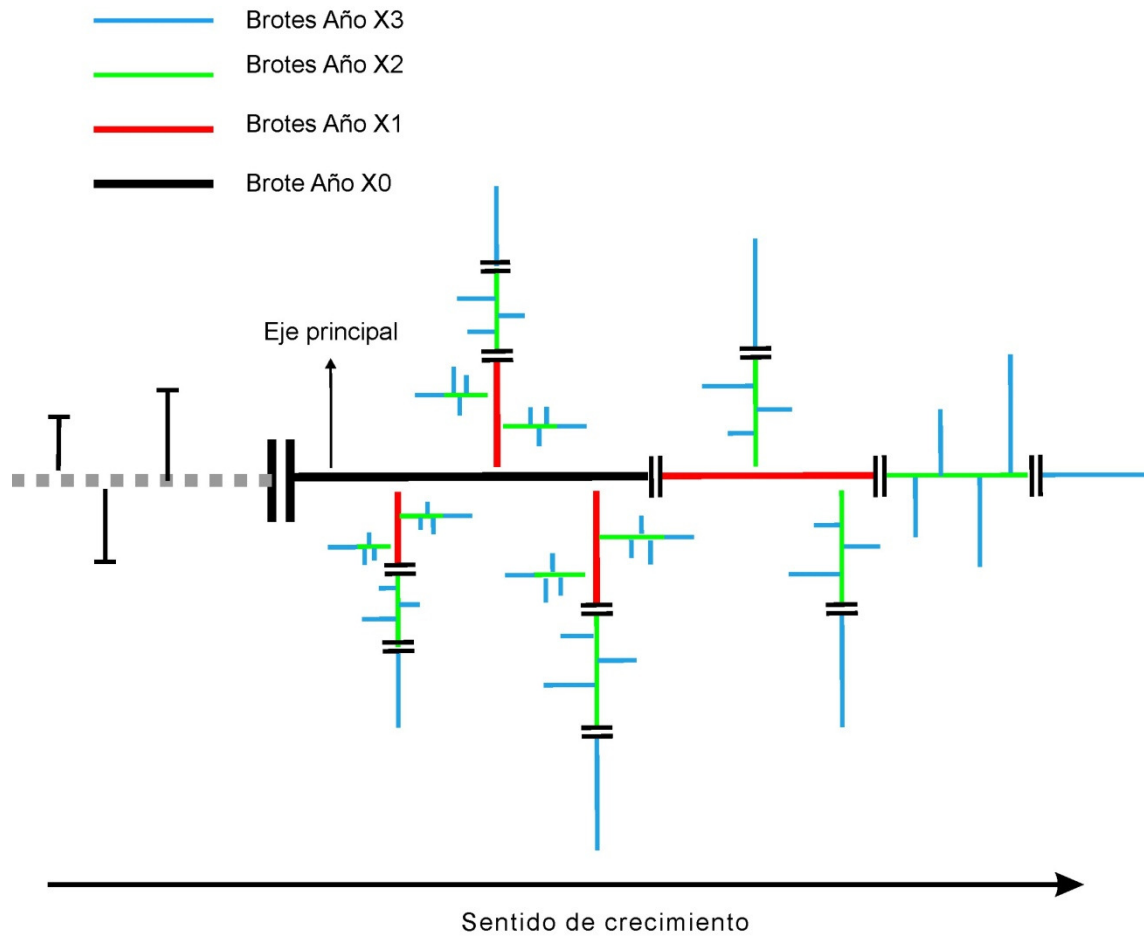
A fin de comparar la magnitud de la variación inter-anual en la producción de cada tipo de flor, para cada árbol se calculó el coeficiente de variación inter-anual ( $CV = \text{desvío estándar} / \text{promedio}$ ) del número relativo de inflorescencias estaminadas y pistiladas. Para cada especie se realizaron pruebas no paramétricas de Wilcoxon para comparar, los CV inter-anales de la producción de inflorescencias estaminadas y pistiladas.

Con los brotes de los años X1 en adelante de cada árbol (Fig. IV.4), se realizó un análisis para estimar el grado de similitud respecto a la producción de flores y estructuras vegetativas (yemas o ramas) entre los brotes del eje

principal de cada rama y los brotes laterales. Para ello se realizaron análisis de correlación de Spearman en cada especie, relacionando la producción relativa anual de inflorescencias (estaminadas + pistiladas /n° de nudos) en los brotes del eje principal y en los brotes laterales. Para cada ejemplar y año de alargamiento se calculó el siguiente cociente:

$$(1) \frac{\text{N}^\circ \text{ relativo de inflorescencias del brote del eje principal en el año Xi}}{\text{N}^\circ \text{ relativo promedio de inflorescencias de los brotes laterales en el año Xi}}$$

Dicho cociente permite evaluar la similitud, en términos cuantitativos, de la producción de flores en el eje principal y en las ramas laterales en cada año. Se observó en forma gráfica la relación entre la longitud de cada brote del eje principal de la rama en el año Xi y el valor del cociente mostrado en la ecuación (1) en el mismo año. Esto indica si la similitud en la producción de flores en el brote del eje principal y en las ramas laterales se relaciona con el vigor de los brotes del eje principal (lo cual es indicador de su grado de diferenciación; Passo et al. 2002).



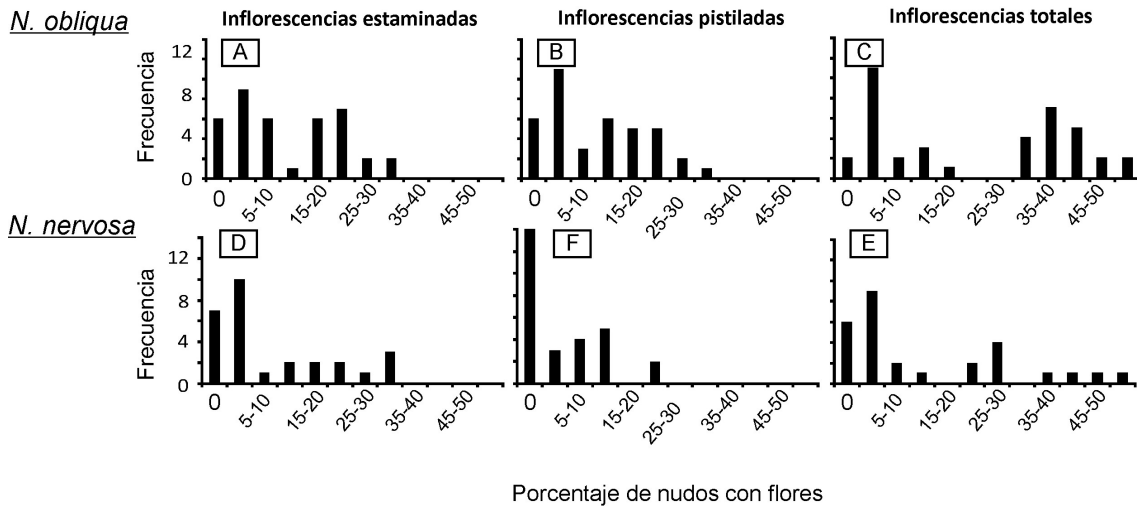
**Figura IV.4:** Esquema de la sección de rama principal utilizada, diferenciando los brotes alargados en distintos años. Se ilustra un ejemplo en el que se analizó una sección de cuatro años. Las dobles líneas cortas indican límites entre brotes anuales.

## Resultados

A partir de la información obtenida de los 12 ejemplares de *N. obliqua* y los siete de *N. nervosa* mediante la observación de años sucesivos se observó que, en los brotes de una misma rama principal, la producción relativa de inflorescencias (inflorescencias/nº total de nudos, expresada en porcentajes) en un año varía dentro de un rango similar en ambas especies (Fig. IV.5; ver información adicional en el anexo IV.1). Dentro de estos rangos de variación, no se observó una distribución normal de la producción anual de inflorescencias estaminadas y pistiladas, es decir, no hubo variación alrededor

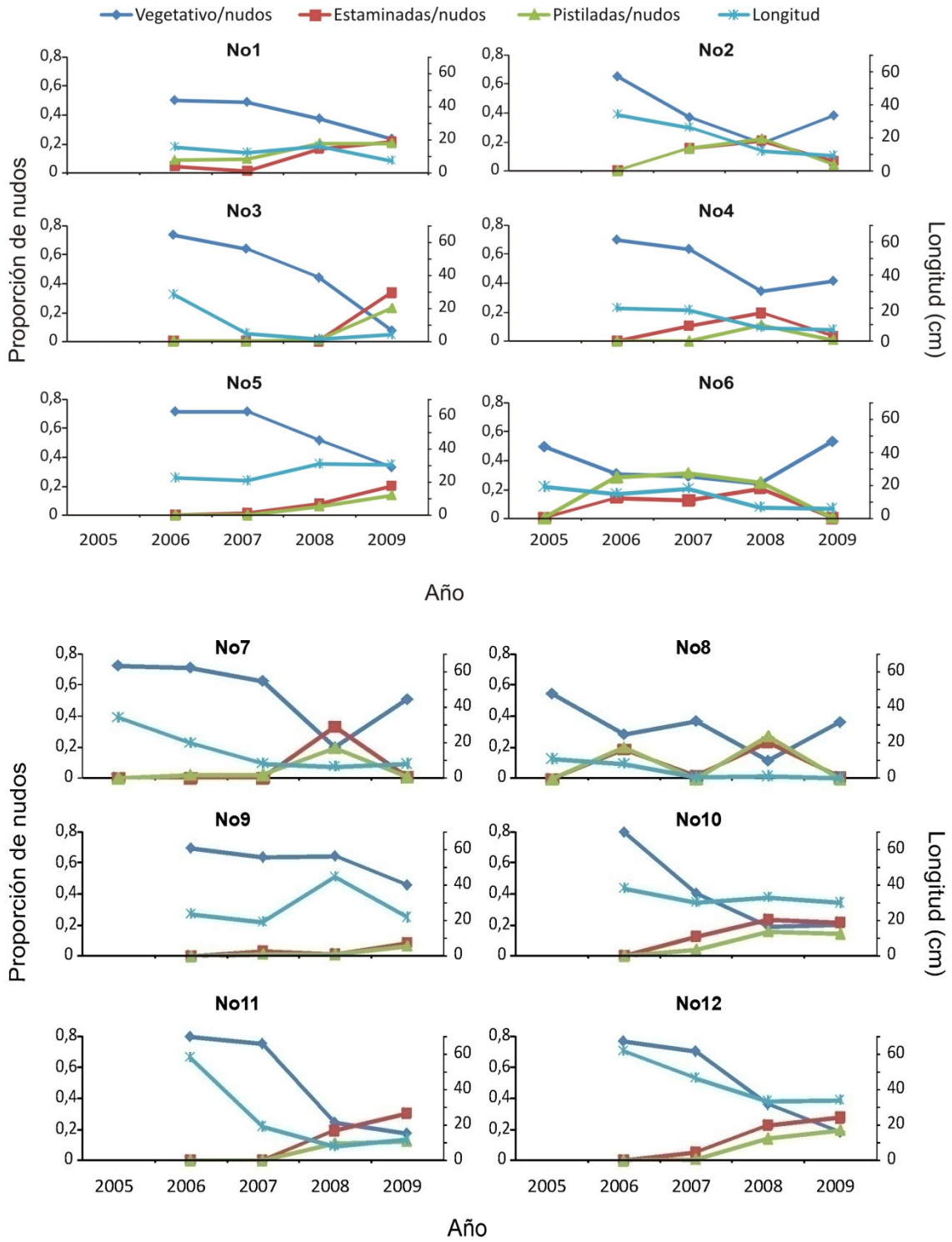
de un valor medio. En el caso de *N. obliqua*, la variación del porcentaje anual de nudos con inflorescencias estaminadas, pistiladas y totales tendió a presentar distribución bimodal (Fig. IV.5 A-C). El porcentaje de nudos por año con presencia de inflorescencias estaminadas varió entre 0 y 35%, siendo más frecuentes años con valores de 0 a 10% y de 15 a 25%. La producción anual de inflorescencias pistiladas ocupó entre 0 y 35% de los nudos, observándose mayor frecuencia de años con valores menores a 5% y de años con valores comprendidos entre 10 y 25%. Tomando la producción total de inflorescencias (estaminadas y pistiladas), numerosos años presentaron nudos floríferos en cantidad menor a 5%. Asimismo, se observa baja frecuencia de años de producción intermedia (5-30% nudos floríferos) y mayor frecuencia de años de alta producción (30-45% nudos floríferos). El máximo valor observado fue de 55%.

En el caso de *N. nervosa*, se observó alta frecuencia de años en los que la producción relativa anual de inflorescencias estaminadas y pistiladas ocupó menos del 5% de los nudos (Fig. IV.5 D-E). Años de alta producción de flores estaminadas implican que dichas flores se desarrollan hasta en el 35% de los nudos (Fig. IV.5D). En la muestra estudiada se observó que la producción anual de inflorescencias pistiladas puede ocupar entre 0 y 25% de los nudos. Entre los años con presencia de inflorescencias pistiladas, fueron algo más frecuentes aquellos en los que entre 10 y 15% de los nudos produjeron ese tipo floral (Fig. IV.5F). La producción anual total de inflorescencias puede ocupar entre 0 y 55% de los nudos, observándose que la distribución de frecuencias de esta variación tiene tendencia bimodal (menos clara que en *N. obliqua*).

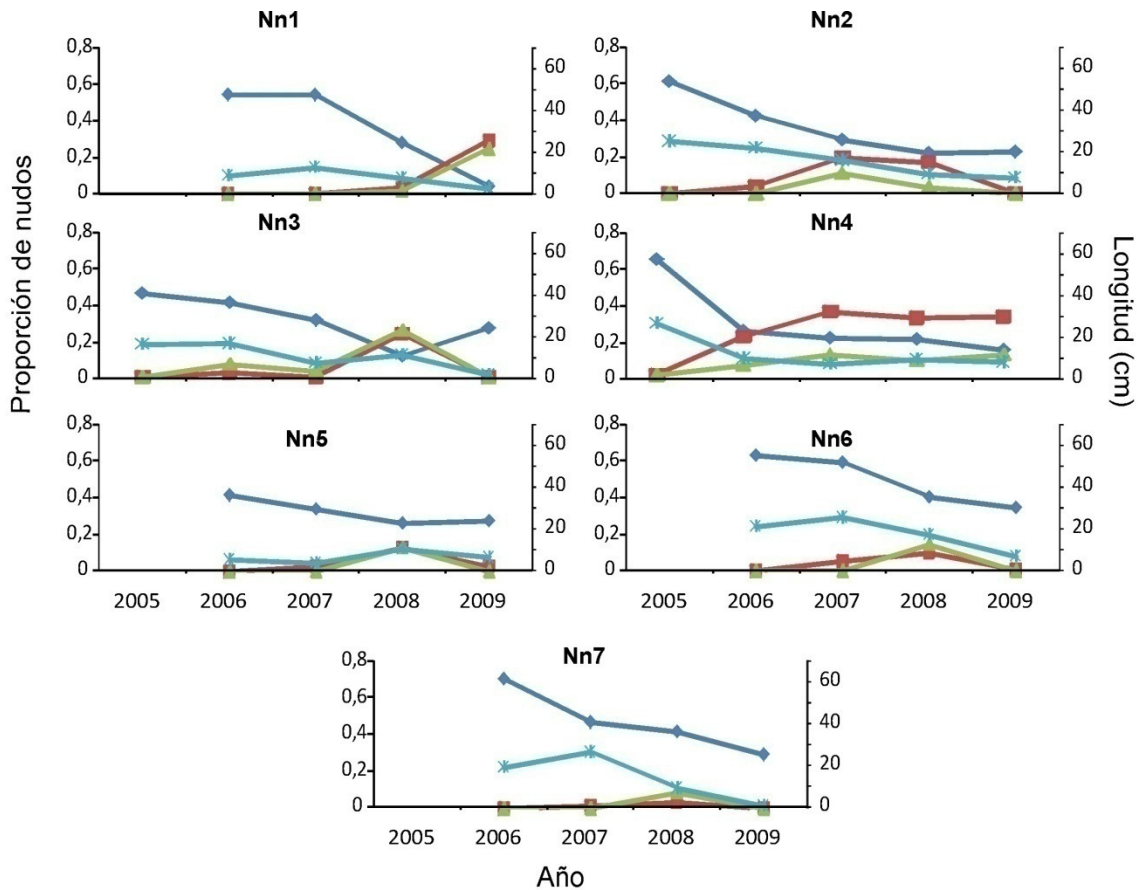


**Figura IV.5:** Distribución de frecuencias del porcentaje del total de nudos desarrollados en un año por una rama principal con inflorescencias estaminadas, pistiladas y totales para 12 ejemplares *N. obliqua* y siete *N. nervosa* en cuatro años sucesivos.

En la figura IV.6 se muestra la variación en cada individuo en las producciones de inflorescencias y de estructuras vegetativas (yemas o ramas) relativas al número de nudos de los brotes a lo largo de 4-5 períodos de alargamiento. Para cada ejemplar, el valor del año más antiguo (2005 ó 2006 según el caso) incluye sólo la medida del brote correspondiente al eje principal de la rama. Asimismo, se muestra la longitud de los brotes del eje principal de la rama en cada año. No se observó un patrón de periodicidad constante en la producción de flores entre los individuos de cada especie. En ambas especies se observan ejemplares con años sucesivos de producción aproximadamente constante de flores (lo cual fue más común en *N. obliqua*) y ejemplares en los que un año de producción de flores alta es precedido y seguido por años de producción muy baja o nula. Para ambas especies llegaron a registrarse períodos consecutivos de hasta tres años con producción de flores muy baja o nula. En la mayoría de los ejemplares se observó una tendencia a la disminución en la longitud de los brotes del eje principal de las ramas en los años sucesivos. En algunos ejemplares dichos brotes presentaron longitud aproximadamente constante en años sucesivos, mientras que en pocos casos se observó un aumento de un año al siguiente.





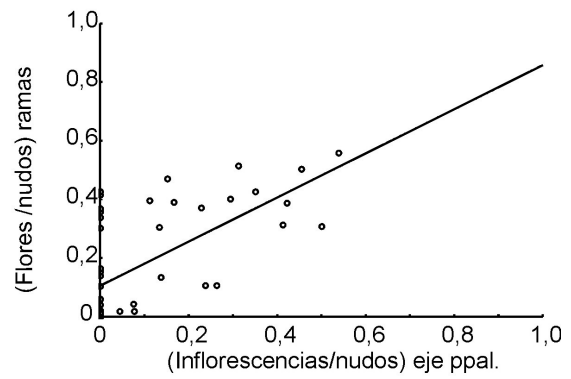
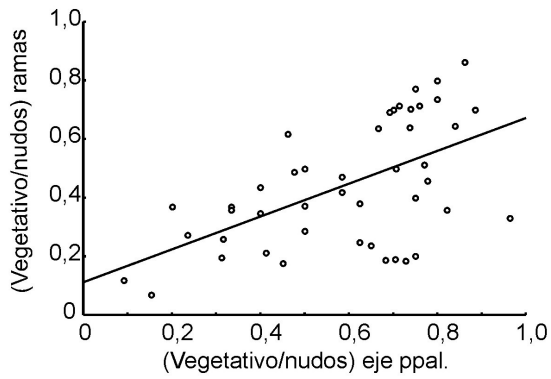


**Figura IV.6:** Producción de inflorescencias estaminadas, pistiladas y estructuras vegetativas expresada como proporción del número total de nudos (considerando todos los brotes extendidos en cada año) en 12 ejemplares de *N. obliqua* y siete de *N. nervosa*. En el eje de ordenadas de la derecha se indica la longitud de los brotes del eje principal en cada año.

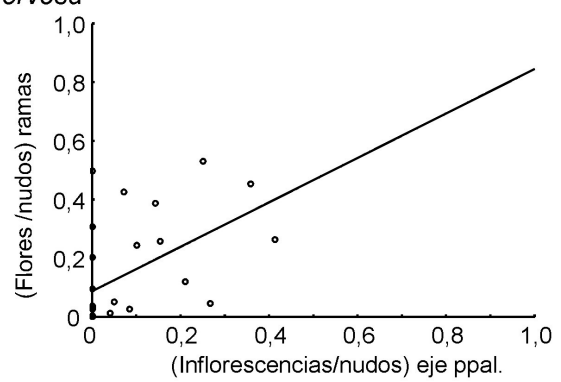
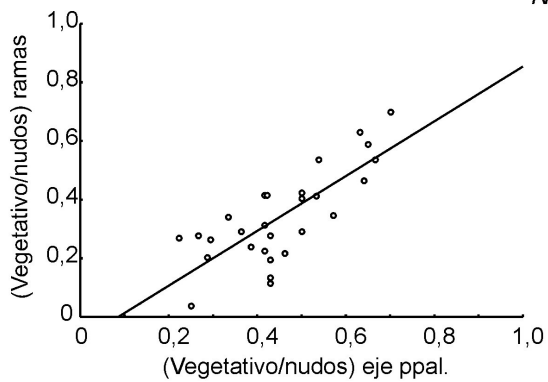
Respecto a la variación inter-anual en la producción de flores, el coeficiente de variación inter-anual del número de inflorescencias estaminadas fue, en promedio, de 1,21 (ES= 0,13) para *N. obliqua* y de 1,32 (ES= 0,12) para *N. nervosa*, mientras que el CV promedio para las inflorescencias pistiladas fue de 1,25 (ES= 0,17) y 1,66 (ES= 0,18) respectivamente. En ninguna de las dos especies se observaron diferencias significativas entre inflorescencias estaminadas y pistiladas según la prueba de Wilcoxon (*N. obliqua*:  $Z= 0,78$ ,  $p= 0,43$ ; *N. nervosa*:  $Z= 1,69$ ,  $p= 0,09$ ).

En ambas especies se la producción relativa anual de inflorescencias (estaminadas + pistiladas) producidas por el brote del eje principal de la rama se correlacionó positivamente con la producción promedio de las ramas laterales (*N. obliqua*:  $\rho = 0,63$ ,  $p < 0,001$ ; *N. nervosa*:  $\rho = 0,61$ ,  $p < 0,001$ ; Fig. IV.7). Similares resultados se observaron al considerar la producción relativa de estructuras vegetativas (yemas o ramas: *N. obliqua*:  $\rho = 0,55$ ,  $p < 0,001$ ; *N. nervosa*:  $\rho = 0,69$ ,  $p < 0,001$ ; Fig. IV.7). Gráficamente, se observó que el grado de similitud entre la producción relativa anual de inflorescencias del brote del eje principal de una rama y la producción en las ramas laterales (ver ecuación (1)) depende del tamaño de dicho brote (Fig. IV.8). Para *N. obliqua*, el grado de similitud se relaciona positivamente con el tamaño de los brotes del eje principal, en brotes con menos de 20 cm de longitud. Entre brotes de tamaños mayores se observa una relación negativa (Fig. IV.8). En el caso de *N. nervosa* se observó una relación positiva entre los brotes menores a 12 cm, mientras que en brotes de tamaño mayor la relación se torna negativa (Fig. IV.8).

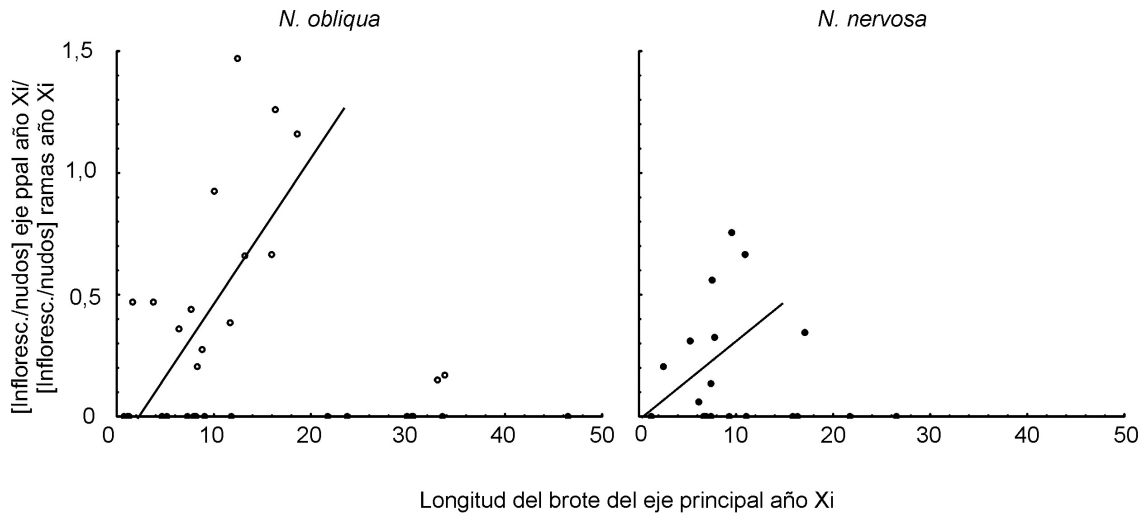
*N. obliqua*



*N. nervosa*



**Figura IV.7:** Para *N. obliqua* y *N. nervosa*, relación entre la producción relativa de nudos con estructuras vegetativas y nudos con inflorescencias entre brotes del eje principal (eje ppal.) y brotes laterales al mismo (ramas).



**Figura IV.8:** Relación entre el cociente de las producciones anuales relativas de inflorescencias entre brotes del eje principal de cada rama (eje ppal.) y sus brotes laterales (ramas), y la longitud del brote anual del eje principal. Las rectas (regresión lineal) ilustran las tendencia para brotes de menos de 20 cm en *N. obliqua* y en brotes de menos de 12 cm en *N. nervosa*

### Discusión

Para *N. obliqua* y *N. nervosa* se observó el rango de variación de la producción relativa de inflorescencias, registrándose que las mismas pueden ocupar, como máximo, entre 50 y 60% de los nudos de los brotes derivados de una rama principal. En el caso de *N. obliqua* fue notorio, dentro de la variación observada en la producción relativa de inflorescencias totales, una distribución bimodal de los datos, con alta abundancia de años de escasa producción (0-5% de nudos floríferos), escasa abundancia de años de producción intermedia (5-30% de nudos floríferos) y alta abundancia de años de alta producción floral (30-60% de nudos floríferos). Esto fue menos evidente en *N. nervosa*, probablemente debido a que, para la última especie, el número de ejemplares analizados no fue suficientemente alto. Considerando que el rango de variación inter-anual observado en la producción relativa de inflorescencias en las ramas principales fue similar para ambas especies, es probable que en *N. nervosa* la distribución de dicha variación presente una tendencia similar a la registrada para *N. obliqua*. La alta frecuencia de años de alta y años de baja producción de flores

y la baja frecuencia de años de producción intermedia es coherente con lo observado a escala poblacional en la mayoría de las especies arbóreas que producen flores en forma variable (Kelly 1994; Herrera et al. 1998). Para *N. obliqua*, puede decirse que, en años de alta producción de flores, los brotes derivados de una rama principal ocupan entre 30 y 55% de sus nudos en el desarrollo de inflorescencias. En el caso de *N. nervosa*, los datos obtenidos no son suficientes para sacar conclusiones en este sentido, aunque en años determinados se observó que algunos de los ejemplares seleccionados presentaron números relativos de inflorescencias similares a los mencionados anteriormente. Estos resultados dan idea de los costos en términos de meristemas que implican años de alta producción de flores, a escala individual.

Los reportes disponibles hasta al momento referidos a las variaciones en la producción de flores en *Nothofagus*, son estudios a escala poblacional basados en el conteo de semillas (Marchelli & Gallo 1999; Ipinza & Espejo 2000; Donoso et al. 2004). No obstante, estos conteos no permiten obtener información directa sobre los costos de la floración, ya que no incluyen a las flores estaminadas ni a las flores pistiladas que no desarrollan frutos. Los datos aquí presentados dan una idea de los costos, en términos de meristemas axilares, asociados a la floración en ramas principales de *N. obliqua* y *N. nervosa*. La observación del consumo de meristemas axilares como estimación de los costos reproductivos resulta de interés, considerando que esto afecta directamente las funciones vegetativas de los ejes (Lehtilä & Larsson 2005; Ishihara & Kikuzawa 2009). En algunas especies, principalmente herbáceas, se ha demostrado que la disponibilidad meristemática sería una de las limitantes de la producción de flores (Geber 1990). Esto se ha estudiado poco en especies arbóreas. En especies de *Quercus* se ha observado que la producción de frutos de un árbol en un año determinado está condicionada por la producción de flores en años previos (Sork et al. 1993). Si bien, el patrón antes mencionado podría tener relación con limitaciones meristemáticas, la metodología y escala de estudio utilizada (recolección de semillas en árboles enteros) impide distinguir si el mismo se relaciona con limitantes meristemáticas o de otro tipo de recurso. En el caso de las especies de *Nothofagus*, que

producen flores en ejes de varias categorías distintas, es posible pensar que el costo meristemático de la floración determine, al menos en parte, la periodicidad en la producción de flores. Se ha propuesto que otras variables no relacionadas con los costos reproductivos, tales como la temperatura durante los períodos de formación y diferenciación de las yemas, actúan como reguladoras de los años de floración masiva (Schauber et al. 2002). Sin embargo, considerando que la producción de flores representa una disminución en la producción de ramas al año siguiente a la floración, la limitación meristemática debe considerarse como otro posible factor regulador de la periodicidad en la producción de flores en *Nothofagus*.

En el presente trabajo se analizó la producción de flores en una secuencia de años sucesivos en ramas principales de *N. obliqua* y *N. nervosa*. La información obtenida da indicios acerca de los posibles patrones de variación inter-anual en la producción de flores a escala individual. En términos generales, se observaron ejemplares que mostraron producción de flores en años sucesivos y ejemplares en los que ocurrió un año de floración precedido y seguido por años de producción baja o nula (menos de 3% de los nudos con flores). En proporción, más ejemplares de *N. obliqua* presentaron flores en años consecutivos. En los ejemplares en los que ocurrieron floraciones sucesivas (No1, No2, No4, No5, No6, No10, No11, No12, Nn2 y Nn4), se observa que la producción relativa de flores o bien se mantuvo aproximadamente constante o aumentó entre los años sucesivos de floración. En el caso de *N. obliqua*, las ramas principales de algunos individuos produjeron flores hasta por tres años consecutivos. Previamente se ha mencionado que algunas poblaciones de *N. nervosa* pueden presentar producción de semillas aproximadamente constante en años sucesivos (Marchelli & Gallo 1999). Esto mismo se observó en dos de los ejemplares de *N. nervosa* aquí estudiados; uno de estos árboles produjo flores durante cuatro años, siendo mayor la proporción de inflorescencias estaminadas que la de inflorescencias pistiladas. Además, en dicho ejemplar se observaron yemas floríferas en los brotes del último año (datos no mostrados), lo que implica la producción de flores en 5 años sucesivos. La variación intra-específica

respecto de las tendencias en la periodicidad de producción de flores y, en consecuencia, de semillas, podría tener origen en variaciones ontogenéticas, genéticas y/o de calidad de sitio. En especies emparentadas como las de los géneros *Betula* y *Quercus* se ha demostrado que factores ambientales como las condiciones climáticas y la disponibilidad hídrica son importantes determinantes de la producción de semillas (Sork et al. 1993; Houle 1999; Pérez-Ramos et al. 2010). A partir de la muestra observada no se deducen claramente factores que determinen el patrón de periodicidad de producción de flores en cada árbol. Para *N. nervosa* se ha sugerido que aspectos genéticos podrían estar involucrados en la capacidad de producción de flores (Marchelli & Gallo 1999). En este trabajo no se observó una clara relación entre el tamaño de los brotes del eje principal de las ramas (lo cual es indicador del estado ontogenético de la rama) y el patrón de periodicidad en la producción de flores.

Observaciones previas en poblaciones naturales y experimentales de *N. obliqua* y *N. nervosa*, mencionan que ocurre buena producción de semillas cada tres y dos años respectivamente (Donoso 1993; Marchelli & Gallo 1999; Donoso et al. 2006a, b). Estos resultados no son totalmente confirmados por este estudio al observar las variaciones en la producción de flores de las ramas principales, lo cual puede deberse a las distintas escalas de análisis empleadas. A partir de los resultados obtenidos aquí no es posible determinar si aspectos como los costos meristemáticos o el estado ontogenético de las ramas se relacionan con la periodicidad en la producción de flores en cada especie.

En *Nothofagus*, las inflorescencias estaminadas y pistiladas ocupan distintas posiciones en los brotes anuales (Puntieri et al. 2009), por lo que su producción implica distintos costos. Las inflorescencias estaminadas se ubican en nudos proximales del brote, mientras que las inflorescencias pistiladas ocupan nudos más distales (Puntieri et al. 2009). En los brotes de *Nothofagus*, los nudos proximales suelen no desarrollar ramas en el corto o mediano plazo (excepto si el brote sufre daño físico) y, por otro lado, las ramas presentan un gradiente creciente de vigor desde los nudos proximales hacia los nudos distales (Barthélémy et al. 1999; Stecconi et al. 2000; Puntieri et al. 2003;

Torres et al. 2009). Es decir que, considerando las potencialidades de los meristemas axilares en cuanto a la producción vegetativa, el costo meristemático por producir flores aumenta, en estas especies, desde la porción proximal hacia la distal del brote anual. Por esta razón, los costos asociados a la producción de cada tipo de flor son distintos: la producción de inflorescencias estaminadas limita, a lo sumo, la producción de ramas cortas (Barthélémy et al. 1999), mientras que la producción de inflorescencias pistiladas restringe con mayor frecuencia la producción de ramas de mayor tamaño (Puntieri et al. 2003; ver capítulo II). Cabe aclarar que deben considerarse otros aspectos que también podrían causar diferencias en la periodicidad de producción de cada tipo de flor, como por ejemplo presiones de selección diferenciales en las funciones masculina y femenina o costos diferenciales en términos de recursos. Considerando las diferencias asociadas a los costos meristemáticos de la producción de cada tipo de flor en ambas especies estudiadas, es posible pensar que, de existir alguna regulación en la periodicidad de floración asociada a estos costos, se observarían diferencias en las variaciones cuantitativas inter-anales entre ambos tipos de flores. Esto no se observó en *N. obliqua*, mientras que para *N. nervosa* se destacaron ciertas diferencias (aunque no confirmadas por los análisis estadísticos), observándose mayor variación inter-anual en la producción de inflorescencias pistiladas. Las inflorescencias estaminadas representarían un costo menor en términos de meristemas, por lo que la ocurrencia de años sucesivos de producción relativamente alta de esas flores no tendría grandes consecuencias en términos de crecimiento vegetativo. Los resultados contrastantes entre ambas especies pueden deberse a la diferencia que existe en la disposición de las flores en los brotes anuales. La diferencia de costos de las inflorescencias pistiladas y estaminadas sería superior en *N. nervosa*, ya que en esta especie las inflorescencias pistiladas se desarrollan en nudos más distales en comparación con *N. obliqua* (Puntieri et al. 2006).

En las especies arbóreas, la morfología de las unidades de crecimiento de los ejes de mayor longevidad como el tronco y las ramas principales, cambia a lo largo de la ontogenia, siguiendo patrones aproximadamente constantes en

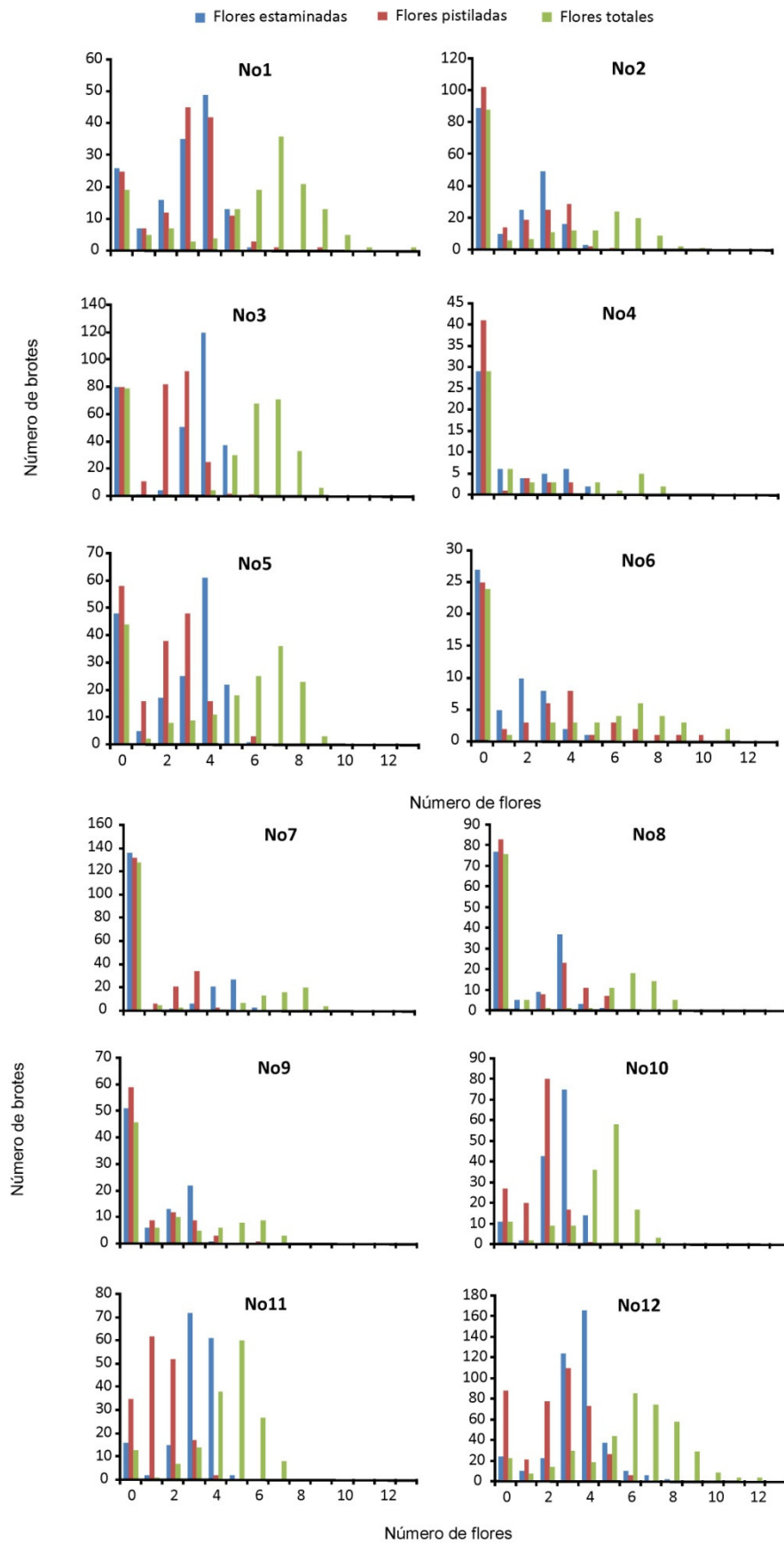


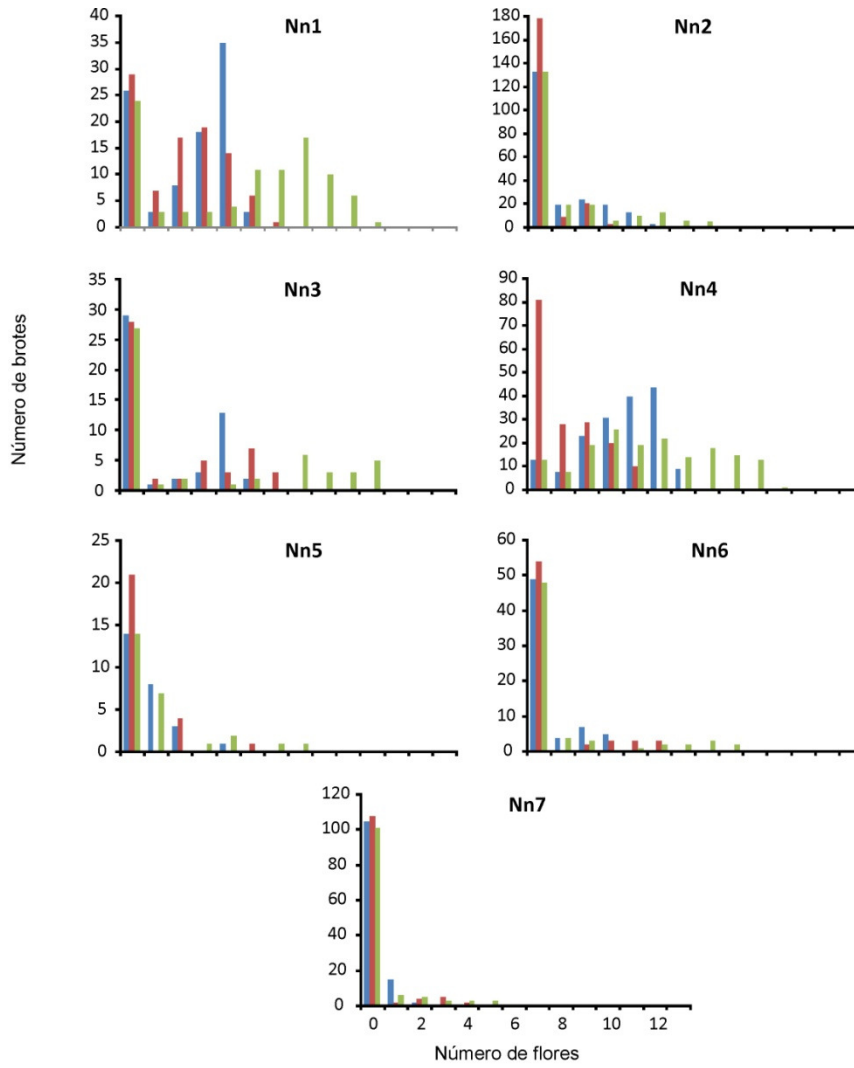
cada especie (Passo et al. 2002; Renton et al. 2006; Barthélémy et al. 2007; Taugordeau et al. 2012). La longitud de las unidades de alargamiento es uno de los aspectos morfológicos que reflejan tendencias asociadas con la edad fisiológica de los meristemas (Passo et al. 2002; Taugordeau et al. 2012). La producción de flores en ramas principales de las especies de *Nothofagus* también podría variar a lo largo de la ontogenia, debido a la relación entre los fenómenos de floración y de diferenciación de los ejes (Barthélémy et al. 2007). En este estudio se observó que la producción de flores en los brotes del eje principal de las ramas tendió a relacionarse positivamente con la producción en las ramas laterales. No obstante, no se observó una relación proporcional y, en ambas especies, los brotes del eje principal de la rama presentaron, comúnmente, menos flores en proporción al número de nudos que el promedio de los brotes laterales. En pocas ocasiones se observó mayor número relativo de flores en brotes del eje principal respecto a los laterales. Lo contrario se observó respecto a la producción relativa de estructuras vegetativas. Estos resultados reflejan las diferencias funcionales de los brotes del eje principal de las ramas principales con respecto a sus brotes laterales, mostrando que en los primeros predominan las funciones vegetativas, a pesar de la presencia de flores. En ambas especies los datos sugieren que el grado de similitud entre las producciones relativas de flores en un brote del eje principal y en los brotes laterales depende del tamaño del primero. En el caso de *N. obliqua*, cuando los brotes del eje principal de las ramas superaron los 20 cm, la producción relativa de flores en esos brotes fue mucho menor a la observada en sus brotes laterales. No obstante, cuando los brotes del eje principal de las ramas fueron menores a 20 cm, se observó una relación positiva entre el tamaño de los brotes del eje principal de las ramas y el cociente entre la producción relativa de flores en esos brotes y la producción relativa de flores en sus brotes laterales. Para *N. nervosa*, se obtuvo una tendencia similar (con mayor variación en brotes de menos de 10 cm y valores muy bajos para longitudes mayores), aunque los brotes del eje principal siempre presentaron menor proporción de nudos con flores que sus laterales. En estas especies, los brotes más vigorosos correspondientes al tronco o a las ramas principales,

comúnmente se componen de órganos preformados y neoformados (Puntieri et al. 2000, 2002, 2007; Souza et al. 2000; Guédon et al. 2006). Debido a que las inflorescencias estaminadas y pistiladas se encuentran preformadas en las yemas, el aumento del número de nudos de un brote por neoformación (diferenciación y alargamiento simultáneo de órganos durante el período de crecimiento; Barthélémy et al. 2007) implica que, en un brote florífero, la proporción de nudos con flores sea menor. Por lo tanto es posible, que la relación lineal observada entre la longitud de los brotes del eje principal y la similitud en la producción relativa de flores con los brotes laterales, sea válida para brotes del eje principal completamente preformados, y el cambio en la tendencia de la relación que se observó para brotes más vigorosos se relacione con la presencia de órganos neoformados. En conjunto, los datos sugieren que la producción de flores tiende a ser proporcionalmente menor en los brotes del eje principal de cada rama. Esta tendencia se acentuaría en estadios ontogenéticos más tempranos, es decir, cuando los brotes del eje principal son más vigorosos. Conocer el grado en que la producción de flores en los brotes del eje principal representa lo ocurrido en las ramas laterales permite determinar si dichos brotes pueden utilizarse como indicadores de la producción de flores en un año determinado. Dichos brotes persisten por muchos años, a diferencia de brotes laterales que pueden caerse por autopoda. A partir de los datos obtenidos es posible indicar que la observación de cicatrices florales en los brotes del eje principal puede dar una idea de la producción de flores en sus ramas para el mismo año de desarrollo. Sin embargo, la ausencia de flores en un brote del eje principal de una rama no es suficiente para afirmar que no se desarrollaron flores en las ramas de ese eje en ese mismo año. Ampliar datos de este tipo sería de utilidad a fin de ajustar modelos que relacionen la producción de flores en el eje principal y en los ejes laterales, lo cual sería una herramienta útil para el estudio de las variaciones inter-anales en la producción de flores.

### *Conclusiones*

Los tipos de inflorescencias que presentan las especies de *Nothofagus*, y el número constante de flores por inflorescencia que se registra en cada especie, permiten realizar evaluaciones retrospectivas de la producción de flores mediante la observación de cicatrices. Si bien estos estudios tienen limitaciones en cuanto al número de años que se pueden analizar en un momento puntual, los mismos permiten distinguir con precisión la producción de cada tipo de flor en años determinados. A futuro, resultaría de gran interés realizar monitoreos de largo plazo sobre árboles específicos, tomando ramas en distintas zonas de la copa. Éstos permitirían una aproximación más precisa al conocimiento del tipo de periodicidad en la producción de flores en *Nothofagus*. A partir de la selección de una muestra relativamente heterogénea en cuanto a edad de árboles y sitio de crecimiento, el presente estudio aporta información acerca del rango de variación en la producción relativa de flores en *N. obliqua* y *N. nervosa*. Asimismo, se observó que la periodicidad en la producción de flores no es homogénea entre árboles de una misma especie. Las variaciones observadas en este sentido podrían asociarse a la edad de los árboles o a diferencias genéticas o de sitio. En el caso de *N. nervosa*, los resultados sugieren un mayor grado de variación inter-anual en la producción de inflorescencias pistiladas con respecto a las estaminadas, lo cual podría asociarse a los altos costos meristemáticos del desarrollo de flores pistiladas en esa especie. Los brotes del eje principal de las ramas tienden a presentar menor número relativo de flores que los brotes laterales, aunque estas diferencias variarían a lo largo de la ontogenia de la rama. La observación de la producción de flores en los brotes del eje principal de la rama puede dar idea de la producción total de flores en cada año, aunque es necesario ampliar estas observaciones a fin de realizar modelos que mejoren la exactitud de dichas estimaciones.





**Anexo IV.1:** Para cada árbol, distribución de frecuencias de los números de inflorescencias estaminadas (azul), pistiladas (rojo) y totales (verde) producidas por brote anual.

## **Capítulo V: Fenología floral de brotes anuales de *N. obliqua*, *N. nervosa* e híbridos inter-específicos**

### **Introducción**

El estudio de la fenología floral, es decir, la identificación de las etapas de desarrollo de las flores y su distribución temporal, es crucial para comprender la ecología reproductiva de las especies vegetales y representa un conocimiento básico con miras a la reproducción controlada de especies de interés comercial y/o de conservación (Varela & Valdivieso 1996; Tooke & Battey 2010; Tal 2011). La liberación y transporte de polen, así como la recepción del mismo en los estigmas receptivos, dependen de la interacción de factores endógenos y ambientales que determinan los momentos de maduración de estambres y pistilos. La cantidad y origen de polen que reciba una flor pistilada es, en gran medida, función de su momento de antesis y del momento de liberación de polen de la misma planta y de plantas co- y hetero-específicas. En las especies monoicas, el grado de solapamiento temporal de los momentos de maduración de los estambres y carpelos producidos por un mismo individuo determina las probabilidades de auto-polinización (Lloyd & Webb 1986; Galen et al. 1989; Navarro 1997; Dai & Galloway 2010). Debido a las barreras de auto-incompatibilidad que se presentan en gran número de especies (Aizen et al. 1990; Riveros et al. 1995b; Yacine & Bouras 1997; Steiner & Gregorius 1999; Allen & Hiscock 2010; McGowen et al. 2010), puede afirmarse que la fenología floral guarda estrecha relación con la producción de semillas viables.

En especies con flores unisexuales, las descripciones de fenología floral implican la determinación de las fases de desarrollo de las flores estaminadas y del momento de liberación de polen, así como también del momento de receptividad de los estigmas de las flores pistiladas. Generalmente, la maduración de las flores estaminadas es observable a simple vista, siendo evidenciada por cambios en la morfología y coloración de los estambres y por la liberación de polen. Por el contrario, la receptividad de los estigmas suele ser más difícil de identificar, ya que está determinada por la presencia de secreciones estigmáticas que promueven la hidratación y germinación del

polen, y el crecimiento del tubo polínico (Herrero & Hormaza 1996; Lush et al. 1998; Sanzol et al. 2003; Edlund et al. 2004; Waites & Ågren 2006). En algunas especies, este período de receptividad es evidenciado por cambios morfológicos o de coloración que afectan a la superficie estigmática (González et al. 1995; Varela & Valdivieso 1996; Oddie & McComb 1998; Tangmitcharoen & Owens 1997; Yi et al. 2006; Lora et al. 2007; Tal 2011). Sin embargo, en otras especies es necesario aplicar métodos indirectos que permiten detectar actividad enzimática en los estigmas para determinar su receptividad, la cual no puede detectarse a simple vista (Jones 2002; Dafni & Maués 1998). Dichas técnicas son calibradas mediante la comparación con la aplicación de polinizaciones manuales y la posterior observación de la producción de semillas viables y/o de la germinación de los granos de polen sobre los estigmas. Esta última es considerada la forma más precisa de evaluación de la receptividad estigmática (Oddie & McComb 1998; Sanzol et al. 2003; Vesprini & Pacini 2005; Ofosu-Anim et al. 2006; Page et al. 2006; Lora et al. 2011).

Los *Nothofagus* son especies altamente auto-incompatibles (Riveros et al. 1995b), por lo que el solapamiento entre las funciones femenina y masculina promoviendo la auto-polinización, podría afectar negativamente la polinización cruzada y reducir la producción de semillas viables, como ocurre en otras especies (Shore & Barrett 1984; Yacine & Bouras 1997; Steiner & Gregorius 1999). Como se mencionó en capítulos anteriores, los brotes floríferos de las especies de *Nothofagus* desarrollan inflorescencias estaminadas en nudos proximales e inflorescencias pistiladas en nudos más distales (ver Capítulos I, II). En *N. nervosa* las secciones del brote florífero donde se desarrollan inflorescencias estaminadas y pistiladas se encuentran separadas entre sí por 1-5 yemas axilares, mientras que en brotes de *N. obliqua* ambas secciones son consecutivas (Puntieri et al. 2009). Considerando la posición de ambos tipos de flores en el brote anual, estudios previos han sugerido que la liberación de polen antecede al período de receptividad de los estigmas del mismo árbol, con lo cual se evitaría la auto-polinización (Riveros et al. 1995a; Donoso et al. 2006). Asimismo, se ha sugerido que dicha separación sería mayor en *N. nervosa* que en *N. obliqua* debido a las diferencias mencionadas en la

distribución de ambos tipos de flores en los brotes anuales de estas especies (Puntieri et al. 2009). Sin embargo, no existen estudios fenológicos a nivel de brote en *Nothofagus* que incluyan una evaluación precisa del período de receptividad de las flores pistiladas ni del tiempo de maduración de las flores estaminadas. Por lo tanto, a partir de la simple observación de los brotes anuales no es posible inferir sobre el grado de separación de la liberación de polen y la receptividad de los estigmas.

La observación detallada de la fenología floral, incluyendo la evaluación del período de receptividad de los estigmas, es necesaria para contrastar las ideas mencionadas anteriormente. Por otra parte, el establecimiento de criterios de análisis de la fenología floral en *Nothofagus* y su relación con factores ambientales resultaría útil para estudios futuros destinados a evaluar los efectos de probables cambios climáticos en la reproducción natural de estas especies. Asimismo, dicha información es necesaria para estudios que impliquen cruzamientos controlados, como aquellos que tienen como meta la domesticación con fines forestales. El presente trabajo tiene como objetivos (A) estimar el período de receptividad de los estigmas relativo al momento de anthesis (momento en que las flores quedan expuestas a la llegada de polen) mediante la aplicación de polinizaciones secuenciales y la evaluación de la germinación de los granos de polen, (B) describir la fenología de las flores de *N. obliqua*, *N. nervosa* e híbridos inter-específicos entre ambas especies, delimitando fases de desarrollo de las flores estaminadas y su relación entre éstas y la anthesis de las flores pistiladas y (C) estimar los efectos de la temperatura y la humedad ambientales sobre la velocidad de maduración de las flores estaminadas.

### **Materiales y Métodos**

Debido a la gran demanda de tiempo que implican tanto el seguimiento de la fenología de los brotes como el análisis de la receptividad de los estigmas mediante polinizaciones secuenciales, ambos estudios se realizaron en años diferentes. Por otra parte, las grandes variaciones en la producción de flores de un año a otro para los mismos individuos, impidió utilizar los mismos ejemplares para ambos estudios.



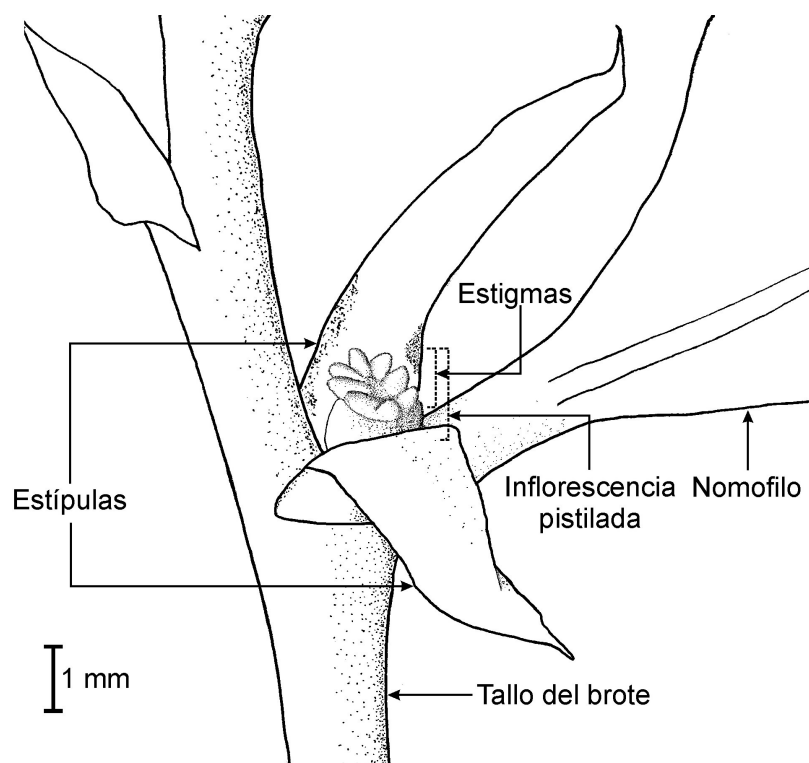
### *Receptividad de los estigmas*

Para el análisis de la receptividad de los estigmas, se utilizaron ramas floríferas colocadas en hidroponia. En experiencias previas se logró mantener ramas floríferas de *Nothofagus* en hidroponia hasta por 30 días sin observarse efectos negativos en el desarrollo de hojas y flores. De esta forma, si se cortan ramas de los árboles luego del inicio de la brotación, es posible observar las etapas de la floración masculina y femenina hasta el inicio de la fructificación. Dos razones motivaron el empleo del cultivo en hidroponia para este estudio. Por un lado, con esta técnica se simplifica el seguimiento del desarrollo de las flores pistiladas, que tienen tamaño muy pequeño (< 1mm de diámetro). Por otro lado, el mantenimiento de brotes en hidroponia facilita la aislación de las flores pistiladas para evitar polinizaciones no deseadas.

En el año de muestreo (2009) se identificaron pocos ejemplares con desarrollo de flores y sólo de la especie *N. obliqua*, por lo que se utilizó solamente dicha especie en este estudio. Se seleccionaron cuatro árboles (de aquí en adelante denominados A1, A2, A3 y A4) con ramas portadoras de yemas floríferas. Los cuatro ejemplares pertenecen a una población natural ubicada en el Parque Nacional Lanín (40°09'40" S; 71°31'32" O). Un quinto ejemplar (A5), ubicado en San Carlos de Bariloche, fue utilizado como proveedor de polen. En septiembre de 2009, antes de la brotación de las yemas, se cortaron cinco secciones de ramas principales de cada árbol. Inmediatamente después, dichas secciones se colocaron en agua y se llevaron a invernadero en donde las mismas se traspasaron individualmente en botellas de 500 cm<sup>3</sup> llenas con agua. Las ramas se colocaron en un sector del invernadero con ventilación a fin de que las condiciones de temperatura difirieran lo menos posible de las condiciones exteriores. El agua de las botellas fue reemplazada cada 48hs y en cada reemplazo se cortó, bajo agua, aproximadamente 1 cm del extremo proximal del eje principal de cada rama. Las inflorescencias estaminadas de la rama del árbol A5 fueron extraídas poco antes de la apertura de las anteras y se colocaron en recipientes abiertos a temperatura ambiente (15-20°C). Una vez que las anteras se abrieron dentro de los recipientes, el polen se mantuvo a 5°C con sílica-gel. En el caso de las

ramas de los árboles A1, A2, A3 y A4, los brotes fueron emasculados antes de la maduración de las flores estaminadas.

Las flores pistiladas de las especies de *Nothofagus* poseen perigonio rudimentario que no cubre los estigmas (Correa 1984). Por otro lado, las inflorescencias pistiladas en las especies de *Nothofagus* incluidas en este estudio son siempre trímeras y, al igual que cada una de las flores, sésiles. De manera que, al inicio de la floración los estigmas de las tres flores pistiladas de cada inflorescencia sólo están cubiertos por la lámina y las estípulas de la hoja tectriz correspondiente. Por esta razón, en este trabajo se consideró como antesis de una flor pistilada (que es equivalente a la antesis de las tres flores de cada inflorescencia) al momento en que se despliegan las estructuras foliares del nudo correspondiente, dejando a los estigmas accesibles al polen (Fig. V.1). Este criterio de definición de la antesis se ha utilizado previamente en otras especies (Richards 1997, en Page et al. 2006). Para los árboles A1, A2 y A3, se asignó cada rama a uno de los siguientes tratamientos: 1- polinización en el día de la antesis (0 DDA); 2- polinización 3 días después de antesis (3 DDA); 3- polinización 6 días después de antesis (6 DDA); 4- polinización 10 días después de antesis (10 DDA), y 5- polinización 15 días después de antesis (15 DDA). Del árbol A4 se obtuvieron pocas ramas con flores, por lo que se asignaron ramas sólo a los tratamientos 1 a 3. Los nomofilos de los brotes se despliegan en forma secuencial desde posiciones proximales a distales, por lo que las inflorescencias pistiladas de un mismo brote no quedan todas expuestas en forma simultánea. Por esta razón, sólo se polinizó la inflorescencia pistilada más proximal de cada brote a fin de mantener la mayor homogeneidad posible en los tiempos de polinización.

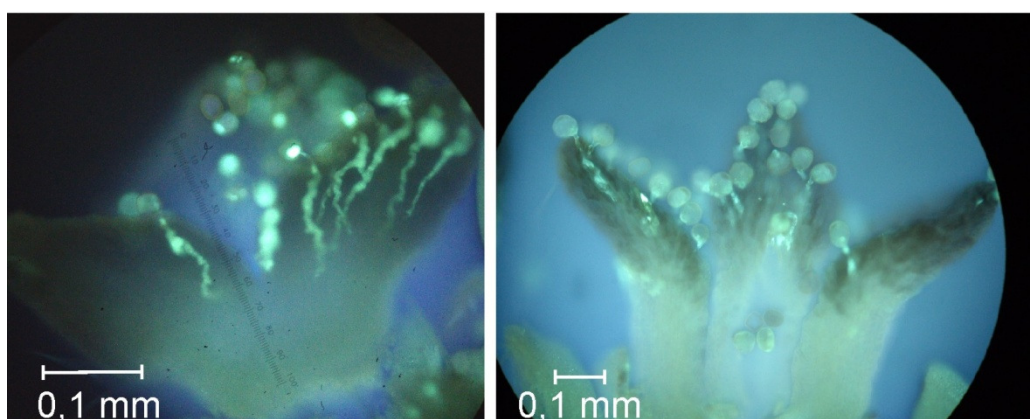


**Figura V.1:** Esquema de un nudo florífero en el período de receptividad de las flores pistiladas de una inflorescencia.

Se utilizaron en total 139 brotes floríferos de los cuales se polinizaron 417 flores pistiladas. Las polinizaciones se aplicaron directamente sobre los estigmas utilizando un pincel fino. Para la primera polinización (0 DDA) de los árboles A2 y A3, debió utilizarse polen del año anterior almacenado en heladera porque, dada la temprana brotación de las ramas de esos árboles, no fue posible disponer de polen fresco en ese momento. Un estudio previo demostró que, conservado a 4°C, el polen de especies de *Nothofagus* mantiene entre 20 y 50% de viabilidad luego de un año de almacenamiento (Báez et al. 2002). Las demás polinizaciones se realizaron con polen fresco procedente de las ramas del árbol A5. Las flores se fijaron en FAA 24 hs luego de aplicada la polinización. Las flores fijadas fueron ablandadas durante 24 hs en solución de NaOH 1.5 M, luego lavadas con agua destilada y por último colocadas en solución 0,1% m/v de azul de anilina en  $K_2POH_4$  0,1M por 24 hs. Al cabo de este tratamiento, las flores fueron montadas en glicerina siguiendo la técnica de aplastado. Se contó el número de granos de polen germinados

sobre los estigmas de cada flor utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51) equipado con una lámpara HBO 50W y un filtro para excitación en luz UV (BP 330-385 nm, BA 420 nm; Fig. V.2). Para cada inflorescencia, las tres flores se consideraron individualmente en los conteos.

Considerando cada individuo por separado, se comparó el número de granos de polen germinados en los estigmas entre los distintos momentos de polinización. Debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, las comparaciones se realizaron con la prueba no paramétrica de Kuskal-Wallis (Sokal & Rolf 1981). Cuando se observaron diferencias significativas mediante la prueba mencionada, se realizaron comparaciones apareadas mediante pruebas de Mann-Whitney, utilizando un nivel de significancia ajustado por el número de comparaciones.



**Figura V.2:** Granos de polen de *N. obliqua* germinados sobre las superficies estigmáticas (áreas oscuras) observadas con microscopio de epifluorescencia.

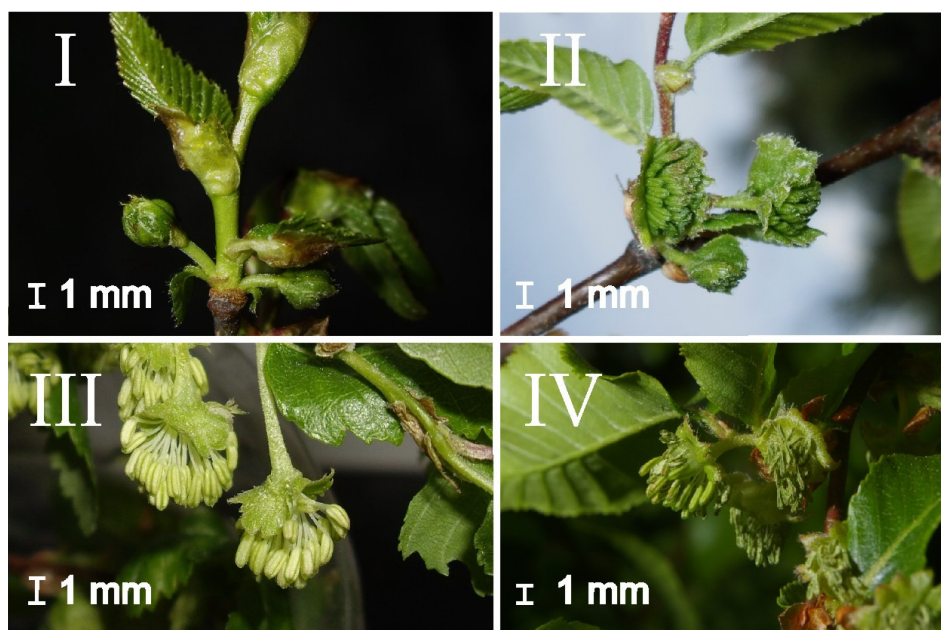
#### *Fenología de los brotes reproductivos*

Para este estudio se utilizaron árboles localizados en el vivero forestal de la Unidad de Mejoramiento Ecológico, Genético y Forestal de la EEA INTA Bariloche, ubicada 5 km al este de San Carlos de Bariloche (41° 07' 15" S, 71° 15' 06" W; 770 m s.n.m.). El empleo de árboles desarrollados en el mismo vivero, bajo condiciones ambientales semejantes, permitió registrar con

precisión el crecimiento de los brotes florales y realizar comparaciones intra- e inter-específicas. La población utilizada ocupa un área de unos 1500 m<sup>2</sup> y se encuentra, aproximadamente, entre 70 y 100 km al sur de las poblaciones naturales más cercanas de *N. nervosa* y *N. obliqua* respectivamente. En el año de estudio (2011) tres árboles de *N. obliqua* (de aquí en adelante No1, No2 y No3), dos de *N. nervosa* (Nn1 y Nn2) y tres ejemplares híbridos entre ambas especies (Hi1, Hi2 y Hi3) presentaron flores. A principios de la primavera de 2011, antes de la brotación, para cada árbol se marcaron tres brotes desarrollados en la estación de crecimiento anterior (2010-2011; de aquí en adelante “brotes portadores”) elegidos en base a la presencia de yemas floríferas, las cuales se identifican por presentar contorno más esférico que el de las yemas vegetativas (Puntieri et al. 2009).

A partir de la brotación, cada brote florífero (en total 98 brotes de *N. obliqua*, 64 brotes de *N. nervosa* y 77 brotes de los híbridos) fue observado cada dos-tres días y en cada observación se registraron: el número de nomofilos desplegados, el número y estado fenológico de las inflorescencias estaminadas y el número de inflorescencias pistiladas visibles (i.e. en antesis o post-antesis). En base a observaciones previas, se reconocieron cuatro fenofases de las flores estaminadas (Fig. V.3): (I) los primordios florales ya no están tapados por los catafilos de la yema floral y comienzan a expandirse, mientras que los estambres siguen cubiertos por el perigonio; (II) el perigonio comienza a abrirse pero los estambres se mantienen densamente reunidos y sus filamentos permanecen cortos; (III) el perigonio está completamente abierto, los filamentos se alargan y los estambres se separan unos de otros sin abrirse todavía las anteras; (IV) las anteras se abren, liberándose el polen. La evolución en el tiempo del número de flores estaminadas en cada fenofase y el número de inflorescencias pistiladas post-antesis se analizaron gráficamente. De cada brote portador de cada árbol se seleccionaron: el brote distal, un brote en posición intermedia y el brote más proximal y para cada uno se graficaron (A) el período comprendido entre la antesis de la inflorescencia pistilada más proximal y la más distal y (B) el período de liberación de polen. Dichos gráficos permitieron observar, en brotes de distintos tamaños, las distribuciones de los momentos de liberación de polen y de antesis de las flores pistiladas. No se

consideraron para dichos gráficos los árboles que presentaron pocos brotes con inflorescencias pistiladas (No2 y Nn1). Durante todo el período de observación se registraron datos de temperatura y humedad relativa con un data logger Lascar EL-USB-2.



**Figura V.3:** Fases fenológicas de las flores estaminadas de *N. obliqua*: I: flores estaminadas desplegadas y con el perigonio cerrado cubriendo los estambres; II: flores con el perigonio abierto y los estambres densamente dispuestos; III: flores con estambres separados como consecuencia del alargamiento de los filamentos; IV: flores con las anteras abiertas liberando el polen.

#### *Efectos de las condiciones ambientales sobre la velocidad de maduración de las flores estaminadas*

Para estimar el efecto de las condiciones ambientales sobre el período de maduración de las flores estaminadas, de cada uno de los árboles en los que se observó la fenología floral en vivero, se cortaron y colocaron en hidroponía ramas con brotes floríferos; estas ramas fueron extraídas dentro del período en que las flores estaminadas se encontraban en fase I. Las ramas se colocaron en el interior en contenedores de vidrio de 60 cm de altura y 30 cm por lado que fueron dispuestos junto a una ventana, recibiendo luz solar pero nunca en forma directa. Se proporcionaron tres condiciones contrastantes a las plantas

de los tres contenedores: A- temperatura media diaria de 20°C y humedad media de 92% (+H<sup>9</sup>); B- temperatura media diaria de 25°C y humedad media de 47% (+T<sup>9</sup>) y C- temperatura media diaria de 20°C y humedad media de 47% (control). Para el tratamiento +H el contenedor de vidrio se mantuvo con una ventilación limitada en su parte superior (parcialmente cerrada con vidrio) a fin de reducir la salida de vapor de agua y aumentar la humedad relativa, mientras que para los demás tratamientos los contenedores se mantuvieron totalmente abiertos en su parte superior. En el caso del tratamiento +T, se utilizaron dos lámparas de tungsteno de 25 W dirigidas a la parte inferior del contenedor por ocho horas durante el día para aumentar la temperatura. Diariamente se reemplazó el agua de los contenedores en los que se encontraban las ramas y se cortó, bajo agua, 1 cm del extremo proximal de las mismas. Adicionalmente, de uno de los ejemplares (No2) se colocó una rama en hidroponía en el vivero a la intemperie a fin de corroborar la existencia de algún efecto del sistema hidropónico en la maduración de las flores. Para cada rama se cuantificó el número total de flores estaminadas en cada fase de maduración en un período de 10 días a partir del corte de las mismas. Dentro del período de tiempo mencionado se comparó, mediante pruebas de  $Ch^2$ , la proporción de flores estaminadas que alcanzó cada fase de maduración entre los brotes de cada tratamiento y los brotes en pie.

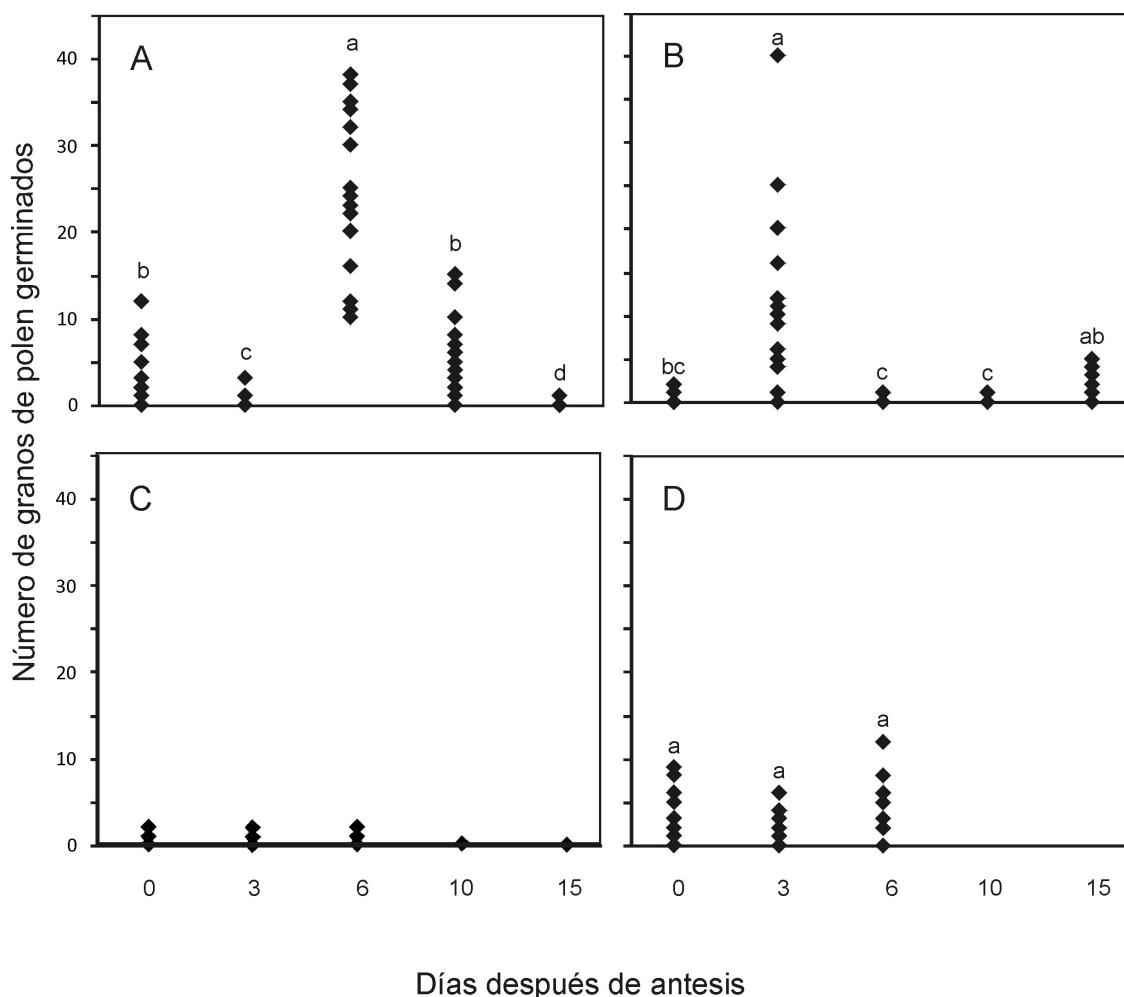
## Resultados

### *Receptividad de las flores pistiladas*

Se observaron flores con al menos un grano de polen germinado en todo el período de tiempo considerado (desde el momento de anthesis y hasta 15 días después; Fig. V.4). En los árboles A1, A2 y A3 se observaron diferencias en el número de granos germinados entre los distintos momentos de polinización (Fig. V.4 A-C). En el caso del árbol A3, se observaron, aunque en baja cantidad, granos de polen germinados en las flores polinizadas entre 0 y 6 DDA, mientras que en las flores polinizadas posteriormente no germinaron granos de polen (Fig. V.4C). Debido al bajo número de granos germinados en este ejemplar, no se aplicaron análisis estadísticos en ese caso. Para los

árboles A1 y A2, el número de granos de polen geminados en los estigmas varió significativamente entre los distintos momentos de polinización ( $H= 102,1$ ,  $p < 0,001$ ;  $H= 56,5$ ,  $p < 0,001$  respectivamente; Fig. V.4A, B). Para el árbol A1, las flores polinizadas 6 DDA presentaron más granos de polen germinados que las flores polinizadas antes y después de dicho momento (Fig. V.4A). Para el mismo árbol, las flores polinizadas 0 y 10 DDA presentaron más granos germinados que aquellas polinizadas 3 DDA, mientras que las polinizadas 15 DDA presentaron la menor cantidad de granos germinados (Fig. V.4A). Para el árbol A2, se observó el máximo de granos geminados en las flores polinizadas 3 DDA; en términos generales, se observaron menos de 5 granos germinados en las flores polinizadas 0, 6, 10 y 15 DDA. Las flores polinizadas 15 DDA no se diferenciaron estadísticamente de las flores polinizadas 0 y 3 DDA (Fig. V.4B). Para el árbol A4, no se observaron diferencias significativas entre los momentos de polinización respecto del número de granos de polen germinados en los estigmas ( $H= 4,8$ ,  $p= 0,09$ ; Fig. V.4D).





**Figura V.4:** Número de granos de polen germinados en flores polinizadas en distintos momentos desde la antesis para los árboles de *N. obliqua* A1 (A), A2 (B), A3 (C) y A4 (D). Para cada gráfico, la presencia de letras diferentes en la parte superior de las series de puntos indica diferencias significativas entre los momentos de polinización (pruebas de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney).

### Fenología floral

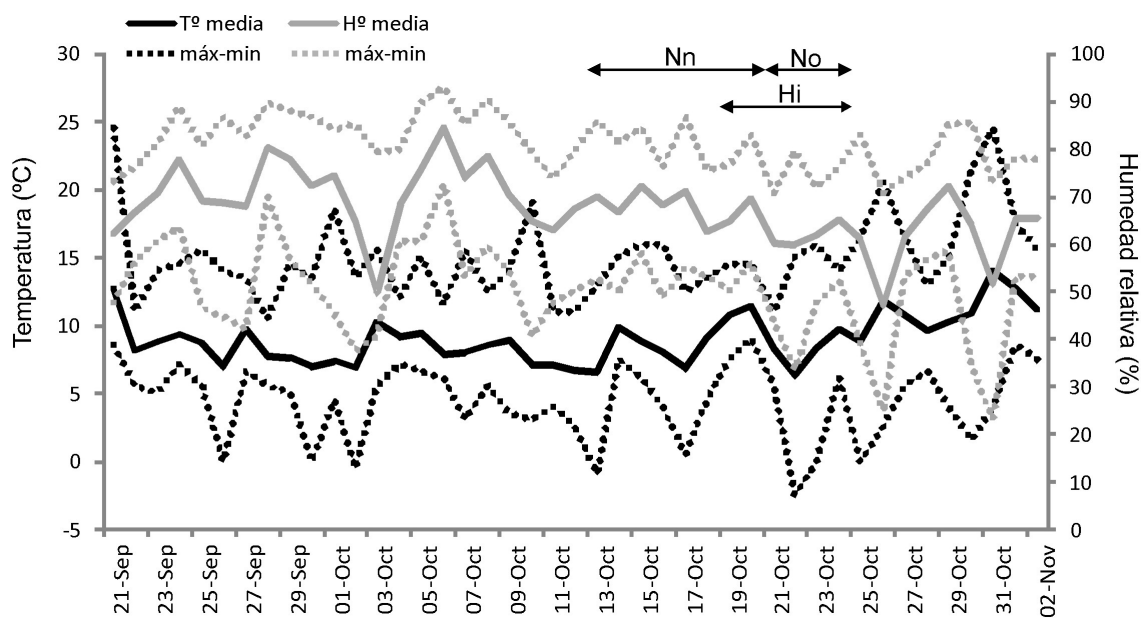
En la Fig. V.5 se indican las condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente en el vivero durante el período de observación.

*N. obliqua*: El patrón de maduración de las flores estaminadas fue similar en los tres ejemplares, comenzando a principios de primavera junto con el inicio del despliegue de los nomofilos (Fig. V.6 A-C). Las flores estaminadas se mantuvieron en la fase de maduración I entre 12 y 14 días, mientras que la fase II duró alrededor de 7 días. La fase III fue notablemente más corta que las

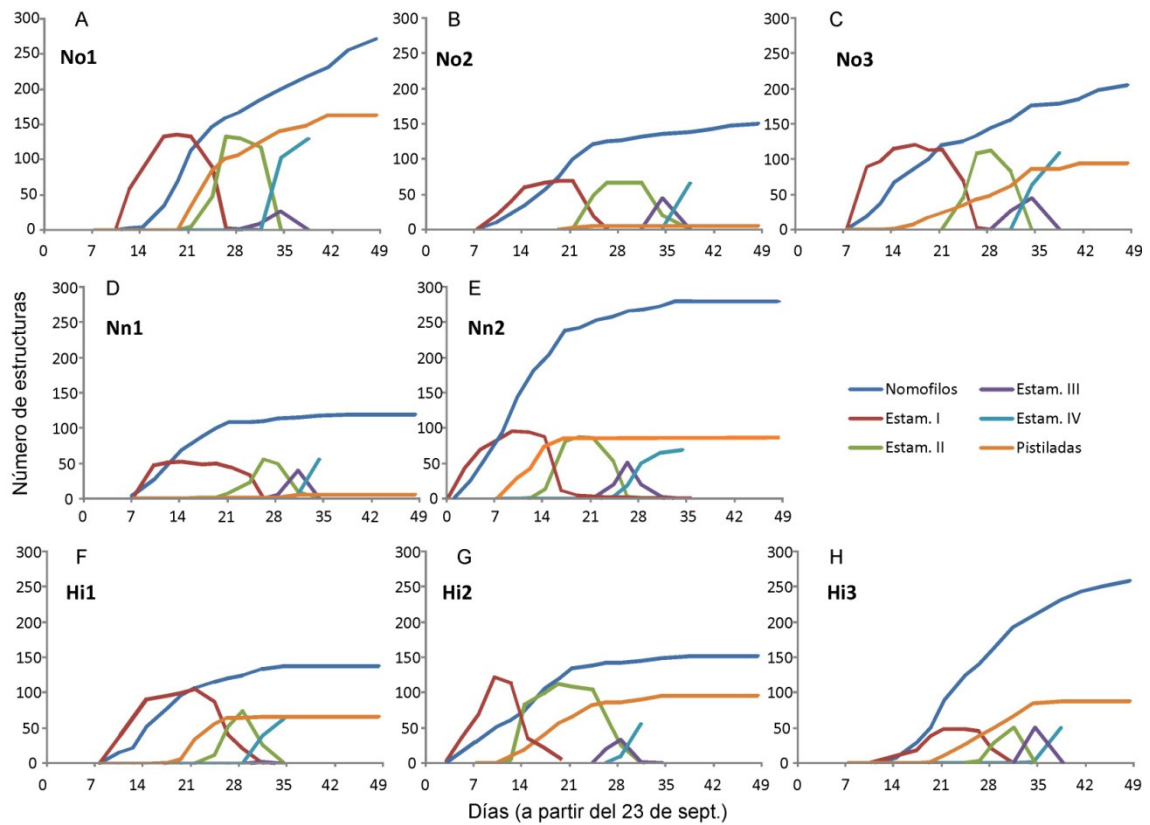
anteriores, por lo que en algunas flores el intervalo entre observaciones resultó demasiado largo para detectar esa fase, registrándose el pasaje de la fase II a la fase IV (Fig. V.6 A-C). La liberación de polen fue aproximadamente simultánea en los árboles analizados (Fig. V.6 A-C y V.7A, B), ocurriendo un mes después del inicio de la floración. Se observaron inflorescencias pistiladas a partir de principios de octubre y su número se incrementó siguiendo el patrón de despliegue de los nomofilos (Fig. V.6 A-C). Uno de los árboles seleccionados (No2) produjo pocas flores, todas las cuales completaron su desarrollo a principios de octubre. En términos generales, el momento de antesis de la mayoría de las inflorescencias pistiladas ocurrió con anterioridad al momento de liberación de polen en el mismo árbol (Fig. V.6 A-C). Esto también se confirmó a nivel de brote anual en los árboles No1 y No3 (Fig. V.7A, B; el árbol No2 no fue considerado porque muy pocos brotes floríferos presentaron inflorescencias pistiladas). El período de antesis de las inflorescencias pistiladas en cada brote (i.e. tiempo entre la antesis de la inflorescencia más proximal y la de la más distal) varió entre brotes (Fig. V.7A, B). Sólo en algunos brotes, en los que el período de antesis de inflorescencias pistiladas fue mayor a 17 días, algunas inflorescencias pistiladas alcanzaron la antesis después de la liberación de polen en el mismo brote (Fig. V.7A, B).

*N. nervosa*: el inicio de la floración masculina en el árbol Nn2 ocurrió aproximadamente siete días antes que en el árbol Nn1 (Fig. V.6D, E). Este desfase se mantuvo a lo largo de todo el período observado y, en última instancia, se tradujo en el inicio anterior de la liberación de polen en el árbol Nn2 (Fig. V.6E). En términos generales, la duración de cada fase de maduración de las flores estaminadas fue similar en ambos árboles: unos 14 días de duración para la fase I, 10 días para la fase II y entre tres y cuatro días para la fase III. En el árbol Nn1, que presentó escasa cantidad de inflorescencias pistiladas (Nn1), la antesis de las mismas presentó alto grado de solapamiento con la liberación de polen (Fig. V.6D). Por el contrario, en el árbol Nn2 se observó que la antesis de la totalidad de las inflorescencias pistiladas precedió en al menos 9 días al inicio del período de liberación de polen (Fig. V.6E, V.7C).

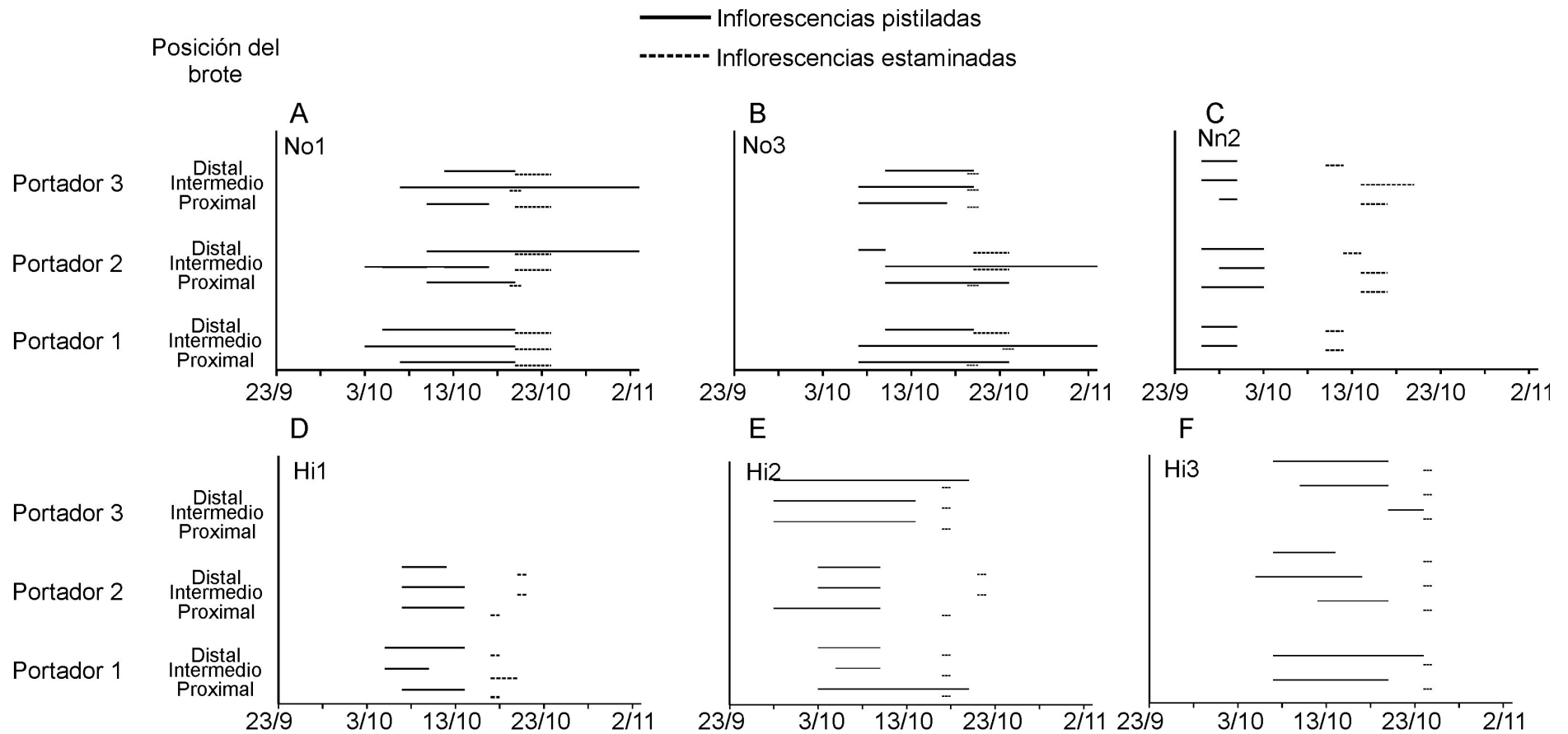
Híbridos: en el caso de los híbridos la duración de las dos primeras fases de maduración de las flores estaminadas presentó cierta variación (12-18 días la fase I y 6-14 días la fase II; Fig. V.6 F-H). La fase III fue menos notable que en las flores de las especies puras, y en dos de los tres ejemplares no se observó que las flores estaminadas mostraran claramente las características asociadas a dicha fase de maduración antes de la liberación de polen (Fig. V.6F, H). En los individuos Hi1 y Hi2, la liberación de polen se inició entre 10 y 12 días antes que en el individuo Hi3 (Fig. V.6 F-H). El momento de antesis de las inflorescencias pistiladas también presentó cierto grado de variación inter-individual. En el ejemplar Hi1 la antesis de la totalidad de las inflorescencias pistiladas abarcó un período de 12 días, mientras que en los demás ejemplares dicho período fue de aproximadamente 17 días (Fig. V.6 F-H). En términos generales, a nivel de los brotes anuales, la antesis de la mayor parte de las inflorescencias pistiladas fue anterior a la liberación de polen (Fig. V.7 D-F). Como fuera observado en *N. obliqua*, sólo en algunos casos en los que el período de antesis de las inflorescencias pistiladas fue muy prolongado, la antesis de las inflorescencias pistiladas más distales fue simultánea o posterior en pocos días a la liberación de polen del mismo brote.



**Figura V.5:** Condiciones de temperatura y humedad (promedio: línea continua; máxima y mínima líneas punteadas) a lo largo del periodo de tiempo del estudio. Las flechas indican el período de liberación de polen de los ejemplares de *N. nervosa* (Nn), híbridos (Hi) y de *N. obliqua* (No).



**Figura V.6:** Número de nomofilos desplegados, flores estaminadas en cada fenofase (I, II, III y IV) e inflorescencias pistiladas en fase de antesis o posterior en cada fecha de observación, para los árboles No1 (A), No2 (B), No3 (C), Nn1 (D), Nn2 (E), Hi1 (F), Hi2 (G) e Hi3 (H).



**Figura V.7:** Periodos de antesis de las inflorescencias pistiladas y de liberación de polen en brotes anuales ubicados en posiciones proximal, intermedia y distal en el brote portador para los árboles No1 (A), No3 (B), Nn2 (C), Hi1 (D), Hi2 (E) y Hi3 (F).

*Efectos de las condiciones ambientales sobre la velocidad de maduración de las flores estaminadas*

El período de tiempo durante el cual se mantuvieron brotes en hidroponia comprendió entre el 23 de septiembre y el 13 de octubre. Durante dicho período las ramas en hidroponia se mantuvieron en las condiciones de temperatura y humedad correspondientes a cada tratamiento (ver metodología), mientras que en el vivero se registró una temperatura media diaria de 9,9°C (DE= 3,1) y una humedad relativa media del 70,8% (DE= 12,4). De las ramas colocadas en hidroponia, aquellas correspondientes a los ejemplares Nn1, Hi1 y Hi2 mostraron claros signos de deterioro prematuro evidenciado por la pérdida de turgencia de las hojas, por lo que no se obtuvieron datos de dichos ejemplares. En cuanto a *N. obliqua*, la proporción de flores estaminadas que alcanzó la fase II no mostró diferencias significativas entre tratamientos en los individuos No1 ( $Ch^2= 7,8$ ;  $p= 0,05$ ; Fig. V.8A) y No2 ( $Ch^2= 5,4$ ;  $p= 0,14$ ; Fig. V.8B). Para el ejemplar No2, al igual que en los brotes en pie (Fig. V.8B) los brotes en hidroponia colocados en el vivero a la intemperie mostraron un patrón similar al de los brotes en pie: en el período de observación casi la totalidad de las flores estaminadas alcanzaron la fase II y no se observaron flores en estados de maduración posteriores en el período considerado. Con respecto al ejemplar No3, no se observaron flores en estado II en los brotes en pie en el período observado, mientras que entre los brotes en hidroponia, los correspondientes a la condición control mostraron menor proporción de flores en estado II que los de los tratamientos  $+H^o$  y  $+T^o$  ( $Ch^2= 27,5$ ;  $p< 0,001$ ; Fig. V.8C). En los tres ejemplares de esta especie, las flores estaminadas de los brotes en pie no alcanzaron la fase de maduración III en el período observado (Fig. V.8 A-C). Por su parte, entre los brotes en hidroponia, la proporción de flores estaminadas que alcanzó la fase III siguió el gradiente  $+T^o>+H^o>control$  en los árboles No1 ( $Ch^2= 18,8$ ;  $p< 0,001$ ; Fig. V.8A) y No2 ( $Ch^2= 21,9$ ;  $p< 0,001$ ; Fig. V.8B), mientras que en el ejemplar No3, los tratamientos  $+H^o$  y  $+T^o$  presentaron proporciones similares de flores que alcanzaron estado III y mayores a la observada en los brotes en la condición control ( $Ch^2= 31,3$ ;  $p< 0,001$ ; Fig. V.8C). En el período observado, entre el 60 y el 90% de las flores estaminadas de los brotes de la condición  $+T^o$  alcanzaron

la liberación de polen, siendo esta proporción significativamente mayor a la observada en los demás tratamientos (No1:  $Ch^2 = 47,1$ ;  $p < 0,001$ ; No2:  $Ch^2 = 42,9$ ;  $p < 0,001$ ; No3:  $Ch^2 = 43,1$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. V.8 A-C). En la condición control, la proporción de flores estaminadas maduras (que liberaron polen) varió entre 0 y 30%, mientras que para el tratamiento  $+H^\circ$  dicha proporción no superó el 10%.

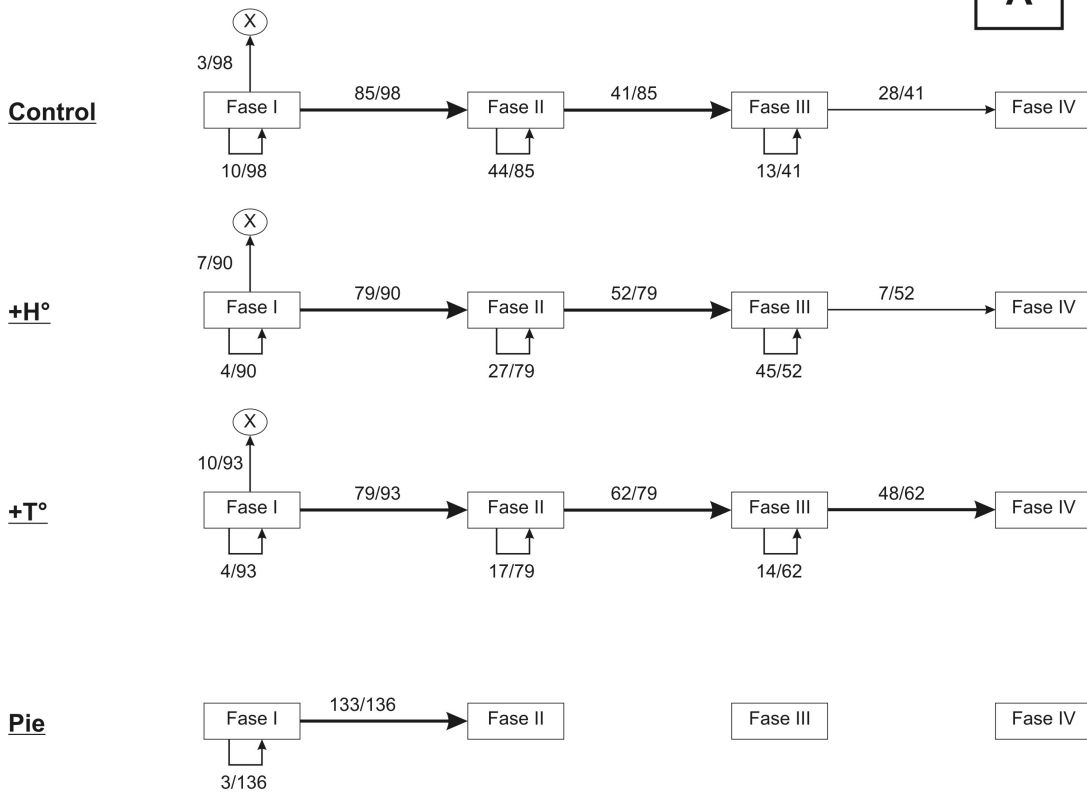
Para el ejemplar Nn2, la proporción de flores estaminadas que alcanzó las fases de maduración II, III y IV fue significativamente diferente entre tratamientos (fase II:  $Ch^2 = 95,0$ ;  $p < 0,001$ ; fase III:  $Ch^2 = 43,4$ ;  $p < 0,001$ ; fase IV:  $Ch^2 = 44,5$ ;  $p < 0,001$ ). Cerca del 80% de las flores estaminadas de los brotes del tratamiento  $+T^\circ$  alcanzó la fase II, mientras que el 50% completó todas las fases de maduración, hasta la liberación de polen (Fig. V.8D). En los brotes en pie, no se observaron flores en fases posteriores a II dentro del período considerado. En los brotes en la condición control, aproximadamente el 65% de las flores alcanzó la fase II y el 35% alcanzó la liberación de polen. En la condición  $+H^\circ$  se observó la menor proporción de flores estaminadas en fase II (aproximadamente 55%), mientras que cerca del 15% alcanzó la liberación de polen.

En el ejemplar híbrido, los brotes en la condición  $+T^\circ$  presentaron la mayor proporción de flores estaminadas en fase II, observándose un valor intermedio en la condición control y el menor valor en la condición  $+H^\circ$  y en los brotes en pie ( $Ch^2 = 20,3$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. V.8E). Sólo en las condiciones control y  $+T^\circ$  se observaron flores estaminadas en las fases III y IV (Fig. V.8E). La proporción de flores estaminadas en fase III fue mayor en los brotes en condición control y que en los del tratamiento  $+T^\circ$  ( $Ch^2 = 6,4$ ;  $p = 0,011$ ), mientras que en los últimos se observó mayor proporción de flores en la fase de liberación de polen ( $Ch^2 = 6,7$ ;  $p = 0,009$ ; Fig. V.8E).



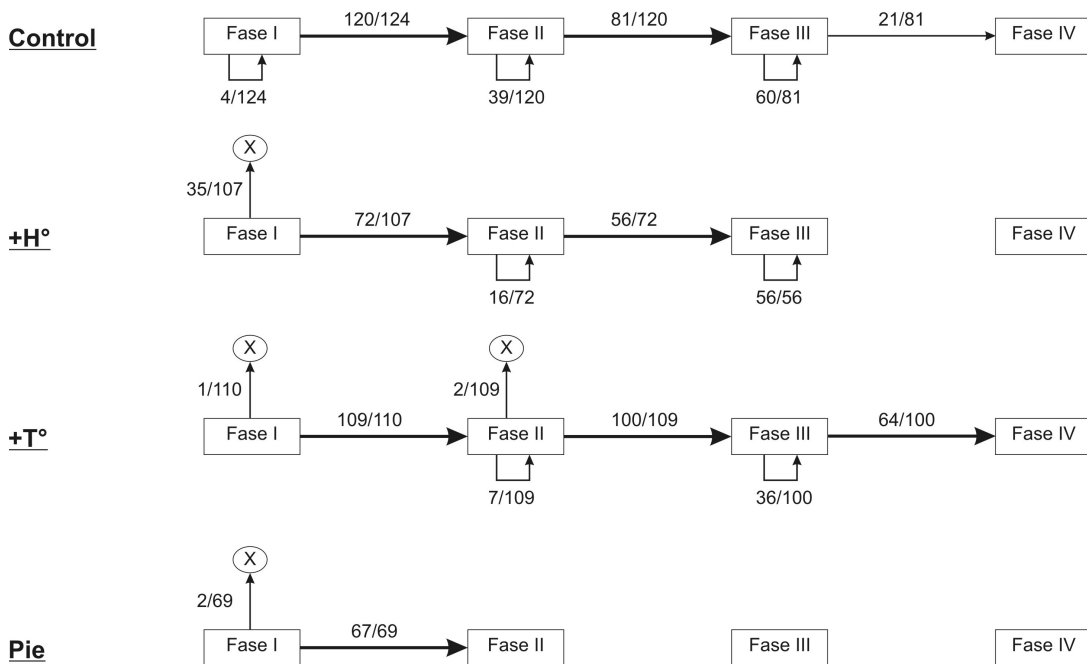
*Nothofagus obliqua 1*

**A**

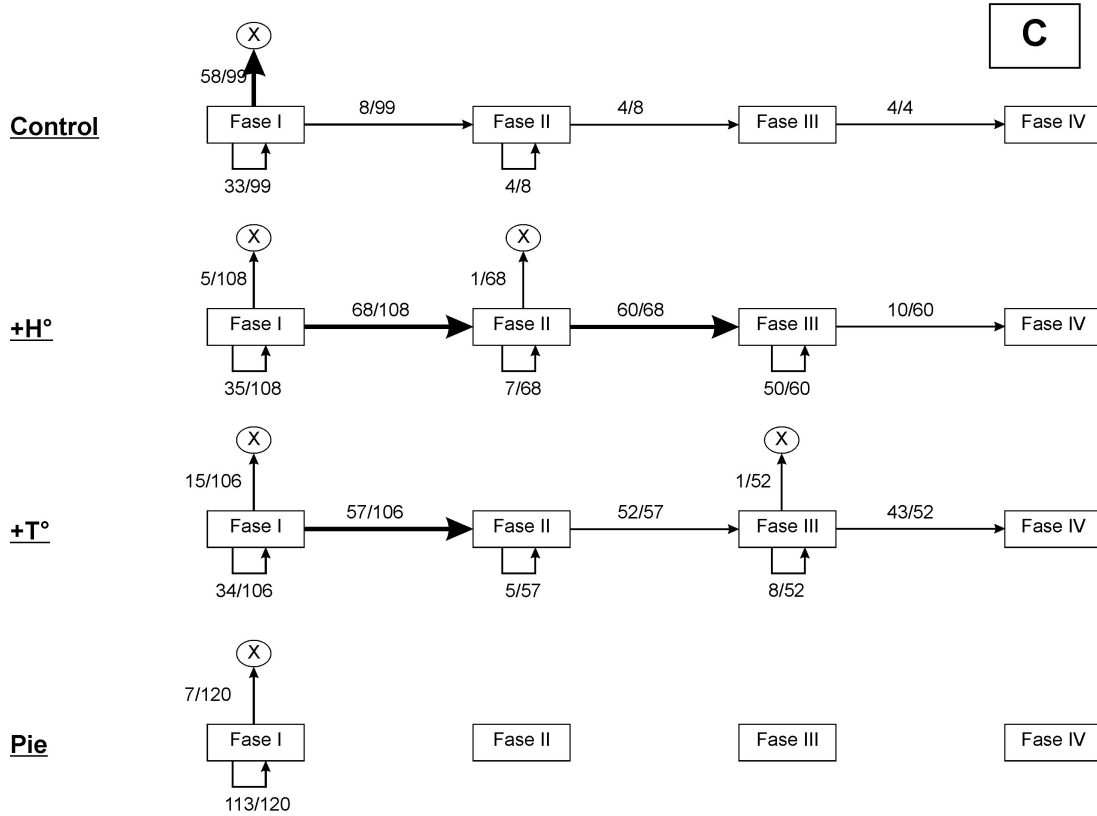


*Nothofagus obliqua 2*

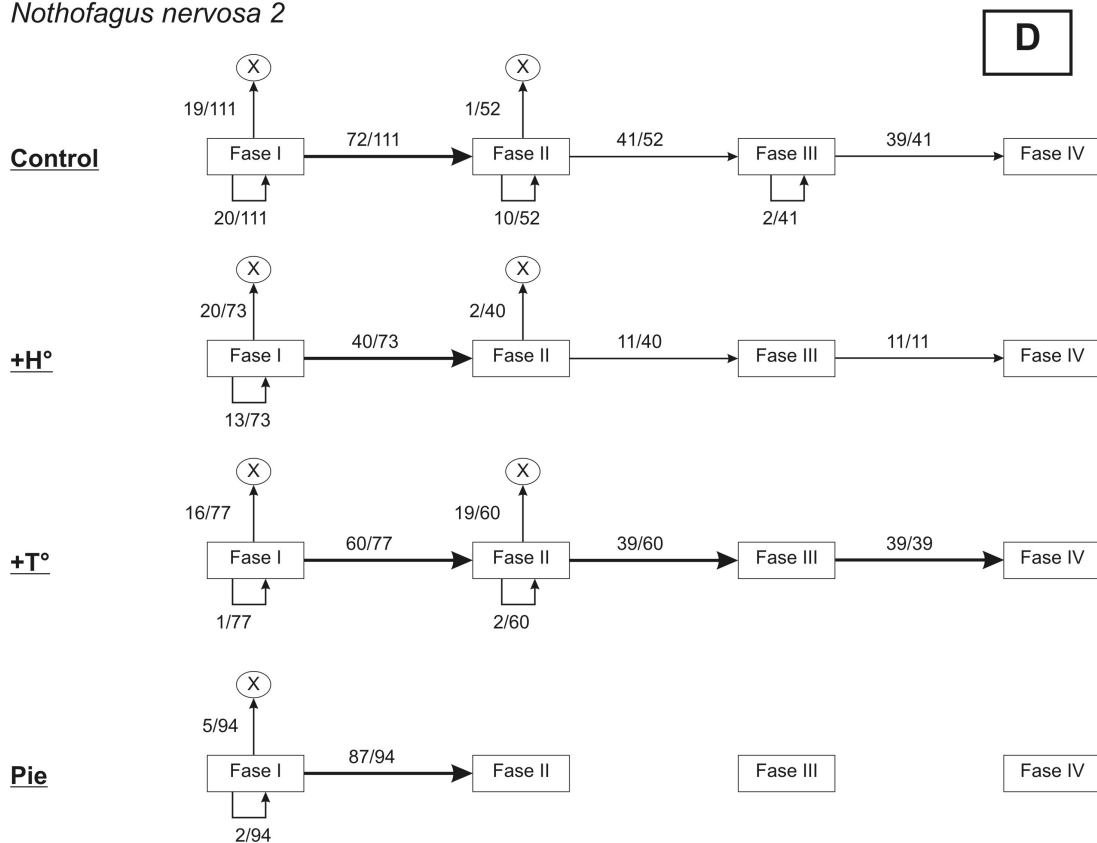
**B**



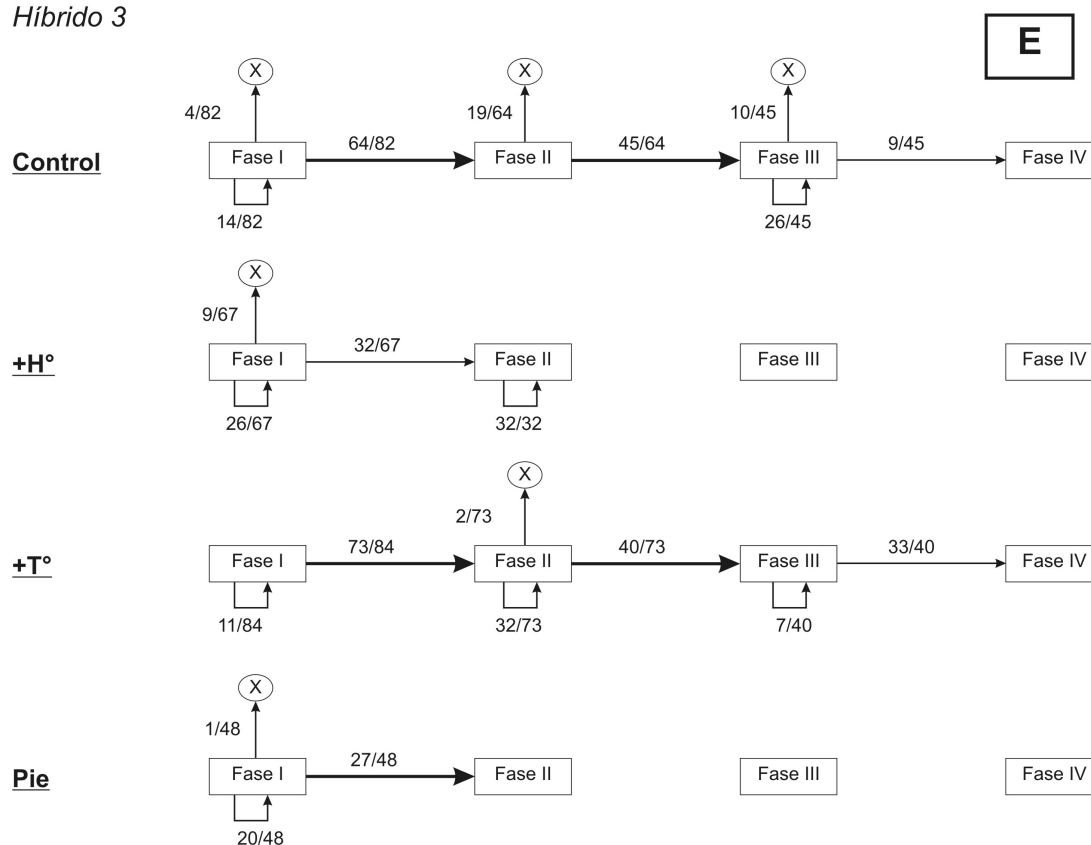
*Nothofagus obliqua* 3



*Nothofagus nervosa* 2



Híbrido 3



**Figura V.8:** Número de flores estaminadas que alcanzó cada fase de maduración, observados en un período de 10 días a partir de la colocación de brotes en hidroponia extraídos en el momentos que las flores estaminadas alcanzaron la fase de maduración I; se muestran los datos para cada ejemplar (**A:** No1; **B:** No2; **C:** No3; **D:** Nn2; **E:** Hi3) y condición: **Control:** brotes en hidroponia a temperatura media diaria de 20°C y 47% de humedad relativa; **+H°:** brotes en hidroponia a temperatura media diaria de 20°C y 92% de humedad relativa; **+T°:** brotes en hidroponia a temperatura media diaria de 25°C y 47% de humedad relativa; **Pie:** brotes en pie en los árboles de vivero (temperatura media diaria: 9,9°C, 70,8% de humedad relativa). Las flechas más gruesas destacan los cambios de estados que implican al menos el 50% del número de flores inicial (en fase I).

## Discusión

### *Periodo de receptividad de los estigmas en N. obliqua*

El período de receptividad de los estigmas de las flores está determinado por su capacidad de promover la hidratación y germinación de los granos de polen en las superficies estigmáticas (Sanzol et al. 2003; Vesprini & Pacini 2005; Ofosu-Anim et al. 2006; Lora et al. 2011). Dicho período fue estimado en este trabajo mediante la aplicación de polinizaciones secuenciales y la evaluación de la germinación de los granos de polen en los estigmas de *N. obliqua*. Tales polinizaciones se realizaron en varias ocasiones a partir del momento de antesis (considerado como el momento en que las estípulas y la lámina de la hoja tectriz de una inflorescencia pistilada dejaron al descubierto a los estigmas). Se determinó que las flores pistiladas pueden encontrarse receptivas desde ese momento, y que la receptividad puede mantenerse hasta por 15 días. Los árboles A1 y A4 presentaron mayor número de granos de polen germinados en las flores polinizadas en antesis, observándose que, respectivamente, el 60 y 90% de dichas flores presentaron granos de polen germinados en tal momento (datos no mostrados). Para los árboles A2 y A3, en contraste, se observaron menos flores receptivas en antesis (aproximadamente 20% en ambos) las cuales, a su vez, presentaron pocos granos de polen germinados. Esta diferencia entre ambos pares de árboles (A1-A4 vs. A2-A3) puede estar relacionada con el hecho de que la polinización en antesis para los árboles A2 y A3 no pudo realizarse con polen fresco (ver Materiales y Métodos). La única referencia encontrada respecto de la viabilidad del polen de *N. obliqua* almacenado en frío procede de un trabajo realizado en Chile, que indica que puede mantenerse entre 30 y 50% de viabilidad luego de un año de almacenamiento (Báez et al. 2002). A pesar de las variaciones interindividuales observadas, los resultados obtenidos sugieren que el período de receptividad de las flores pistiladas de *N. obliqua* comenzaría en forma aproximadamente simultánea con el momento de antesis, determinado por el despliegue del nomofilo tectriz.

Los resultados muestran que la receptividad de las flores pistiladas en *N. obliqua* puede mantenerse hasta por 15 días después de la antesis. No obstante, en los dos ejemplares en los que se observaron flores receptivas 15

DDA, el número de granos de polen germinados fue bajo. El período de receptividad de 15 días encontrado aquí para las flores pistiladas de *N. obliqua* es relativamente largo en comparación con otras especies arbóreas (Oddie & McComb 1998; Kalinganire et al. 2000; Sanzol et al. 2003; Page et al. 2006). Sin embargo, no he encontrado registros previos disponibles para especies Fagaceae y Nothofagaceae. En general, se considera que la duración del período de receptividad de los estigmas estaría bajo control endógeno y que, dependiendo de la especie, el final de la receptividad puede relacionarse con distintos factores (por ej. llegada de polen, temperatura, humedad), y podría relacionarse con estrategias específicas de polinización (Oddie & McComb 1998; Stpiczynka 2003; Vesprini & Pacini 2005; Hedhly et al. 2005; Yi et al. 2006; Lora et al. 2011). Comúnmente, las especies anemófilas poseen estigmas prominentes, lo cual favorece la captura de polen (Leins & Erbar 2010, p. 207). En *Nothofagus*, por el contrario, los estigmas son sésiles y pequeños, con lo cual la eficiencia de captura del polen sería baja. En estas especies, un período prolongado de receptividad de los estigmas podría aumentar las probabilidades de polinización efectiva y compensar la supuestamente baja eficiencia de captura de polen de las flores pistiladas. En concordancia con esta hipótesis, otros autores han propuesto que un período de receptividad extenso es beneficioso cuando las probabilidades de recepción de polen por unidad de tiempo son bajas (Arroyo et al. 1985; Waites & Ågren 2006). Por otra parte, períodos de receptividad largos pueden aumentar las probabilidades de proliferación de organismos patógenos, favorecidos por la presencia de los fluidos estigmáticos (Heslop-Harrison 2000).

En flores de dos de los ejemplares se observó que el número de granos de polen germinados sobre los estigmas varió notablemente dentro del período de tiempo en el que se aplicaron las polinizaciones, alcanzándose máximos de receptividad entre los 3 (A2) y 6 (A1) días desde la antesis. En el caso del ejemplar A3, sólo se observaron granos de polen germinados en las flores polinizadas entre el momento de antesis y 6 DDA, observándose siempre pocos granos geminados. Es probable que la baja cantidad de granos germinados en las flores de este ejemplar se asocie con una baja compatibilidad entre este ejemplar y aquel del cual se extrajo polen. Por otra

parte, en el ejemplar A4 no se observaron diferencias significativas en el número de granos de polen germinados en los distintos momentos de polinización, aunque hubo una leve tendencia a que las flores polinizadas 6 DDA presentaran mayor número de granos germinados que las flores polinizadas con anterioridad. Los resultados obtenidos, principalmente de los ejemplares A1 y A2, indican que dentro del período de receptividad existiría un momento relativamente corto en el cual la receptividad es máxima. Similarmente, en especies de *Eucalyptus* se ha observado un pico de receptividad mediante la aplicación de polinizaciones secuenciales (Oddie & McComb 1998). Las variaciones en el grado de receptividad a lo largo de un determinado período podrían relacionarse con cambios en la proporción de superficie estigmática receptiva, tal como se ha observado en *Kunzea pomífera* mediante la evaluación de actividad peroxidasa (Page et al. 2006). Es probable que en los estigmas, al igual que en otros órganos de la planta, la curva de actividad fisiológica siga un patrón gaussiano (con un pico intermedio entre fases inicial y final de baja actividad). La ocurrencia de picos de alta receptividad determinaría mayor competencia entre los granos de polen depositados en los estigmas para la fertilización del óvulo (Herrero & Hormaza 1996).

La información derivada de este estudio respecto del período de receptividad de las flores pistiladas es de principal importancia para la reproducción controlada de especies de *Nothofagus*. El conocimiento del inicio, duración y pico de receptividad de las flores optimiza la aplicación de polinizaciones manuales destinadas a generar individuos de origen conocido, lo que es de gran importancia en programas de selección y mejoramiento genético (Grattapaglia & Resende 2011). Si bien las condiciones ambientales en las que se mantuvieron los brotes durante el experimento difieren de las condiciones naturales, los resultados aquí obtenidos aportan en gran medida al conocimiento del período de receptividad de las flores pistiladas de *N. obliqua* a partir de sus momentos de antesis. Sería deseable reproducir este experimento con flores desarrolladas en pie en árboles de poblaciones naturales, aunque la distancia a la que se encuentran dichas poblaciones plantea dificultades logísticas para seguir diariamente la fenología floral y determinar el momento

de antesis de cada flor. En este sentido, el control mantenido en la observación de las flores de brotes en hidroponia utilizados en este estudio garantizó una alta homogeneidad en los momentos de polinización de las flores.

### *Fenología de los brotes florales*

El estudio de la fenología floral provee información básica para estudios tanto en biología básica como aplicada. A largo plazo, dicho conocimiento resulta indispensable para analizar las variaciones fenológicas inter-anales y los factores asociados a las mismas. Asimismo, la descripción de las fases fenológicas que atraviesan las flores estaminadas y pistiladas resulta de gran utilidad tanto para el estudio de la dinámica de polinización natural y el flujo génico como para la aplicación de polinizaciones controladas (William & Adam 1994; Varela & Valdivieso 1996; Bai et al. 2006; Ortiz & Espejo 2004; Elzinga et al. 2007; Dai & Galloway 2010). Actualmente, la información disponible respecto de la fenología floral de especies de *Nothofagus* es escasa (Rusch 1993; Riveros et al. 1995a; Ortiz & Espejo 2004). En las especies sudamericanas existen pocos registros disponibles sobre las fases de maduración de las flores estaminadas y su distribución temporal y, menos aún, acerca del período de antesis de las inflorescencias pistiladas (Ortiz & Espejo 2004).

Tal como se ha mencionado para *N. pumilio* (Rusch 1993), en *N. obliqua*, *N. nervosa* y en los híbridos entre ambas especies, los momentos de despliegue de las flores estaminadas y de antesis de las flores pistiladas están estrechamente relacionados con el inicio de la expansión de los nomofilos. En este trabajo se identificaron tres fases de maduración de las flores estaminadas, desde la separación de éstas del brote en alargamiento (fase I) hasta la liberación del polen (fase IV). En el caso de las inflorescencias pistiladas, por otro lado, resulta dificultoso establecer fases de desarrollo evidentes a simple vista debido a su pequeño tamaño. El período de desarrollo de las flores estaminadas entre el inicio de la fase I y la liberación de polen duró entre 25 y 30 días en las tres entidades estudiadas. Trabajos previos mencionan períodos más cortos para la floración masculina de *Nothofagus*, aunque las comparaciones entre esos estudios y el actual no son posibles

debido a que en aquellos no se explicitan los criterios adoptados para establecer el momento de inicio de dicha floración (Riveros et al. 1995a; Ortiz & Espejo 2004). En los árboles del vivero, el momento de liberación de polen de las flores estaminadas no pareció relacionarse fuertemente con condiciones de temperatura y/o humedad particulares (Fig. V.5). La duración de las fases de maduración de las flores estaminadas fue progresivamente menor desde la fase I a la fase IV. En muchos casos, la fase III (perigonio abierto y estambres alargados) ocurrió en un período más corto que la periodicidad de observación (2-3 días) por lo que no se registró dicha fase en algunas flores. La maduración de las flores estaminadas en uno de los híbridos (Hi1) presentó ciertas diferencias con respecto a los individuos de *N. obliqua* y *N. nervosa*, ya que la fase III no fue evidente. En dicho ejemplar, no se observó la apertura del perigonio y las tecas de los estambres abrieron contenidas dentro del mismo. Esto demuestra ciertas deficiencias en el desarrollo de las flores estaminadas en el ejemplar híbrido mencionado.

La antesis de las inflorescencias pistiladas se inicia alrededor del momento en que ocurre el primer cambio de estado de las flores estaminadas (de fase I a fase II). En cada individuo, el período de tiempo transcurrido entre la antesis de las primeras inflorescencias pistiladas y la de las últimas dependió del patrón de expansión de los nomofilos y del número de inflorescencias pistiladas desarrolladas en el brote. En aquellas áreas de distribución natural en que *N. obliqua* y *N. nervosa* están próximas entre sí, *N. obliqua* suele ocurrir a menor altitud que *N. nervosa*, por lo cual la floración de la primera especie antecede a la de la segunda (Donoso et al. 2006a, b). Los resultados obtenidos sugieren que, bajo condiciones ambientales homogéneas, puede esperarse cierto grado de solapamiento entre los momentos de floración de ambas especies, lo cual facilitaría la hibridación inter-específica, documentada anteriormente para poblaciones naturales (Gallo et al. 1997). De modo que, a priori, el establecimiento de poblaciones mixtas de ambas especies favorecería la hibridación.

La presunción de que la ubicación en los brotes más proximal para las inflorescencias estaminadas que para las pistiladas prevendría la auto-polinización (por ej. Riveros 1995a; Donoso 1975, en Donoso et al. 2006), no



fue confirmada en este estudio. Después de iniciada la brotación, las flores estaminadas requieren de un período de aproximadamente un mes para completar su maduración. En las tres entidades estudiadas, la antesis de la mayor parte o de la totalidad de las flores pistiladas ocurrió antes del momento de liberación de polen. Por otra parte, según los resultados aquí obtenidos, las tres flores pistiladas de una inflorescencia de *N. obliqua* estarían receptivas desde el momento en que la lámina y las estípulas del nomofilo tectriz dejan expuestos a los estigmas. Un estudio previo sobre *Nothofagus* en Chile menciona que “la floración femenina se inició 10 a 15 días más tarde que la masculina” (Riveros et al. 1995a). En el presente estudio, la antesis de las primeras inflorescencias pistiladas (las más proximales) ocurrió entre siete y 11 días después de la iniciación de la fase I de las flores estaminadas. Si consideramos el despliegue de las flores estaminadas (fase I) como el inicio de dicha floración, los resultados obtenidos serían concordantes con los del trabajo antes citado. Sin embargo, esto no implica que la liberación de polen anteceda a la receptividad de los estigmas en un mismo árbol o en un mismo brote florífero. Se sugiere aquí la existencia de un alto grado de solapamiento intra-individual entre los momentos de liberación de polen y receptividad de los estigmas. Los patrones esquematizados en la figura V.7 muestran que la antesis de las inflorescencias pistiladas tiende a anteceder al período de liberación de polen en el mismo brote. Sin embargo, considerando que, al menos en *N. obliqua*, las flores pistiladas podrían mantenerse receptivas hasta 15 días a partir de la antesis, es posible pensar que el período de liberación de polen en un brote anual coincida con el período de receptividad de las flores pistiladas del mismo brote. Incluso, el inicio del período de receptividad de las flores pistiladas ubicadas en posiciones más proximales podría preceder al momento de liberación de polen en el mismo brote. Un estudio en especies de *Nothofagus* de Nueva Zelanda menciona conclusiones similares (Poole 1950), aunque carece de especificaciones metodológicas.

Teniendo en cuenta que los *Nothofagus* son auto-incompatibles (Riveros et al. 1995b), altos niveles de auto-polinización podrían explicar las bajas proporciones de semillas viables observadas a menudo en poblaciones naturales de estas especies (Ledgard & Cath 1983; Premoli 1991; Manson

1994; Martínez-Pastur et al. 1994; Bahamonde et al. 2011). Si bien las probabilidades de auto-fertilización son bajas, la presencia de polen de la misma planta sobre los estigmas puede obstaculizar la deposición y/o germinación del polen compatible, como se observa en otras especies (Lloyd & Webb 1986; Cesaro et al. 2004; Dai & Galloway 2010), afectando negativamente la fertilización de los óvulos. Existe evidencia que sugiere que la producción de semillas viables en *N. nervosa*, es afectada negativamente cuando se deposita polen del mismo árbol sobre los estigmas de las flores pistiladas al menos 24 hs antes que el polen procedente de otros árboles compatibles (ver capítulo VI). Con el mismo intervalo de tiempo entre auto-polinización y polinización cruzada, no se observó un efecto evidente en *N. obliqua*, aunque no puede descartarse que haya efecto en lapsos de tiempo mayores. Por lo tanto, las altas probabilidades de auto-polinización que sugieren los resultados de este trabajo, pueden condicionar la producción de semillas viables en poblaciones naturales de *Nothofagus*.

En especies emparentadas con los *Nothofagus*, como *Alnus* sp. y *Juglans* sp., se ha reportado una clara segregación temporal intra-individual entre las funciones femenina y masculina (Sogo & Tobe 2005; Bai et al. 2006), lo cual se interpreta como un mecanismo que promueve la polinización cruzada (Lloyd & Webb 1986). En el caso de *Juglans* sp., la presencia de individuos protándricos y protoginos (heterodicogamia) permite separar con mayor eficiencia las funciones masculina y femenina a nivel intra-individual, promoviendo el cruzamiento inter-individual (Bai et al. 2006). Tanto en *Nothofagus* como en otras especies que no presentarían tal dimorfismo reproductivo, debe existir un equilibrio entre el grado de separación intra-individual de las funciones masculina y femenina y el grado de solapamiento inter-individual de las mismas que promueva la polinización cruzada.

#### *Efecto de las condiciones ambientales*

Las observaciones realizadas sobre los brotes en hidroponia colocados en el vivero indican que el desarrollo en hidroponia en sí mismo no afecta la velocidad de maduración de las flores estaminadas. Debido a que los tres tratamientos en hidroponia estuvieron sujetos a temperaturas medias mayores

a la registrada en el vivero, resulta congruente que en los primeros se observara mayor velocidad de maduración de las flores estaminadas con respecto a lo observado en los brotes del vivero.

Para brotes desarrollados en hidroponia en interior, se observó mayor velocidad de maduración de las flores estaminadas y de liberación de polen al aumentar la temperatura ambiente, mientras que altos niveles de humedad relativa del ambiente tuvieron el efecto opuesto. En los brotes correspondientes al tratamiento  $+T$ , el inicio de la liberación de polen ocurrió entre 12 y 16 días antes que en las flores en pie. Por su parte, condiciones de humedad relativa por sobre el 90% retrasaron la liberación de polen con respecto a los tratamientos con menor humedad (control y  $+T$ ). En los brotes en la condición control se observaron resultados intermedios entre los tratamientos  $+H$  y  $+T$ , sugiriendo que tanto la humedad como la temperatura tienen efectos significativos y antagónicos sobre la velocidad de maduración de las flores estaminadas. Esto se observó en las tres entidades estudiadas, en concordancia con lo observado en otras especies arbóreas anemófilas (Yates et al. 1993, incluyendo especies de Fagáceas, Rizzi-Longo et al. 2005), y resulta consistente con la idea que el transporte de polen se correlaciona positivamente con la temperatura y negativamente con la humedad ambiente (Yates et al. 1993; William & Adam 1994; Knapp et al. 2001). No obstante, el bajo número de ejemplares utilizados impide realizar comparaciones inter-específicas en cuanto a la magnitud de los efectos observados.

Se podría pensar que las condiciones medias de temperatura probadas en este estudio fueron algo elevadas con respecto a las condiciones de campo. Sin embargo, los datos meteorológicos tomados en el vivero durante el período de floración mostraron temperaturas máximas cercanas a los 25<sup>o</sup>, mientras que la humedad relativa máxima alcanzó el 93%. El experimento realizado permitió comprobar el efecto de condiciones elevadas de temperatura y humedad sobre la velocidad de maduración de las flores estaminadas de *Nothofagus*. Los resultados dan indicios de que el grado de solapamiento entre la liberación de polen y la receptividad de los estigmas a nivel intra-individual podría variar en relación a las condiciones ambientales durante el período de brotación-floración. En base a los resultados obtenidos, es posible hipotetizar que

condiciones cálidas y secas al inicio de la floración promoverían el solapamiento de los períodos de antesis de las flores estaminadas y pistiladas a nivel de brote anual (y probablemente del árbol completo), afectando negativamente la producción de semillas viables.

En varios estudios se ha mencionado la existencia de variaciones interanuales cualitativas y cuantitativas en la producción de semillas en poblaciones naturales de *Nothofagus* (Marchelli & Gallo 1999; Donoso et al. 2006a; Monks & Kelly 2006). Las condiciones ambientales ( $T^{\circ}$  y  $H^{\circ}$ ) durante el crecimiento de los brotes floríferos podrían jugar un rol significativo en la producción de semillas viables, afectando el momento de liberación de polen tal como se observó en este trabajo. La verificación de los resultados aquí obtenidos sería de utilidad para estimar los efectos de las tendencias de cambio climático actuales sobre la reproducción natural de estas especies. Modelos de cambio climático aplicados en Patagonia Sur predicen, para los próximos 70 años, un aumento de  $3^{\circ}\text{C}$  en la temperatura media máxima al igual que un aumento en las precipitaciones (Kreps et al. 2012). La información aquí presentada puede resultar útil como información de base con miras al desarrollo de modelos que describan posibles efectos causados por los cambios climáticos antes mencionados sobre la producción de semillas viables en años y poblaciones determinadas.

### *Conclusiones*

En mi conocimiento, el presente trabajo representa la primera evaluación de la fenología floral de una especie de *Nothofagus* que incluye el análisis experimental del período de receptividad de las flores pistiladas. En *N. obliqua*, la receptividad de los estigmas puede comenzar tan pronto como éstos quedan expuestos por la expansión de la hoja tectriz y podría mantenerse, por lo menos, durante los 15 días subsiguientes. La receptividad sería máxima entre tres y seis días después de la antesis. A partir de la brotación, las flores estaminadas maduran y liberan el polen en un período de aproximadamente un mes. Al momento de liberación de polen, la mayor parte de las flores pistiladas del mismo árbol ya se encuentran expuestas a la llegada de polen y, probablemente, son receptivas. Dicho momento dependería, parcialmente, de

las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente. Se deduce la existencia de una alta probabilidad de solapamiento entre la receptividad de las flores pistiladas y la liberación de polen a nivel intra-individual e intra-brote, lo cual podría relacionarse con la baja proporción de semillas viables a menudo observada en poblaciones naturales de *Nothofagus*. Si consideramos que la mayor receptividad de las flores pistiladas ocurre en los primeros seis días a partir de la antesis, es posible pensar que condiciones de baja temperatura y/o alta humedad relativa en los días posteriores a la brotación, implicarían menor grado de solapamiento intra-individual entre la liberación de polen y la receptividad de las flores pistiladas.

## **Capítulo VI: Cruzamientos controlados en *N. obliqua* y *N. nervosa*: análisis de auto-interferencia y compatibilidad inter-específica**

### **Introducción**

La producción de semillas en las especies vegetales está condicionada por aspectos cuantitativos y cualitativos de la polinización, es decir, por la cantidad de polen recibido, el origen y viabilidad del mismo (Lee 1988; Knight et al. 2005; Aizen & Harder 2007). Los estigmas están expuestos a la llegada de polen de diversos orígenes. El efecto que tiene la deposición de polen sobre la producción de semillas depende, para cada especie, de (A) la compatibilidad entre el estigma receptor y polen recibido, ya sea del mismo individuo (intra-individual), de otro individuo de la misma especie (co-específico) o de un individuo de otra especie emparentada (hetero-específico); y (B) del grado en que la presencia de polen incompatible interfiere con la polinización con polen compatible (Lee 1988; Barrett 2002). Muchas especies dependen exclusivamente de la polinización con otros ejemplares de la misma especie para la producción de semillas viables, en tanto que otras tienen la capacidad de producir semillas a partir de la polinización con polen de la misma planta, y/o a partir de polinización con especies emparentadas (Ellstrand et al. 1996; Barrett 2003). En una alta proporción de las especies vegetales las funciones masculina y femenina se desarrollan en la misma planta, lo que implica algún grado de exposición a la auto-polinización. Muchas de estas especies son auto-incompatibles, por lo que la auto-polinización se traduce en una baja producción de semillas (Clausen 1966; Aizen et al. 1990; Riveros et al. 1995*b*; Yacine & Bouras 1997; Steiner & Gregorius 1999; Allen & Hiscock 2010; McGowen et al. 2010). Por otra parte, la compatibilidad entre especies cercanamente emparentadas es más variable, pudiendo ocurrir incompatibilidad, compatibilidad total o compatibilidad parcial dependiendo del grado de similitud genética entre las especies y del sentido de cruzamiento (Clausen 1966; Johnsson 1973; Pandey 1981; Takada et al. 2005). Las

barreras de incompatibilidad pueden expresarse en forma pre- o post-cigótica (Vanden Broeck et al. 2005). Las barreras pre-cigóticas se expresan antes de la fertilización, a nivel del estigma, del estilo o del ovario (Allen & Hiscock 2010), en tanto que las barreras post-cigóticas se expresan luego de la fertilización, mayormente en las fases de germinación y de crecimiento temprano de las plántulas. Considerando que estas últimas no evitan la pérdida de óvulos, las mismas pueden interpretarse como una expresión de depresión por endogamia temprana.

En especies de *Nothofagus* se ha comprobado un alto grado de auto-incompatibilidad, evidenciado por la escasa producción de semillas viables que se observa luego de la aplicación manual de auto-polinización (Riveros 1995b). No obstante, se desconoce a qué nivel/es se expresa la auto-incompatibilidad, y cuál es el grado de competencia entre el polen propio y el polen externo a nivel de la flor pistilada. A pesar de los mecanismos de auto-incompatibilidad, la auto-polinización puede interferir en la germinación y/o fertilización por parte del polen compatible, afectando negativamente la producción de semillas viables (Shore & Barrett 1984; Cesaro et al. 2004; Dai and Galloway 2010). En el Capítulo V se mencionó que en *N. obliqua* y *N. nervosa* existiría alta probabilidad de auto-polinización, dada la secuencia de maduración de las flores estaminadas y el período de receptividad de las flores pistiladas. Resulta de gran interés evaluar, para estas especies, a qué niveles actúan los sistemas de auto-incompatibilidad, y en qué medida se produce interferencia del polen propio sobre el polen de otros árboles de la misma especie. Esta información permitiría un mayor conocimiento de los costos causados por la auto-polinización en términos de producción de semillas viables.

La hibridación inter-específica es muy común entre las familias del Orden Fagales (Erdogan & Mehlembacher 2000; Petit et al. 2003; Hoban et al. 2009; Abadie et al. 2012). En el género *Nothofagus*, la existencia de híbridos inter-específicos en poblaciones naturales y experimentales se ha documentado en varias ocasiones llegándose, en algunos casos, a las caracterizaciones genética y morfológica de los híbridos (Stewart 1979; Donoso et al. 1990; Gallo et al. 1997; Stecconi et al. 2004; Quiroga et al. 2005; Burns et al. 2010). La hibridación entre *N. obliqua* y *N. nervosa* es una de las más

relevantes desde el punto de vista productivo debido a la importancia económica de ambas especies. Poblaciones mixtas suelen ocurrir en los límites altitudinales superior e inferior de *N. obliqua* y *N. nervosa* respectivamente (Donoso et al. 2004; Gallo et al. 2004; Sabatier et al. 2011). En muchas especies, incluyendo algunas del Orden Fagales, se ha documentado que las hibridaciones inter-específicas ocurren en forma unilateral, es decir, sólo existe compatibilidad en una dirección de cruzamiento (Erdogan & Mehlenbacher 2000; Harrison & Darby 1955; Hancock et al. 2003). Observaciones a campo sugieren que el cruzamiento entre ambas especies ocurre principalmente en el sentido *N. nervosa* x *N. obliqua* (es decir, contribuyendo *N. nervosa* con los óvulos y *N. obliqua* con el polen; Gallo et al. 1997). El sentido de cruzamiento observado entre *N. nervosa* y *N. obliqua* resulta más probable que el recíproco en poblaciones naturales debido a que el período de floración de *N. obliqua* antecede al de *N. nervosa*. No obstante, no existe evidencia experimental respecto del grado de compatibilidad en el sentido de cruzamiento opuesto, *N. obliqua* x *N. nervosa*, lo cual podría analizarse mediante la aplicación de polinizaciones manuales.

Debido a la alta probabilidad de auto-polinización de polinización cruzada inter específica entre *N. obliqua* y *N. nervosa* que se deduce de las observaciones fenológicas realizadas anteriormente (Capítulo V), resulta importante evaluar la producción de semillas viables en relación a la presencia de polen de distintos orígenes. El presente trabajo tiene como objetivo analizar, para *N. obliqua* y *N. nervosa*, (A) el grado de auto-incompatibilidad y auto-interferencia y (B) el grado de compatibilidad inter-específica en ambos sentidos de cruzamiento. Para ello se aplicarán diferentes polinizaciones y se analizará el grado de compatibilidad a dos niveles: (1) en la germinación de los granos de polen en los estigmas y (2) en la producción de semillas viables.

### **Materiales y Métodos**

Durante la primavera de 2010 se seleccionaron 3 árboles de la especie *N. obliqua* y 4 árboles de la especie *N. nervosa*, todos ellos con yemas florales evidentes. Dos de los árboles de la primera especie están ubicados en zonas urbanas, mientras que el restante se encuentra en una población natural cerca



del lago Lácar, en el Parque Nacional Lanín. Los ejemplares de la especie *N. nervosa* se encuentran en una población natural del mismo Parque Nacional, en las cercanías del lago Lolog. El número de ejemplares utilizados estuvo limitado por la disponibilidad de árboles con ramas floríferas accesibles en el año de muestreo. De cada individuo se tomaron segmentos de ramas, abarcando los brotes de los últimos dos a cuatro años de alargamiento. Luego de la brotación, los brotes fueron emasculados y, en el mismo momento, cada rama fue aislada con una bolsa de polietileno sujeta al brote con un alambre liviano y maleable. Entre cuatro y 10 días después de la emasculación, cuando las inflorescencias pistiladas eran visibles, se aplicaron manualmente las siguientes polinizaciones: (I) polinización cruzada, (II) auto-polinización, (III) polinización cruzada seguida de auto-polinización 24 hs más tarde, (IV) auto-polinización seguida de polinización cruzada 24 hs más tarde, (V) polinización cruzada y auto-polinización simultáneas y (VI) polinización inter-específica. El polen se aplicó directamente sobre los estigmas utilizando un pincel fino. Se utilizó polen extraído de brotes cosechados al momento de la emasculación y colocados en hidroponía en un ambiente cálido y seco, lo que permitió la obtención de polen con anterioridad a la maduración de las flores estaminadas en condiciones naturales. Hasta el momento de su utilización, el polen se conservó a 5°C en recipientes herméticos con silica-gel. Luego de la polinización, las flores se mantuvieron aisladas durante 48 hs, al cabo de las cuales se extrajeron las bolsas. Previamente se había observado que, una vez depositado el polen sobre el estigma receptivo, la germinación del mismo ocurría dentro de las 24 hs siguientes (Capítulo V).

Al momento de la extracción de las bolsas, una muestra de las flores polinizadas con cada tratamiento fue fijada en FAA. Posteriormente, las flores fueron ablandadas durante 24 hs en solución de NaOH 1,5 M, luego lavadas con agua destilada y por último colocadas en solución 0,1% m/v de azul de anilina en  $K_2POH_4$  0,1M por 24 hs. Al cabo de este tratamiento, las flores fueron montadas en glicerina siguiendo la técnica de aplastado. Para cada flor se contó el número de granos de polen germinados sobre los estigmas utilizando microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51) equipado con una lámpara HBO 50W y un filtro para excitación en luz UV (BP 330-385 nm, BA

420 nm). Luego de la fructificación de las flores mantenidas en pie, se cosecharon las semillas obtenidas a fin de evaluar su viabilidad. En primera instancia se determinó la presencia de embrión en las semillas mediante flotación en alcohol 96% (las semillas con embrión se hunden inmediatamente al ser colocados en alcohol). Las semillas viables fueron sacadas inmediatamente del alcohol y enjuagadas con agua. Para probar la capacidad germinativa de las semillas con embrión, éstas se lavaron con hipoclorito de sodio al 10% y con agua destilada, luego de lo cual fueron estratificadas a 4°C durante 90 días en algodón embebido con Vitavax® al 2% para evitar el desarrollo de hongos. Una vez finalizada la estratificación, las semillas se colocaron en cámara de cultivo a 22°C. Se consideró a una semilla como germinada cuando se visualizó la radícula emergiendo de la misma. Se contó el número de semillas germinadas derivadas de cada tratamiento.

#### *Análisis de datos*

Se comparó entre los tratamientos de polinización (I-VI) el número de granos de polen germinados en los estigmas. Para dicha comparación se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) incluyendo a cada individuo como bloque. Para cumplir con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas del análisis, los datos fueron transformados a su raíz cuadrada.

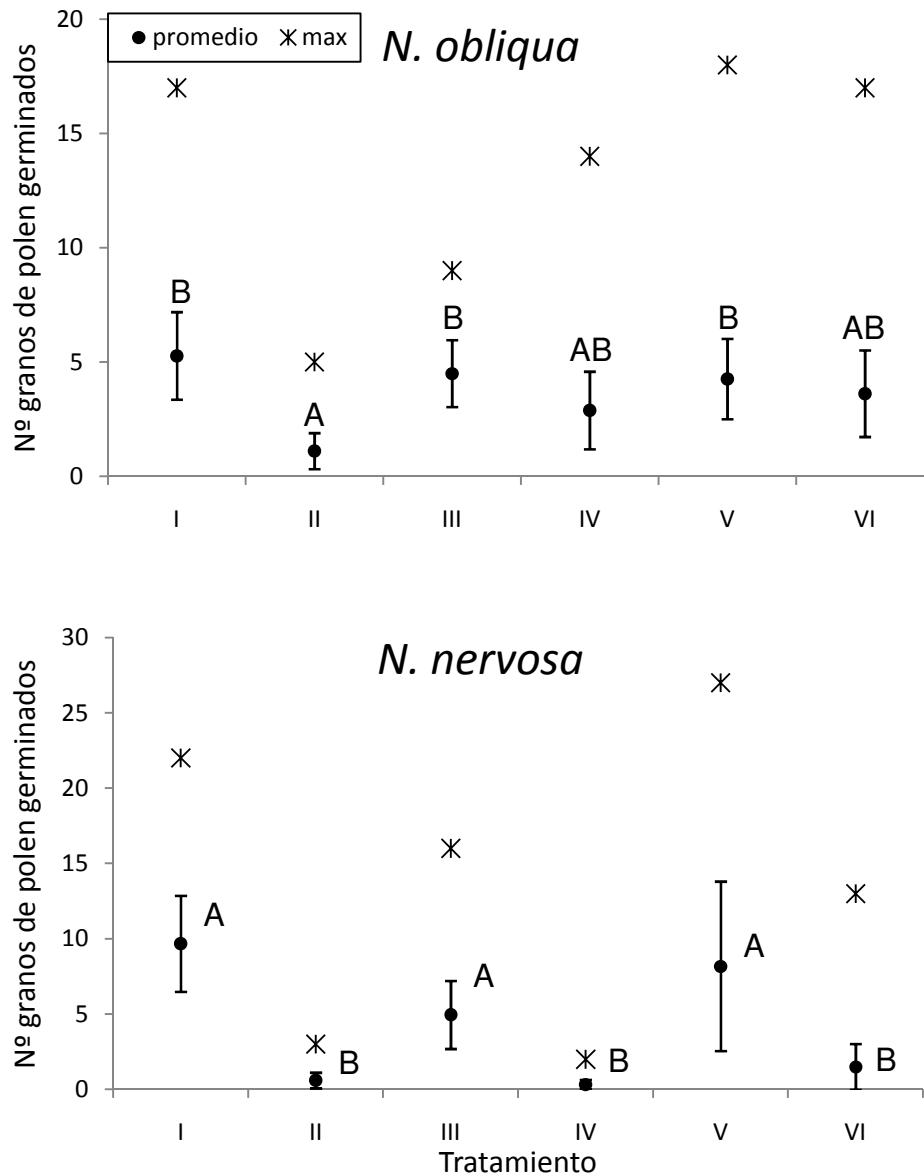
Para cada individuo se compararon las proporciones de semillas viables e inviables derivadas de cada tratamiento de polinización, mediante una prueba  $Ch^2$ . En el caso de *N. nervosa*, uno de los árboles polinizados no fue considerado en este análisis debido a la baja producción de semillas. Se calculó el porcentaje de germinación de las semillas con embrión, aunque en este caso no fue posible aplicar análisis estadísticos debido al bajo número de semillas con embrión en algunos tratamientos.

## **Resultados**

### *Germinación de granos de polen en las flores*

La variación en el número promedio de granos de polen germinados en relación al tipo de polinización aplicada fue significativa en ambas especies,

observándose menor variación en *N. obliqua* ( $F= 4,8$ ;  $p< 0,001$ ;  $n= 122$ ) que en *N. nervosa* ( $F= 23,8$ ;  $p< 0,001$ ;  $n= 130$ ; Fig. VI.1). Las diferencias interindividuales (efecto de bloque) fueron significativas en ambas especies (*N. obliqua*:  $F= 12,1$ ;  $p< 0,001$ ; *N. nervosa*:  $F= 7,0$ ;  $p= 0,002$ ). En ambas especies el número promedio de granos de polen germinados fue mínimo en las flores en las que se aplicó auto-polinización (tratamiento II; Fig. VI.1A, B). Esta tendencia se acentúa al observar los valores máximos encontrados para cada tratamiento. En el caso de *N. obliqua*, el número de granos de polen germinados observados para el tratamiento II (auto-polinización) fue significativamente menor a los de los tratamientos I (polinización cruzada), III (polinización cruzada seguida de auto-polinización) y V (polinización cruzada y auto-polinización simultáneas), mientras que los tratamientos IV (auto-polinización seguida de polinización cruzada) y VI (polinización inter-específica) mostraron valores intermedios (Fig. VI.1A). El valor máximo de granos de polen germinados en los estigmas fue alto y similar para los tratamientos I, IV, V y VI (entre 14 y 18 granos germinados), intermedio para el tratamiento III y mínimo para el tratamiento II (Fig. VI.1A). Con respecto a *N. nervosa*, el promedio de granos germinados fue similar para las polinizaciones I, III y V y mayor a lo observado para las demás polinizaciones (Fig. VI.1B). Si bien no se encontraron diferencias significativas, las flores derivadas de polinización inter-específica (tratamiento VI) presentaron, en promedio, mayor número de granos germinados que aquellas derivadas de las polinizaciones II y IV. Con respecto a los valores máximos, los tratamientos I y V presentaron los mayores valores. Los tratamientos III y VI fueron similares e intermedios en este sentido, mientras que los menores valores se observaron para los tratamientos II y IV.



**Figura VI.1:** Promedio ( $\pm$  EE) y número máximo de granos de polen germinados en estigmas luego de (I) polinización cruzada, (II) auto-polinización, (III) polinización cruzada seguida por auto-polinización 24 hs después, (IV) auto-polinización seguida por polinización cruzada 24 hs después, (V) polinización cruzada y auto-polinización simultáneas y (VI) polinización inter-específica

*Viabilidad de semillas*

En los tres individuos de *N. obliqua* se detectaron diferencias notables en la proporción de semillas con embrión derivadas de cada polinización (Tabla VI.1). Asimismo, para cada tratamiento de polinización se observaron

variaciones entre distintos individuos. En términos generales, en esta especie, las polinizaciones I, III, IV y V presentaron las mayores proporciones de semillas con embrión, con valores que, en su mayoría, superaron el 50% de viabilidad (mínimo 31,2%, máximo 88,6%; Tabla VI.1). Las semillas derivadas de auto-polinización no superaron el 5% de viabilidad en dos de los individuos, mientras que en el restante fue de 13%. Luego de aplicar polinización inter-específica, dos de los árboles presentaron valores notablemente bajos, mientras que en el restante, cerca del 30% de las semillas presentó embrión. Por último, la proporción de semillas con embrión derivadas de flores con polinización abierta varió entre 10 y 20%.

Con respecto a *N. nervosa* también se observó alta variación en la formación de embriones tanto entre tratamientos de polinización como entre individuos (Tabla VI.1). Mediante polinización cruzada intra-específica se obtuvieron altas proporciones de semillas con embrión en dos de los tres árboles utilizados. La viabilidad de las semillas derivadas de auto-polinización fue menor al 5% en dos de los individuos, observándose un valor comparativamente alto en el restante (Tabla VI.1). Entre los tratamientos en los que se aplicaron tanto polinización cruzada como auto-polinización sobre las mismas flores, las menores proporciones de semillas con embrión se obtuvieron cuando la auto-polinización se aplicó en primera instancia (tratamiento IV). Luego de la aplicación de polen de *N. obliqua*, el porcentaje de semillas con embrión no superó el 15%. En comparación a lo observado para *N. obliqua*, se obtuvieron altas cantidades de semillas viables a partir de polinización abierta.

Para *N. obliqua*, las semillas con embrión derivadas de polinización inter-específica germinaron comparativamente menos que las de los demás tratamientos (Tabla VI.2). La capacidad germinativa de las semillas con embrión no mostró variaciones notables entre tratamientos en el caso de *N. nervosa* (Tabla VI.2).

**Tabla VI.1. Porcentaje de viabilidad de semillas obtenidas para cada especie e individuo luego de la aplicación de los distintos tipos de polinización manual y mediante polinización abierta (control). Códigos de los tratamientos igual a la figura 1.**

|            | I           |    | II          |    | III         |    | IV          |    | V           |    | VI          |    | control     |     | $Ch^2$ | $p$    |
|------------|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|-----|--------|--------|
| N. obliqua | %           | n  | %           | n  | %           | n  | %           | n  | %           | n  | %           | n  | %           | n   |        |        |
| 1          | <b>44.4</b> | 54 | <b>3.1</b>  | 32 | <b>83.3</b> | 48 | <b>60.0</b> | 20 | <b>88.6</b> | 44 | <b>0</b>    | 12 | <b>16.0</b> | 438 | 213.0  | <0.001 |
| 2          | <b>52.9</b> | 51 | <b>13.0</b> | 46 | <b>55.3</b> | 38 | <b>31.2</b> | 16 | <b>58.6</b> | 29 | <b>29.5</b> | 78 | <b>19.0</b> | 211 | 51.1   | <0.001 |
| 3          | <b>84.4</b> | 45 | <b>4.9</b>  | 41 | <b>48.1</b> | 79 | <b>66.7</b> | 66 | <b>82.8</b> | 29 | <b>2.4</b>  | 41 | <b>10.3</b> | 561 | 314.1  | <0.001 |
| N. nervosa |             |    |             |    |             |    |             |    |             |    |             |    |             |     |        |        |
| 1          | <b>59.4</b> | 32 | <b>20.0</b> | 15 | <b>44.4</b> | 36 | <b>11.8</b> | 17 | -           | -  | <b>10.7</b> | 28 | <b>35.0</b> | 80  | 21.6   | <0.001 |
| 2          | <b>21.0</b> | 81 | <b>0</b>    | 50 | <b>25.0</b> | 12 | <b>10.5</b> | 19 | <b>51.3</b> | 37 | <b>0</b>    | 21 | <b>32.4</b> | 238 | 46.0   | <0.001 |
| 3          | <b>86.0</b> | 93 | <b>4.8</b>  | 21 | <b>35.8</b> | 53 | <b>22.2</b> | 40 | <b>40.0</b> | 30 | <b>13.3</b> | 30 | <b>56.7</b> | 171 | 98.1   | <0.001 |

**Tabla VI.2: Porcentaje de germinación de las semillas con embrión obtenidas para cada tipo de polinización manual y polinización abierta (control).Códigos de los tratamientos igual que en la figura 1.**

| Tratamiento | % Germinación <i>N. obliqua</i> | % Germinación <i>N. nervosa</i> |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|
| I           | 94,5                            | 94,8                            |
| II          | 88,9                            | 100                             |
| III         | 94,9                            | 88,5                            |
| IV          | 100                             | 84,6                            |
| V           | 100                             | 100                             |
| VI          | 54,2                            | 100                             |
| Control     | 84,9                            | 79,2                            |

### Discusión

En ambas especies estudiadas se confirma el alto grado de auto-incompatibilidad mencionado previamente en *Nothofagus* (Riveros et al. 1995b), y también observado en otras especies emparentadas (Clausen 1966; Yacine & Bouras 1997; Steiner & Gregorius 1999). En este trabajo la auto-incompatibilidad no sólo se evidenció por una baja producción de semillas sino que también la germinación de los granos de polen en las flores pistiladas del mismo individuo fue notablemente baja. Este resultado sugiere que en *Nothofagus* existirían mecanismos de auto-incompatibilidad actuando a nivel de los estigmas. Para las plantas con flores en general, y dependiendo de los mecanismos involucrados, el rechazo del polen incompatible en las flores pistiladas puede observarse en la superficie estigmática, en el pistilo o en el ovario. La incompatibilidad expresada en la superficie estigmática ocurre cuando la inhibición del polen incompatible está dada por el genotipo diploide de los tejidos parentales (incompatibilidad esporofítica; Gibbs 1988; Allen & Hiscock 2010). Entre las familias del orden Fagales, este mecanismo se ha observado previamente sólo para la familia Betulaceae (Thompson 1979), en tanto que para las familias Fagaceae y Nothofagaceae se ha mencionado que los mecanismos de auto-incompatibilidad actúan a nivel del ovario, previo a la fertilización (Yacine & Bouras 1997; Allen & Hiscock 2010). El presente estudio indica que, por lo menos en *N. obliqua* y *N. nervosa*, la baja proporción de semillas viables obtenidas mediante auto-polinización sería consecuencia,

principalmente, de una baja probabilidad de germinación de polen en los estigmas. Es decir que en estas especies las barreras contra la endogamia serían mayormente pre-cigóticas. En principio, podrían operar otros mecanismos de auto-incompatibilidad; dentro de la familia Fagaceae, estudios previos demuestran en una misma especie pueden existir mecanismos de auto-incompatibilidad actuando a distintos niveles, es decir, en forma pre-cigótica (en el estigma y/o el estilo) y en forma post-cigótica (Yacine & Bouras 1997). Las capacidades germinativas de las semillas con embrión derivadas de auto-polinización y de polinización cruzada fueron similares en el presente estudio. Esto sugiere que, no existirían mecanismos post-cigóticos que induzcan el aborto de las semillas derivadas de auto-polinización, aunque el bajo número de semillas derivadas de auto-polinización impide sacar conclusiones categóricas en este sentido. La presencia de barreras post-cigóticas actuando en el establecimiento temprano de las plántulas aún debe ser evaluada.

Los resultados obtenidos para ambos niveles de análisis (germinación del polen en los estigmas y viabilidad de las semillas) sugieren mayor grado de interferencia por auto-polinización en *N. nervosa* que en *N. obliqua*. En la primera especie, las flores auto-polinizadas 24 hs antes de aplicar polinización cruzada manual (tratamiento IV) mostraron un bajo número de granos de polen germinados en los estigmas. Por el contrario, al aplicar polinización cruzada previamente a la auto-polinización y al aplicar ambas polinizaciones simultáneamente (tratamientos III y V respectivamente), no se observaron diferencias en la germinación de polen en los estigmas con respecto a lo observado para la polinización cruzada manual. En el caso de *N. obliqua*, ninguno de los tratamientos de polinización mixta se diferenció de la polinización cruzada manual respecto de la germinación de granos de polen en los estigmas. No obstante, las tendencias observadas en cuanto a los números promedio de granos de polen germinado por tratamiento, fueron similares a las de *N. nervosa* (menor cuando se aplicó auto-polinización primero; Fig. VI.1), lo que sugiere que, de haberse usado una muestra mayor quizás se habría encontrado el mismo resultado. Con respecto a la viabilidad de las semillas, considerando los resultados de los tres individuos, en el caso de *N. obliqua* no se observa una diferencia clara entre los tratamientos de polinización mixta y la



polinización cruzada pura. Por el contrario, en los tres individuos de *N. nervosa* la aplicación de auto-polinización previamente a polinización cruzada se tradujo en una menor proporción de semillas viables con respecto a lo observado para los restantes tratamientos de polinización mixta y a la polinización cruzada pura. Es decir que, al menos en *N. nervosa* sería esperable que la auto-polinización sólo produzca interferencia en caso de ser previa a la polinización cruzada. Esto se ha observado en otras especies (Galen et al. 1989; Scribailo & Barrett 1994; Cesaro et al. 2004), aunque existen pocos registros sobre especies arbóreas (Steiner & Gregorius 1999). Para *Quercus ilex* (Fagaceae) existen reportes que indican que la llegada previa de polen de un árbol a los estigmas del mismo árbol puede producir el aborto de la flor, afectando la producción de semillas (Yacine & Bouras 1997). Cabe mencionar que en ese caso la incompatibilidad de las flores pistiladas con el polen propio se observó con mayor intensidad a nivel del estilo, inhibiendo el crecimiento del tubo polínico, a diferencia con lo observado para las especies aquí estudiadas (a nivel del estigma).

Observaciones fenológicas previas sobre *N. obliqua* y *N. nervosa* sugieren altos grados de solapamiento entre los períodos de liberación de polen y receptividad de flores pistiladas de un mismo brote anual, lo que implica alta probabilidad de auto-polinización (Capítulo V). Considerando los resultados de este estudio, podría esperarse que esto afecte negativamente la producción de semillas viables principalmente en caso de que la auto-polinización preceda la llegada de polen compatible. Si bien esto no se demostró en *N. obliqua*, no puede descartarse que en lapsos mayores que el aquí estudiado entre auto-polinización y polinización cruzada (24 hs) exista algún grado de interferencia, considerando que en ambas especies se observó una marcada auto-incompatibilidad. Por lo tanto, es posible pensar que la baja producción de semillas viables a menudo observada en *N. obliqua* y *N. nervosa*, puede tener relación no sólo con las probabilidades de polinización, como se mencionó en el capítulo anterior, sino también con las probabilidades de auto-polinización. Los datos obtenidos sugieren que flores pistiladas auto-polinizadas con anterioridad a la llegada de polen compatible, pueden perder su capacidad de producción de semillas.

La hibridación natural entre *N. obliqua* y *N. nervosa* ha sido mencionada en numerosos estudios (Stewart 1979; Tuley 1980; Donoso et al. 1990; Gallo et al. 1997). Sin embargo el grado de compatibilidad entre ambas especies es poco conocido. En este sentido, el presente trabajo puso en evidencia cierto grado de variación inter-individual. En el caso de *N. obliqua*, en los tres ejemplares se observó germinación de granos de polen a partir de la polinización con *N. nervosa*. Sin embargo, uno de los individuos presentó mayor número de granos de polen germinados y un porcentaje de semillas con embrión cercano al 30%. Este último dato debe tomarse con cautela, ya que análisis genéticos realizados sobre los ejemplares germinados al momento de escribirse esta tesis arrojan dudas sobre la identidad híbrida de los mismos (El-Mujtar, comunicación personal); considerando que los brotes se mantuvieron aislados por 48 hs después de la polinización, no puede descartarse la polinización con polen de individuos co-específicos cercanos. En los dos individuos restantes de *N. obliqua* tanto la germinación de granos de polen en los estigmas como la producción de semillas con embrión fue baja. Con respecto a *N. nervosa*, la aplicación de polen de *N. obliqua* se tradujo, en los tres individuos estudiados, en una baja germinación de polen en los estigmas. Cabe destacar que, si bien en ambas especies la polinización inter-específica no se diferenció estadísticamente de la auto-polinización respecto al promedio de granos de polen germinados, los números máximos observados fueron notablemente mayores en el primero de esos tratamientos de polinización. Los resultados sugieren que entre *N. obliqua* y *N. nervosa* existiría compatibilidad parcial y variable entre individuos. En los casos en los que se observó incompatibilidad, la misma se notó a nivel de los estigmas, al igual que lo observado en cuanto a la auto-incompatibilidad. En estudios recientes sobre especies del género *Quercus*, se demuestra que las barreras reproductivas al cruzamiento inter-específico son principalmente de tipo pre-cigótico, siendo más débiles las barreras post-cigóticas (Abadie et al. 2012). Los resultados del presente trabajo sugieren algo similar para *Nothofagus*, considerando las diferencias observadas entre la polinización cruzada intra-específica y la inter-específica respecto a la germinación de los tubos polínicos y al porcentaje de viabilidad de las semillas obtenidas. En el caso de *N. obliqua*, cabe mencionar

que la capacidad germinativa de las semillas con embrión derivadas de la polinización con *N. nervosa*, fue menor que en los demás tratamientos.

Entre especies cercanamente emparentadas es común la ocurrencia de hibridación en forma unilateral, actuando sólo una especie como receptora de polen y otra como dadora (Pandey 1981; Erdogan & Mehlembacher 2000; Takada et al. 2005). Esto también se ha registrado en géneros emparentados con los *Nothofagus* como *Betula* y *Quercus*, indicándose que las diferencias en la producción de semillas viables relacionadas con el sentido de cruzamiento varían según los individuos que se utilicen (Clausen 1966; Steinhoff 1993). En poblaciones naturales, los híbridos producidos entre las especies aquí estudiadas ocurren mayormente en la dirección *N. nervosa* x *N. obliqua* (Gallo et al. 1997). Esto ha llevado a pensar que la hibridación entre estas especies resulta más compatible en el sentido de cruzamiento mencionado. La baja cantidad de individuos utilizados en este trabajo y la elevada variabilidad de respuesta inter-individual impiden establecer diferencias concretas de compatibilidad inter-específica relacionadas con la dirección de cruzamiento. No obstante, los resultados aquí obtenidos sugieren algún grado de compatibilidad en sentido *N. obliqua* x *N. nervosa*, sobre todo considerando lo observado respecto de la germinación de granos de polen en los estigmas. Por otra parte, no pueden descartarse barreras post-cigóticas en el cruzamiento *N. obliqua* x *N. nervosa*.

Las limitaciones en el tamaño de la muestra utilizada impiden efectuar generalizaciones a nivel de especie en cuanto a la magnitud de aspectos tales como auto-incompatibilidad, auto-interferencia y compatibilidad inter-específica. Sin embargo, realizar estudios de este tipo utilizando un alto número de ejemplares resulta dificultoso en *Nothofagus* por varios motivos. En primer lugar no siempre es posible contar con muchos ejemplares de ambas especies florecidos en el mismo año y en sitios cercanos. Por otra parte, debido al alto número de polinizaciones efectuadas en cada ejemplar, es necesario que los mismos presenten gran cantidad de flores. Al inicio del trabajo de campo se seleccionaron algunos árboles más que los aquí presentados, los cuales, o bien presentaron escasa cantidad de brotes floríferos o presentaron mayormente flores estaminadas y pocas flores pistiladas (el reconocimiento de

yemas floríferas se realiza mediante la identificación de las flores estaminadas). Por último, considerando el método de polinización utilizado (flor por flor con pincel) y la gran cantidad de flores por árbol que deben ser polinizadas, es difícil utilizar muchos ejemplares por cuestiones logísticas. Trabajos previos en *Nothofagus* han utilizado tamaños de muestra similares al presentado en este estudio (Riveros et al. 1995b). Parte de los resultados aquí presentados confirman los obtenidos en el trabajo citado respecto a la auto-incompatibilidad en *N. obliqua*. Asimismo, dicha información es ampliada, al observar la germinación de los granos de auto-polen en los estigmas, y extendida a *N. nervosa*.

### *Conclusiones*

En el presente trabajo se demuestra que, en *N. obliqua* y *N. nervosa*, el estigma actuaría como una primera línea de prevención de la auto-fecundación. La presencia de polen propio sobre los estigmas con anterioridad a la llegada de polen de otros árboles de la misma especie (polen ajeno) reduce las probabilidades de formación de tubos polínicos a partir de polen ajeno, en especial en *N. nervosa*. Adicionalmente, en dicha especie, la auto-polinización previa a la polinización también deriva en una reducción en la producción de semillas viables. Se confirma cierto grado de inter-fertilidad de estas dos especies, si bien se evidencian altos niveles de variación entre individuos en el grado de compatibilidad inter-específica.

## **Conclusiones, Interrogantes y Perspectivas**

- En los *Nothofagus* estudiados no existen diferencias cualitativas en la producción de flores entre ejes de distintas categorías; excepto el tronco, los demás ejes son capaces de producir ambos tipos de flores. Tanto en las ramas principales como en las ramas secundarias y las cortas brotes con mayor número de nudos producen también más flores. Es decir que las flores están distribuidas en distintas zonas de la copa. Esto podría compensar el hecho que, debido a su pequeño tamaño y a sus estigmas poco destacados, las flores pistiladas tendrían baja eficiencia de captura de polen.
- Las inflorescencias estaminadas y pistiladas de estas especies mayormente conviven en los mismos brotes, aunque también pueden formarse brotes que sólo portan inflorescencias estaminadas, generalmente los de menor tamaño. La relación entre el tamaño de los brotes y su sexualidad es más evidente en *N. nervosa*. El alto costo de la floración (en términos de meristemas dedicados a la producción de flores) no impide que los ejes encargados de la expansión lateral de la copa (las ramas principales) mantengan esta potencialidad a partir de la producción de yemas y ramas.
- La formación de semillas viables depende de la posición de las flores en la copa (en altura y en distancia al tronco). Estos resultados no parecen relacionarse con la distribución de recursos en la planta, sino con las probabilidades de polinización. La posición de las flores pistiladas dentro del brote florífero no incidiría sobre sus probabilidades de producción de semillas viables.

- El patrón de periodicidad en la producción floral de *N. obliqua* y *N. nervosa* difiere entre individuos. No se identificaron aspectos estructurales o de desarrollo que pudieran inducir estas diferencias.
- Las flores pistiladas de *N. obliqua* pueden estar receptivas desde el momento de antesis (determinada por la exposición por despliegue de la hoja tectriz) y hasta por los 15 días posteriores. Un máximo de receptividad ocurriría entre tres y seis días después de la antesis. En ambas especies existiría alta probabilidad de auto-polinización durante el período de receptividad de las flores pistiladas. La velocidad de maduración de las flores estaminadas varía notablemente con las condiciones de temperatura y humedad ambiental, por lo que las probabilidades de auto-polinización y polinización cruzada pueden variar significativamente entre años.
- La auto-incompatibilidad en ambas especies se expresa a nivel de los estigmas, donde se observan bajas probabilidades de germinación de granos de polen del mismo individuo; esto se traduce en una baja proporción de semillas viables. El grado de compatibilidad inter-específica es variable entre individuos.
- La auto-polinización previa a la polinización cruzada interfiere en la germinación de los granos de polen compatible en los estigmas y, en el caso de *N. nervosa*, se traduce en una menor producción de semillas viables con respecto a lo obtenido mediante polinización exclusivamente cruzada. Las elevadas probabilidades de auto-polinización podrían afectar negativamente la viabilidad de las semillas, principalmente en *N. nervosa*.
- La disponibilidad de polen compatible de otros individuos al momento de antesis de las flores pistiladas sería el principal condicionante de la producción de semillas viables en poblaciones naturales de estos *Nothofagus*. Asimismo, la auto-polinización también debe considerarse

en este sentido, ya que puede afectar negativamente la producción de semillas viables.

### Interrogantes y Perspectivas

- ¿Qué factores determinan las diferencias observadas en la proporción de semillas viables derivadas de flores de distinta ubicación en la copa? Estudios tendientes a comparar el flujo polínico en diferentes sectores de la copa serían de utilidad para abordar este interrogante.
- ¿Qué factores condicionan la variación inter-anual de la producción de flores de *Nothofagus* spp.? Para ello sería necesario contar con poblaciones coetáneas de ejemplares adultos en sitios ambientalmente homogéneos que pudieran ser monitoreadas a largo plazo (> 10 años).
- ¿A qué se deben las grandes diferencias inter-individuales observadas respecto del grado de compatibilidad entre *N. obliqua* y *N. nervosa*? ¿Podrían relacionarse con variaciones genéticas? Ampliar estos estudios ayudaría a comprender la dinámica de hibridación entre estas especies.

## **Bibliografía**

- Abadie P, Roussel G, Dencausse B, Bonnet C, Bertocchi E, Louvet J-M, Kremer A & Garnier-Géré P. 2012. Strength, diversity and plasticity of postmating reproductive barriers between two hybridizing oak species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl.). *J Evol Biol* 25: 157-173.
- Ackerman JD. 2000. Abiotic pollen and pollination: ecological, functional and evolutionary perspectives. *Pl Syst Evol* 222: 167-185.
- Aizen M & Kenigsten A. 1990. Floral sex ratios in scrub oak (*Quercus ilicifolia*) vary with microtopography and stem height. *Can J Bot* 68: 1364-1368.
- Aizen M & Harder L. 2007. Expanding the limits of the pollen-limitation concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology* 88: 271-281.
- Allen AM & Hiscock SJ. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. *En: Franklin-Tong VE (Ed). Self-incompatibility in flowering plants*, Springer, Berlin, pp 73-101.
- Arroyo MTK, Armesto JJ & Primack RB. 1985. Community studies in pollination ecology in the High Temperate Andes of central Chile. *Pl Syst Evol* 149: 187-203.
- Azpilicueta MM & Gallo L. 2009. Shaping forces modelling genetic variation patterns in the naturally fragmented forests of a South-American beech. *Biochem Syst Ecol* 37: 290-297.
- Báez P, Riveros M & Lehnebach C. 2002. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. *New Zeal J Bot* 40: 671-678.
- Bahamonde HA, Peri PL, Monelos LH & Martínez Pastur G. 2011. Aspectos ecológicos de la regeneración por semillas en bosques nativos de *Nothofagus antarctica* en Patagonia Sur, Argentina. *Bosque* 32: 20-29.
- Bai W-N, Zeng Y-F, Liao W-J & Zhang D-Y. 2006. Flowering phenology and wind-pollination efficacy of heterodichogamous *Juglans mandshurica* (Juglandaceae). *Ann Bot* 98: 397-402.
- Barrett SCH. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends Plant Sci* 3: 335-341.
- Barrett SCH. 2002. Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88: 154-159.
- Barrett SCH. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Phil Trans R Soc Lond B* 358: 991-1004.



- Barthélémy D. 1988. Architecture et sexualité chez quelques plantes tropicales: le concept de floraison automatique. Tesis Doctoral, Universidad de Montpellier 2.
- Barthélémy D, Puntieri JG, Brion C, Raffaele E, Marino J & Martínez P. 1999. Morfología de las unidades estructurales y modo de desarrollo básico de especies patagónicas de *Nothofagus* (Fagaceae). Bol Soc Arg Bot 34: 29-38.
- Barthélémy D & Caraglio Y. 2007. Plant architecture: a dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny. Ann Bot 99: 375-407.
- Bell A. 1991. Plant Form. An illustrated guide to flowering plant morphology. Oxford University Press, Oxford.
- Bhattacharya K & Datta BK. 1992. Anthesis and pollen release of some plants of West Bengal, India. Grana 31: 67-71.
- Buide ML. 2004. Intra-inflorescence variation in floral traits and reproductive success of the hermaphrodite *Silene acutifolia*. Ann Bot 94: 441-448.
- Buonaccorsi JP, Elkinton J, Koenig W, Duncan RP, Kelly D & Sork V. 2003. Measuring mast seeding behavior: relationships among population variation, individual variation and synchrony. J Theor Biol 224: 107-114.
- Burgos A, Grez AA & Bustamante RO. 2008. Seed production, pre-dispersal seed predation and germination of *Nothofagus glauca* (Nothofagaceae) in a temperate fragmented forest in Chile. For Ecol Manag 255: 1226-1233.
- Burns SL, Cellini JM, Lencinas MV, Martínez Pastur GJ & Rivera SM. 2010. Descripción de posibles híbridos naturales entre *Nothofagus pumilio* y *N. antartica* en Patagonia Sur (Argentina). Bosque 31: 9-16.
- Cabanettes A, Courdier F, Meredieu C & Trichet P. 1995. Facteurs et expresión du polycyclisme juvénile chez le chêne rouge d'Amérique (*Quercus rubra* L.) planté en conditions naturelles. Ann For Sci 52: 489-506.
- Caesar JC & Macdonald AD. 1983. Shoot development in *Betula papyrifera*. II. Comparison of vegetative and reproductive short-shoot growth. Can J Bot 61: 3066-3071.
- Campbell DR & Waser NM. 1989. Variation in pollen flow within and among populations of *Ipomopsis aggregata*. Evolution 43: 1444-1455.
- Cao G, Xue L, Li Y & Pan K. 2011. The relative importance of architecture and resource competition in allocation to pollen and ovule number within inflorescences of *Hosta ventricosa* varies with the resource pools. Ann Bot 107: 1413-1419.

- Caraglio Y & Barthélémy D. 1997. Revue critique des termes relatifs à la croissance et à la ramification des tiges des végétaux vasculaires. *En: Bouchon J, de Reffye P & Barthélémy D (Eds.). Modélisation et simulation de l'architecture des végétaux. INRA Editions, Science Update. Paris, Francia, pp 11-87.*
- Carrillo RL & Cerda LM. 1987. Zoofitófagos en *Nothofagus* chilenos. *Bosque* 8: 99-103.
- Cesaro AC, Barrett SCH, Maurice S, Vaissiere BE & Thompson JD. 2004. An experimental evaluation of self-interference in *Narcissus assoanus*: functional and evolutionary implications. *J Evol Biol* 17: 1367-1376.
- Chanyenga TF, Geldenhuys CJ & Sileshi GW. 2011. Effect of population size, tree diameter and crown position on viable seed output per cone of the tropical conifer *Widdringtonia whytei* in Malawi. *J Trop Ecol* 27: 515-520.
- Clausen KE. 1966. Studies of compatibility in *Betula*. Joint Proc. 2nd Genet. Workshop Soc. Amer. Foresters and Seventh Lake States Tree Improv. Conf., USDA Forest Serv. Res. Pap. NC-6, pp 48-52.
- Collet C, Colin F & Bernier F. 1997. Height growth, shoot elongation and branch development of young *Quercus petraea* grown under different levels of resource availability. *Ann For Sci* 54: 65-81.
- Comps B, Thiébaud B, Barrière G & Letouzey J. 1994. Répartition de la biomasse entre organes végétatifs et reproducteurs chez le hêtre européen (*Fagus sylvatica* L.), selon le secteur de la couronne et l'âge des arbres. *Ann Sci For* 51: 11-26.
- Correa MN. 1984. Flora Patagónica, vol. IV a, Fagaceae. pp 4-11. Colección científica del INTA. Buenos Aires.
- Cox PA & Grubb PJ. 1991. Abiotic Pollination: An evolutionary Escape for Animal-Pollinated Angiosperms: *Phil Trans R Soc Lond B* 333: 217-224.
- Dafni A & Maués MM. 1998. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sex Plant Reprod* 11: 177-180.
- Dai C & Galloway LF. 2011. Do dichogamy and herkogamy reduce sexual interference in a self-incompatible species? *Funct Ecol* 25: 271-278.
- Destremau DX. 1988. La sylviculture des *Nothofagus* en Europe. Monografías de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 4: 115-122.
- Diggle PK. 1995. Architectural effects and the interpretation of patterns of fruit and seed development. *Annu Rev Ecol Syst* 26: 531-552.
- Diggle PK. 2003. Architectural effects on floral form and function: a review. *En: Stuessy T, Hörandl E, & Mayer V (Eds.). Deep morphology: toward a*

- renaissance of morphology in plant systematics. Koeltz, Königstein, Germany, pp 63-80.
- Donoso C. 1987. Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque* 8: 85-97.
- Donoso C. 1993. Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, Estructura y Dinámica. *Ecología Forestal*. Ed. Universitaria, Chile, pp 484.
- Donoso C. 2006. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. *Autoecología*. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia, Chile.
- Donoso C, Morales J & Romero M. 1990. Hibridación natural entre roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.) y raulí (*N. alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst.), en bosques del sur de Chile. *Rev Chilena Hist Nat* 63: 49-60.
- Donoso C, Gallo L, Donoso P & Azpilicueta MM. 2004. Variación en *N. obliqua* (Mirb.) Oerst. (Roble, Coyán, Hualle o Pellín). *En*: Donoso D, Prémoli A, Gallo L & Ipinza R (Eds.). Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosque templados en Chile y Argentina. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, pp 79-113.
- Donoso P, Donoso C, Marchelli P, Gallo L & Escobar B. 2006a. *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil., otros nombres científicos usados: *Nothofagus alpina*, *Nothofagus procera*, Raulí, Familia: Fagaceae. *En*: Donoso C (Ed). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia, Chile, pp 448–461.
- Donoso P, Donoso C, Gallo L, Azpilicueta MM, Baldini A & Escobar B. 2006b. *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. Roble, Pellín, Hualle, Familia: Fagaceae. *En*: Donoso C (Ed). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia, Chile, pp 471–485.
- Dudash MR & Fenster CB. 1997. Multiyear study of pollen limitation and cost of reproduction in the iteroparous *Silene virginica*. *Ecology* 78: 484-493.
- Edlund AF, Swanson R & Preuss D. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell* 16: 84-98.
- Ellstrand NC, Whitkus R & Rieseberg LH. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5090-5093.
- Elzinga JA, Atlan A, Biere A, Gigord L, Weis AE & Bernasconi G. 2007. Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends Ecol Evol* 22: 432-439.
- Erdogan V & Mehlenbacher SA. 2000. Interspecific hybridization in Hazelnut (*Corylus*). *J Amer Soc Hort Sci* 125: 489-497.

- Fenster CB. 1991. Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) I. gene dispersal. *Evolution* 45: 398-409.
- Friedman J & Barrett SCH. 2008. A phylogenetic analysis of the evolution of wind pollination in the Angiosperms. *Int J Plant Sci* 169: 49-58.
- Galen C, Gregory T & Galloway LF. 1989. Costs of self-pollination in a self-incompatible plant, *Polemonium viscosum*. *Am J Bot* 76: 1675-1680.
- Gallo LA. 1993 "Nutzung und Konservierung patagonischer forstlicher enresources". (Uso y conservación de los recursos genéticos forestales patagónicos). GTZ (Sociedad Alemana de Cooperación Técnica), Proyecto N° 9348, pp 9.
- Gallo L. A. 2004. Modelo conceptual sobre la hibridación natural interespecífica entre *Nothofagus nervosa* y *N. obliqua*. Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Donoso C, Prémoli A, Gallo L & Ipinza R (Eds.). Editorial Universitaria, Chile, pp 397-408.
- Gallo LA, Marchelli P & Breitenbücher A. 1997. Morphological and allozymic evidence of natural hybridization between two southern beeches (*Nothofagus* spp.) and its relation to heterozygosity and height growth. *For Genet* 4: 15-23.
- Gallo LA, Marchelli P & Crego P. 2000. Dinámica de hibridación interespecífica entre Raulí y Roble Pellín. *En*: Ipinza R, Gutiérrez B & Emhart V (Eds.). Domesticación y Mejora Genética de Raulí y Roble. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal, Exsion Comunicaciones, Valdivia, Chile, pp 181-196.
- Gallo LA, Donoso C, Marchelli P & Donoso P. 2004. Variación en *N. nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. (*N. alpina*, *N. procera*) (Raulí o Roblí). *En*: Donoso D, Prémoli A, Gallo L & Ipinza R (Eds.). Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosque templados en Chile y Argentina. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, pp 115-139.
- Geber MA. 1990. The cost of meristem limitation in *Polygonum arenastrum*: negative genetic correlations between fecundity and growth. *Evolution* 44: 799-819.
- Gibbs PE. 1988. Self-incompatibility mechanisms in flowering plants: some complications and clarifications. *Lagascalia* 15: 17-28.
- Gleissner P. 1999. Arrangement of reproductive elements in some temperate deciduous tree species. *Syst Geogr Pl* 68: 95-111.
- González MV, Coque M & Herrero M. 1995. Papillar integrity as an indicator of stigmatic receptivity in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *J Exp Bot* 46: 263-269.

- Grattapaglia D & Resende MDV. 2011. Genomic selection in forest tree breeding. *Tree Genetics & Genomics* 7: 241-255.
- Grosfeld J, Barthélémy D & Brion C. 1999. Architectural variations of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch (Araucariaceae) in its natural habitat. *En: Kurmann MH, Hemsley AR (Eds.). The evolution of plant architecture.* Kew: Royal Botanic Gardens, pp 109–122.
- Guédon Y, Puntieri JG, Sabatier S & Barthélémy D. 2006. Relative extents of preformation and neoformation in tree shoots: analysis by a deconvolution method. *Ann Bot* 98: 835-844.
- Gutiérrez B. 2003. Mejoramiento genético y conservación de recursos forestales nativos en Chile. *Invest Agrar: Sist Recur For* 12: 145-153.
- Hallé F & Martin R. 1968. Étude de la croissance rythmique chez *Hevea brasiliensis* Müll.- Arg. (Euphorbiacées – Crotonoïdées). *Adansonia* 8: 475-503.
- Hallé F & Oldeman RAA. 1970. Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux. Paris: Masson.
- Hallé F, Oldeman RAA & Tomlinson PB. 1978. Tropical trees and forest. An architectural analysis. Springer-Verlag, Berlin, pp 441.
- Hancock CN, Kondo K, Beecher B & McClure B. 2003. The S-locus and unilateral incompatibility. *Phil Trans R Soc Lond B* 358: 1133-1140.
- Harrison BJ & Darby LA. 1955. Unilateral hybridization. *Nature* 176: 982.
- Heads M. 1985. Biogeographic analysis of *Nothofagus* (Fagaceae). *Taxon* 34: 474-492.
- Hedhly A, Hormaza JI & Herrero M. 2005. The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in peach (*Prunus persica* L. Batsch.). *Plant Biol* 7: 476-483.
- Herrera CM, Jordano P, Guitián J & Traveset A. 1998. Annual variability in seed production by woody plants and the masting concept: reassessment of principles and relationship to pollination and seed dispersal. *Am Nat* 152: 576-594.
- Herrero M & Hormaza JI. 1996. Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sex Plant Reprod* 9: 343-347.
- Heslop-Harrison Y. 2000. Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. *Ann Bot* 85: 5-13.
- Heuret P, Guédon Y, Guérard N & Barthélémy D. 2003. Analysing branching pattern in plantations of young red oak trees (*Quercus rubra* L., Fagaceae). *Ann Bot* 91: 479-492.

- Hill RS. 1992. *Nothofagus*: evolution from a Southern perspective. Trends Ecol Evol 7: 190-194.
- Hill RS & Jordan GJ. 1993. The evolutionary history of *Nothofagus* (Nothofagaceae). Aust Syst Bot 6: 111-126.
- Hoban SM, McCleary TS, Schlarbaum SE & Romero-Severson J. 2009. Geographically extensive hybridization between the forest trees American butternut and Japanese walnut. Biology Letters 5: 324-327.
- Hoffmann AJ & Alliende V. 1982. Impact of trampling upon the vegetation of Andean areas in Central Chile. Mt Res Dev, 2: 189-194.
- Holden AM & McPherson G. 1982. Male flowers of *Nothofagus discoidea* (Baumann-Bodenheim) van Steenis. New Zeal J Bot 20: 425-427.
- Houle G. 1999. Mast seeding in *Abies balsamea*, *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* in an old growth, cold temperate forest of north-eastern North America. J Ecol 87: 413-422.
- Ipinza R. 2000. Modelo básico de mejora genética. En: Ipinza R, Gutierrez B & Emhart V (eds.). Domesticación y mejora genética de raulí y roble. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, pp 215-235.
- Ipinza R & Espejo J. 2000. Biología reproductiva en *Nothofagus*. En: Ipinza R, Gutiérrez B & Emhart V (Eds.). Domesticación y mejora genética de raulí y roble. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal, Exsion Comunicaciones, Valdivia, Chile, pp 75-93.
- Ishihara M & Kikuzawa K. 2004. Species-specific variation in shoot production patterns of five birch species with respect to vegetative and reproductive shoots. Can J Bot 82: 1393-1401.
- Ishihara MI & Kikuzawa K. 2009. Annual and spatial variation in shoot demography associated with masting in *Betula grossa*: comparison between mature trees and saplings. Ann Bot 104: 1195-1205.
- Janzen DH. 1971. Seed predation by animals. Ann Rev Ecol Syst 2: 465-492.
- Johnsson H. 1973. The hybrid *Betula lutea* sect. *Costatae* x *Betula occidentalis* sect. *Albae*. Silvae Genetica 23: 1-3.
- Jones ML. 2002. Ethylene responsiveness in carnation styles is associated with stigma receptivity. Sex Plant Reprod 15: 107-112.
- Kalinganire A, Harwood CE, Slee MU & Simons AJ. 2000. Floral structure, stigma receptivity and pollen viability in relation to protandry and self-incompatibility in silky oak (*Grevillea robusta* A. Cunn.). Ann Bot 86: 133-148.

- Karlsson PS & Méndez M. 2005. The resource economy of plant reproduction. *En: Reekie EG & Bazzaz FA (Eds.). Reproductive Allocation in Plants. Elsevier Academic Press, California, pp 1-40.*
- Kaul RB & Abbe EC. 1984. Inflorescence architecture and evolution in the Fagaceae. *J Arnold Arboretum* 65: 375-401.
- Kaul RB. 1986. Evolution and reproductive biology of inflorescences in *Lithocarpus*, *Castanopsis*, *Castanea* and *Quercus* (Fagaceae). *Ann Mo Bot Gard* 73: 284-296.
- Kawamura K & Takeda H. 2006. Cost and probability of flowering at the shoot level in relation to variability in shoot size within the crown of *Vaccinium hirtum* (Ericaceae). *New Phytol* 171: 69-80.
- Kelly D. 1994. The evolutionary ecology of mast seeding. *Tree* 9: 465-470.
- Kelly D, Hart DE & Allen RB. 2001. Evaluating the wind pollination benefits of mast seeding. *Ecology* 82: 117-126.
- Klekowski JE & Godfrey PJ. 1989. Ageing and mutation in plants. *Nature* 340: 389-391.
- Kliber A & Eckert CG. 2004. Sequential decline in allocation among flowers within inflorescences: proximate mechanisms and adaptive significance. *Ecology* 85: 1675-1687.
- Knapp EE, Goedde MA & Rice KJ. 2001. Pollen-limited reproduction in blue oak: implications for wind pollination in fragmented populations. *Oecologia* 128: 48-55.
- Knight TM, Steets JA, Vamosi JC, Mazer SJ, Burd M, Campbell DR, Dudash MR, Johnston MO, Mitchell RJ & Ashman TL. 2005. Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36: 467-497.
- Koenig WD, Mumme RL, Carmen WJ & Stanback MT. 1994. Acorn production by oaks in central coastal California: variation within and among years. *Ecology* 75: 99-109.
- Kon H, Noda T, Terazawa K, Koyama H & Yasaka M. 2005. Evolutionary advantages of mast seeding in *Fagus crenata*. *J Ecol* 93: 1148-1155.
- Kozlowski TT. 1971. Growth and development in trees, vol. I: Seed germination, ontogeny, and shoot growth, pp 443. vol. II: Cambial growth, root growth, and reproductive growth, pp 514. Academic Press, New York.
- Kreps G, Martínez Pastur G & Peri PL. 2012. Cambio climático en Patagonia Sur: escenarios futuros en el manejo de los recursos naturales. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, pp 100.

- Lebedeff N. 1942. Informe preliminar sobre los estudios de los bosques en la reserva "Lanín." Boletín Forestal 1938/1940: 7-51.
- Lee TD. 1988. Patterns of fruit and seed production. *En: Lovett Doust J & Lovett Doust L (Eds.). Plant reproductive ecology: patterns and strategies.* Oxford University Press, Oxford, New York, pp 179-202.
- Ledgard NJ & Cath PW. 1983. Seed of New Zealand *Nothofagus* species. New Zeal J For 28: 150-161.
- Lehtilä K & Larsson AS. 2005. Meristem allocation as a means of assessing reproductive allocation. *En: Reekie EG & Bazzaz FA (Eds.). Reproductive allocation in plants.* Elsevier Academic Press, San Diego, pp 50-74.
- Leins PC & Erbar C. 2010. Flower and Fruit. Morphology, ontogeny, phylogeny, function and ecology. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart.
- Linder HP & Crisp MD. 1995. *Nothofagus* and pacific biogeography. Cladistics 11: 5-32.
- Lloyd DG & Webb CJ. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in Angiosperms I. Dichogamy. New Zeal J Bot 24: 135-162.
- Loewe V, Toral M, Freitte G, Camelio MA, Mery A, López C & Urquieta E. 1998a. Monografía de raulí, *Nothofagus alpina*. INFOR-CONAF, Santiago de Chile, pp 90.
- Loewe V, Toral M, Mery A, Camelio MA, López C E & Urquieta E. 1998b. Monografía de roble, *Nothofagus obliqua*. INFOR-CONAF, Santiago de Chile, pp 88.
- Lora J, Herrero M & Hormaza JI. 2007. Germinación de polen de chirimoyo. Implicaciones para la optimización de la polinización manual. Actas de Horticultura 48: 134-136.
- Lora J, Herrero M & Hormaza JI. 2011. Stigmatic receptivity in a dichogamous early-divergent angiosperm species, *Annona cherimola* (Annonaceae): influence of temperature and humidity. Am J Bot 98: 265-274.
- Lovett Doust J & Lovett Doust L. 1988. Sociobiology of plants: an emerging synthesis. *En: Lovett Doust J & Lovett Doust L (Eds.). Plant reproductive ecology: patterns and strategies.* Oxford University Press, Oxford, New York, pp 5-29.
- Lush W, Grieser F & Wolters-Arts M. 1998. Directional guidance of *Nicotiana glauca* pollen tubes in vitro and on the stigma. Plant Physiol 118: 733-741.



- Manos PS. 1997. Systematics of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on rDNA spacer sequences (ITS): taxonomic congruence with morphology and plastid sequences. *Am J Bot* 84: 1137-1155.
- Manson BR. 1974. The life history of silver beech (*Nothofagus menziesii*). *P New Zeal Ecol Soc* 21: 27-31.
- Marchelli P & Gallo L. 1999. Annual and geographic variation in seed traits of Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *For Ecol Manag* 121: 239-250.
- Marchelli P & Gallo L. 2004. Conservación y utilización de la variación genética en poblaciones argentinas de raulí (*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil.). Actas simposio internacional de raulí, IUFRO, Valdivia, 14-16.
- Marchelli P, Smouse PE & Gallo L. 2012. Short-distance pollen dispersal for an outcrossed, wind-pollinated southern beech (*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil.). *Tree Genet Genom* 8: 1123-1134.
- Martínez-Pastur C, Arena ME & Fernández C. 1994. Nota sobre la inferencia del ácido giberélico y del nitrato de potasio en la germinación de semillas de *Nothofagus betuloides* (Mirb.) Oerst. *Invest Agrar, Sist Recur For* 3: 83-89.
- McCarthy BC & Quinn JA. 1989. Within- and among-tree variation in flower and fruit production in two species of *Carya* (Juglandaceae). *Am J Bot* 76: 1015-1023.
- McGowen MH, Vaillancourt RE, Pilbeam DJ & Potts BM. 2010. Sources of variation in self-incompatibility in the Australian forest tree, *Eucalyptus globules*. *Ann Bot* 105: 737-745.
- Millerón M, López de Heredia U, Lorenzo Z, Perea R, Dounavi A, Alonso J, Gil L & Nanos N. 2012. Effect of canopy closure on pollen dispersal in a wind-pollinated species (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Ecol* DOI:10.1007/s11258-012-0125-2
- Monks A & Kelly D. 2006. Testing the resource-matching hypothesis in the mast seeding tree *Nothofagus truncata* (Fagaceae). *Aust Ecol* 31: 366-375.
- Mooney KA, Linhart YB & Snyder MA. 2011. Masting in ponderosa pine: comparisons of pollen and seed over space and time. *Oecologia* 165: 651-661.
- Moreira Muñoz A. 2004. *Nothofagus* Bl., pieza clave en la reconstrucción de la biogeografía del hemisferio austral. *Rev Chagual (Jardín Botánico Santiago)* 2: 48-56.
- Nagamitsu T, Kawahara T & Kanazashi A. 2006. Pollen-limited production of viable seeds in an endemic dwarf birch, *Betula apoiensis*, and incomplete

- reproductive barriers to a sympatric congener, *B. ermanii*. *Biol Conserv* 129: 91-99.
- Navarro L. 1996. Fruit-set and seed weight variation in *Anthyllis vulneraria* subsp. *vulgaris* (Fabaceae). *Pl Syst Evol* 201: 139-148.
- Navarro L. 1997. Is the dichogamy of *Salvia verbenaca* (Lamiaceae) an effective barrier to self-fertilization? *Pl Syst Evol* 207: 111-117.
- Nicolini E. 1997. Approche morphologique du développement du Hêtre (*Fagus sylvatica* L.). PhD thesis, Université Montpellier II, France.
- Nicolini E & Chanson B. 1999. La pousse courte feuillée, un indicateur du degré de différenciation chez le Hêtre (*Fagus sylvatica* L.). *Can J Bot* 77: 1539-1550.
- Niklas KJ. 1985. The aerodynamics of wind pollination. *Bot Rev* 51: 328-386.
- Nilsson SG & Wästljung U. 1987. Seed predation and cross-pollination in mast-seeding beech (*Fagus sylvatica*) patches. *Ecology* 68: 260-265.
- Normand F, Habib R & Chadeuf J. 2002. A stochastic flowering model describing an asynchronously flowering set of trees. *Ann Bot* 90: 405-415.
- Normand F, Bello AKP, Trottier C & Lauri P-E. 2009. Is axis position within tree architecture a determinant of axis morphology, branching, flowering and fruiting? An essay in mango. *Ann Bot* 103: 1325-1336.
- Obeso JR. 2002. The costs of reproduction in plants. *New Phytol* 155: 321-348.
- Oddie RLA & McComb JA. 1998. Stigma receptivity in *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Silvae Genet* 47: 142-146.
- Oforu-Anim J, Offei SK & Yamaki S. 2006. Pistil receptivity, pollen tube growth and gene expression during early fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*). *Int J Agri Biol* 8: 576-579.
- Ormazabal P & Benoit I. 1987. El estado de conservación del género *Nothofagus* en Chile. *Bosque* 8: 109-120.
- Ortiz NO & Espejo J. 2004. Cruzamientos controlados en raulí *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst. *En: Molina BMP, Gutiérrez CB & Ortiz NO (Eds.), Acta del Simposio Internacional IUFRO "Raulí, riqueza de los bosques templados: silvicultura, genética e industria"*. Valdivia, Chile.
- Page TA, Moore GMA, Will JA & Halloran GMB. 2006. Onset and duration of stigma receptivity in *Kunzea pomifera* (Myrtaceae). *Aust J Bot* 54: 559-563.

- Pandey KK. 1981. Evolution of unilateral incompatibility in flowering plants: further evidence in favour of twin specificities controlling intra- and interspecific incompatibility. *New Phytol* 89: 705-728.
- Passo A, Puntieri J & Barthélémy D. 2002. Trunk and main-branch development in *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae): a retrospective analysis of tree growth based on the size and structure of its annual shoots. *Can J Bot* 80: 763–772.
- Pérez-Ramos IM, Ourcival JM, Limusin JM & Rambal S. 2010. Mast seeding under increasing drought: results from a long-term data set and from a rainfall exclusion experiment. *Ecology* 91: 3057-3068.
- Petit RJ, Bodénès C, Ducouso A, Roussel G & Kremer A. 2003. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytol* 161: 151-164.
- Picca PI. 1998. Estudio exomorfológico y anatómico de las inflorescencias de las especies austroamericanas del género *Nothofagus* Bl. (Fagaceae). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina.
- Poole AL. 1950. Studies of the New Zealand *Nothofagus* species: 2. Nut and cupule development. *Trans R Soc New Zeal* 78: 502-508.
- Poole AL. 1952. The development of *Nothofagus* seed (Including a preliminary account of the embryogeny, etc.). *Trans R Soc New Zeal* 80: 207-212.
- Pound LM, Wallwork MAB, Potts BM & Sedgley M. 2002. Early ovule development following self- and cross-pollination in *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus*. *Ann Bot* 59: 613-620.
- Prémoli A. 1991. Morfología y capacidad germinativa en poblaciones de *Nothofagus antarctica* (Forster) Oerst. del noroeste andino patagónico. *Bosque* 12: 53-59.
- Prémoli AC, Raffaele E & Mathiasen P. 2007. Morphological and phenological differences in *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations: evidence from a common garden. *Austral Ecology* 32: 515-523.
- Puntieri JG, Barthélémy D, Martínez P, Raffaele E & Brion C. 1998. Annual-shoot growth and branching patterns in *Nothofagus dombeyi* (Fagaceae). *Can J Bot* 76: 673-685.
- Puntieri JG, Souza MS, Barthélémy D, Brion C, Nuñez M & Mazzini C. 2000. Preformation, neof ormation and shoot structure in *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Blume (Nothofagaceae). *Can J Bot* 78: 1044–1054.
- Puntier JG, Barthélémy D, Mazzini C & Brion C. 2002. Periods of organogenesis in shoot of *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oersted (Nothofagaceae). *Ann Bot* 89: 115-124.

- Puntieri JG, Souza MS, Brion C, Mazzini C. & Barthélémy D. 2003. Axis differentiation in two South American *Nothofagus* species (Nothofagaceae). *Ann. Bot.* 92: 589-599.
- Puntieri JG, Grosfeld JE, Stecconi M, Brion C, Azpilicueta MM & Gallo L. 2006. Desarrollo temprano de roble (*Nothofagus obliqua*): un análisis arquitectural de procedencias de Argentina. *Bosque* 27: 44-51.
- Puntieri JG, Grosfeld JE, Stecconi M, Azpilicueta MM, Gallo L, Brion C & Barthélémy D. 2007. Shoot development and dieback in progenies of *Nothofagus obliqua*. *Ann For Sci* 64: 839–844.
- Puntieri JG, Grosfeld JE & Heuret P. 2009. Preformation and distribution of staminate and pistillate flowers in growth units of *Nothofagus alpina* and *N. obliqua* (Nothofagaceae). *Ann Bot* 103: 411-421.
- Puntieri JG & Ghirardi S. 2010. Growth-unit structure in trees: effects of branch category and position in *Nothofagus nervosa*, *N. obliqua* and their hybrids (Nothofagaceae). *Trees* 24: 657-665.
- Quiroga P, Vidal Russell R & Prémoli A. 2005. Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N. pumilio* en el noroeste patagónico. *Bosque* 26: 25-32.
- Ramírez CG. 1987. The genus *Nothofagus* and his importance in Chile. *Bosque* 8: 71-76.
- Read J, Hill RS, Hope GS & Carpenter RJ. 2010. The contrasting biology of tropical versus temperate *Nothofagus* species and its relevance to interpretations of Cenozoic rainforest history in southeast Australia. *En: Haberle SG, Stevenson J & Prebble M (Eds). Altered ecologies: fire, climate and human influences on terrestrial landscapes. S. ANU E Press. Australian National University, Australia, pp 15-31.*
- Regal PJ. 1982. Pollination by wind and animals: ecology of geographic patterns. *Ann Rev Ecol Syst* 13: 497-524.
- Renton M, Guédon Y, Godin C & Costes E. 2006. Similarities and gradients in growth unit branching patterns during ontogeny in “Fuji” apple trees: a stochastic approach. *J Exp Bot* 57: 3131-3143.
- Riveros M, Palma B, Erazo S, O’Reilly S. 1995a. Fenología y flujo de polen en especies del género *Nothofagus*. *Phyton* 57: 45-54.
- Riveros M, Parades MA, Rosas M, Cardenas E, Armesto J, Arroyo M & Palmas B. 1995b. Reproductive biology in species of the genus *Nothofagus*. *Environ Exp Bot* 35: 519-524.
- Rizzi-Longo L, Pizzulin-Sauli M & Ganis P. 2005. Aerobiology of Fagaceae pollen in Trieste (NE Italy). *Aerobiologia* 21: 217-231.

- Rozefelds AC & Drinnan AN. 1998. Ontogeny and diversity in staminate flowers of *Nothofagus* (Nothofagaceae). *Int J Plant Sci* 159: 906-922.
- Rusch V. 1993. Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. *Rev Chil Hist Nat* 66: 131-141.
- Sabatier S, Barthélémy D, Ducouso I & Germain E. 1998. Modalités d'allongement et morphologie des pousses annuelles chez le noyer commun, *Juglans regia* L. cv. 'Lara' (Juglandaceae). *Can J Bot* 76: 1253-1264.
- Sabatier S & Barthélémy D. 1999. Growth dynamics and morphology of annual shoots according to their architectural position in young *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière (Pinaceae). *Ann Bot* 84: 387-392.
- Sabatier Y, Azpilicueta MM, Marchelli P, González-Peñalba M, Lozano L, García L, Martínez A, Gallo LA, Umaña F, Bran D & Pastorino M. 2011. Distribución natural de *Nothofagus alpina* y *Nothofagus obliqua* (Nothofagaceae) en Argentina, dos especies de primera importancia forestal de los bosques templados norpatagónicos. *Bol Soc Argent Bot* 46: 131-138.
- Sánchez-Humanes B, Sork VL & Espelta JM. 2011. Trade-offs between vegetative growth and acorn production in *Quercus lobata* during a mast year: the relevance of crop size and hierarchical level within the canopy. *Oecologia* 166: 101-110.
- Sanzol J, Rallo P & Herrero M. 2003. Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis*; Rosaceae) flower. *Am J Bot* 90: 78-84.
- Schauber EM, Kelly D, Turchin P, Simon C, Lee W, Allen RB, Payton IJ, Wilson PR, Cowan PE, Brockie RE. 2002. Masting by eighteen New Zealand plant species: the role of temperature as a synchronizing cue. *Ecology* 83: 1214-1225.
- Scribailo RW & Barrett SCH. 1994. Effects of prior self-pollination on outcrossed seed set in tristylous *Pontederia sagittata* (Pontederiaceae). *Sex Plant Reprod* 7: 273-281.
- Shore JS & Barrett SCH. 1984. The effect of pollination intensity and incompatible pollen on seed set in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Can J Bot* 62: 1298-1303.
- Smith CC, Hamrick JL & Kramer CL. 1988. The effects of stand density on frequency of filled seeds and fecundity in lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl.). *Can J For Res* 18: 453-460.
- Smith CC, Hamrick JL & Kramer CL. 1990. The advantage of mast years for wind pollination. *Am Nat* 136: 154-166.

- Sogo A & Tobe H. 2005. Intermittent pollen-tube growth in pistils of alders (*Alnus*). PNAS 102: 8770-8775.
- Sokal RR, FJ Rohlf. 1981. Biometry. 2nd edition. WH Freeman and Company, New York.
- Sork VL, Bramble J & Sexton O. 1993. Ecology of mast-fruited in three species of North American deciduous oaks. Ecology 74: 528-541.
- Sork VL, Davis FW, Smouse PE, Apsit VJ, Dyer RJ, Fernandez-M JF & Kuhn B. 2002. Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone? Mol Ecol 11: 1657-1668.
- Souza M, Puntieri JG, Barthélémy D & Brion C. 2000. Bud content and its relation to shoot size and structure in *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser (Nothofagaceae). Ann Bot 85: 547-555.
- Steconni, M. 2006. Variabilidad arquitectural de algunas especies nativas de *Nothofagus* de la Patagonia (*N. antarctica*, *N. pumilio*, *N. dombeyi*). Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche.
- Steconni M, Puntieri JG & Barthélémy D. 2000. Annual shoot-growth in *Nothofagus antarctica* (G. Forster) Oersted (Nothofagaceae) from northern Patagonia. Trees 14: 289-296.
- Steconni M, Marchelli P, Puntieri JG, Picca P & Gallo LA. 2004. Natural hybridisation between a deciduous (*Nothofagus antarctica*, Nothofagaceae) and an evergreen (*N. dombeyi*) forest tree species as evidenced by morphological and isoenzymatic traits. Ann Bot 94: 775-786.
- Steconni M, Puntieri JG & Barthélémy D. 2010. An architectural approach to the growth forms of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) along an altitudinal gradient. Botany 88: 699-709.
- Steiner W & Gregorius HR. 1999. *In vitro* pollen germination experiments in *Alnus* and their relevance for mating system analysis. For Genet 5: 47-60.
- Steinhoff S. 1993. Results of species hybridization with *Quercus robur* L and *Quercus petraea* (Matt) Liebl. Ann Sci For 50: 137-143.
- Stephenson AG. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. Ann Rev Ecol Syst 12: 253-279.
- Stewart PJ. 1979. Le genre "*Nothofagus*" et son utilisation dans la sylviculture Britannique. Rev For Fr 31: 473-482.
- Stpiczynska M. 2003. Stigma receptivity during the life span of *Platanthera chlorantha*. Acta Biol Cracov Bot 45: 37-41.

- Suzuki A. 2000. Patterns of vegetative growth and reproduction in relation to branch orders: the plant as a spatially structured population. *Trees* 14: 329-333.
- Suzuki A. 2001. Resource allocation to vegetative growth and reproduction at shoot level in *Eurya japonica* (Theaceae): a hierarchical investment? *New Phytol* 152: 307-312.
- Swenson U, Hill RS & McLoughlin S. 2000. Ancestral area analysis of *Nothofagus* (Nothofagaceae) and its congruence with the fossil record. *Aust Syst Bot* 13: 469-478.
- Swenson U, Hill RS & McLoughlin S. 2001. Biogeography of *Nothofagus* supports the sequence of Gondwana break-up. *Taxon* 50: 1025-1041.
- Takada Y, Nakanowatar T, Sato J, Hatakeyama K, Kakizaki T, Ito A, Suzuki G, Shiba H, Takayama S, Isogai A & Watanabe M. 2005. Genetic analysis of novel intra-species unilateral incompatibility in *Brassica rapa* (syn. *campestris*) L. *Sex Plant Reprod* 17: 211-217.
- Takhtajan A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, pp 643.
- Tal O. 2011. Flowering phenological pattern in crowns of four temperate deciduous tree species and its reproductive implications. *Plant Biol* 13: 62-70.
- Tangmitcharoen S & Owens J. 1997. Floral biology, pollination, pistil receptivity, and pollen tube growth of teak (*Tectona grandis* Linn f.). *Ann Bot* 79: 227-241.
- Taugourdeau O, Dauzat J, Griffon S, Sabatier S, Caraglio Y & Barthélémy D. 2012. Retrospective analysis of tree architecture in silver fir (*Abies alba* Mill.): ontogenetic trends and responses to environmental variability. *Ann For Sci* 69:713-721.
- Thiébaud B, Payri C, Vigneron P & Puech S. 1981. Observations sur la croissance et la floraison du Hêtre (*Fagus sylvatica* L.). *Naturalia Monspeliensia. Série Botanique* 48: 1-25.
- Thompson MM. 1979. Genetics of incompatibility in *Corylus avellana* L. *Theor Appl Genet* 54: 113-116.
- Tomlinson PB. 1978. Branching and axis differentiation in tropical trees. *En: Tomlinson PB & Zimmermann MH (Eds.). Tropical trees as living systems.* Cambridge University Press, pp 187-207.
- Tooke F & Battey NH. 2010. Temperate flowering phenology. *J Exp Bot* 61: 2853-2862.

- Tormo Molina R, Rodríguez AM, Palaciso IS & López FG. 1996. Pollen production in anemophilous trees. *Grana* 35: 38-46.
- Torres C, Puntieri J & Stecconi M. 2009. Estudio comparativo del crecimiento y la ramificación de brotes anuales en dos especies de *Nothofagus* (Nothofagaceae) y en híbridos inter-específicos. *Bol Soc Arg Bot* 44: 287-303.
- Tortorelli LA. 2009. Maderas y Bosques Argentinos. 2ª ed. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, pp 302-309.
- Tuley G. 1980. *Nothofagus* in Britain. Forestry Commission. *Forest Record* 122, pp 26.
- Vanden Broeck A, Villar M, Bockstaele EV & Van Slycken J. 2005. Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. *Ann For Sci* 62: 601-613.
- Varela M & Valdivieso T. 1996. Phenological phases of *Quercus suber* L. flowering. *For Genet* 3: 93-102.
- Veblen TT, Hill RS & Read J. 1996. Introduction: themes and concepts in the study of *Nothofagus* forests. *En: Veblen TT, Hill RS & Read J (Eds.). The ecology and biogeography of Nothofagus forests.* Yale University Press, Yale, pp 1-10.
- Vesprini JL & Pacini E. 2005. Temperature-dependent floral longevity in two *Helleborus* species. *Plant Syst Evol* 252: 63-70.
- Waites AR & Ågren J. 2006. Stigma receptivity and effects of prior self-pollination on seed set in tristylous *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Am J Bot* 93: 142-147.
- Waller DM. 1988. Plant morphology and reproduction. *En: Lovett Doust J & Lovett Doust L (Eds.). Plant Reproductive Ecology: Patterns and strategies.* Oxford University Press, New York, pp 207-227.
- Webb CJ & Lloyd DG. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zeal J Bot* 24: 163-178.
- Wiens D, Nickrent DL, Davern CI, Calvin CL & Vivrette NJ. 1989. Developmental failure and loss of reproductive capacity in the rare paleoendemic shrub *Dedeckera eurekaensis*. *Nature* 338: 65-67.
- Williams G & Adam P. 1994. A review of rainforest pollination and plant-pollinator interactions with particular reference to Australian subtropical rainforests. *Aust Zool* 29: 177-212.



- Yacine A & Bouras F. 1997. Self- and cross-pollination effects on pollen tube growth and seed set in holm oak *Quercus ilex* L (Fagaceae). *Ann Sci For* 54: 447-462.
- Yasaka M, Terazawa K, Koyama H & Kon H. 2003. Masting behavior of *Fagus crenata* in northern Japan: spatial synchrony and pre-dispersal seed predation. *For Ecol Manag* 184: 277-284.
- Yates IE & Sparks D. 1993. Environmental regulation of anther dehiscence and pollen germination in pecan. *J Amer Soc Hort Sci* 118: 699-706.
- Yi W, Law SE, McCoy D & Wetzstein HY. 2006. Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*). *Ann Bot* 97: 57-63.
- Yoshimura K. 2011. Hydraulic function contributes to the variation in shoot morphology within the crown in *Quercus crispula*. *Tree Physiol* 31: 774-781.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco a mi director Javier Puntieri por su constante ayuda y predisposición tanto para la proyección de los experimentos, como para el trabajo de campo y procesamiento de los datos. Su aporte desde lo profesional y desde lo humano fue invaluable en la realización de este trabajo y en mi formación como investigador.

Agradezco al CONICET por el apoyo económico para la realización de la tesis.

A la Universidad Nacional del Comahue por el espacio brindado para mi formación profesional tanto durante la carrera de grado como de posgrado. A la comisión de posgrado del CRUB por su trabajo y dedicación.

Al grupo de Genética Forestal del INTA Bariloche por el espacio y el material brindado. Un especial agradecimiento a Leonardo Gallo, por su valiosa discusión sobre la problemática abordada.

A Parques Nacionales por el permiso para realizar trabajos en árboles de campo. Un especial agradecimiento a Beatríz Dábila.

A Mónica Díaz y el laboratorio de Aguas por permitirme usar el microscopio de Epifluorescencia.

A Claudia Quimaliños por permitirme el uso del microscopio de epifluorescencia. A Félix Cruz por el préstamo de datta loggers.

A Nora Baccalá por su asistencia en análisis estadísticos.

Al Grupo de Suelos del CRUB por el espacio brindado en el invernadero.

A Gernot Vobis por toda la ayuda brindada y constante predisposición (cortes de cúpulas y técnicas de tinción).

A Verónica Arana, del INTA Bariloche, por su asistencia en ensayos de germinación de semillas.

A Alejandra Ruffini, un especial agradecimiento por estar siempre dispuesta ante cualquier consulta, pedidos de espacio, material, asistencia.

A Vanina Chalcoff por su predisposición ante consultas y por la ayuda brindada

A quienes accedieron a corregir esta tesis, Dr. Gabriel Berdardello, Dr. Marcelo Aizen y Dr. Diego Medán por el tiempo dedicado y por sus comentarios, lo cuales fueron de gran utilidad para mejorar la presentación del trabajo.

A todos los compañeros del Departamento de Botánica del CRUB. A mis compañeros de oficina Amaru, Javier Grosfeld y Marina por estar siempre presentes, dispuestos a ayudar en lo que haga falta y por compartir el día a día, charlar, reflexionar, aconsejar (en esto incluyo a Alfredo).

A los ayudantes de campo, por su invaluable ayuda: Marina, Eugenia, Silvia.

A Marina, mi compañera de caminos, de decisiones, por recorrer esta vida juntos, tanto en lo afectivo como en lo laboral.

A mis padres, hermana, abuelos y tíos que, por estar siempre, sostenerme, alentarme y darme las herramientas para desenvolverme en lo laboral y en lo personal.

A todos los amigos y colegas que compartieron conmigo este camino, por escuchar, aconsejar, por hacerme pasar buenos momentos. A Eugenia, Gerardo, Santi Q, Sil, Amaru, Alfredo, Karen, Maya, Alfo, Fer, Santi V, los "vecinos" Alex, Agus y Flavia.