

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

**Variabilidad genética en Raulí (*Nothofagus nervosa*  
(Phil.) Dim. et Mil. su relación con procesos evolutivos  
y su importancia en la conservación y utilización de  
sus recursos genéticos.**

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

**Autora: Lic. Paula Marchelli**

**Director: Dr. Leonardo A. Gallo**

**Junio 2001**

*a Sofía y Esteban  
por el amor de todos los días.*

## Agradecimientos

Son muchas las personas a quienes quiero agradecer porque de alguna u otra manera ayudaron a que hoy esté finalizando esta etapa.

Cuando llegué a Bariloche, hace ya siete años, Leo me recibió en su entonces pequeño grupo sin siquiera conocerme, abriéndome las puertas y confiando, quizás más que yo misma, en mi capacidad para realizar este trabajo. Después de todos estos años puedo decir que más que un director fue y es un gran amigo con quien se puede contar en las buenas y en las malas. Quiero agradecerle por haber estado siempre que necesité una mano y por empujarme para seguir cuando dudaba, pero más que nada por todas las charlas, mate mediante, en las que discutimos no sólo de trabajo sino también de la vida.

Al principio éramos pocos, después el grupo fue creciendo. A todos les agradezco mil cosas, pero principalmente el saber que puedo contar con ustedes. A Mario, que está desde el comienzo, y que empezamos esta amistad compartiendo largas horas de laboratorio, separando las semillitas, luchando con las “corridas”, pero también con discusiones valiosas y aportes importantes a mi trabajo. A Fer, no sólo por ayudar en las salidas a campo y con el dichoso mapmaker, sino principalmente por la amistad que hemos logrado. A Lucas... qué haríamos sin Lucas! Por todas las salidas a juntar material, por colaborar con la separación de las semillas, por todas las veces que necesité ayuda en el laboratorio y estuviste, mil gracias!! A Ale que también compartió cosechas y últimamente hace todos los trámites bancarios! A Paulita y María Marta porque sobre todo en este último tiempo se han ocupado de mil cosas bancando mi ausencia.

Una ayuda indispensable para poder realizar este trabajo fue la del Cuerpo de Guardaparques del Parque Nacional Lanín y de las seccionales Pichi Traful y Espejo Chico del Parque Nacional Nahuel Huapi. Todos ellos participaron en forma activa en la cosecha de semillas, colocando las redes muchas veces en lugares de difícil acceso. En especial quiero agradecer a Freddy Retta, que con el entusiasmo que lo caracteriza siempre se interesó en nuestro trabajo y encontró la pequeña población de Roble en Lolog, aunque los paseos en lancha tendríamos que dejarlos para días más lindos! También quiero agradecer al Departamento Forestal de la Delegación Técnica

Regional, APN, especialmente a Luis Chauchard, Marcelo González Peñalba y Leo Maresca, por coordinar todo el trabajo de recolección de semillas desde San Martín.

En el INTA EEA Bariloche encontré un lugar de trabajo, pero también mucha gente que a lo largo de estos años me brindó su cariño y su ayuda. A Tomás que es codirector de mi beca y que siempre accede a los pedidos de referencias, algunos a último momento! A los “chicos forestales” por los favores de todos los días (como prestar yerba!) y compartir penas y alegrías de nuestra situación tan estable! A Priscila por su paciencia ante mil preguntas de estadística. A Marcolín por brindarme todos sus conocimientos en charlas sobre las glaciaciones y muchísimo material bibliográfico. A Rosita por esmerarse siempre en conseguir los papers que le pedía y a Luisa por su disposición para ayudarme en múltiples pedidos. A Luis que siempre respondía a mis dudas existenciales sobre química y me salvaba cuando me faltaba algo en el laboratorio. A Jorge por “scanear” millones de diapositivas y fotos! Al Laboratorio de Teledetección, especialmente a Daniel, que me hizo el mapa de distribución binacional. Al Laboratorio de Suelos (María Luisa, Viqui y Silvana) que muchas veces contribuyeron con el agua destilada o prestando equipamiento. A Sonia por las ayuditas con el Word! A Paco y Patricia que me prestaron sus impresoras para esta entrega.

También quiero agradecer a María Marta, María Elena y Andrea de la cátedra de Genética del CRUB, porque me brindaron un espacio cuando llegué a Bariloche. A Andrea, además, por facilitarme toda su colección de papers.

A Birgit y toda la gente del Institut für Forstgenetik de Grosshansdorf, Alemania, por hacer que mi breve estadía entre ellos fuera tan buena. Por brindarme todo su conocimiento y experiencia, pero también su amistad.

Al CONICET por otorgarme las becas para realizar esta tesis, al DAAD por mi estadía en Alemania y a los proyectos que enumero a continuación por financiar mi trabajo: INTA-APN (“Estudio de la variación genética en Raulí y Roble Pellín”), INTA (“Conservación dinámica de *Nothofagus caducifolios*”), SAGPyA-BIRF Proyecto Forestal de Desarrollo (“Producción de material de propagación mejorado en Pino ponderosa, Pino oregón, Raulí y Roble Pellín”), GTZ-DAAD (“Programa de Conservación y utilización de los recursos genéticos forestales patagónicos”), FONTAGRO (“Caracterización genética de poblaciones de *Nothofagus obliqua* (Mirb. et Oerst.) y *N. alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst. (= *N. nervosa* (Phil.) Dim. et Mil.) mediante marcadores moleculares e isoenzimáticos.”).

A mis amigos que tanto me acompañaron en estos años y que supieron estar y poner el hombro en los malos momentos: Myru, Gustavo, Fer, Leo, María Rosa, Gordi, Lau, Mario, Sil, Guillito, Lauri, Capocha, Viqui, Guille, Ale, Beth, Ricky, Paulita, María Marta. Seguro me olvido de alguno, pero están todos en mi corazón.

Y muy especialmente a mi familia, Sofi y Esteban, por el amor de todos los días, por estar y acompañarme, por las horas que estuve ausente y espero recuperar, por ser mi cable a tierra. Por las horas de sueño que perdiste, Esteban, para programar los caracoles de diferenciación, y todas las otras horas dedicadas a ayudarme a terminar esta tesis! También a mi familia de Mardel, mamá, papá, Mile y Maru, porque allá están las raíces que me sostienen, porque siempre me apoyaron y me dieron fuerzas cuando aflojé.

A todos mil gracias porque no hubiera podido sin ustedes.

Pau

## Índice

### Capítulo I: Introducción

---

1. Características generales de los bosques Andino–patagónicos	1
2. Marco teórico y especie a estudiar	4
2.1. Taxonomía e historia evolutiva del género <i>Nothofagus</i>	4
2.2. <i>Nothofagus nervosa</i>	7
2.2.1. Nombre científico	7
2.2.2. Características generales y distribución	8
2.2.3. Variación genética y conservación	12
2.2.4. Factores que afectarían la distribución de la variación genética en <i>N. nervosa</i>	14
2.2.4.1. Glaciaciones en Sudamérica	14
2.2.4.2. Distribución geográfica e hibridación	16
3. Hipótesis general	18
4. Objetivos	18
5. Criterio general para la selección de poblaciones	19
6. Criterio general para la selección de marcadores genéticos	19

### Capítulo II: Variación geográfica y anual en características seminales

---

1. Introducción	24
1.1. Variación morfométrica y sistema adaptativo	24
1.2. Ciclo de vida y formación de la semilla	27
1.3. Objetivos	29
2. Materiales y Métodos	29
2.1. Poblaciones analizadas	29
2.2. Variables determinadas	32
2.2.1. Producción total de semillas	32
2.2.2. Peso de semillas	32
2.2.3. Proporción de semillas dañadas por insectos	33
2.3. Análisis estadístico	34
3. Resultados	35
3.1. Producción de semillas	35
3.2. Proporción de semillas dañadas por insectos	37
3.3. Peso de las semillas	40
3.4. Asociaciones entre características seminales y con variables geográficas	41
3.5. Comparaciones entre y dentro de las cuencas lacustres	43
4. Discusión	43
4.1. Producción de semillas	43
4.2. Daño en las semillas	45
4.3. Peso de las semillas	49
4.4. Variación entre y dentro de cuencas	50
4.5. Consideraciones finales	50

### Capítulo III: Análisis genético de las variantes isoenzimáticas

1. Introducción	52
1.1 Bases moleculares y bioquímicas de la variación isoenzimática	52
1.2 Ventajas y desventajas de las isoenzimas como marcadores génicos	54
1.3. Principios básicos del análisis genético	57
2. Materiales y Métodos	59
2.1. Material analizado	59
2.2. Extracción de las isoenzimas	59
2.3. Electroforesis	61
2.4. Análisis genético y designación de las isoenzimas	62
3. Resultados y discusión	64
3.1. Descripción de los fenotipos	65
3.2. Marcadores específicos de especie	68
3.3. Análisis genético	70
3.4. Determinación de marcadores específicos de especie	75
4. Conclusiones	79

### Capítulo IV: Diversidad y diferenciación genéticas en poblaciones de Raulí detectada mediante marcadores isoenzimáticos

1. Introducción	82
1.1. Factores que afectan la generación y distribución de la variación genética	82
1.2. Variación geográfica	88
1.3. Sistema de apareamiento y variación temporal	89
1.4. Hipótesis	91
2. Materiales y Métodos	91
2.1. Material de estudio	91
2.2. Medición de la variación genética	93
2.2.1. Estructura genética	93
2.2.2. Medidas de variación intrapoblacional	94
2.2.2.1. Proporción de loci polimórficos	94
2.2.2.2. Caracterización de los perfiles genéticos	94
2.2.2.3. Multiplicidad alélica y número medio de alelos por locus	97
2.2.2.4. Diversidad ( $\nu$ )	97
2.2.2.5. Heterocigosis observada ( $H_o$ )	97
2.2.2.6. Heterocigosis esperada ( $H_e$ )	97
2.2.3. Medidas de variación entre poblaciones	98
2.2.3.1. Distancia genética ( $d_{\theta}$ )	98
2.2.3.2. Diferenciación entre poblaciones ( $D_j$ y $\delta$ )	99
2.2.4. Dendrogramas (análisis de clusters)	100
2.2.5. Correlaciones	101
2.2.6. Programas utilizados	101
2.3. Poblaciones analizadas	101
2.4. Análisis electroforético	102
2.5. Niveles de análisis de la variación genética	103
3. Resultados	105
3.1. Diversidad genética	105
3.2. Diferenciación entre poblaciones	109
3.3. Análisis entre cuencas y variación geográfica	115
3.4. Variación temporal de la estructura genética	115
3.5. Diversidad y diferenciación en tres poblaciones de Chile	118

4. Discusión	121
4.1. Perfiles genéticos, variación alélica y alelos raros	121
4.2. Diversidad	124
4.3. Diferenciación entre poblaciones	125
4.4. Variación en tres poblaciones de Chile	129
4.5. Variación geográfica y flujo génico	130
4.6. Variación temporal	133
4.7. Influencia de la hibridación con Roble Pellín sobre la variación genética	134

## **Capítulo V: Diferenciación genética en poblaciones de Raulí detectada mediante marcadores de ADN de cloroplasto**

1. Introducción	138
2. Fundamentos teóricos de la técnica	139
2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	139
2.1.1. Factores que afectan a la Reacción en Cadena de la Polimerasa	142
2.1.2. Primers	143
2.2. Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP)	143
2.3. PCR – RFLP	144
3. Materiales y Métodos	146
3.1. Poblaciones	146
3.2. Extracción de ADN total	146
3.3. PCR	147
3.4. Digestión	147
3.5. Análisis de la variación	148
4. Resultados	148
4.1. Extracción de ADN	148
4.2. Productos de PCR	149
4.3. Digestión de los productos de PCR	149
4.4. Tipo de herencia del ADN de cloroplasto	150
5. Discusión	152

## **Capítulo VI: Discusión**

1. Niveles de análisis de la variación genética	157
2. Variación genética detectada en <i>Nothofagus nervosa</i>	159
2.1. Variación geográfica	159
2.2. Variación temporal e hibridación	161
2.3. Variación genética total	164
3. Relación entre la variación genética y las glaciaciones del Cuaternario	167
4. Efecto antrópico	172
5. Modelo de migración postglacial	174
6. Consideraciones finales	176
Referencias	178
Apéndice I	198
Apéndice IB	201
Apéndice II	204
Apéndice III	206
Apéndice IV	216
Apéndice V	222



## Índice de Figuras

Figura I.1: Individuo adulto de <i>Nothofagus nervosa</i> .....	9
Figura I.2: Distribución natural de Raulí y Roble Pellín en Chile y Argentina.....	10
Figura I.3 Distribución natural en Argentina de <i>Nothofagus nervosa</i> y <i>N. obliqua</i> ...	17
Figura II.1: Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>Nothofagus nervosa</i> analizadas. ....	30
Figura II.2: Variación en la producción de semillas.....	37
Figura II.3: Variación en el daño ocasionado por insectos.....	39
Figura II.4: Variación en el peso de las semillas. ....	41
Figura III.1: Esquema de las relaciones entre los estados alélicos de un locus génico con dos variantes ( $A_1$ y $A_2$ ), los polipéptidos que se sintetizan y los patrones electroforéticos de las diferentes aloenzimas formadas. ....	54
Figura III.2: Ubicación geográfica de las poblaciones utilizadas para el análisis genético de los marcadores génicos isoenzimáticos. ....	60
Figura III.3: Fenotipos observados en yemas y embriones de <i>Nothofagus nervosa</i> ....	65
Figura III.4: Zimograma observado en el sistema enzimático IDH.....	66
Figura III.5: Zimograma observado en el sistema enzimático MDH. ....	66
Figura III.6: Zimograma observado en el sistema enzimático GOT. ....	67
Figura III.7: Zimograma observado en el sistema enzimático LAP. ....	68
Figura III.8: Zimogramas observados en los sistemas enzimáticos a) ADH y b) PGI.	69
Figura III.9: Esquema de los zimogramas observados en <i>Nothofagus nervosa</i> y <i>N.</i> <i>obliqua</i> para los sistemas enzimáticos <i>Adh</i> y <i>Pgi</i> en yemas y embriones. ....	69
Figura IV. 1: Ubicación geográfica de las poblaciones de Raulí estudiadas. ....	104
Figura IV.2: Variación entre poblaciones en la diversidad génica y en el número medio de alelos.....	108
Figura IV.3: Variación entre poblaciones en la diversidad génica y en el número medio de alelos.....	109
Figura IV.4: Dendrograma para el pool de loci analizados. ....	110
Figura IV.5:“Caracoles de diferenciación”.....	112
Figura V.1: Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	142
Figura V. 2: Esquema del procedimiento de obtención de los Polimorfismos del largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP) .....	145
Figura V. 3: Tipos de polimorfismos detectados con la técnica RFLP .....	145
Figura V.4: Extracción de ADN genómico en Raulí. ....	148
Figura V.5: Fragmentos obtenidos luego de amplificación con los primers <i>trnF-trnV</i> y <i>trnD-trnT</i> .....	150
Figura V.6: Patrones de restricción observados.....	151
Figura V.7: Ubicación geográfica de los dos haplotipos encontrados entre las poblaciones de <i>Nothofagus nervosa</i> de Argentina y Chile. ....	153
Figura VI. 1: Diferenciación entre poblaciones según marcadores aloenzimáticos y moleculares. ....	166
Figura VI.2: Ubicación de los refugios glaciares y posibles rutas migratorias	174

## Índice de Tablas

Tabla II.1: Ubicación geográfica de las poblaciones de Raulí analizadas. ....	31
Tabla II.2: Producción estimada de semillas por m <sup>2</sup> .....	36
Tabla II.3: Proporción de semillas dañadas .....	38
Tabla II.4: Peso de 1000 semillas. ....	40
Tabla II.5: Coeficientes de correlación de Pearson entre las distintas variables. ....	42
Tabla III.1: Sistemas enzimáticos, buffers de electrodo y de gel y condiciones de la electroforesis. ....	61
Tabla III.2: Análisis genético según modo de herencia de un locus único con alelos codominantes .....	63
Tabla III.3: Análisis genético de la enzima IDH. ....	70
Tabla III.4: Análisis genético de la zona enzimática MDH-B. ....	72
Tabla III.5: Análisis genético de la enzima GOT. ....	74
Tabla III.6: Genotipos observados para las isoenzimas LAP-A (a) y LAP-B (b). ....	76
Tabla III.7: Determinación de marcadores especie-específicos. ....	78
Tabla IV.1: Causas sugeridas para los perfiles genéticos isoenzimáticos más frecuentes. ....	95
Tabla IV.2: Años comparados en el análisis de la variación temporal. ....	103
Tabla IV.3: Diversidad genética media en poblaciones argentinas y chilenas. ....	106
Tabla IV.4: Diversidad genética en las poblaciones de Raulí estudiadas. ....	107
Tabla IV.5: Diferenciación entre poblaciones. ....	111
Tabla IV.6: Diferenciación entre poblaciones dentro de las distintas cuencas .....	116
Tabla IV.7: Variación temporal en nueve poblaciones de Raulí. ....	117
Tabla IV.8: Diferenciación génica (D <sub>j</sub> ) entre años para nueve poblaciones. ....	118
Tabla IV.9: Distancias genéticas de Gregorius entre años y entre poblaciones. ....	119
Tabla IV.10: Comparación de las frecuencias alélicas y la heterocigosis observada (H <sub>o</sub> ) de individuos adultos y la descendencia .....	119
Tabla IV.11: Relación entre la diferenciación y el área de distribución estimada en distintas especies arbóreas de los bosques templados de América del Sur. ....	128
<b>Tabla V.1: Tamaño de los productos de amplificación</b>	<b>149</b>
<b>Tabla V.2: Fragmentos polimórficos y haplotipos</b>	<b>152</b>
Tabla VI.1: Relación entre ubicación geográfica y niveles de variación analizados	165

## Resumen

El Raulí, *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil., es una de las especies arbóreas de los bosques Andino-patagónicos de importancia ecológica y económica. Su distribución en Argentina es muy reducida y relativamente fragmentada. Abarca una estrecha franja entre 39° 25' S y 40° 35' S que no supera los 40 km en su ancho máximo, siguiendo los valles de las distintas cuencas lacustres de origen glacial. La sobreexplotación de la que fue objeto en el pasado por la calidad de su madera, agravada por sobrepastoreo e incendios forestales recurrentes llevaron a una situación crítica a muchas de las poblaciones de la especie, lo cual derivó en la necesidad de implementar programas de conservación y mejoramiento genético. El primer paso en dichos programas es conocer la intensidad y patrón de distribución de la variación genética de las poblaciones. Los objetivos principales de esta tesis son conocer dicha variación y relacionarla con procesos evolutivos, principalmente el flujo génico, la hibridación y el efecto de las últimas glaciaciones por la drástica reducción de las masas boscosas.

La distribución natural de la especie restringida a las cuencas lacustres y la unidireccionalidad de los fuertes vientos en sentido oeste-este dentro de cada cuenca sugieren una diferenciación genética en sentido latitudinal con la posibilidad de un flujo génico extensivo que homogeneice la variación genética dentro de las cuencas.

Con el objetivo de estudiar la variación genética dentro y entre poblaciones y con la intención de poner a prueba la hipótesis planteada arriba, se recolectaron semillas durante cuatro años consecutivos en 28 poblaciones de Raulí abarcando todo su rango de distribución natural en Argentina. A modo comparativo, se estudiaron semillas provenientes de tres localidades de Chile.

En primer lugar se analizaron, en todas las poblaciones y años recolectados, características seminales como la producción total de semillas por unidad de superficie, el peso de mil semillas y la proporción de daño por insectos. La variación en estas características tiene una influencia ambiental muy importante por lo que brinda información sobre procesos adaptativos de las poblaciones.

Todas las características seminales analizadas fueron altamente variables tanto a nivel espacial (entre poblaciones) como temporal (entre años), existiendo interacción entre las poblaciones y los años tanto para el peso de las semillas como para el daño ocasionado por insectos. A su vez, se detectaron correlaciones

significativas con variables geográficas como la latitud y la longitud. En particular, el peso de las semillas mostró una variación latitudinal, siendo las semillas de las poblaciones del norte significativamente más pesadas que las del sur.

En una segunda etapa se estudió la variación genética en 20 poblaciones de la especie mediante la utilización de marcadores génicos isoenzimáticos. Si bien en general se asume que las variantes aloenzimáticas son selectivamente neutras, se han descrito numerosas excepciones. Por ende, la variación detectada en estos marcadores podría tener alguna implicancia adaptativa. El primer paso de este estudio consistió en la determinación de los marcadores mediante el análisis genético de las variantes fenotípicas observadas. A tal fin se cosecharon yemas de 55 árboles madre y su descendencia (semillas) de polinización abierta. Se probaron distintos sistemas enzimáticos encontrándose buena resolución y variación en seis de ellos. Se detectaron los árboles madre supuestamente heterocigotas para cada locus putativo y se analizaron al menos 100 semillas de los mismos. Se puso a prueba la hipótesis de segregación 1:1 de las variantes detectadas. Con este método se determinaron ocho loci marcadores.

La superposición de zonas de actividad en los zimogramas de algunos sistemas enzimáticos, la existencia de bandas dobles o triples para genotipos homocigotas y la hibridación natural con Roble Pellín resaltan la importancia del análisis genético previo a la utilización de las variantes fenotípicas como marcadores génicos.

Con los marcadores determinados se analizaron la diversidad y diferenciación genéticas en las 20 poblaciones de Raulí de Argentina y tres de Chile. Por otro lado se analizaron 390 individuos adultos (yemas) de Raulí y Roble Pellín: 100 de cada especie en zona pura y 100 de Roble Pellín y 90 de Raulí de zona de simpatría. Este estudio confirmó la existencia de dos loci enzimáticos que poseen alelos especie-específicos (*Adh* y *Pgi*), permitiendo el seguimiento del proceso de hibridación entre ambas especies. En cada población se estudió un mínimo de 100 semillas.

Se detectaron altos niveles de variación intrapoblacional con un número medio de alelos ( $A_L$ ) de 3,38, diversidad génica ( $\nu$ ) de 1,29, heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) de 15,9 % y 18,1 % respectivamente. La diferenciación de cada población respecto a las restantes ( $D_j$ ) varió entre 2,4 % y 8,1 % siendo el valor medio de diferenciación entre poblaciones ( $\delta$ ) de 4,7 %. Todos estos parámetros fueron

variables entre las poblaciones, incluso entre aquellas cercanas y pertenecientes a una misma cuenca lacustre. Las poblaciones más diferenciadas se encontraron en el sector occidental de la distribución, mientras que las mayores proporciones de semillas híbridas se observaron entre las poblaciones del este, detectándose altos porcentajes de retrocruzas en algunas de ellas. Las poblaciones de Chile mostraron niveles menores de variación.

Se analizó también la variación temporal en el sistema de apareamiento y su influencia en la estructura genética de la generación seminal. A tal fin se comparó la variación genética de las semillas provenientes de dos temporadas de cosecha en nueve poblaciones. En todas las poblaciones se detectaron diferencias significativas entre años tanto cuali (presencia/ausencia de alelos raros) como cuantitativas (frecuencias alélicas).

Por último, se analizó el polimorfismo en secuencias no codificantes del ADN de cloroplasto. En general se desconoce la función de estas regiones de ADN por lo que se considera que las mutaciones se acumulan en forma selectivamente neutra. La elevada conservación del genoma cloroplástico y la herencia clonal permiten que las variantes haplotípicas se mantengan en un linaje a través de las generaciones. La baja tasa de mutaciones de este genoma, la herencia materna y la escasa dispersión de las semillas en Raulí facilitan la diferenciación entre poblaciones y el seguimiento de los caminos migratorios recorridos por las distintas poblaciones de la especie luego de las glaciaciones del Cuaternario.

Mediante las técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RFLP (Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción) se detectaron dos regiones variables en el genoma cloroplástico de Raulí. El polimorfismo permitió la identificación de dos haplotipos distintos con una clara distribución geográfica en sentido norte-sur. La misma distribución se observó en dos poblaciones de Chile cercanas a la Cordillera de los Andes. Una población de la Cordillera de Nahuelbuta, en la zona costera de Chile presentó el mismo haplotipo que las poblaciones situadas al sur.

La variación detectada en los tres niveles analizados es considerablemente alta dada la reducida distribución de la especie en Argentina. La diferenciación genética entre poblaciones en sentido latitudinal observada tanto en el genoma cloroplástico como en el peso de las semillas confirma, en parte, la hipótesis principal de la tesis. Sin embargo, los altos niveles de variación encontrados con los marcadores

isoenzimáticos entre poblaciones pertenecientes a una misma cuenca lacustre, agregan el componente longitudinal en el patrón de distribución de la variación genética. A su vez, el proceso de hibridación introduce otro factor de variación por la posible introgresión del pool génico de *N. obliqua* en *N. nervosa*.

La identificación de dos haplotipos cloroplásticos sugiere la expansión de las poblaciones a partir de al menos dos refugios glaciarios. Se proponen los posibles centros de dispersión luego de las glaciaciones así como un modelo de migración a partir de los mismos.

Se discute la importancia de los resultados obtenidos como apoyo a los programas de conservación y utilización de los recursos genéticos de *Nothofagus nervosa*, así como los distintos procesos evolutivos que ejercen mayor influencia en la variación genética de la especie.

## Abstract

*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. is an ecologically and economically important species of the southern South American temperate forests. In Argentina it has a very reduced and fragmented natural distribution area. It covers a narrow fringe of 40 km in its maximum wide between 39° 25' S and 40° 35' S, following the valleys of the numerous lake watersheds. Overexploitation, overgrazing and recurrent forest fires had seriously affected this species in the past, and led to the implementation of conservation and breeding programs. Knowledge of the amount and distribution of the genetic variation is the first step in such programs. The main objective of this thesis is to contribute with the study of the amount and distribution patterns of the genetic variation in *N. nervosa* and to relate this variation with evolutive processes like gene flow, hybridisation and the effect of last glaciations by drastic reduction of the forests.

The particular distribution of the species restricted to the valleys of the west-east lake watersheds, and the strong unidirectional winds within them, suggest the possibility of a latitudinal genetic differentiation among populations with an extensive gene flow that homogenise the genetic variation within watersheds.

Seeds from 28 populations distributed along the entire natural distribution area in Argentina were collected during four consecutive years. For comparison purposes, seeds from three populations from Chile were also harvested.

Seed traits as total seed production, 1000-seed weight and damage by insects were analysed in all populations and years. Variation in these traits has a strong environmental influence; therefore adaptive processes could be inferred.

All the analysed seed traits were highly variable both among populations (spatial variation) and among years (temporal variation). A strong populations x years interaction exists both for seed weight and seed damage by insects. Besides, significant correlation's with geographic variables such as latitude and longitude were observed. Seed weight showed a latitudinal variation being the northern most seeds the most heaviest.

Genetic variation was analysed through both isozyme and molecular gene markers. Allozyme variants are usually assumed as selectively neutral, although exceptions were described. In that case, variation in these genetic traits could have an adaptive significance. Before using the phenotypic variants as gene markers, genetic

analyses was performed in order to be sure of the complete genetic control of the observed variation. For this purpose, buds of 55 individual trees and their offspring from open pollination were collected. Different enzyme systems were assayed founding good resolution and polymorphism in six of them. After a first screening of maternal tissue, 100 seeds from each of those probable heterozygous trees for each putative locus were analysed. Mendelian segregation of the detected variants was tested and eight marker loci were determined.

Overlapping between different activity zones in zymograms of one enzyme system (MDH), existence of double or tripled banded phenotypes for homozygous genotypes and natural hybridisation with *N. obliqua* highlight the importance of the genetic analyses of the observed phenotypic variants and the correct determination of the gene markers.

Genetic variation within and among 20 populations of *N. nervosa* from Argentina and three from Chile was studied using the eight marker loci previously determined. A minimum of 100 seeds were analysed in each population. In addition, bud tissue from 390 adult trees of both *Nothofagus nervosa* and *N. obliqua* was assayed: 100 of each species from pure populations, 100 of *N. obliqua* and 90 of *N. nervosa* from the sympatric distribution area. These analyses revealed the existence of species-specific alleles in two enzyme loci (*Adh* and *Pgi*), allowing the study of the hybridisation process between these two species.

High levels of intrapopulation variation were detected with a mean number of alleles per locus ( $A_L$ ) of 3,38; genic diversity ( $\nu$ ) of 1,29; observed and expected heterozygosity ( $H_o$  and  $H_e$  respectively) of 15,9 % and 18,1%. Genetic differentiation of each population from the remaining ( $D_j$ ) varied between 2,4 % and 8,1 %, being the mean genetic differentiation among populations value ( $\delta$ ), 4,7 %. All these parameters were highly variable both among populations and within watersheds. The most variable populations were those situated to the west, while the higher proportion of hybrid seeds were found among the eastern most populations. Moreover, backcrosses between the  $F_1$  generation and the parental species were detected. Comparison with the three Chilean populations revealed higher levels of diversity and differentiation among the Argentinean populations.

Temporal variation in the matting system and its influence in the genetic structure of the seeds was also analysed. Comparison between seeds from two



harvested years in nine populations showed significant differences in the presence/absence of rare alleles as well as in the frequency of the common ones.

Finally, non coding regions of chloroplast DNA were screened searching for polymorphism. The variation in these regions is assumed to be selectively neutral and its function is unknown. However, the high conservation of the chloroplast genome and its clonal inheritance, allows that haplotype lineage's persist over generations. The slow mutation rate, the maternal inheritance and the scarce seed dispersal in *N. nervosa* facilitate the genetic differentiation among populations. This differentiation can be used to trace post-glacial migratory routes of the species.

Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) were used to look for polymorphism in 16 non coding regions. Two of these regions revealed variation and allowed the identification of two different haplotypes. Moreover these haplotypes had a clear geographic distribution separating populations to the north from those to the south. Same results were obtained in two Chilean populations located near the Andes. The population from Cordillera de Nahuelbuta, in the northern coastal distribution of the species in Chile showed the south haplotype.

The variation revealed by the three levels analysed in this thesis (seed traits, isozymes and cpDNA) could be considered as high regarding the very reduced distribution area of the species. The genetic differentiation among populations detected by cpDNA as well as the latitudinal variation in seed weight partially supports the main hypothesis of this work. However, the high differentiation levels observed among populations from the same watershed suggest an even more complex distribution pattern of the genetic variation, with longitudinal and latitudinal components. Moreover, the hybridisation process introduces another source of variation with the possible introgression of the gene pool of *Nothofagus obliqua* into *N. nervosa*.

The identification of two haplotypes suggest the persistence of the species in at least two different refugia during the last glaciations. The location of such refugia is proposed as well as a model of post-glacial migration.

Results are discussed in connection with conservation and breeding programs, and the main evolutive processes affecting the distribution of the genetic variation are stated.

# Capítulo I

## Introducción

### 1. Características generales de los bosques Andino–patagónicos

Los bosques Andino-patagónicos se extienden entre los 35° y 55° de latitud sur, a ambos lados de la Cordillera de los Andes, principalmente hacia el sector occidental. Por las bajas temperaturas invernales que toleran sus especies y la latitud en que se encuentran, se clasifican dentro de los bosques templados del mundo. El origen de estos bosques data del Cretaceo tardío (Dettmann et al., 1990) cuando las masas terrestres del Hemisferio Sur estaban interconectadas formando el continente de Gondwana, uniendo Sudamérica con Australia a través de la Antártida. El intercambio florístico entre estos continentes perduró hasta que Sudamérica comenzó a desplazarse hacia el norte, durante el Terciario, quedando totalmente interrumpido en el Oligoceno (Markgraf et al., 1996). También existieron conexiones con las regiones tropicales del NE de Argentina, SE de Brasil y Andes tropicales antes de desarrollarse la aridez al este de los Andes y el desierto de Atacama durante el Oligoceno-Mioceno (Arroyo et al., 1995). Sin embargo, en la actualidad se encuentran aislados de otro tipo de formaciones boscosas limitando al este con la estepa Patagónica, al sur con el océano Atlántico, al oeste con el océano Pacífico y al norte con el bosque esclerófilo y el desierto de Atacama, constituyendo una *isla biogeográfica* (Armesto et al., 1995).

Toda la zona de distribución de los bosques Andino-patagónicos fue afectada durante las últimas glaciaciones, ya sea por el avance de los hielos como por los procesos periglaciarios y los cambios climáticos que acompañaron estos fenómenos. Por otro lado, el clima y la topografía a lo largo de la cual se desarrollan estos bosques determinan una gran variedad de formaciones boscosas, tipos de suelos y regímenes de perturbación (Armesto et al., 1995; Veblen et al., 1996), los cuales influyen en gran medida en los patrones de distribución de las especies y su grado de variación.

La región comprendida entre los paralelos 35° y 43° de latitud sur se caracteriza geográficamente por dos cordilleras, la Cordillera de la Costa y la Cordillera de los Andes, separadas por un valle longitudinal, la Depresión Central de Chile. Al sur sólo continúa la Cordillera de los Andes disminuyendo gradualmente la elevación de sus cumbres. Estas cordilleras determinan en gran medida el clima de la

región, ejerciendo una barrera para las lluvias hacia el este. El efecto es mayor en la Cordillera de los Andes donde, en las latitudes intermedias, las precipitaciones disminuyen de 3000 mm a 800 mm hacia la estepa Patagónica en una distancia de sólo 50 km (Veblen et al., 1995). A su vez, se registra un aumento en las precipitaciones de norte a sur, pasando de 1500 mm anuales a los 39° S a 4500 mm a los 47° S (di Castri & Hajek, 1976, cit. en Arroyo et al., 1995). En el extremo suroccidental las precipitaciones vuelven a disminuir ya que a los 55° S las mismas alcanzan los 1300 – 1400 mm anuales (Arroyo et al., 1995). Estos patrones marcados en las precipitaciones y el descenso gradual de las temperaturas de norte a sur determinan la existencia de distintos tipos de bosques. Al norte, entre los 35° y 37° 20' S, se encuentran los bosques deciduos templado-cálidos de *Nothofagus*, principalmente en la zona costera de Chile, conocidos como bosques Maulinos. Estos bosques se caracterizan por la dominancia de especies caducifolias, con preponderancia de *N. glauca* y constituyen la transición entre los bosques esclerófilos del norte y los bosques templados lluviosos del sur (San Martín & Donoso, 1995). Al sur del bosque Maulino se desarrolla la selva Valdiviana entre los 37° 45' y 43° 20' S, principalmente en la vertiente occidental de los Andes. El bosque lluvioso Nordpatagónico se extiende hacia el sur hasta los 47° 30', y desde esta latitud hasta los 55° S, predomina el bosque lluvioso Magallánico (Veblen et al., 1983, cit. en Veblen et al., 1995). Estos bosques se encuentran principalmente en Chile, introduciéndose en Argentina en los sectores más húmedos. La selva Valdiviana contiene la mayor riqueza de especies arbóreas, tanto deciduas como siempreverdes, entre las que se encuentran, por ejemplo, *N. obliqua*, *N. nervosa*, *Laurelia sempervirens*, *Fitzroya cupressoides*, *Saxegothaea conspicua*, entre otras. La riqueza específica decae gradualmente hacia el sur hasta los bosques lluviosos Magallánicos. Las especies siempreverdes *N. betuloides*, *N. dombeyi* y *N. nítida* dominan los bosques lluviosos Patagónicos, asociadas con pocas angiospermas y coníferas. El bosque Magallánico se caracteriza por la presencia de *N. betuloides*, *Pilgerodendrum uviferum* y *Drymis winteri*. Las especies deciduas *N. antarctica* y *N. pumilio* se encuentran en los tres tipos de bosques (Veblen et al., 1995). Por otro lado, el gradiente precipitacional hacia el este determina un cambio en la vegetación desde bosques lluviosos templados a bosques templado-fríos de *Nothofagus*, para dar paso luego a bosques abiertos y matorrales en la zona de ecotono hacia la estepa Patagónica. Estos bosques templado-fríos de *Nothofagus* y bosques abiertos se

extienden entre los 37° 30' S y los 55° S e incluyen bosques andinos subalpinos y bosques secos al este de los Andes, caracterizados por *N. dombeyi*, *N. antarctica*, *N. pumilio*, y las coníferas *Austrocedrus chilensis* y *Araucaria araucana* (Veblen et al., 1995). La superficie estimada de bosque nativo en Argentina es de 2.185.598 has (Lara et al., 1999), con una riqueza específica menor a la encontrada en Chile, principalmente debido al marcado gradiente precipitacional.

Disturbios de distintos orígenes y a distintas escalas influyen en la dinámica de regeneración de los bosques Andino-patagónicos. Aquellos de origen geológico constituyen uno de los principales factores en la dinámica de estos bosques dada la gran actividad volcánica y tectónica de la zona. Estas perturbaciones generan sitios desnudos que facilitan el establecimiento de especies intolerantes a la sombra como algunas especies de *Nothofagus* y el alerce. Otros factores de importancia son los disturbios asociados con procesos glaciarios. En tal sentido, se ha observado el establecimiento de especies de *Nothofagus* sobre depósitos de origen glaciario y desarrollo de bosques sobre morrenas en tránsito. Los fuertes vientos de la Patagonia y las avalanchas de nieve provocan también disturbios a escalas locales, especialmente en bosques de *Nothofagus*, debido a sus sistemas radiculares superficiales. Por último, los incendios naturales por tormentas eléctricas aumentan en importancia de sur a norte y de oeste a este. Si bien su frecuencia es baja, parecen haber jugado un rol selectivo importante en la evolución de las especies dado que muchas muestran características que responderían a adaptaciones al fuego. La frecuencia de incendios aumentó con el asentamiento de culturas aborígenes, pero se convirtió en la perturbación más importante con la llegada del hombre blanco, cuando grandes áreas fueron quemadas para el establecimiento de sistemas agroganaderos (una revisión detallada se puede ver en Veblen et al., 1995; Veblen et al., 1996).

La composición florística de los bosques Andino-patagónicos se caracteriza por un predominio de angiospermas las cuales son acompañadas por gimnospermas longevas como *Araucaria araucana*, *Fitzroya cupressoides* y *Austrocedrus chilensis*. La gran riqueza de especies y la ocurrencia de numerosos endemismos diferencian a estos bosques de aquellos climáticamente comparables del Hemisferio Norte, señalando un origen gondwuánico de la flora (Arroyo et al., 1995). Entre las angiospermas, el género *Nothofagus* con diez especies (incluyendo al híbrido *N. leoni*) constituye el componente principal de los bosques de esta región. Tanto los factores climáticos como los geográficos determinan en gran medida la distribución

actual de las especies y su grado de variación genética. La diversidad de hábitats que ocupan estas especies a lo largo de sus distribuciones resultan en un alto grado de variabilidad natural reflejando tanto plasticidad fenotípica como diferencias genéticas (Donoso, 1987). Existen trabajos que revelan esta variación en especies de *Nothofagus* tanto detectada en características morfológicas (ej. Burschel et al., 1976; Donoso, 1979; Ramírez et al., 1985; Premoli, 1991, 1996a; Rusch, 1993; Marchelli & Gallo, 1995, 1999; Breitembücher & Gallo, 1995; Breitembücher, 1998) como con marcadores isoenzimáticos (Godoy, 1994; Premoli, 1996b, 1997, 1998; Carrasco & Eaton, 1997; Marchelli & Gallo, 2000a, 2000b, 2000d, Marchelli & Gallo, 2001) y moleculares (Marchelli et al., 1998; Marchelli & Gallo, 2000b). Otro factor que introduce variación es la formación de híbridos naturales entre varias de las especies de este género (Donoso & Atienza, 1983, 1984; Donoso et al., 1990; Gallo, 1995; Premoli, 1996b; Gallo et al., 1997a, 1997b; Crego, 1999; Gallo et al., 2000a, 2000c, Gallo, 2000; Marchelli & Gallo, 2000a), proceso generalizado entre algunas de las especies.

Los bosques Andino–patagónicos han sido intensamente explotados en el pasado, principalmente en Chile. Extensas áreas fueron taladas y quemadas luego de la colonización europea, generando una dramática reducción en la distribución de muchas especies. El reemplazo de las especies nativas ya sea para la implementación de sistemas agroganaderos como por la plantación de especies exóticas llevó a un estado crítico a gran parte de estos bosques (Donoso & Lara, 1995). En Argentina, la creación de Parques Nacionales en el año 1937 fue el primer paso tendiente a proteger parte de los recursos nativos. Sin embargo, para implementar programas de conservación y uso sustentable es de fundamental importancia conocer la dinámica de los bosques, los procesos evolutivos que regulan su existencia así como la variación genética de sus especies. El objetivo principal de esta tesis es estudiar la variación genética entre y dentro de poblaciones de *Nothofagus nervosa* de su área natural de distribución en Argentina para contribuir con los programas de conservación y utilización de sus recursos genéticos que ya se han puesto en marcha.

## **2. Marco teórico y especie a estudiar**

### **2.1. Taxonomía e historia evolutiva del género *Nothofagus***

La distribución trans - Antártica del género *Nothofagus* y sus endemismos han llevado a que sea considerado como una pieza clave en estudios de biogeografía del Hemisferio Sur. La escasa dispersión de los frutos que representa una barrera en la migración y el registro fósil extenso, especialmente de polen, son otras de las características del género que han suscitado el interés de muchos investigadores (Hill & Dettmann, 1996).

*Nothofagus* fue tradicionalmente incluido dentro de la familia Fagaceae en la subfamilia Fagoideae muy cercano al género *Fagus*. Sin embargo, recientemente esta clasificación fue criticada y numerosas evidencias sugieren la inclusión del género en una familia monogénica: Nothofagaceae, incluida en el orden Fagales, dentro de la subclase de las “grandes” Hamamelididae (en Manos et al., 1993). Tanto estudios de características morfológicas (Romero, 1986; Nixon, 1989, cit. en Manos et al., 1993) como análisis filogenéticos de secuencias de ADN de cloroplasto (Manos et al., 1993; Manos & Steele, 1997) apoyan la separación de *Nothofagus* de la familia Fagaceae, ya que este género se separa como grupo basal dentro de las “grandes” Hamamelididae. Si bien algunos autores sugieren una relación más cercana con la familia Betulaceae (e.g. Nixon, 1989, cit. en Manos et al., 1993), otros aportan evidencias de mayor similitud con *Fagus* (e.g. Hill & Jordan, 1993). El argumento principal para separar a *Nothofagus* de la familia Fagaceae recae en el origen de la cúpula que es diferente en *Nothofagus* con respecto a los otros géneros dentro de la familia (Nixon, 1989, cit. en Hill & Dettmann, 1996).

La clasificación infragenérica original, basada en el hábito deciduo o siempreverde de las especies, también ha sido criticada (Hill & Read, 1991). Estos autores señalan que el hábito deciduo es primitivo en *Nothofagus* y que, por otro lado, el hábito siempreverde ha surgido más de una vez, por lo que no tienen significancia taxonómica. A su vez, proponen una clasificación basada en la morfología de la cúpula y el patrón cuticular de las hojas, la cual genera cuatro subgéneros que coinciden con los cuatro tipos de polen descritos entre las especies actuales (Dettmann et al., 1990) (Tabla 1, Apéndice I). Esta clasificación fue evaluada mediante análisis cladísticos (Hill & Jordan, 1993) y confirmada mediante el estudio de secuencias de ADN de cloroplasto (Martin & Dowd, 1993; Setoguchi et al., 1997), la combinación de datos morfológicos y moleculares (Linder & Crisp, 1995) y el análisis de secuencias ribosomales (ITS) (Manos, 1997). Si bien estos estudios filogenéticos concuerdan en el agrupamiento de las especies en cuatro subgéneros

(*Lophozonia*, *Fuscospora*, *Nothofagus* y *Brassospora*), no coinciden en la relación entre éstos y entre las especies. La filogenia presentada por Manos (1997) es quizás la más confiable dado que combina todos los datos morfológicos y moleculares disponibles de los distintos estudios (Fig. 1, Apéndice I). En esta filogenia, *Nothofagus nervosa* (= *N. alpina*, ver más adelante) se ubica en el subgénero *Lophozonia*, estrechamente relacionada con *N. glauca* y *N. obliqua*. Este subgénero, al igual que *Fuscospora*, posee una distribución trans-Antarctica ya que las otras tres especies se encuentran en Nueva Zelanda, Tasmania y Australia (Fig. 1, Apéndice I).

El centro de origen y de diversificación del género *Nothofagus* es todavía un tema en discusión. La evidencia fósil ha demostrado que el sur de Gondwana fue un centro de diversificación de varios géneros, incluyendo *Nothofagus*. El registro palinológico incluye ocho tipos de polen, cuatro de los cuales se encuentran en las especies actuales. Los datos más antiguos corresponden al Cretáceo tardío (Campánico temprano) hace aproximadamente 70 millones de años, en el oeste de la Península Antártica y Sudamérica. Esto sugiere que los ancestros de las especies actuales de *Nothofagus* evolucionaron y se dispersaron en el Hemisferio Sur (Dettmann et al., 1990), descartando las hipótesis que suponían un origen en el Hemisferio Norte. La escasa dispersión de las semillas de este género ha llevado a diversas especulaciones para evaluar la naturaleza vicariante de su distribución, existiendo dos hipótesis contrapuestas: “dispersiones a largas distancias” y “extinción y especiación simpátrica”.

Entre los autores que apoyan la dispersión por migraciones a largas distancias, existen dos hipótesis con respecto al área ancestral: una plantea a Sudamérica y la península Antártica como posible centro de dispersión (Hill & Dettmann, 1996) y la otra a Australasia (Hill, 1992). La primera incluye un área dentro de la región conocida como “Provincia Zoogeográfica de Weddellia”, reconocida como centro de dispersión de muchas especies y, por otro lado, concuerda con el abundante registro polínico en la zona (Dettmann et al., 1990). En el caso de la segunda hipótesis se infiere el intercambio biótico entre el Sudeste Asiático y Australia durante el Cretáceo tardío y el Paleoceno, donde una serie de fragmentos continentales puede haber favorecido algún tipo de paso entre ambos continentes a partir del Cretáceo temprano (Metcalf, 1990, cit. en Hill, 1992). Por otro lado, esta segunda hipótesis supone la existencia de un complejo de Fagales durante el Cretáceo en esta región que produce un polen distinto de *Nothofagus*, el cual habría dado origen a Betulaceae y Fagaceae

en su migración hacia el norte, y a Nothofagaceae hacia el sur (Hill, 1992). Recientemente, estudios cladísticos sugieren a Sudamérica como el área ancestral a partir de la cual se diversificó la familia *Nothofagaceae* (Swenson et al., 2000).

Estudios basados en análisis filogenéticos con datos morfológicos y moleculares, apoyan la hipótesis de extinciones y especiación simpátrica (Linder & Crisp, 1995; Manos, 1997). Según los datos palinológicos, la distribución ancestral del género fue continua para los cuatro subgéneros actuales desde Sudamérica hasta Australia (Dettmann et al., 1990). La distribución trans-Antártica actual de dos de los subgéneros (*Fuscospora* y *Lophozonia*) apoya la hipótesis vicariante (Manos, 1997). Más aún, el registro fósil provee numerosas evidencias que indican la presencia y posterior extinción de los otros dos subgéneros de las regiones donde no se encuentran hoy en día (revisión en Manos, 1997). Linder & Crisp (1995), quienes incluyeron otros géneros además de *Nothofagus* en su análisis, señalan que es más parsimonioso invocar una existencia ancestral y subsecuente extinción que eventos de dispersión múltiples y a largas distancias, especialmente en *Nothofagus*, donde el movimiento de las semillas es tan escaso. Sin embargo, los subgéneros con distribución trans-Antártica sugieren que Australia está más estrechamente relacionada con Nueva Zelandia que con Sudamérica, lo cual no concuerda con las teorías geológicas de separación de Gondwana ni con los datos obtenidos a partir de especies de insectos (Linder & Crisp, 1995; Manos, 1997).

## **2.2. *Nothofagus nervosa***

### **2.2.1. Nombre científico**

El Raulí puede considerarse como uno de los componentes más importantes de las especies Sudamericanas del género *Nothofagus* tanto por la necesidad de su conservación como por el uso del que es y fue objeto. El área de distribución natural muy reducida en Argentina sumada a la sobre-explotación en el pasado llevó a una situación crítica a muchas de sus poblaciones. Por otro lado, la calidad de su madera lo convierte en un recurso de alto valor económico. Su nombre científico merece una breve mención, dado que existen controversias con el mismo.

Tres denominaciones distintas aparecen en la literatura en referencia a esta especie: *Nothofagus procera* (Poepp. et Endl) Oerst (ya prácticamente en desuso), *N. nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. y *N. alpina* (Poepp. et Endl) Krasser. Según Lennon et al. (1987), quienes realizaron una revisión sobre el nombre científico del Raulí, la



confusión surgió después de la invalidación del nombre *N. procera*. Dimitri & Milano (1950) describieron a *N. nervosa* (Phil.) como sinónimo de *N. procera* (Poepp. et Endl) Oerst y propusieron luego ese nombre para la especie. Sin embargo, el nombre no se adoptó y surgió posteriormente el trabajo de Muñoz (1964) quién refiere a un nombre más antiguo (*Fagus alpina* Poepp. et Endl.) como legítimo. Dado que Poeppig & Endlicher (1938) describieron tanto a *F. procera* como a *F. alpina* en la misma publicación, Van Stennis (1953) sugirió la posibilidad de que *N. alpina* sea un híbrido. Lennon et al. (1987) llegan a la conclusión de que dicha especie es en realidad *Nothofagus x alpina* (Poepp. et Endl) Oerst, un híbrido entre Raulí y Roble Pellín. Por lo tanto, según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (1978), el nombre correcto para el Raulí es *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. En esta tesis se utilizará este último nombre como denominación de la especie en estudio.

### 2.2.2. Características generales y distribución

*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. es un árbol de gran porte que alcanza alturas de entre 25 y 30 m, llegando en ocasiones a 40 m (Fig. I.1) (Donoso, 1993), cuyo tronco puede sobrepasar los 2 m de diámetro. Su hábito es deciduo, tornándose las hojas en color rojizo durante el otoño. Las hojas ovadooblongas de 4 a 12 cm de largo tienen borde crenado serrulado y nervaduras notables (Dimitri & Milano, 1950). Es una especie monoica, protándrica, siendo la polinización y la dispersión de las semillas anemófila. Las flores masculinas son pedunculadas, solitarias o en racimos de 2 ó 3, con estambres numerosos. Las flores femeninas son axilares, en número de tres, envueltas por un involucre pubescente cortamente pedunculado; estilo bifido en la flor central y trifido en las laterales (Dimitri & Milano, 1950). La polinización tiene lugar entre los meses de octubre y noviembre, y la semillazón entre febrero y abril. El fruto, en forma de cúpula cuatrivalvada, contiene tres semillas (frutos aquenios), dos trialadas laterales y una bialada central. La dispersión de las semillas es pobre, alcanzando entre 50 y 100 m (Donoso, 1993). La madera, de color rojizo y muy buena calidad, tiene un alto valor comercial.

La distribución del Raulí en Argentina y Chile abarca desde los 35° hasta los 40° 35' de latitud Sur (Fig. I.2). En Chile, donde la distribución es más extensa, se encuentra tanto en la Cordillera de los Andes como en la Cordillera de la Costa entre los 35° y 40° 30' S. (Donoso, 1993). En Argentina sólo cubre una estrecha franja de

aproximadamente 120 km de largo y 40 km en su ancho máximo, ocupando un área estimada en 55.000 has de bosques mixtos (Informe de la Administración de Parques



Figura I.1: Individuo adulto de *Nothofagus nervosa*.

Nacionales) entre los 39° 25' y los 40° 35' de latitud Sur. Si bien el límite sur en Argentina se había establecido en 40° 21' (Dimitri, 1959), en el marco del Proyecto “Estudio de la variación genética en Raulí y Roble Pellín” (INTA-APN, 1995) y guiándose a través de un informe interno de la Dirección General de Parques Nacionales (1961) se detectaron poblaciones más hacia el sur de esa distribución descrita originalmente, en cercanías de los lagos Espejo y Villarino, Parque Nacional Nahuel Huapi (Marchelli & Gallo, 1995; Gallo et al., 2000b).

En el sentido altitudinal, el Raulí ocupa principalmente la franja entre los 800 y 1000 m snm, aunque puede bajar hasta 650 m snm, por ejemplo en la cuenca del lago Lácar, donde ingresa en el área predominante de *N. obliqua*.

A lo largo de la Cordillera de los Andes, la especie se desarrolla sobre suelos de origen volcánico, mientras que en la Cordillera de la Costa, en Chile, lo hace sobre suelos graníticos (en Donoso, 1993). El área de distribución natural en Argentina comprende precipitaciones medias anuales que varían entre 1200 mm hacia el este y más de 3000 mm hacia el oeste.



Existen distintos niveles de simpatría entre *Nothofagus nervosa* y otras especies de los bosques Andino-patagónicos. Debido al proceso de hibridación con *N. obliqua* (Donoso et al., 1990; Gallo, 1995; Gallo et al., 1997a, 1997b; Gallo et al., 2000; Marchelli & Gallo, 2000a; Gallo, 2000) es interesante destacar la zona de simpatría entre ambas especies. A escala regional, dada la posibilidad de flujo génico a través de los pasos bajos en la Cordillera de los Andes en algunas cuencas lacustres, la zona de simpatría se podría extender a toda el área de distribución de ambas especies. Esto mismo es extensible a otras especies. A nivel local, el Raulí forma, en Argentina, bosques mixtos con *N. obliqua* en dos de las cuencas lacustres: Lácar y Quillén y, en menor medida, en la cuenca Lolog. Dentro de las mismas, el grado de simpatría está determinado por la altitud. A bajas altitudes (600 – 800 m snm), en la zona de distribución del Roble, se pueden encontrar individuos más o menos aislados de Raulí, aumentando la proporción entre ambas especies en la zona de contacto (800 m snm) en donde la relación es 1:1. En relación con otras especies, se lo encuentra asociado a mayores altitudes con *N. dombeyi* y, en el límite altitudinal de su distribución, con *N. pumilio* (1000 m snm). Asimismo, en la zona del lago Tromen, en la base del volcán Lanín, forma bosques mixtos con *Araucaria araucana*. El sotobosque está compuesto principalmente por *Chusquea culeou* (caña colihue), que forma densas matas en algunos sectores.

Los bosques de Raulí son en general sobremaduros con estructuras principalmente de tipo fustal-oquedal, con edades individuales entre 100-150 años, pudiendo alcanzar, algunos individuos, 300 años (Gallo et al., 2000b). Entre los ecosistemas de bosques templados, estos bosques constituyen uno de los más productivos en cuanto a biomasa comercial, con crecimientos que alcanzan en algunos sitios los 12 m<sup>3</sup>/ha x año (Chauchard et al., 1997). Como ya ha sido mencionado antes, el fuego representa uno de los factores más importantes en la dinámica de estos bosques. En tal sentido, grandes incendios recurrentes de baja frecuencia generan pulsos de regeneración post - incendio a escala de paisaje (Gallo et al., 2000b). Si bien el Raulí requiere espacios relativamente abiertos para la regeneración natural, no tolera exposición total, por lo que la regeneración se da en sitios protegidos.

El Raulí posee una madera de gran calidad, lo cual llevó a una sobre-explotación en el pasado, principalmente en sitios como las costas de aquellos lagos que poseían algún camino de acceso. Dicha explotación fue de tipo selectiva (elección de los mejores individuos) y provocó una reducción drástica en el número de

individuos de algunas poblaciones. Toda el área de distribución del Raulí en Argentina se encuentra actualmente bajo jurisdicción de los parques nacionales Lanín y, en menor medida, Nahuel Huapi. Al crearse el Parque Nacional Lanín, en el año 1937, se realizó un informe sobre el estado de los bosques describiéndose que habían sido intensamente explotados y padecido de grandes áreas quemadas (Ing. Lebedeff, Informe Preliminar sobre los estudios realizados en los bosques de la Reserva Lanín). Las actividades de extracción de madera continuaron, al menos en la Cuenca del Lago Lolog, hasta la década del 70, bajo control relativo de la Administración de Parques Nacionales (González Peñalba et al., 1997). En la actualidad, y desde esa fecha, la especie es aprovechada solamente en parte de la Zona de Reserva del Parque Nacional Lanín (cuenca del Lago Lácar) por empresas madereras, con planes de manejo y ordenación realizados y controlados por la Administración de Parques Nacionales. Dichos planes contemplan la regeneración natural de la especie manteniendo una cobertura sugerida como silvícolamente adecuada para la misma (Chauchard, 1989) e incluyen, en algunos casos, estudios de impacto ambiental y corrección de torrentes.

### **2.2.3. Variación genética y conservación**

El mantenimiento de altos niveles de diversidad genética provee a las poblaciones naturales la potencialidad de adaptarse a situaciones cambiantes del ambiente en el que habitan. Esto es particularmente importante en especies arbóreas, dada su condición de longevas. Numerosos estudios de variación isoenzimática han demostrado que, en comparación con otros taxa, los árboles mantienen niveles de diversidad muy altos (ver Hamrick et al., 1992 para una comparación detallada).

Determinar el grado de diversidad genética que existe en una especie y explicar esta diversidad en términos de su origen, organización y mantenimiento es de fundamental importancia en la aplicación de principios genéticos en conservación (Yeh, 2000). El conocimiento del grado de variación genética y su distribución dentro y entre poblaciones permite establecer pautas para la conservación de poblaciones de una especie así como también para su manejo y aprovechamiento. Se ha enfatizado la importancia de mantener la adaptabilidad genética de las poblaciones de una especie y plantear estrategias de conservación que combinen tanto conservación *in situ* como *ex situ* (Finkeldey & Gregorius, 1994; Hattemer, 1995). En tal sentido, la conservación estática (*ex situ*) es inferior a la dinámica (*in situ*), dado que esta última incluye la conservación del ecosistema como un todo y favorece la adaptabilidad de las especies

ante cambios ambientales. La conservación *ex situ* incluye también la creación de poblaciones artificiales, como por ejemplo, los ensayos de procedencias.

Si bien toda el área de distribución de *Nothofagus nervosa* en Argentina se encuentra dentro de dos Parques Nacionales, la especie fue objeto de una explotación desmesurada y selectiva en el pasado que probablemente derivó en una pérdida de diversidad genética en aquellas poblaciones más afectadas. Por otro lado, y como ya fuera expuesto más arriba, el Raulí está siendo aprovechado actualmente, bajo supervisión de la Administración de Parques Nacionales. Sin embargo, no se han realizado estudios concernientes a analizar el grado de diversidad genética que posee la especie y cómo se distribuye esta variación entre las poblaciones de la misma. Tampoco se habían realizado estudios de cuantificación de la producción de semillas y variación anual en dicha producción, ni de la variación en el peso de las semillas, características estrechamente relacionadas con la viabilidad y regeneración potencial de una especie. Dichos estudios fueron realizados como parte de esta tesis (Marchelli & Gallo, 1999; Capítulo II). Actualmente se reconoce que en planes de conservación, tanto la información ecológica y demográfica como la variación genética son de fundamental importancia (Schemske et al., 1994).

El conocimiento de la variación genética en *Nothofagus nervosa* es, por lo tanto, el primer paso para orientar el programa de conservación y mejoramiento que se puso en marcha para ésta y otras especies forestales nativas de los bosques Nordpatagónicos (Gallo, 1993). En el mencionado programa se establece que este conocimiento no sólo permitirá ubicar las poblaciones de mayor diversidad genética e inferir los procesos evolutivos que le dieron origen, sino que aportará al conocimiento y elección de las mejores procedencias para el cultivo de la especie fuera de su rango de distribución natural. Cultivar estas especies representaría disminuir el impacto extractivo sobre el bosque nativo. Asimismo, establecer áreas de transferencia de semillas apoyará los planes de asistencia a la regeneración natural, reforestando con plantas de origen conocido, evitando de este modo la contaminación genética dentro de los parques nacionales.

Por otro lado, conocer la variación genética de esta especie contribuirá al conocimiento de los procesos evolutivos recientes y a reconstruir su historia postglacial.

## 2.2.4. Factores que afectarían la distribución de la variación genética en *N. nervosa*

### 2.2.4.1. Glaciaciones en Sudamérica

La región que ocupan los bosques Andino-patagónicos en la actualidad fue afectada por los cambios paleoecológicos que ocurrieron durante el Cuaternario, los cuales determinaron los patrones actuales de distribución de las especies e influyeron en su evolución (Vuilleumier, 1971; Markgraf et al., 1996). Existen controversias entre los distintos autores, utilizándose diversos nombres para denominar cada glaciación. La primer glaciación en la Patagonia ocurrió hace aproximadamente 3,5 millones de años (MA), durante el Plioceno, aunque la más extensa fue hace 1,2 – 0,7 MA, en el Pleistoceno Temprano (Mercer, 1976). Esta glaciación fue denominada de diversas maneras según los autores que la estudiaron: “Initioglacial” (Caldenius, 1932), “Pichileufu” (Flint & Fidalgo, 1964, 1969)<sup>1</sup>, “Río Llico” y “Caracol” (Porter, 1981). La Última Gran Glaciación ocurrida luego de sucesivos períodos glaciarios e interglaciarios desde aquella primer glaciación, fue denominada “Finiglacial” (Caldenius, 1932), “Nahuel Huapi” (Flint & Fidalgo, 1964, 1969), Llanquihue I, II y III (Porter, 1981) y sus depósitos se pueden correlacionar, en forma muy generalizada, con la época glaciaria “Wisconsin-Würm-Weichsel” del Hemisferio Norte (Fidalgo & Rabassa, 1984). Los períodos glaciarios e interglaciarios descritos en Argentina se correlacionan con los de Chile, donde la presencia de restos de madera permitió una datación radiométrica completa, determinándose que el último máximo glacial ocurrió aproximadamente hace 19.000 – 20.000 años (Porter, 1981), con tres períodos de avances más leves desde esa fecha hasta la actualidad (Mercer, 1976). Estudios más recientes proponen la subdivisión de la última glaciación en dos períodos, “Nahuel Huapi I y II” (Rabassa & Clapperton, 1990).

En las glaciaciones del Pleistoceno tardío la descarga principal de las masas de hielo fue a través de glaciares de valle (Rabassa & Clapperton, 1990). Como se puede observar en el mapa elaborado por Fint & Fidalgo (1963, 1964), correspondiente a la región de estudio de esta tesis (ver próxima sección) (Fig. 2, Apéndice I), los hielos avanzaron hacia el este de la Cordillera de los Andes, a lo largo de todas las cuencas lacustres de la actualidad, en forma de amplios cuerpos confinados dentro de los valles mayores. Según estos autores, el hielo alcanzó alturas de hasta 1.500 m,

<sup>1</sup> Cabe destacar que estos autores no realizaron una datación de los depósitos glaciarios que describieron. La estimación de la edad fue tomada de Kodama et al., 1986.

quedando sectores de altas elevaciones por encima del hielo (nunatacks). La línea de la nieve se encontraba a 1.300 m, lo cual desplazó a la vegetación a altitudes menores que la actual (Flint & Fidalgo, 1963, 1964). En Chile los hielos cubrieron toda la región al sur de los 44°, siendo la cobertura de la Región de los Lagos (34° - 43° de latitud Sur) similar a la descrita para Argentina, dado que los glaciares formaban lóbulos “pie de monte” (Porter, 1981). Las áreas libres de hielo de esta región se ubican en la zona costera (Cordillera de la Costa y Noroeste de la Isla Grande de Chiloé) (Porter, 1981) y en la Depresión Intermedia, sobre todo su vertiente occidental (Veit & Garleff, 1995).

Se ha señalado la diferencia de los fenómenos glaciarios del Hemisferio Sur con respecto a sus correspondientes en el Hemisferio Norte. Mientras que en el norte los hielos avanzaron como masas compactas extendiéndose en grandes superficies y desplazando a las especies hacia latitudes más tropicales, en el Hemisferio Sur el escenario fue aparentemente muy distinto. Se menciona que en todos los continentes quedaron lugares libres de hielo donde las especies pudieron refugiarse. La rápida expansión de los bosques al retirarse los hielos sugiere la persistencia de los mismos en numerosos refugios dispersados en pequeños parches (Markgraf et al., 1995). En función de datos palinológicos, en conjunto con los datos geológicos, distintos autores concuerdan con la existencia de varios sitios a partir de los cuales las especies se expandieron luego de las glaciaciones (Markgraf 1983, 1989; Villagrán, 1991; Villagran et al., 1995; Markgraf et al., 1995; Heusser, et al., 1996; Moreno, 1997a; Bianchi, 1999). Las bajas temperaturas y el clima más árido que en la actualidad redujo considerablemente la superficie del bosque templado. Sin embargo, en la zona entre los 34° y 43° de latitud Sur, al oeste de la Cordillera de los Andes, el clima habría sido lo suficientemente húmedo durante todo el período glacial como para que los taxa de *Nothofagus* persistieran desde el Terciario. Por otro lado, la topografía tan diversa de la zona permitiría la presencia de numerosos microhábitats que también marcan la diferencia del efecto de las glaciaciones en el Hemisferio Sur con respecto al Hemisferio Norte (Markgraf et al., 1996).

El efecto de las glaciaciones, especialmente en especies longevas, puede estar reflejado en la estructura genética actual (Newton et al., 1999). Los sucesivos “cuellos de botella” a través de los cuales pasaron las poblaciones de las distintas especies al recolonizar áreas previamente glaciadas, pueden haber originado una disminución en la diversidad genética al recorrer largas distancias (Hewitt, 2000). Estudios genéticos



en especies nativas de los bosques Andino–patagónicos han sugerido la existencia de numerosos refugios a partir de los cuales las especies se expandieron al final del período glaciario (Marchelli et al., 1998; Premoli, 1998; Allnutt et al., 1999; Premoli et al., 2000b; Pastorino, 2001; Bekessy et al., en prensa; Carrasco & Eaton, enviado). Más aún, la permanencia de los bosques en refugios al este de la Cordillera de los Andes fue sugerido en estudios realizados en poblaciones de *Nothofagus nervosa* (Marchelli et al., 1998), *Fitzroya cupressoides* (Allnutt et al., 1999; Premoli et al., 2000b) y *Austrocedrus chilensis* (Pastorino, 2001).

De acuerdo a los datos palinológicos, se asume en general que los refugios glaciarios se ubicaron en la región occidental de la Cordillera de los Andes y, a partir de los mismos, se re - colonizó el faldeo oriental. Estos caminos migratorios desde el oeste presuponen una reducción en la diversidad genética a medida que se avanza hacia el este y, a su vez, estarían relacionados con los pasos bajos en la Cordillera de los Andes. Por el contrario, si existieron refugios en el faldeo oriental de los Andes, la variación genética en poblaciones del este debería ser al menos igual a la detectada hacia el oeste.

#### **2.2.4.2. Distribución geográfica e hibridación**

El área de distribución geográfica de una especie influye en la distribución de su variación genética (Hamrick et al., 1992). Sin embargo, además del área, el tipo de distribución fragmentada o continua determinará las posibilidades de flujo génico entre las poblaciones y por ende el grado de diferenciación entre las mismas.

Una particularidad de la distribución geográfica del Raulí en Argentina, además de ser muy reducida, es que está restringida a los valles transversales en sentido oeste - este de las cuencas lacustres de origen glacial (Fig. I.3). Esta distribución relativamente fragmentada, sugiere la posibilidad de que existan diferencias genéticas en sentido latitudinal entre las poblaciones de la especie ubicadas en distintas cuencas. A su vez, los fuertes vientos en sentido oeste – este que constituyen el 57,6 % de la totalidad de los vientos anuales podrían estar favoreciendo el flujo génico en sentido unidireccional dentro de las cuencas lacustres y limitándolo entre cuencas vecinas. Más aún, durante el período de polinización (octubre - noviembre) los vientos provenientes del oeste llegan a alcanzar el 72,2 % de los vientos totales, mientras que durante la semillazón varían entre 53,1 y 62,8 % (Servicio Meteorológico Nacional, Estación Aeropuerto San Carlos de Bariloche) .

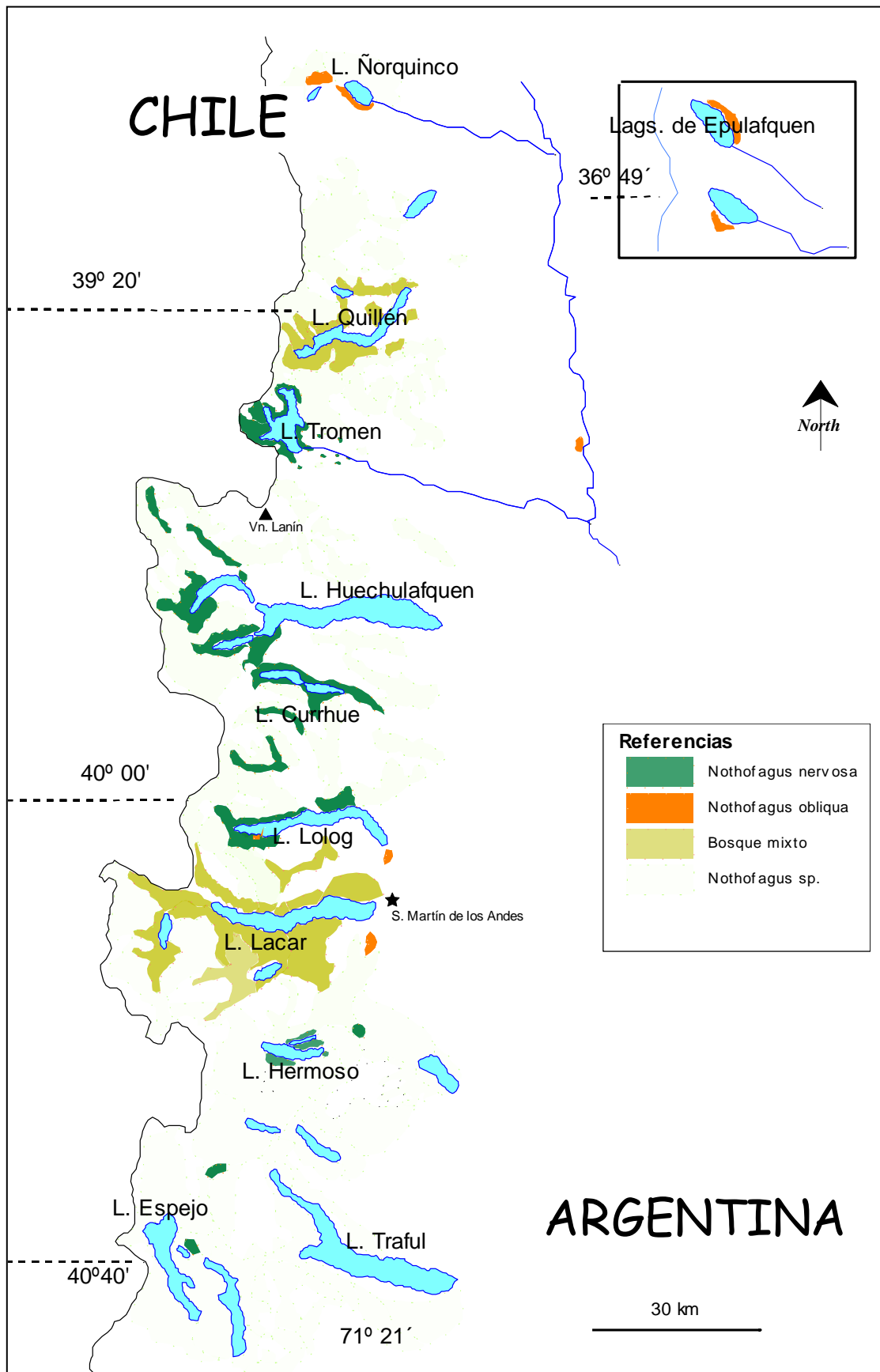


Figura I.3: Representación esquemática de la distribución natural en Argentina de *Nothofagus nervosa* y *N. obliqua*.

Además de esta distribución fragmentada que sugiere la existencia de variación en sentido latitudinal, la superposición con *Nothofagus obliqua* en parte del área de distribución de *N. nervosa* permite la ocurrencia de hibridación entre ambas especies. La mayor riqueza alélica en aquellas poblaciones con individuos híbridos influirá también en el patrón de distribución de la variación genética. La superposición ocurre principalmente en dos de las cuencas lacustres (Lagos Lácar y Quillén) y en muy baja proporción en la cuenca del Lago Lolog, por lo que el proceso de hibridación también podría influir en la existencia de variación en sentido latitudinal.

### 3. Hipótesis general

La particular distribución natural de *Nothofagus nervosa* en Argentina, (reducida, restringida a los valles de las cuencas lacustres con fuertes vientos unidireccionales) y los caminos migratorios de colonización postglacial asumidos “a priori” como más probables, sugieren una estructuración de su variación genética con diferenciación principalmente en el sentido latitudinal.

### 4. Objetivos

Los objetivos generales de este trabajo son:

- \* Determinar el grado y distribución de la variación genética en poblaciones de Raulí (*Nothofagus nervosa*) de toda el área de distribución de la especie en Argentina.
- \* Contribuir al conocimiento de la historia glacial y postglacial de la especie.
- \* Contribuir al conocimiento de algunos procesos genéticos de importancia evolutiva (flujo génico, hibridación).
- \* Aportar datos de variación genética para la elaboración de programas de conservación y uso sustentable de la especie.

Los objetivos particulares son:

- \* Determinar la variación espacial y temporal de características seminales relacionadas indirectamente con la dinámica de regeneración poblacional (producción, disponibilidad y viabilidad de las semillas).
- \* Determinar marcadores génicos isoenzimáticos, por medio del análisis genético de las variantes fenotípicas observadas.

- \* Determinar niveles de diversidad y diferenciación genéticas dentro y entre poblaciones.
- \* Determinar la probable ubicación de los refugios durante las últimas glaciaciones y las rutas de migración de la especie.

## **5. Criterio general para la selección de poblaciones**

El área de distribución tan reducida de Raulí en Argentina, sugiere que con relativamente pocas poblaciones se podría cubrir la variación genética de la especie. Sin embargo, las características del paisaje de tipo montañoso imprimen a la región una gran variación ambiental. Por este motivo, y para evaluar la hipótesis planteada es necesario realizar un muestreo más exhaustivo con poblaciones representativas. Ese fue el criterio seguido en este trabajo en donde se muestreó un total de 28 poblaciones y, en función de datos preliminares, se eligieron 20 procurando cubrir todas las cuencas lacustres en donde ocurre naturalmente la especie con más de una población (Figuras II.1 y IV.1). De este modo se puede evaluar la hipótesis de variación genética latitudinal y, a su vez, la hipótesis alternativa.

Se muestrearon también tres poblaciones en Chile, que dada la baja representatividad de este número respecto a la distribución de la especie en dicho país, sólo se utilizaron para algunas comparaciones.

## **6. Criterio general para la selección de marcadores genéticos**

Los primeros estudios de genética poblacional en plantas estimaban la diversidad genética a través de la medición de características cuantitativas. Estas características están generalmente controladas por más de un gen y la influencia ambiental sobre su expresión es muy importante. La medición de estos caracteres morfométricos poligénicos se realiza en los llamados ensayos de orígenes o procedencias, donde distintas poblaciones (con distintos acervos genéticos) crecen en un mismo ambiente (“jardines comunes”), permitiendo así realizar inferencias genéticas sobre la distribución de la variación observada. Sin embargo, dados los tiempos generacionales tan largos, especialmente en especies arbóreas, se requieren muchos años de estudio antes de sacar conclusiones fehacientes. Por otro lado, al constituir herencias de tipo poligénica, el efecto medio de un gen sólo es estimable

estadísticamente en el caso poco probable del cumplimiento de numerosos supuestos genéticos para todos los genes involucrados, y las medidas de diversidad comúnmente usadas en genética de poblaciones no son de fácil aplicación.

La observación de una característica fenotípica que implique inequívocamente la expresión de un único gen representa un **marcador génico**. Para determinar la relación entre fenotipo y genotipo inherente a cada marcador génico es necesario realizar el análisis genético de la segregación fenotípica observada, lo cual implica determinar el modo de herencia de dicho marcador (Hattemer, 1991a). Los primeros marcadores génicos utilizados fueron **características morfológicas**, y se remontan a los trabajos de Mendel en 1866. Sin embargo, generalmente es difícil encontrar características morfológicas que sean codificadas por un único gen e independientes del ambiente, existiendo muy pocas en especies arbóreas (Hattemer, 1991a). Otras características usadas, pero con resultados muchas veces inciertos, son los compuestos secundarios, como los fenoles (ver revisión en Hattemer, 1991a; Müller-Starck et al., 1992).

Características morfológicas como el peso de las semillas no son consideradas como marcadores génicos. Sin embargo, se ha señalado el alto valor adaptativo del peso seminal (e.g. Harper et al., 1970; Baker, 1972; Wright, 1976; Silvertown, 1987) y su relación con la capacidad germinativa (e.g. Langdon, 1958; Shoulders, 1961; Tripathi & Khan, 1990; Chaisurisri et al., 1992; Dunlap & Barnett; 1993). Diversos estudios han analizado la variación en el peso de las semillas en relación con variables geográficas como la latitud (e.g. Wright 1976; Baker, 1972; Donoso, 1979; Aizen & Woodcock, 1992), así como también la variación temporal en la producción de semillas (Koenig et al., 1994; Hiroki & Matsubara, 1995; Alley et al., 1998), característica que está en estrecha relación con la regeneración natural de las poblaciones. En esta tesis se analizarán características seminales como producción, peso y porcentaje de daño por insectos en relación a variables geográficas, estudiándose también su variación temporal.

La utilización de **marcadores génicos isoenzimáticos** en especies forestales a partir de la década del 70, con los trabajos de Bartels (1971) y Bergmann (1971) marcó un cambio fundamental en la disponibilidad de una herramienta sencilla y confiable que originó la realización de numerosos trabajos en genética de poblaciones.

Las isoenzimas “son variantes electroforéticamente separables de un sistema enzimático” (Bergmann et al., 1989), codificadas por genes en uno o varios loci.

Representan formas distintas de una enzima cuya función es la misma. Su principal ventaja como marcadores génicos radica en su herencia de tipo Mendeliana con expresión codominante de los alelos y penetrancia completa, salvo pocas excepciones. Por otro lado, en especial las enzimas constitutivas (Grupo I, Bergmann, 1991) no varían con el ambiente y son ontogenéticamente estables. A pesar de que muchos loci son monomórficos o poseen un alelo muy frecuente, otros poseen distintos alelos con frecuencias intermedias, detectándose niveles considerables de polimorfismo. Existen controversias respecto a la neutralidad adaptativa de estos marcadores. Algunos estudios demostraron la acción de la selección natural en forma directa sobre loci enzimáticos, mientras que otros concluyeron que los mismos eran selectivamente neutros. Bergmann (1991) sugiere que la condición de “selectivamente neutra o adaptativa” de la variación aloenzimática es probablemente dependiente de las condiciones ambientales en las cuales vive la población del organismo. Más aún, para las enzimas del grupo I (enzimas constitutivas) las variantes alélicas que aparecen en las poblaciones en frecuencias al menos moderadas, no deberían ser selectivamente equivalentes, dado que, sobre todo en el caso de enzimas poliméricas, la estructura cuaternaria de la proteína debe sufrir cambios drásticos al modificarse la secuencia de aminoácidos. Esto llevó a considerar la hipótesis de que estas variantes o bien se eliminan por selección en contra o bien permanecen por poseer mejor función catalítica, quizás en determinado ambiente (Bergmann et al., 1990). Se ha sugerido también que la presencia de los mismos alelos predominantes en las poblaciones de muchas especies es evidencia de diferenciación ontogenética en la función de las enzimas, mientras que la presencia de alelos raros es producto de mutaciones recurrentes deletéreas (Gregorius & Bergmann, 1995).

Entre las desventajas de estos marcadores está la imposibilidad de monitorear todas las mutaciones en las secuencias proteicas tanto por la degeneración del código genético (diferentes tripletes nucleotídicos que codifican para el mismo aminoácido) como por la imposibilidad de detectar cambios que no originen una modificación en la carga neta de la proteína. A su vez, al estar codificadas por genes estructurales, sólo constituyen una parte reducida del genoma.

Los marcadores génicos isoenzimáticos han sido ampliamente utilizados en especies arbóreas para estudios de genética de poblaciones, evolución, sistemática, como marcadores de loci que codifican caracteres cuantitativos (QTLs), entre otros. Existen numerosas revisiones sobre el uso de estos marcadores (e.g. Feret &

Bergmann, 1976; Adams, 1983; Bergmann & Hattemer, 1998). En el presente trabajo, dado el carácter codominante de los marcadores génicos isoenzimáticos, la posibilidad de detectar niveles aceptables de polimorfismo, su invariancia con el ambiente y su estabilidad ontogenética, entre otras ventajas, se utilizarán como herramienta para analizar la diversidad y diferenciación genéticas entre las poblaciones de Raulí en Argentina. El detalle de la técnica y los resultados se describen en los Capítulos III y IV.

Otro tipo de marcadores que han surgido recientemente son los **marcadores moleculares o de ADN**. Existen diversos tipos de marcadores, cada uno con sus ventajas y desventajas y sus usos específicos. La descripción de los mismos escapa al alcance de esta tesis, pero para revisiones detalladas se recomienda Avise (1994); Karp et al. (1998); Parker et al., (1998); Gillet (1999); Glaubitz & Moran (2000); Szmidt & Wang (2000). Una característica general de estos marcadores es la posibilidad de estudiar directamente la secuencia de nucleótidos del ADN, lo que permite monitorear todas las mutaciones. Más aún, el estudio no se restringe a genes estructurales, sino que también se pueden analizar secuencias no codificantes, las cuales acumulan mutaciones de manera neutral con una presión de selección menor. Por otra parte, se puede analizar tanto el ADN nuclear como el de las organelas (cloroplastos y mitocondrias), lo que permite distintos tipos de estudios. El uso de estos marcadores se ha generalizado recientemente por el empleo de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* que permite amplificar el ADN a estudiar obteniendo grandes cantidades del mismo (ver Capítulo V). Por otro lado, el empleo de enzimas de restricción que digieren el ADN en secuencias específicas detecta *polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP)* lo cual permite realizar estudios de diversidad y diferenciación entre poblaciones (ver Capítulo V).

Como se mencionó más arriba, uno de los tipos de ADN que se puede estudiar es el ADN de cloroplasto. Este constituye una molécula circular, cuyo tamaño varía entre 120 kilobases (kb) y 217 kb (Palmer, 1987). Su herencia es de tipo clonal, uniparental, predominantemente materna en angiospermas y paterna en gimnospermas. La evolución del ADN de cloroplasto es relativamente lenta, con sustituciones de nucleótidos en una tasa baja, siendo la molécula muy conservada en estructura y secuencia, entre especies muy diversas (Clegg et al., 1991; Clegg et al., 1994). Estas características hacen del ADN de cloroplasto una molécula útil tanto en estudios de sistemática como en análisis filogenéticos entre especies de un género. Si

bien la tasa de mutación es baja, se ha detectado variación intraespecífica, en la mayoría de los casos entre poblaciones (ver revisión en Soltis et al., 1992). Sin embargo, se han reportado también casos de especies altamente polimórficas a nivel intrapoblacional (por ejemplo en *Sorbus torminalis*, Demesure, com. pers.). La herencia clonal del ADN de cloroplasto impide la recombinación génica, por lo que las variantes que ocurren en la secuencia del ADN se mantienen en un linaje uniparental. Esta característica hace que sean especialmente útiles en el estudio de procesos evolutivos dentro de una especie. En este sentido, se ha utilizado la variación intraespecífica para trazar rutas migratorias de las especies luego de las últimas glaciaciones y establecer las posibles áreas libres de hielo donde se refugiaron durante las mismas (Kremer & Petit, 1993; Petit et al., 1993; Ferris et al., 1995; Dumolin-Lapègue et al., 1997b; Marchelli et al., 1998). En el presente trabajo este tipo de marcador se utilizará para determinar los posibles refugios glaciarios y las rutas migratorias de *Nothofagus nervosa*.

Si bien estas nuevas técnicas brindan información en tiempos relativamente cortos, es importante continuar en forma paralela con ensayos de progenies y procedencias, donde se puedan medir las características morfométricas que tienen una implicancia adaptativa muy grande.

Resumiendo, en esta tesis se analizarán la variación espacial y temporal en algunas características seminales (Capítulo II) y se estudiará la variación genética mediante marcadores isoenzimáticos (Capítulo III y IV) y de ADN de cloroplasto (Capítulo V). La información sobre la intensidad y distribución de la variación detectada con cada tipo de característica se integrará finalmente en la discusión de los resultados (Capítulo VI).



## **Capítulo II**

### **Variación geográfica y anual en características seminales**

#### **1. Introducción**

##### **1.1. Variación morfométrica y sistema adaptativo**

Las características morfométricas están generalmente muy influidas por el ambiente siendo, en la mayoría de los casos, producto de herencias de tipo poligénica. La importancia de su estudio radica en su asociación con el sistema adaptativo de una especie, dado que la variación en estas características normalmente expresa en forma directa mecanismos de adaptación del individuo o la población en estudio al ambiente en el que se encuentra. Como ya se mencionó en el Capítulo I son muy pocos los marcadores morfométricos determinados en especies arbóreas que cumplan con el requisito de herencia de tipo Mendeliana. Características fenotípicas como la altura, por ejemplo, presentan una herencia de tipo cuantitativa, en la cual interviene más de un gen, con un componente ambiental muy fuerte. En esos casos, el estudio del componente genético se realiza tradicionalmente mediante pruebas de progenies y ensayos de procedencias, donde la influencia ambiental está controlada. En este tipo de ensayos se puede inferir la expresión genética de los distintos genotipos y analizar su comportamiento relativo en un ambiente homogéneo y común a todos (“jardines comunes”).

En especies longevas y con dinámicas reproductivas complejas, como los árboles, la capacidad reproductiva está fuertemente relacionada con el sistema adaptativo tanto de los individuos como de las poblaciones. En tal sentido la semilla, propágulo de origen sexual del ciclo reproductivo, constituye el medio principal a través del cual la información genética recombinada de un individuo o población se dispersa (Harper et al., 1970), ocupando por ende un lugar crítico en el ciclo de vida de la planta adulta y de la evolución de una población. El establecimiento de una nueva plántula es la etapa final en el ciclo reproductivo de un individuo y depende en gran medida de las características fisiológicas y bioquímicas de la semilla.

El estudio de la variación genética y geográfica en características de importancia adaptativa es un paso fundamental para orientar programas de conservación y mejoramiento genético. Características seminales como la producción total de cada población, el porcentaje de semillas dañadas por insectos y el peso de las

semillas están estrechamente relacionadas con la adaptación potencial de la especie en cada población. La periodicidad en la producción de semillas es un hecho frecuente en especies forestales (e.g. Koenig et al., 1994; Hiroki & Matsubara, 1995) y ha sido también estudiada en el género *Nothofagus* (Wardle, 1984; Donoso, 1993; Alley et al., 1998). En general, la producción de semillas por parte de distintos individuos de cada población está sincronizada y los años de gran producción están correlacionados con variables climáticas (Silvertown, 1987). La producción cíclica de semillas puede deberse a condiciones climáticas favorables en determinados años o a una vía de escape a predadores. Según esta segunda hipótesis los predadores no pueden consumir la totalidad de las semillas en un año de gran producción, pero podrían causar daños considerables si la producción fuera menor y pareja en el tiempo. Distintas evidencias confirmarían esta segunda hipótesis tanto en especies forestales (referencias en Silvertown, 1987) como en otras especies (Janzen, 1976).

La variación en el peso de las semillas en relación con variables geográficas observada en numerosas especies sugiere que esta característica es adaptativa. Tanto Baker (1972) en especies de California, como Wright (1976) en especies de Europa sugieren un proceso de adaptación a las condiciones de sequía que determina en general un peso seminal mayor en poblaciones de regiones áridas y consecuentemente un mayor contenido de reservas en sus semillas y un sistema radicular más profundo en las plántulas. Una asociación negativa entre el peso de las semillas y la latitud en especies del género *Quercus* en América del Norte ha sido interpretada o bien como una respuesta a estaciones de crecimiento más cortas y/o frías, como consecuencias de la expansión postglacial o como una combinación de estos dos procesos (Aizen & Woodcock, 1992). Por otro lado, se han reportado asociaciones positivas entre el peso seminal y la capacidad germinativa y supervivencia de las plántulas en diversas especies (e.g. Langdon, 1958; Dunlap & Barnett, 1982; Tripathi & Khan, 1990). A su vez, la variación en la capacidad germinativa entre distintas poblaciones puede estar relacionada con factores ambientales o con la dormancia de las semillas (Bewley & Black, 1994). Una consecuencia importante y con implicancias adaptativas de la dormancia es la distribución en el tiempo y el espacio de la germinación. Por otro lado, muchas semillas permanecen en estado de dormancia en el suelo durante varios años, sin perder viabilidad, constituyendo un banco de semillas. En varias especies arbóreas la composición de la siguiente generación está determinada en parte por la población de semillas en estado de dormancia (Stern & Roche, 1974), con la

influencia en la estructura genética de dicha generación que esto implica. Esta variación temporal en la germinación asociada con la producción cíclica de semillas que se ha observado en especies arbóreas, incluyendo *Nothofagus*, genera pulsos de regeneración natural en las poblaciones.

De las enormes cantidades de semillas que producen las especies arbóreas generalmente una gran proporción es vana, producto quizás de autofecundación o de fallas en la polinización, lo que produce un mal desarrollo del embrión. A su vez, otra gran proporción puede ser consumida por insectos. El consumo de semillas por parte de insectos granívoros en *Nothofagus nervosa* es un factor importante que reduce la cantidad de semillas que se producen cada año (Burschel et al., 1976; Marchelli & Gallo, 1995, 1999), disminuyendo de este modo su potencial regenerativo. El ciclo de vida del lepidóptero del género *Perzelia* que consume las semillas de *Nothofagus*, está en estrecha relación con el ciclo reproductivo del Raulí (Cruz, 1981). El insecto cumple su etapa larval dentro de la semilla consumiendo todo el embrión. Este daño causa pérdidas muy importantes en la producción de semillas, sobre todo en algunos años, como se discutirá más adelante.

Se conoce muy poco sobre la variación genética y geográfica en características seminales de *Nothofagus nervosa* y menos aún de su covariación anual. En Chile, observaciones en una población durante cuatro años evidenciaron, como en otras especies nativas, ciclos en la producción de semillas con estaciones de buena producción cada dos años (Burschel, et al., 1976). También se han realizado estudios sobre dinámica regenerativa (Burschel, et al., 1976) y variación geográfica en el peso de semillas (Werner, 1987, citado en Donoso, 1987). En Argentina se estudió la capacidad germinativa en árboles individuales pertenecientes a la cuenca del Lago Lácar (Breitembücher y Gallo, 1995; Breitembücher, 1998) así como también la variación individual en frutos y semillas (Breitembücher, 1998). En un trabajo previo se encontró variación geográfica en el peso de las semillas y el daño ocasionado por insectos en 15 poblaciones de Raulí cosechadas en un mismo año (Marchelli y Gallo, 1995). Hasta el momento no se han realizado estudios de características seminales en especies forestales nativas que incluyan muchas poblaciones y analicen la variación temporal a lo largo de varios años.

## 1.2. Ciclo de vida y formación de la semilla

El ciclo de vida de una planta se divide en una fase vegetativa y una reproductiva, siendo muy variable en las especies arbóreas la edad a la cual alcanzan esta segunda etapa. En el género *Nothofagus* se estima que entre los 20 y 30 años los individuos se encuentran en edad reproductiva (Rogríguez, 1990); el inicio de la floración marca el comienzo de esta etapa y, en cada año, el inicio del ciclo reproductivo. En *Nothofagus nervosa* aparecen primero las flores masculinas (protandria) durante la primavera y una semana más tarde las femeninas, en las axilas de las hojas, más atrás de las masculinas, favoreciendo de este modo la polinización cruzada (Donoso, 1993). El período de aparición de las flores masculinas en Raulí en un estudio realizado en la zona de Valdivia abarcó dos meses (20 de agosto al 20 de octubre) (Aichele, 1998, cit. en Ipinza & Espejo, 2000). Este período de dos meses se dividió en 23 días de crecimiento de anteras, 14 días de maduración de las mismas y siete días en que éstas estuvieron vacías. En cuanto al desarrollo de la flor femenina, en dicho estudio se observó la aparición de las mismas en un estadio incipiente durante un mes (13 de octubre al 11 de noviembre); la etapa de crecimiento se prolongó por un lapso de 15 días, alcanzando la maduración siete días más tarde. Estas fechas pueden variar de una localidad a otra en función de la latitud y la altitud. En *Nothofagus pumilio* por ejemplo, dos poblaciones distantes a sólo 165 m en sentido altitudinal mostraron diferencias en la floración existiendo un retardo de diez días en aquella situada a mayor altitud (Rusch, 1993). El primer estadio de la floración femenina corresponde al período de receptividad y su mayor duración está relacionado con mecanismos tendientes a aumentar las posibilidades de polinización (Ipinza & Espejo, 2000). En tal sentido, es importante destacar que el desarrollo de las flores debe ser sincrónico, dado que el estigma de la flor femenina debe estar receptivo en el momento de la liberación del polen (Stern & Roche, 1974).

La polinización se encuentra altamente influenciada por factores climáticos ya que, al ser anemófila, depende de la presencia de vientos al momento de la liberación del polen. Por otro lado, las lluvias o niveles muy altos de humedad pueden provocar la caída del polen o la imposibilidad de su liberación, impidiendo o disminuyendo sensiblemente de este modo la polinización. Dadas las condiciones ambientales óptimas, el polen de las especies de *Nothofagus* puede ser transportado por el viento a largas distancias (Dettmann et al., 1990), si bien la nube verdaderamente efectiva se concentra a una distancia más cercana de la fuente emisora. En *Pinus sylvestris*, por

ejemplo, la probabilidad de que un individuo sea polinizado por otro situado a 10 m se determinó en 0,44, decayendo rápidamente este valor con la distancia ya que a 20 m la probabilidad fue de sólo 0,01 (Hattemer et al., 1993).

Luego de la polinización la fecundación ocurre en aproximadamente una semana (Rodríguez, 1990). En las angiospermas existe una doble fertilización, uno de los núcleos polínicos se fusiona con el óvulo o célula huevo para formar el cigoto diploide y el otro núcleo se fusiona con los dos núcleos polares para producir el núcleo triploide que originará el endosperma. En el género *Nothofagus* las semillas maduran, dentro de los frutos, al cabo de tres a cuatro meses (entre febrero y marzo), cuando las cúpulas se tornan de un color amarronado y se abren para liberar las tres semillas que contienen. La dispersión de las semillas es por gravedad y viento, siendo por ende muy escasa. Se ha señalado que puede alcanzar hasta dos veces la altura del árbol, distancia que oscilaría entre 50 y 80 m y, excepcionalmente, llegaría a los 100 m (Donoso, 1993).

La brotación, floración y maduración de las semillas constituyen etapas fundamentales en la fenología de las especies arbóreas. Las fechas en las cuales ocurren estos procesos y su variación en distintas localidades, representan adaptaciones al clima de cada sitio. En especial, las especies anemófilas y de regiones templadas han desarrollado mecanismos para sincronizar la floración, debiendo florecer en un período de tiempo relativamente corto para que la polinización cruzada sea efectiva, y estando por otro lado sus ciclos vegetativos adaptados a la estacionalidad del clima (Stern & Roche, 1974).

Las semillas viables permanecen en el suelo durante el invierno hasta la primavera. Esta permanencia en el suelo durante el invierno, a temperaturas por debajo de cero, facilita la ruptura de la dormancia. Por otra parte también favorece climáticamente a las plántulas, dado que emergerán en la primavera con temperaturas más elevadas.

Una vez superada la etapa germinativa, las plántulas deben competir por espacio y nutrientes, lo cual lleva a la mortandad de la gran mayoría. Observaciones recientes en una población natural de *Nothofagus obliqua* denotan una supervivencia media al final del verano de aproximadamente el 40 % de las plántulas surgidas en la primavera (Crego, com. pers.). La fuerza que ejerce la selección en la viabilidad de las semillas primero y de las plántulas después, representa un cuello de botella para la

enorme cantidad de combinaciones genéticas determinadas por el sistema de apareamiento de una población.

### **1.3. Objetivos**

En el presente capítulo se estudiará la variación geográfica y anual en la producción de semillas, el peso de las mismas y el daño ocasionado por lepidópteros en poblaciones de Raulí de toda el área de distribución natural en Argentina. Se analizarán las características seminales mencionadas en relación con variables geográficas como latitud, longitud y altitud. En el contexto de la hipótesis general de la tesis donde se menciona la distribución fragmentada del Raulí a lo largo de las cuencas lacustres con vientos unidireccionales en sentido oeste-este, se evaluará también la existencia de variación en las características seminales entre las distintas cuencas lacustres.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Poblaciones analizadas**

Se recolectaron semillas de Raulí en 28 poblaciones de toda el área de distribución natural de la especie en Argentina (Fig. II.1; Tabla II.1). La cosecha se realizó durante cuatro años consecutivos en 12 de estas poblaciones, durante 3 años en 14 y durante dos años en las dos restantes (Tabla II.2). La recolección se hizo mediante la colocación de redes debajo de las copas a aproximadamente 1,5 m del suelo y a una distancia de entre 80 y 100 m entre cada red. En el año 1994 se colocaron 4 redes por población captando semillas, en cada una, de un mínimo estimado de 20 árboles productores. En cambio, en los años subsiguientes se elevó el número de redes a un mínimo de 8 por población, logrando de este modo obtener semillas de al menos 40 árboles productores por población. La superficie efectiva de recepción de semillas de cada red se estimó en 7 m<sup>2</sup>. Durante 1995 y 1996 se recolectaron semillas de las 28 poblaciones. En estos dos años se realizaron dos cosechas, una al comienzo de la estación de caída de semillas (febrero) y otra al final (abril). En los otros años analizados se cosechó la semilla al final de la estación.

La edad promedio de los árboles productores de semillas de estas poblaciones fue de entre 100 y 150 años.

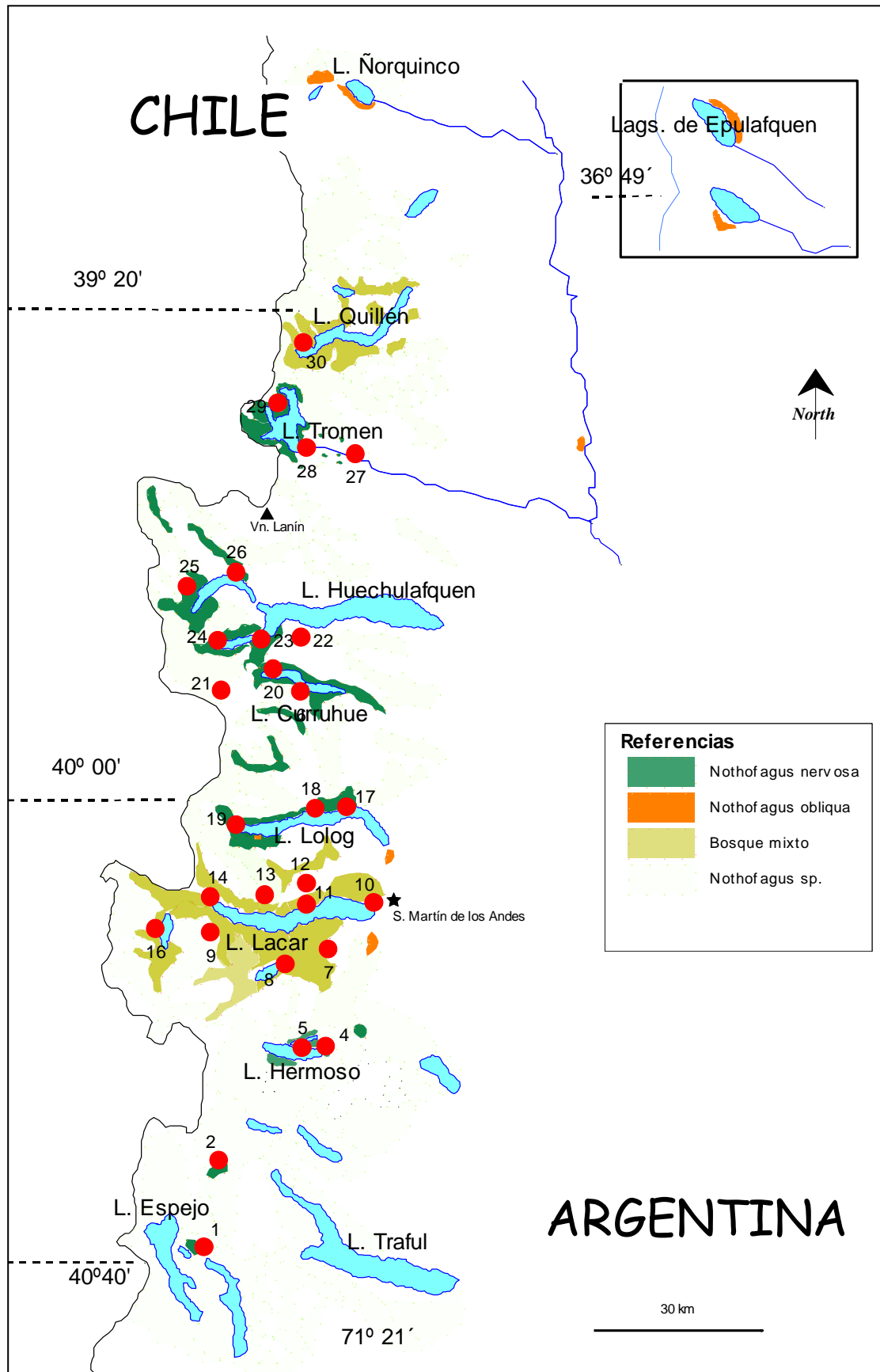


Figura II.1: Ubicación geográfica de las poblaciones de *Nothofagus nervosa* analizadas.

Las semillas fueron almacenadas en bolsas plásticas a 4° C hasta su utilización. La limpieza de las semillas de Raulí se realizó mediante zarandas de distinto tamaño de malla que separaban la hojarasca y las semillas de otras especies. Dado que la semilla de Roble Pellín tiene un tamaño similar a la de Raulí, la separación en este caso se efectuó manualmente. Las semillas de ambas especies se distinguen claramente ya que en Raulí el centro es de color marrón oscuro y el ala color claro, mientras que en Roble toda la semilla es de un mismo color (marrón muy claro). Las semillas híbridas entre ambas especies no se distinguen.

Tabla II.1: Ubicación geográfica y datos de precipitación media anual de las poblaciones de Raulí analizadas.

Población	Cuenca lacustre	Denominación	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Precipitación (mm anuales)
1	Espejo	Espejo chico	40° 34'48''	71° 43'12''	1000	3000
2	Villarino	Pichi Trafal	40° 28'48''	71° 37'48''	800	2000
4	Hermoso	Península Raulí	40° 21'00''	71° 31'48''	1030	2000
5	Hermoso	Pudú-Pudú	40° 21'36''	71° 28'12''	1050	2100
6	Curruhue	L. Curruhue Grande	39° 51'00''	71° 29'24''	970	1800
7	Lácar	Cerro Tren-Tren	40° 12'00''	71° 25'48''	930	1800
8	Lácar	L. Escondido	40° 10'48''	71° 33'00''	960	2500
9	Lácar	Pucará	40° 10'12''	71° 40'12''	780	2500
10	Lácar	Bandurrias	40° 09'00''	71° 21'00''	980	1400
11	Lácar	Chidiak	40° 09'00''	71° 28'48''	650	1900
12	Lácar	Quilanlahue	40° 07'48''	71° 28'48''	920	2000
13	Lácar	Yuco Alto	40° 07'48''	71° 34'48''	930	2500
14	Lácar	Hua Hum	40° 10'12''	71° 40'12''	940	2500
16	Lácar	L. Queñi	40° 10'12''	71° 46'12''	900	3000
17	Lolog	Puerto Arturo	40° 01'12''	71° 22'48''	850	1400
18	Lolog	Playa Bonita	40° 01'12''	71° 24'00''	820	1700
19	Lolog	Boquete	40° 01'12''	71° 35'24''	720	2000
20	Curruhue	Las Termas (Lag. Verde)	39° 49'48''	71° 31'12''	970	1800
21	Curruhue	Las Termas (Frontera)	39° 49'48''	71° 36'00''	990	2000
22	Huechulafquen	El Contra	39° 47'24''	71° 25'48''	1000	1600
23	Epulafquen	Puerto Canoas	39° 47'24''	71° 30'00''	1000	1900
24	Epulafquen	Epulafquen Fondo	39° 48'00''	71° 36'00''	980	2500
25	Paimún	Paimún	39° 45'00''	71° 37'48''	970	3000
26	Paimún	Lanín	39° 42'00''	71° 34'12''	970	2500
27	Tromen	Río Turbio	39° 36'00''	71° 19'48''	1100	2000
28	Tromen	Seccional	39° 34'12''	71° 25'48''	1040	3000
29	Tromen	Tromen Fondo	39° 29'24''	71° 25'48''	910	3000
30	Quillén	Rincón del Pül-Pül	39° 25'12''	71° 22'48''	886	2500

Nota: Los datos de latitud y longitud se tomaron con GPS, la altitud con altímetro y la precipitación media anual aproximada de mapas de isohietas.



Las semillas provenientes de las distintas redes se combinaron en un único lote para homogeneizar la variación intrapoblacional generada por la producción diferencial de los distintos individuos y la caída de semillas de distinto peso según el momento de recolección (comienzo o final de la temporada). El lote de semillas se considera, en el sentido estadístico, como la población a partir de la cual se toman las muestras a analizar.

## 2.2. Variables determinadas

**2.2.1. Producción total de semillas:** se estimó para cada población el número total de semillas recolectadas por metro cuadrado. Para la estimación se tomó el peso, en gramos, del total de semillas recolectadas y, en función del peso de 1000 semillas determinado para cada población (ver más adelante) se calculó el número de semillas. Este valor se dividió por la superficie efectiva de recepción de cada red, multiplicado por el número de redes colocadas en cada caso, obteniéndose de este modo una estimación aproximada de la cantidad de semillas por metro cuadrado de superficie cubierta. En síntesis este cálculo se puede expresar de la siguiente manera:

$$N^{\circ} \text{ semillas recolectadas} = \text{Peso total} / \text{Peso semillas}$$

$$\text{Superficie de recolección} = \text{número de redes colocadas} * \text{superficie efectiva de recepción de cada red (7 m}^2\text{)}.$$

$$\text{Cantidad de semillas/m}^2 = N^{\circ} \text{ semillas recolectadas} / \text{Superficie de recolección}$$

**2.2.2. Peso de semillas:** Un método confiable para determinar la proporción de semillas llenas es a través del corte de la semilla. Sin embargo este es un método destructivo que no permite utilizar luego la semilla en ensayos de laboratorio y vivero. En un pre-ensayo realizado con una muestra de cinco poblaciones en donde se cortaron 100 semillas de cada una, se determinó que el tegumento seminal comprende entre el 84 y el 95 % del peso total de la semilla. Es decir, aún la variación en el peso de semillas vanas sería un buen estimador de la variación de semillas llenas. En base a esto y a la necesidad de contar con la mayor cantidad posible de semillas para su utilización posterior en ensayos de vivero y laboratorio, se tomaron semillas no

dañadas (llenas + vanas) para la determinación del peso de 1000 semillas, en lugar de sólo semillas llenas como sugiere la reglamentación de ISTA (1976).

Según la reglamentación establecida en el decimoséptimo Congreso Internacional de Ensayos de Semillas, Varsovia, 1974 de la International Seed Testing Association (ISTA) que entrara en vigencia a partir de 1976, la determinación del peso seminal se realiza analizando ocho muestras de cien semillas cada una las cuales deben ser tomadas al azar a partir del lote total de semillas con el que se cuenta. Dado que normalmente existe variación dentro de cada lote de semillas el análisis de distintas muestras permite estimar el error. Las muestras tomadas de este modo se consideran repeticiones. Esta metodología es ampliamente utilizada tanto para determinar el peso de las semillas como en ensayos de germinación (e.g. Gordon, 1958; Ackerman & Gorman, 1969; Baker, 1972; Dunlap & Barnett, 1983; Verheggen & Farmer, 1983; Tripathi & Khan, 1990; Chaisurisri et al., 1992) y es la recomendada, por ejemplo, por la FAO (1991) y por el Servicio Forestal de Canadá (Edwards & Wang, 1995).

En el caso de *Nothofagus nervosa*, se decidió tomar cuatro muestras de 100 semillas cada una para poder incluir en el análisis a la mayor cantidad posible de poblaciones. Las muestras se tomaron con cuchara luego de mezclar bien el contenido total del lote de semillas. En los casos en los que el número de semillas producidas fue inferior a 400 (19 % de las combinaciones población/año) se tomaron cuatro muestras de igual número de semillas cada una. Los lotes población/año con menos de 200 semillas no fueron incluidos en el análisis. Las muestras fueron colocadas en estufa a 37 °C durante 20 horas, para homogeneizar su contenido de humedad. Posteriormente se colocaron durante 30 minutos en desecador a temperatura ambiente y se pesaron en balanza analítica de precisión. Este procedimiento se realizó en cuatro días consecutivos, analizando una repetición cada día (bloque) de modo de homogeneizar las condiciones de humedad y temperatura ambiente. A su vez, en cada repetición la medición del peso de cada población se hizo al azar. Para el análisis estadístico se empleó un diseño en bloques completamente aleatorizados. Se calculó la variable “peso de 1000 semillas” que luego fue estadísticamente analizada.

**2.2.3. Proporción de semillas dañadas por insectos:** Al igual que en el caso de la determinación del peso de 1000 semillas, se tomaron al azar tres muestras de 100 semillas cada una del lote total de semillas recolectadas de cada población en cada

año. Se contó la cantidad de semillas perforadas que representó directamente el porcentaje de semillas dañadas. En los casos en que las semillas recolectadas fueron menores a 300 (17 % del total de combinaciones población/año) no se consideró esa población en el análisis.

### 2.3. Análisis estadísticos

La variación en la producción total de semillas, el peso de las mismas y la proporción de semillas dañadas por lepidópteros entre poblaciones y entre años fue analizada mediante un test de análisis de la variancia (ANOVA). En todos los casos se probaron previamente los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Tanto para la producción total como para la proporción de semillas dañadas se consideró un modelo factorial con interacción que se puede generalizar en la siguiente expresión:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \alpha_i \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

donde  $Y_{ijk}$  representa la observación del  $i$ ésimo nivel del factor  $\alpha$  y el  $j$ ésimo nivel del factor  $\tau$  en la  $k$ ésima repetición,  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto de la ubicación geográfica (población),  $\tau_j$  es el efecto del año analizado,  $\alpha_i \tau_j$  es el efecto de la interacción entre la ubicación geográfica y el año y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error aleatorio. En el caso de la producción total de semillas al no contarse con repeticiones no se analizó estadísticamente la interacción.

Para el análisis del peso seminal, donde se aplicó un diseño en bloques completamente aleatorizado, el modelo utilizado es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \beta_k + \alpha_i \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

donde  $Y_{ijk}$  representa la observación del  $i$ ésimo nivel del factor  $\alpha$  y el  $j$ ésimo nivel del factor  $\tau$  en el  $k$ ésimo bloque,  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto de la ubicación geográfica (población),  $\tau_j$  es el efecto del año analizado,  $\beta_k$  es el efecto del bloque,  $\alpha_i \tau_j$  es el efecto de la interacción entre la ubicación geográfica y el año y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error aleatorio. El modelo asume que la interacción entre bloques y tratamientos es despreciable (Montgomery, 1997).

La comparación de las medias se realizó utilizando el test de Scheffè, dado que se lo considera el más adecuado para datos desbalanceados. Las asociaciones entre las características seminales y variables geográficas como latitud, longitud y altitud, así como entre las distintas características seminales se estudiaron a través del coeficiente de correlación de Pearson. El mismo análisis se realizó además sólo con aquellas poblaciones en las que se contaba con semillas de los cuatro años cosechados.

Dada la distribución particular del Raulí en Argentina, la cual, como se mencionó en el Capítulo I, sigue los valles transversales de las distintas cuencas lacustres, se realizó otro análisis estadístico agrupando las poblaciones de acuerdo a su ubicación en 5 cuencas principales:

- Cuenca del Lago Hermoso: dos poblaciones
- Cuenca del Lago Lácar: nueve poblaciones
- Cuenca del Lago Lolog: tres poblaciones
- Cuenca de los Lagos Curruhue y Huechulafquen: ocho poblaciones
- Cuenca de los Lagos Tromen y Quillén: cuatro poblaciones

Se comparó la producción de semillas, el peso de las mismas y la proporción de daño por insectos tanto dentro como entre las distintas cuencas.

En función de los resultados obtenidos en el estudio de diferenciación de 20 poblaciones de la especie por medio de marcadores de ADN de cloroplasto (ver capítulo V), se analizaron adicionalmente las distintas variables tomando dos grupos de poblaciones:

Sur (16 poblaciones) = 1, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 23 y 24.

Norte (4 poblaciones) = 26, 27, 28 y 30.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SAS General Linear Models Procedure (SAS Institute Inc., 1999) con un nivel de significación del 5 % ( $\alpha = 0,05$ ) establecido “a priori”. Los cuadros de los análisis de la variancia se resumen en el apéndice IB.

### **3. Resultados**

#### *3.1. Producción de semillas*

La producción de semillas fue altamente variable entre años como así también entre las distintas ubicaciones geográficas (poblaciones), observándose desde una

producción nula de semillas (por ejemplo las poblaciones 1 y 8 en tres de los años analizados) hasta una producción de 16 millones de semillas por hectárea (población 27 en 1997) (Tabla II.2). De los cuatro años estudiados la mayor producción general de semillas se registró en 1997, aunque no todas las poblaciones tuvieron la mayor producción de semillas el mismo año. Por ejemplo, las poblaciones 1 y 12 (ambas cosechadas los cuatro años) (Fig. II.2) y las poblaciones 2 y 22 (cosechadas durante tres años), mostraron el máximo en sus producciones durante el año 1995. Además, independientemente de la fluctuación anual en la producción de semillas, algunas poblaciones siempre tuvieron una producción de semillas importante (por ejemplo las poblaciones 16 y 27). Es destacable que las poblaciones 1 y 8 tuvieron una producción

Tabla II.2: Producción estimada de semillas por m<sup>2</sup> para los distintos años analizados en todas las poblaciones de Raulí.

Población	Número de semillas/m <sup>2</sup>				Promedio
	1994	1995	1996	1997	
1	0	34	0	1	8,75
2	-	257	2	61	106,67
4	93	91	2	1224	352,50
5	153	250	3	1188	398,50
6	-	152	2	1290	481,33
7	68	25	8	97	49,50
8	0	0	1	8	2,25
9	476	62	10	-	182,67
10	7	59	183	-	83,00
11	21	111	202	-	111,33
12	27	137	126	93	95,75
13	3	102	48	-	51,00
14	233	14	135	-	127,33
16	360	405	89	467	330,25
17	-	359	97	-	228,00
18	34	173	122	-	109,67
19	-	2095	30	-	1062,50
20	46	149	2	1597	448,50
21	-	5	2	1109	372,00
22	-	32	0	27	19,67
23	-	63	20	1983	688,67
24	6	292	1	1112	352,75
25	21	344	1	-	122,00
26	30	70	12	605	179,25
27	49	306	87	1641	520,75
28	102	12	23	1086	305,75
29	-	102	0	195	99,00
30	-	64	4	341	136,33
Promedio	91,00	205.89	43.29	743.42	

-: no hay dato.

nula o escasa durante los cuatro años analizados (Fig. II.2). Más aún, similares resultados se observaron para la población 1 durante dos años más en que se intentó recolectar semillas y la producción fue nula (años 1998 y 1999).

La producción de semillas fue significativamente distinta entre años ( $P < 0.0001$ ), pero no entre los promedios poblacionales cuando los cuatro años analizados se tomaron en conjunto. El test de comparación de medias de Scheffe separa el año 1997 con la mayor producción de semillas y agrupa los tres restantes,

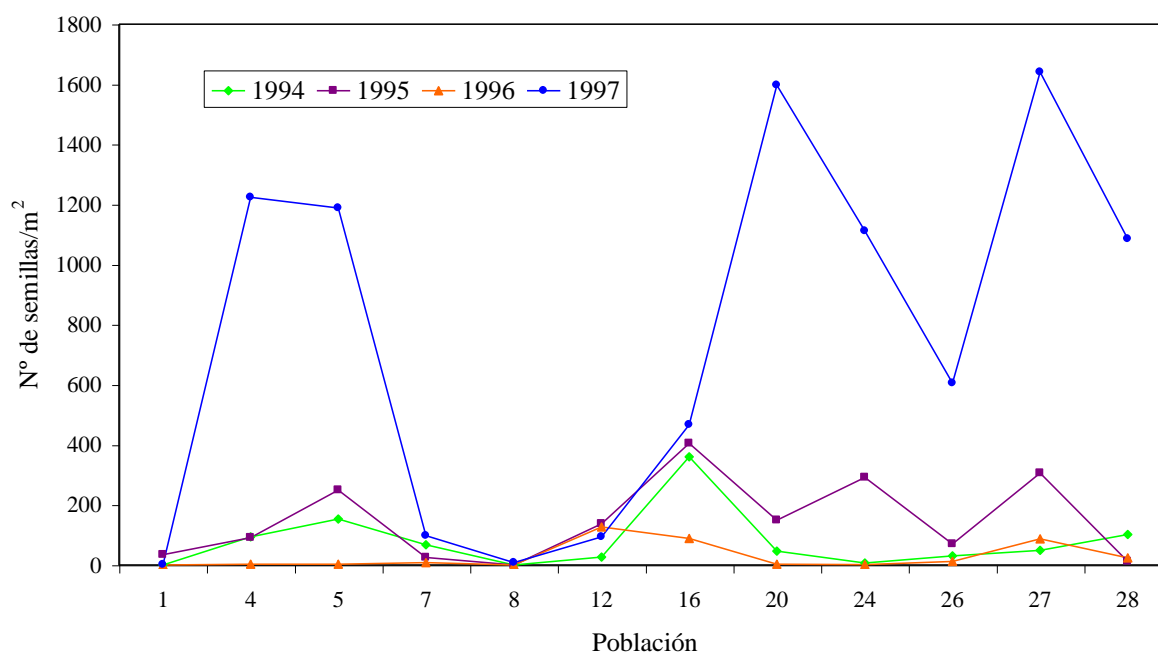


Figura II.2: Variación en la producción de semillas en doce poblaciones de *Nothofagus nervosa* cosechadas durante cuatro años consecutivos.

tanto cuando se tienen en cuenta todas las poblaciones como cuando sólo se toman las cosechadas durante los cuatro años.

Como muestra la Figura II.2, gráficamente existe una clara interacción entre los efectos del año y de la ubicación geográfica (población) sobre la producción total de semillas de las poblaciones.

### 3.2. Proporción de semillas dañadas por insectos

En todas las poblaciones se observó una alta proporción de semillas dañadas por insectos, alcanzando en algunas de ellas valores de hasta un 80 % del total de semillas producidas (Tabla II.3).

La proporción de semillas dañadas fue significativamente distinta tanto entre años como entre poblaciones ( $P < 0.0001$ ). Se detectó, además, una interacción significativa entre las poblaciones y los años para esta variable ( $P < 0.0001$ ). La apertura de esta interacción para los dos factores en cada nivel mostró diferencias significativas tanto para los años como para la mayoría de las poblaciones (una excepción fue la población 12). La mayor proporción promedio de semillas atacadas se observó en el año 1995, mientras que la menor en 1997 (Tabla II.3).

El análisis de aquellas poblaciones que se cosecharon los cuatro años consecutivos y tuvieron una cantidad de semillas suficiente como para evaluar esta variable (seis poblaciones), también mostró una interacción significativa entre poblaciones y años, así como una variación significativa entre poblaciones y entre

Tabla II.3: Proporción de semillas dañadas en los distintos años analizados en todas las poblaciones de Raulí estudiadas.

Población	Proporción de semillas dañadas (%)				Promedio
	1994	1995	1996	1997	
1	-	72,00	-	-	72,00
2	-	76,00	-	79,67	77,83
4	51,67	56,20	-	11,00	39,62
5	60,83	78,30	-	7,00	48,71
6	-	69,50	-	12,00	40,75
7	45,67	29,70	21,00	12,33	27,18
8	-	-	-	50,33	50,33
9	63,33	67,50	50,00	-	60,28
10	-	26,70	21,67	-	24,19
11	6,67	15,00	22,83	-	14,83
12	34,67	28,90	30,20	29,67	30,86
13	-	63,00	46,00	-	54,50
14	37,83	53,90	50,89	-	47,54
16	57,22	79,50	49,64	23,00	52,34
17	-	50,20	33,67	-	41,93
18	23,73	51,30	28,00	-	34,34
19	-	74,70	38,50	-	56,60
20	79,76	56,50	-	27,33	54,53
21	-	66,50	-	35,33	50,92
22	-	45,00	-	13,00	29,00
23	-	29,30	54,33	20,00	34,54
24	-	53,90	-	21,00	37,45
25	60,60	49,00	-	-	54,80
26	36,23	59,00	48,33	34,67	44,56
27	16,50	22,80	37,67	3,67	20,16
28	42,00	64,60	62,50	20,67	47,44
29	-	49,90	-	53,00	51,45
30	-	68,80	-	34,67	51,73
Promedio	41,30	53,99	39,68	27,13	

-: no hay dato.

años ( $P < 0.0001$ ) (Fig. II.3). La función de respuesta del año 1997 muestra claramente una menor cantidad de semillas dañadas. Valores extremos en la proporción de semillas dañadas fueron observados en poblaciones ubicadas en la misma cuenca lacustre (cuenca de los lagos Tromen y Quillén). Por otro lado, el análisis de aquellas poblaciones con cantidad suficiente de semillas los cuatro años evidenció que, para todos los años, la población 27 tuvo una proporción de semillas atacadas significativamente menor que las poblaciones 28, 26 y 16 ( $P < 0.0001$ ) (Fig. II.3).

En algunas poblaciones se realizaron dos cosechas durante las temporadas de caída de semillas de 1995 y 1996 (10 y 8 poblaciones respectivamente). En 1995 la proporción de semillas dañadas fue significativamente distinta entre estas dos cosechas (42,38 % en la primera cosecha y 54,35 % en la segunda,  $P < 0.0371$ ). En

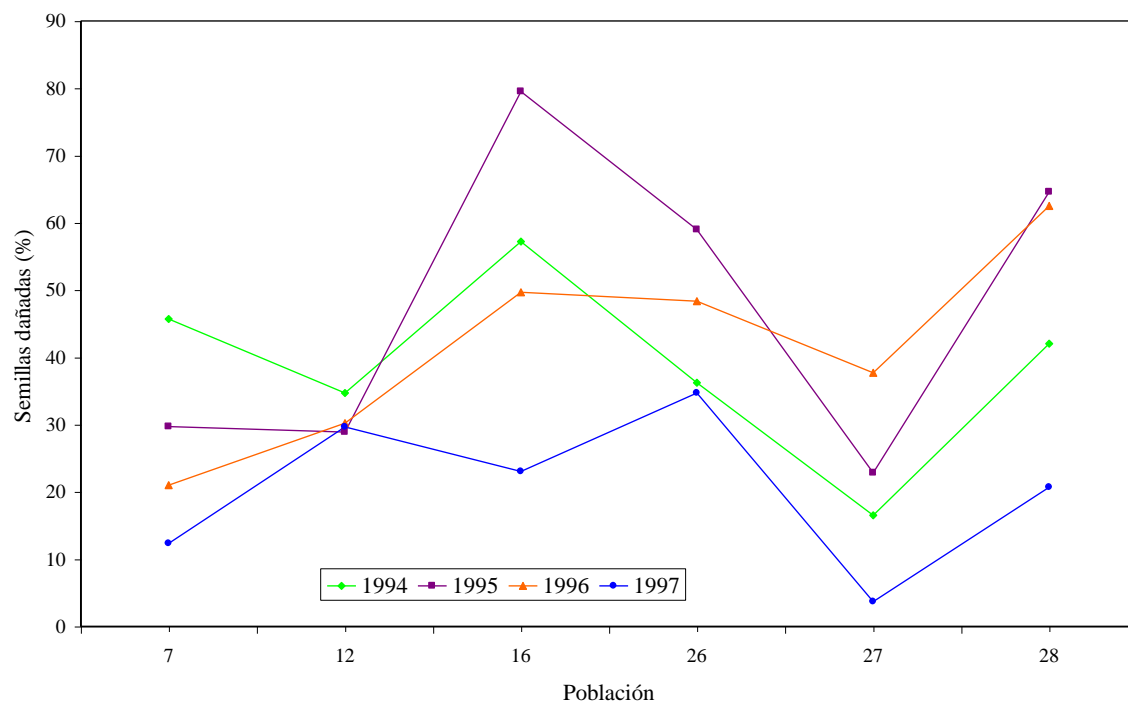


Figura II.3: Variación en el daño ocasionado por insectos en las semillas de seis poblaciones de *Nothofagus nervosa* cosechadas durante cuatro años consecutivos.

cambio, para el año 1996 no se detectaron diferencias significativas entre ambas recolecciones, aunque, al igual que en 1995, en la segunda se observó una mayor proporción de semillas dañadas.



### 3.3. Peso de las semillas

El peso de 1000 semillas varió entre 3,84 g y 11,77 g, siendo también significativamente diferente entre poblaciones y entre años ( $P < 0.0001$ ). Como en el caso de la proporción de semillas dañadas, se detectó una interacción significativa ( $P < 0.0001$ ) entre poblaciones y años, mostrando los niveles de ambos factores diferencias significativas entre sí. Entre los cuatro años cosechados las semillas más pesadas se observaron en 1997, mientras que entre las poblaciones las más pesadas resultaron ser las semillas de la población 11 (Cuenca del Lago Lácar) en los años 1994 a 1996 y las de la población 27 (Cuenca de los Lagos Tromen y Quillén) en el año 1997 (Tabla II.4).

Tabla II.4: Peso de 1000 semillas en los distintos años analizados en todas las poblaciones de Raúl estudiadas.

Población	Peso de 1000 semillas (g)				Promedio
	1994	1995	1996	1997	
1	-	4,579	-	-	4,579
2	-	6,075	-	3,844	4,960
4	6,620	8,466	-	8,954	8,013
5	6,624	7,207	-	9,405	7,745
6	-	6,749	-	7,489	7,119
7	6,819	6,152	5,680	9,267	6,979
8	-	-	-	6,346	6,346
9	7,952	8,176	7,029	-	7,719
10	-	7,314	7,203	-	7,258
11	8,032	10,820	8,328	-	9,060
12	5,503	6,983	7,825	9,400	7,427
13	-	7,519	7,454	-	7,487
14	7,707	-	7,933	-	7,820
16	5,573	6,793	6,706	8,280	6,782
17	-	8,494	8,250	-	8,372
18	5,265	5,891	6,945	-	6,034
19	-	7,746	7,460	-	7,603
20	6,874	6,845	-	8,809	7,509
21	-	-	-	9,187	9,187
22	-	6,457	-	7,592	7,024
23	-	7,760	7,323	10,061	8,382
24	7,705	6,824	-	9,150	7,893
25	6,395	5,832	-	-	6,113
26	5,839	7,887	8,142	7,822	7,422
27	8,000	7,544	7,335	11,775	8,663
28	7,101	8,244	8,279	9,676	8,325
29	-	8,274	-	8,612	8,443
30	-	7,111	-	10,123	8,617
Promedio	6,725	6,939	7,459	8,655	

-: no hay dato.

Analizando aquellas seis poblaciones cosechadas los cuatro años y con suficiente cantidad de semillas, se observó nuevamente una interacción significativa años x poblaciones así como también una variación significativa entre poblaciones y entre años ( $P < 0.0001$ ) (Fig. II.4). La función respuesta del año 1997 se distingue claramente con valores mayores en el peso de las semillas que los observados en los otros años analizados, especialmente aquellos del año 1994. Dentro de cada año cosechado, el test de Scheffè mostró diferencias significativas entre las poblaciones, variando el agrupamiento según el año.

Tanto en 1995 como en 1996, las semillas caídas en la primera cosecha fueron significativamente más pesadas que las caídas durante la segunda cosecha ( $P < 0.0063$  y  $P < 0.0001$  respectivamente).

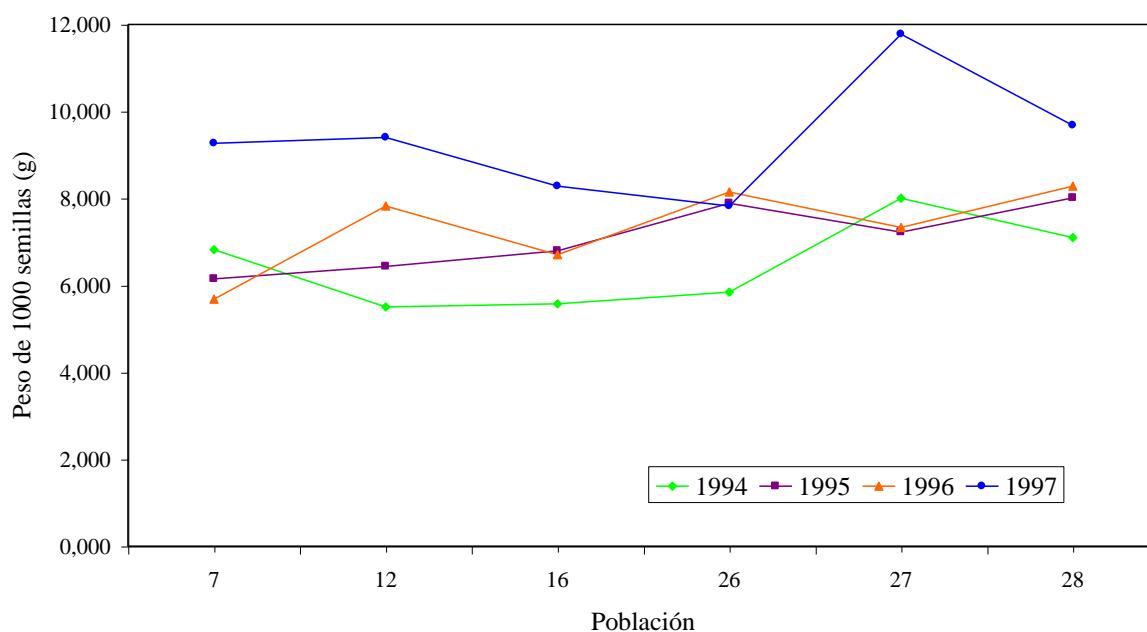


Figura II.4: Variación en el peso de las semillas en seis poblaciones de *Nothofagus nervosa* cosechadas durante cuatro años consecutivos.

#### 3.4. Asociaciones entre características seminales y con variables geográficas

Se observaron asociaciones moderadas con significación estadística ( $\alpha = 0,05$ ) entre algunas de las variables estudiadas (Tabla II.5). En el caso de la producción de semillas, se observa un coeficiente de correlación significativo y positivo, aunque muy bajo, con la longitud en 1994 y una asociación negativa con la altitud en 1995 y positiva en 1997. Entre las características seminales, esta variable se asoció negativa y significativamente con la proporción de semillas dañadas por insectos en 1996 y 1997

y positivamente con el peso de las semillas en 1997. Para las 12 poblaciones cosechadas los cuatro años, la producción media de semillas estuvo asociada positivamente con el peso de las semillas ( $\rho = 0,71$ ).

En cuanto a la proporción de semillas dañadas por insectos, se observó una correlación positiva significativa con la longitud para los años 1994, 1995 y 1996 (en 1994 con  $\alpha = 0,1$ ), mientras que para 1997 esta variable se asoció significativa y negativamente con la altitud y con el peso de las semillas (Tabla II.5).

Tabla II.5: Coeficientes de correlación de Pearson entre las distintas variables.

Año	Variable	Latitud	Longitud	Altitud	Peso de 1000 semillas	Semillas Dañadas
1994	Producción <sup>(19)</sup>	0,17	0,47*	-0,24	0,15	0,39
	Semillas dañadas <sup>(14)</sup>	0,14	0,47	0,29	-0,15	-
	Peso de 1000 semillas <sup>(14)</sup>	-0,12	-0,10	-0,08	-	-
1995	Producción <sup>(28)</sup>	0,03	0,12	-0,41*	0,05	0,25
	Semillas dañadas <sup>(28)</sup>	0,17	0,55*	-0,01	-0,32	-
	Peso de 1000 semillas <sup>(25)</sup>	-0,20	-0,30	-0,34	-	-
1996	Producción <sup>(28)</sup>	0,18	-0,22	-0,35	0,28	-0,55*
	Semillas dañadas <sup>(15)</sup>	-0,48	0,51*	0,35	0,28	-
	Peso de 1000 semillas <sup>(15)</sup>	-0,38	-0,09	-0,07	-	-
1997	Producción <sup>(19)</sup>	-0,30	-0,20	0,59*	0,52*	-0,52*
	Semillas dañadas <sup>(18)</sup>	0,11	0,34	-0,76*	-0,70*	-
	Peso de 1000 semillas <sup>(18)</sup>	-0,49*	-0,52*	0,63*	-	-
Promedios poblacionales	Producción <sup>(28)</sup>	-0,20	0,002	0,003	0,35	-0,00
	Semillas dañadas <sup>(28)</sup>	0,24	0,64*	-0,09	-0,48*	-
	Peso de 1000 semillas <sup>(28)</sup>	-0,54*	-0,44*	0,02	-	-

Los números entre paréntesis indican el número de poblaciones analizadas. Entre variables, se utilizó el menor número de poblaciones. \*  $P < 0,05$ .

Finalmente en el caso del peso de las semillas se detectó una asociación significativa y positiva con la altitud y una correlación negativa con la latitud y la longitud para las semillas recolectadas durante el año 1997 (Tabla II.5).

Tomando los promedios poblacionales para los cuatro años analizados se observó una correlación significativa y positiva entre el daño ocasionado por insectos y la longitud y correlaciones negativas entre el peso de las semillas y la latitud, la longitud y el daño ocasionado por insectos (Tabla II.5).

### 3.5. Comparaciones entre y dentro de las cuencas lacustres

No se observaron diferencias significativas en la producción de semillas entre las cuencas lacustres analizadas. Dentro de las cuencas se detectaron diferencias significativas sólo entre las poblaciones de la cuenca del Lago Lácar ( $P < 0.0268$ ).

Similares resultados se obtuvieron para la proporción de semillas dañadas por insectos, ya que no hubo diferencias entre cuencas. Sin embargo, dentro de las cuencas de los lagos Lácar ( $P < 0.0001$ ), Lolog ( $P < 0.0330$ ) y Tromen-Quillén ( $P < 0.0001$ ) el porcentaje de semillas atacadas fue significativamente distinto entre las poblaciones, encontrándose las poblaciones más atacadas hacia el oeste.

En cambio, el peso de las semillas fue significativamente distinto entre cuencas ( $P < 0.0001$ ). A su vez, las semillas producidas en 1997 fueron más pesadas que aquellas producidas en los otros años en todas las cuencas estudiadas. Dentro de las cuencas hubo diferencias significativas entre las poblaciones de las cuencas de los lagos Lácar ( $P < 0.0001$ ), Lolog ( $P < 0.0001$ ) y Huechuelafquen-Curruhue ( $P < 0.0002$ ).

El análisis de los dos grupos de poblaciones portadores de distintos haplotipos de cloroplasto denotó diferencias significativas en el peso de las semillas pertenecientes a ambos grupos, siendo significativamente más pesadas aquellas de las poblaciones del grupo Norte ( $P < 0.0012$ ). Las variables producción de semillas y daño ocasionado por insectos no mostraron diferencias.

## 4. Discusión

### 4.1. Producción de semillas

La producción de semillas está afectada por todos los factores intrínsecos y extrínsecos que de alguna manera influyen en los procesos del desarrollo seminal (floración, polinización, fertilización, maduración de la semilla). En estos procesos, tanto la influencia ambiental biótica y abiótica (predadores, clima, suelo) como la constitución genética de la población ejercen un rol fundamental en la cantidad y calidad de las semillas.

En el género *Nothofagus*, como en la mayoría de las especies arbóreas, la producción anual de semillas es variable. Los años se suelen clasificar como extraordinarios (“full”), abundantes (“partial”) y escasos (“poor”) de acuerdo a la cantidad de semillas caídas (Wardle, 1984). Este autor considera para especies del género *Nothofagus* de Nueva Zelanda que un año es extraordinario cuando la

producción de semillas supera las 4.000 semillas/m<sup>2</sup>. Sin embargo, de acuerdo a Ledgard & Cath (1983), las semillas producidas por la mayoría de las especies de Nueva Zelanda son más livianas que las producidas por *Nothofagus nervosa*. Las especies nativas de *Nothofagus* que tienen semillas más livianas producen cantidades mayores de semillas, como por ejemplo *N. dombeyi* (Burschel et al., 1976). En base a esto, se podría considerar que para *N. nervosa* un año de producción extraordinaria debería tener un límite inferior menor que el descrito para especies de Nueva Zelanda.

Estos años de producción extraordinaria ocurren, en Nueva Zelanda, cada 4 a 6 años, pero este intervalo es variable pudiendo en ocasiones alcanzar períodos de 11 años (Wardle, 1984). En Sudamérica, la producción de semillas se estudió en algunas especies en Chile (*N. nitida*, *N. glauca*, *N. dombeyi*, *N. pumilio*, *N. obliqua* y *N. nervosa* = *N. alpina*). Aunque en la mayoría de los casos se analizaron no más de cuatro años generalmente en una única zona o población, en todas las especies la producción de semillas fue variable y se observaron temporadas de buena producción cada dos años, excepto en *N. obliqua* donde este intervalo sería de tres años (ver Donoso, 1993). En *N. pumilio*, estudios realizados durante dos años revelaron fluctuaciones entre años y entre poblaciones, tanto en Chile (Schlegel et al., 1979) como en Argentina (Rusch, 1987). Con respecto a *N. nervosa*, resultados de cuatro años sobre una única población en Chile sugieren una producción de semillas abundante cada dos años (Burschel et al., 1976).

Hasta el momento no se habían realizado estudios de covariación temporal y geográfica en la producción de semillas en especies nativas de este género. Se podría decir, de los resultados presentados aquí, que *N. nervosa* tiene una producción de semillas abundante cada dos años. El año 1997 (743,42 semillas/m<sup>2</sup>) podría ser considerado como un año extraordinario, dado que la cantidad de semillas producidas fue varias veces superior a la de los otros años analizados, e incluso más de tres veces mayor que la producción de 1995 (205,89 semillas/m<sup>2</sup>) el cual podría ser considerado como un año de buena producción. Los años 1994 y 1996 deberían considerarse como de producción escasa (90,00 y 43,29 semillas/m<sup>2</sup> respectivamente). Por otro lado, en 1998 nuevamente ocurrió una producción escasa de semillas, como se observó en recorridas a campo (datos no mostrados), confirmando esta periodicidad bianual.

La periodicidad observada en la producción de semillas no fue una regla general para todas las poblaciones analizadas. Algunas de ellas tuvieron su máximo

de producción en 1996 y otras en 1994, años de producción general escasa. Por otro lado, algunas poblaciones tuvieron una producción de semillas relativamente constante, independientemente del año (por ejemplo las poblaciones 7 y 12 de la cuenca del Lago Lácar). Esto podría deberse tanto a calidad del sitio como a características genéticas.

Al considerar la variación geográfica debe tenerse en cuenta que el área de distribución del Raulí en Argentina es muy reducida. Por ende, desde este punto de vista, la variación fenotípica en una característica dada debería ser baja y, por lo tanto, no es esperable una correlación fuerte con variables geográficas, tal como se observó en este trabajo. Las poblaciones del límite sur de distribución de la especie en Argentina (poblaciones 1 y 2 de Lago Espejo y Lago Villarino respectivamente), tuvieron en general una baja, o en algunos años nula, producción de semillas así como una alta proporción de daño y un bajo peso. Si bien se ha observado regeneración natural en la población de Lago Espejo, los renovales tendrían entre 5 y 10 años, sugiriendo un intervalo mayor entre los años de producción abundante de semillas que el registrado en las otras poblaciones. La escasa o nula producción de semillas de estas poblaciones marginales y el ciclo de producción más extendido podrían indicar condiciones ambientales no tan propicias. En general se podría concluir que la producción cíclica de semillas es una estrategia de la especie que responde principalmente a factores macroambientales y que es modificado localmente tanto por factores ambientales como por la constitución genética de la población.

#### **4.2. Daño en las semillas**

Las semillas del género *Nothofagus* son consumidas por lepidópteros del género *Perzelia*. El ciclo de vida de este insecto está en estrecha relación con el ciclo reproductivo de las especies de *Nothofagus*. La oviposición ocurre en las flores femeninas durante las primeras semanas de noviembre. La larva crece dentro de la semilla, consumiendo todo su contenido y, al final del verano, emerge de la semilla vacía a través de un pequeño orificio (~ 1 mm de diámetro) en su superficie. Finalmente, se deja caer al suelo donde entra en el período de pupa (Cruz, 1981).

En la mayoría de las poblaciones analizadas en el presente trabajo se observó una altísima proporción de semillas dañadas que alcanzó hasta un 79,7 % del total de semillas producidas. La mayor proporción de semillas dañadas se observó en 1995, detectándose diferencias significativas entre las poblaciones. La variación en el

porcentaje de semillas perforadas no ha sido estudiada en *N. nervosa* y, dentro del género, existen pocos trabajos (Rusch, 1987; Premoli, 1991). En Chile, observaciones en una población de Raulí mostraron porcentajes de semillas dañadas de 92,8 % (Burschel et al., 1976) y 61,72 % (Cruz, 1981). Sin embargo, la variación entre poblaciones y entre distintos años no fue estudiada.

Según Donoso (1993), el daño causado por insectos es más intenso en años de escasa producción de semillas, lo cual ha sido asociado con la periodicidad en la producción de semillas. La población de insectos aumenta en años de producción abundante de semillas y causa un daño mayor sobre una baja cantidad de semillas al año siguiente (dinámica “crash and burst”). Sin embargo, a pesar de que la producción de semillas es uno de los factores limitantes que regulan la proporción de semillas consumidas, existen otros factores como la tasa reproductiva del insecto, el clima, la presencia de enemigos naturales y factores inherentes a la genética de la coevolución de ambas especies, que también podrían estar ejerciendo una influencia. Cruz (1981) observó que una hembra del género *Perzelia* en condiciones de laboratorio, ovipone aproximadamente 120 huevos. Podría decirse que, en años de producción “extraordinaria” de semillas, el insecto no tendría la capacidad de consumir toda la producción de semillas dado que su tasa de crecimiento intrínseca se vería excedida por la cantidad de semillas (Silvertown, 1987).

Según los resultados presentados aquí, el año 1995 podría ser considerado como de producción abundante, sin embargo, la proporción de semillas consumidas fue la más alta. Esto no es lo esperado de acuerdo a la dinámica “crash and burst” mencionada más arriba. La producción de semillas en 1994, aunque menor, podría no necesariamente ser el factor limitante para la tasa de crecimiento intrínseca del insecto. Esto podría explicar el aumento en la proporción de semillas dañadas en 1995. Por otro lado, esta proporción disminuyó en 1996, un año de producción escasa de semillas, sugiriendo la influencia de otros factores diferentes a la producción de semillas como, por ejemplo, el clima. Las condiciones climáticas previas, es decir las de 1995, fueron inusuales dado que se produjeron grandes nevadas durante el invierno mientras que la primavera fue más calurosa y seca que los valores típicos<sup>2</sup>. Estas condiciones climáticas particulares pueden haber causado una mortalidad importante

---

<sup>2</sup> Promedio de precipitaciones (1981-1996): invierno: 124,6 mm, primavera: 42,08 mm  
Promedio de 1995: invierno: 202,9 mm. Primavera: 22,8 mm.  
Promedio temperaturas (1981-1996): primavera: 8,5 °C. Promedio 1995: 10,2 °C.

en la población de insectos y por lo tanto un ataque menor en 1996. En 1997, un año de producción “extraordinaria” la proporción de semillas consumidas fue considerablemente menor. Esto sigue el patrón general discutido antes para las especies de producción cíclica como las del género *Nothofagus*. En este caso el factor limitante para la proporción de semillas dañadas no sería la producción de semillas sino la cantidad de hembras en la población del insecto y el tamaño de su postura. Un número reducido de hembras debido a la baja producción de semillas durante 1996 y, como consecuencia, un reducido número de huevos, podrían haber llevado a una considerablemente baja proporción de semillas dañadas en un año de producción “extraordinaria” (1997).

La variación en la proporción de semillas dañadas en relación a la producción de semillas pudo ser también verificada entre poblaciones dentro de un mismo año. En 1995, las poblaciones 26 y 28 tuvieron una baja producción de semillas y una alta proporción de éstas dañadas. En 1997, la mayor proporción de semillas dañadas se observó también en aquellas poblaciones con menor producción de semillas (poblaciones 2 y 8). Aunque en algunas poblaciones la proporción de semillas dañadas permaneció relativamente constante durante los cuatro años estudiados (por ejemplo la población 12 de la cuenca del Lago Lácar, de producción de semillas constante), en otras se observó una reducción significativa durante 1997. En las poblaciones 4 y 5, por ejemplo, el porcentaje de semillas consumidas disminuyó de 60% en 1995 a 10 % en 1997.

En cuanto a los factores climáticos, la proporción de semillas dañadas parece estar asociada con la precipitación, dado que se observó una correlación positiva baja, pero significativa con la longitud<sup>3</sup>. Esta relación no se encontró al analizar el año de producción de semillas “extraordinario” (1997). Una posible explicación es que la gran cantidad de semillas producidas en todas las poblaciones diluya la variación inherente a la densidad relativa de la población de insectos y, en consecuencia, la variación en el daño. Es interesante destacar que poblaciones pertenecientes a la misma cuenca lacustre, como por ejemplo las poblaciones 27 y 28 (cuenca de los lagos Tromen-Quillén), se encontraron en extremos opuestos cuando se comparó la

---

Datos de la estación meteorológica del INTA EEA Bariloche.

<sup>3</sup> Cabe aclarar que el mismo resultado se observa al analizar directamente la precipitación media anual (datos no mostrados), pero la menor precisión de los datos tomados de cartas con la variación que



proporción de semillas dañadas. Sin embargo, a pesar de estar muy próximas, la precipitación media anual es diferente. Mientras que en la población 27 la precipitación no alcanza los 2000 mm anuales y la proporción de semillas dañadas es en promedio del 20,16 %, en la población 28 excede los 2500 mm anuales teniendo en promedio, 47,44 % de semillas perforadas por insectos.

La pérdida de semillas por el daño ocasionado por insectos es muy importante en la producción total, especialmente considerando que entre las semillas no dañadas, una alta proporción puede no ser viable. La proporción de semillas llenas observadas en una muestra de cinco poblaciones cosechadas durante 1995, fue menor al 16 %. Ensayos de germinación realizados con semillas no dañadas de árboles individuales cosechados durante 1994 en la cuenca del Lago Lácar mostraron una capacidad germinativa promedio de 18 %. Algunas de las semillas que no germinaron tenían el embrión formado (Breitembücher, 1998). La capacidad germinativa promedio entre las poblaciones cosechadas durante 1997 fue de 56,6 % (Izquierdo, informe interno), sugiriendo que un año de gran producción de semilla coincide con una capacidad germinativa alta. Esto también fue reportado para Raulí por Burschel et al. (1976) y en especies de Nueva Zelandia por Wardle (1984). Una cantidad importante de genotipos se pierde durante la germinación por los efectos de la selección natural, especialmente aquellos en bajas frecuencias. De los resultados presentados más arriba se puede decir que las semillas de años de escasa producción tienen una capacidad germinativa menor que las semillas de años de producción abundante o “extraordinaria”. Por lo tanto, en años de escasa producción, la pérdida de genotipos es aún mayor dado que a las pocas semillas producidas las afecta una mayor proporción de semillas dañadas y las no dañadas poseen una capacidad germinativa menor. En conclusión, la cosecha de semillas en años de producción abundante o, mejor aún, “extraordinaria” va a representar mejor la estructura genética de la población. Esto es de gran importancia al recolectar material para estudios de variación genética así como para programas de mejoramiento y de forestación.

### **4.3. Peso de las semillas**

---

implica el paisaje de tipo montañoso, sugieren que los registros de longitud tomados con GPS son más confiables.

El peso de las semillas fue significativamente diferente entre las poblaciones, algunas de las cuales mostraron una tendencia a producir semillas más pesadas. Por ejemplo, la población 11 de la cuenca del Lago Lácar tuvo, en los tres años que fue cosechada, las semillas más pesadas entre todas las poblaciones. Cuando se analizó la variación de cada población en los distintos años, se observó, aunque con algunas excepciones, que a mayor producción mayor era el peso de las semillas. Si se consideran los promedios anuales del peso de semillas, el año de producción “extraordinaria” (1997) presenta las semillas más pesadas.

La mayor proporción de semillas llenas (y su viabilidad) en años de mayor producción de semillas (por ejemplo en Raulí, Burschel et al., 1976; en *Nothofagus* de Nueva Zelandia, Wardle, 1984) sugiere un peso en las semillas mayor para estos años, debido a una cantidad menor de semillas vacías. Esto coincide con lo observado en el presente trabajo donde el peso de las semillas fue significativamente mayor en las semillas del año de producción extraordinaria. Se ha observado que en *Nothofagus nervosa* esta variable está también relacionada positiva y significativamente con la capacidad germinativa (Breitembücher, 1998).

A pesar del área de distribución reducida de *Nothofagus nervosa* en Argentina, se observó una correlación negativa baja, pero significativa, entre el peso de las semillas y la latitud. En Chile, en un análisis de un solo año de cosecha, se obtuvo una asociación similar encontrándose una “disminución gradual” en el peso de las semillas de norte a sur (Werner, 1987 cit. en Donoso, 1987). Correlaciones entre estas dos variables fueron observadas en otras especies de *Nothofagus* (por ejemplo *N. obliqua* (Donoso, 1979) y *N. dombeyi* (Ordoñez, 1986 cit. en Donoso, 1987)). Dado que las condiciones climáticas son más secas hacia el norte de la distribución de Raulí, un peso seminal mayor implica más reservas de carbohidratos lo cual permite un rápido crecimiento de la raíz en las plántulas con posibilidades de contacto temprano con zonas de humedad adecuadas en el suelo (Donoso, 1987). Se ha reportado en numerosas especies un mayor peso seminal en relación a un aumento de las condiciones de aridez (Baker, 1972; Wright, 1976) así como también en asociación con la duración de la estación de crecimiento (Aizen & Woodcock, 1992). Un tamaño mayor de las semillas confiere, por lo tanto, una mejor adaptación a condiciones de humedad más rigurosas, como las que se observan en el límite norte de la distribución y en aquellas poblaciones hacia el Este.

La distribución del Raulí en Argentina tiene un rango altitudinal pequeño (650 – 1100 m snm). En la recolección de 1997 se observó una correlación positiva significativa entre el peso de las semillas y la altitud. Sin embargo, como en este trabajo no se tomaron transectas altitudinales no se pueden hacer más especulaciones en este sentido. En dos transectas altitudinales de *N. obliqua* analizadas en Chile, el peso de las semillas disminuyó de altas a bajas altitudes (Donoso, 1979). En especies de nueva Zelandia no se encontró una correlación entre el peso de las semillas y la altitud (Ledgard & Cath, 1983); sin embargo, como en el presente trabajo, otras variables geográficas (latitud y longitud) podrían haber influido en los resultados.

#### 4.4. Variación entre y dentro de cuencas

Los resultados obtenidos demuestran, en general, una gran variación dentro de las cuencas, a veces mayor que entre las mismas. Esta gran variación se detectó principalmente en el daño ocasionado por insectos, donde la asociación de esta variable con la longitud denotó una mayor variación en este sentido (dentro de cuencas) que en el latitudinal (entre cuencas). La gran diferencia en esta variable encontrada entre las poblaciones 27 y 28 de la cuenca de los lagos Tromen y Quillén, es un ejemplo de esta variación interna.

La comparación de los dos grupos de poblaciones pertenecientes a las zonas norte y sur determinadas por los marcadores de ADN de cloroplasto (ver Capítulo V), marcan una diferencia significativa entre ambos grupos en el peso de las semillas. Estos resultados coinciden con la diferenciación genética detectada con los marcadores moleculares e isoenzimáticos y será discutida en conjunto en el capítulo final.

Asimismo, la gran variación entre las poblaciones dentro de las cuencas lacustres coincide con los resultados obtenidos con marcadores isoenzimáticos y se retomará su discusión en el Capítulo VI.

#### 4.5. Consideraciones finales

En los años de producción abundante de semillas el número efectivo de la población (número de individuos que participan en el proceso reproductivo) es mayor, sugiriendo una mejor representatividad de la variación genética de la población adulta en la generación seminal. A su vez, en dichos años la calidad de las semillas es

mayor, dado el menor porcentaje de daño por insectos y el mayor peso con su consecuente mayor capacidad germinativa. Por lo tanto, las semillas recolectadas en los años de producción abundante constituyen el material más adecuado para estudios de variación genética así como también para ensayos de procedencias y prácticas de vivero. Más aún, los resultados obtenidos de la primera y segunda cosecha tanto para 1995 como para 1996 mostraron que las primeras semillas que cayeron tuvieron un menor porcentaje de daño por insectos y un mayor peso. Dado que en Raulí el peso de las semillas está fuertemente relacionado con la capacidad germinativa (Breitembücher, 1998), las semillas obtenidas durante los primeros 30 días del período de caída deben tener una calidad significativamente superior. Esto concuerda con lo observado en especies de este género en Nueva Zelandia (Wardle, 1984). Esta información es importante no sólo por sus consecuencias comerciales en las prácticas de vivero, sino que también debe tenerse en cuenta cuando se llevan a cabo estudios de variación genética y de genética de poblaciones.

La gran covariación temporo-espacial observada y los patrones generales detectados, con las particularidades de cada caso que han sido discutidas, sugieren que las características seminales analizadas expresan adaptaciones de la especie tanto a su ubicación geográfica particular (de cada población) como a las condiciones climáticas. La composición diferencial de progenitores de cada año inferida por la periodicidad en la producción de semillas y por las observaciones realizadas a campo, sugiere una variación anual en la contribución gamética que originará cada generación seminal. Esto tiene también importancia adaptativa en relación con la permanencia de las semillas en el banco seminal del suelo. La acumulación en los diferentes años de distintos genotipos en este banco de semillas representaría una estrategia adaptativa importante dado que constituye una reserva de variabilidad genética disponible para cada población en particular y para la especie en general. La importancia y consecuencias evolutivas de estas características seminales se discutirán en conjunto con los datos isoenzimáticos y moleculares en el Capítulo VI.

## Capítulo III

### Análisis genético de las variantes isoenzimáticas

#### 1. Introducción

La expresión diferencial de características fenotípicas que puede ser inequívocamente relacionada con diferencias en el genotipo que las controla, implica que dichas características están bajo un control genético completo y se las denomina *características genéticas* (Bergmann, 1991). Para inferir la presencia del gen que controla una característica, se requiere tanto conocer el efecto del gen en el fenotipo como tener la percepción inequívoca del gen a partir de la expresión de una característica fenotípica. El uso de estas características genéticas como *marcadores génicos* requiere el conocimiento de esta relación bidireccional entre el fenotipo y cada uno de los genes involucrados en su expresión (Hattemer, 1991a). Las variantes moleculares de las enzimas (isoenzimas) se comportan generalmente como características genéticas dado que no varían con el ambiente.

Antes de proseguir, es conveniente establecer algunas definiciones. Según Bergmann (1991):

- **Sistema enzimático:** moléculas proteicas presentes en distintos organismos que tienen la misma función catalítica y que pueden estar codificadas por distintos loci.
- **Isoenzimas:** variantes estructurales de un sistema enzimático detectadas mediante electroforesis.
- **Aloenzimas:** isoenzimas codificadas por distintos alelos de un mismo gen.
- **Zimograma:** patrón electroforético de las isoenzimas visualizado por tinción histoquímica.

#### 1.1 Bases moleculares y bioquímicas de la variación isoenzimática

La mayoría de los cambios en la secuencia nucleotídica del ADN induce cambios en la secuencia de aminoácidos del polipéptido que codifica (Bergmann, 1991). Estas alteraciones, generalmente sustituciones, pueden llevar a un cambio en la carga neta o, menos frecuentemente, en la conformación de las moléculas enzimáticas resultantes, dando origen, por lo tanto, a cambios en su movilidad relativa en la

electroforesis. Como resultado de estas alteraciones se producen distintos alelos en un locus. En organismos diploides, como las especies arbóreas, cada cromosoma homólogo tendrá un alelo y el individuo podrá ser *homocigota* para uno u otro alelo si ambos cromosomas tienen la misma variante, o *heterocigota* si cada homólogo lleva un alelo distinto. Mientras que los homocigotas codifican sólo un polipéptido, el heterocigota tiene ambos. Las enzimas resultantes difieren en su movilidad electroforética y se definen como *aloenzimas*. En base a la estructura cuaternaria del sistema enzimático, el número de aloenzimas en individuos heterocigotas varía: las enzimas *monoméricas* tienen dos aloenzimas, las *diméricas* tres, las *tetraméricas* cinco. Las bandas adicionales que se forman y que presentan una movilidad relativa intermedia entre las aloenzimas de movilidad idéntica a la de los homocigotas se denominan *bandas híbridas*, ya que poseen ambos polipéptidos (Fig. III.1).

Existen dos grupos de enzimas según su función metabólica: Grupo I: enzimas que actúan en el metabolismo primario y que tienen generalmente un único sustrato; Grupo II: enzimas del metabolismo secundario o de función desconocida, con acción catalítica sobre más de un sustrato (Bergmann, 1991). Estas enzimas difieren en su grado de variación genética, siendo las del grupo I menos variables (esto se discutirá con mayor detalle en el Capítulo IV, en relación a los resultados de variación genética en poblaciones de Raúlí).

La explicación del origen de la variación isoenzimática mencionada arriba (Fig. III.1) está basada en una línea teórica de razonamientos en la cual un locus génico presenta variación alélica, que se expresa en variación polipeptídica observable en un zimograma a través de la detección de diferentes aloenzimas. Sin embargo, la secuencia que normalmente sigue un investigador es la opuesta, dado que se obtiene un zimograma y se desconocen las bases genéticas que generan los patrones de bandas observados. Por este motivo, es muy importante realizar el *análisis genético* para determinar qué isoenzimas en el zimograma están especificadas por alelos de un mismo locus génico y son, por ende, aloenzimas, y cuales están especificadas por genes no alélicos y son sólo isoenzimas (Bergmann, 1991).

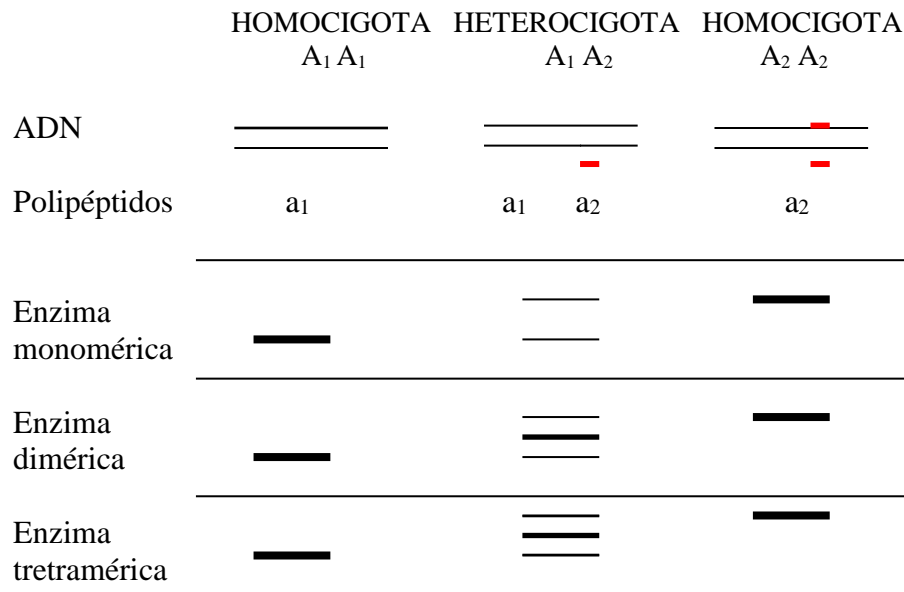


Figura III.1: Esquema de las relaciones entre los estados alélicos de un locus génico con dos variantes ( $A_1$  y  $A_2$ ), los polipéptidos que se sintetizan y los patrones electroforéticos de las diferentes aloenzimas formadas. Se muestran los distintos patrones de bandas según la enzima tenga una estructura monomérica, dimérica o tetramérica (modificado de Bergmann, 1991).

## 1.2 Ventajas y desventajas de las isoenzimas como marcadores génicos

Las isoenzimas presentan numerosas propiedades que las convierten en marcadores muy útiles para estudios genéticos. Bergmann (1991) y Hattemer (1991a) resumen las siguientes ventajas y desventajas de este tipo de marcador génico:

- \* Los patrones isoenzimáticos de la mayoría de los sistemas son independientes de la variación ambiental, una excepción la constituyen las peroxidasas.
- \* Las isoenzimas presentan, en general, penetrancia completa, sin efectos pleiotrópicos ni interacciones epistáticas.
- \* La mayoría de los patrones isoenzimáticos son ontogenéticamente estables.
- \* Las aloenzimas son generalmente expresadas en forma codominante, permitiendo la distinción entre individuos homocigotas y heterocigotas.
- \* El análisis isoenzimático sólo requiere muestras pequeñas de tejido. Esto permite el estudio de la siguiente generación en la etapa seminal, ahorrando tiempo en experimentos de cruza controladas y permitiendo realizar inferencias sobre el sistema de apareamiento.

- \* La información previa existente sobre la estructura cuaternaria de muchas enzimas facilita el reconocimiento de los estados homocigota y heterocigota en un locus génico.
- \* Muchos sistemas enzimáticos están codificados por varios loci, cuyos productos se pueden observar en un mismo gel.
- \* La mayor similitud en la tasa de migración de las aloenzimas, en relación a las isoenzimas, permite asignar en forma relativamente fácil las “zonas de actividad” de un zimograma a distintos loci génicos.
- \* Aparentemente, los loci enzimáticos no afectan drásticamente la viabilidad o el comportamiento reproductivo de los individuos.
- \* Si bien la mayoría de los loci estructurales que codifican enzimas son monomórficos o poseen un alelo muy común y varios alelos poco frecuentes, existen numerosos loci que presentan varios alelos con frecuencias intermedias (Lewontin, 1985). Esto permite detectar niveles considerables de polimorfismo.
- \* En general, los loci polimórficos poseen más de dos alelos.
- \* La bibliografía sobre la aplicación de las isoenzimas como marcadores génicos es muy abundante y puede servir como base para la comparación en especies relacionadas.
- \* La posibilidad de “correr” muchas muestras en un mismo gel es una ventaja en estudios de genética poblacional. Asimismo, el corte del gel en fetas permite analizar al mismo tiempo, y en los mismos individuos, distintos sistemas enzimáticos.
- \* El costo y el esfuerzo que requiere la técnica de electroforesis isoenzimática es razonable.

Entre las desventajas y limitaciones que se han encontrado a estos marcadores se pueden mencionar dos de relativa importancia:

- \* Los loci enzimáticos que pueden ser identificados por medio de electroforesis comprenden sólo una pequeña muestra no aleatoria de todos los genes estructurales presentes en el genoma de una especie, dado que no se incluyen otras proteínas, como proteínas estructurales por ejemplo. Esto



puede llevar a una estimación sesgada de la diversidad genética y la heterocigosis. Asimismo, según las enzimas que se utilicen en un estudio (grupo I o II), puede existir una sobreestimación o subestimación de la variación genética.

- \* De las sustituciones nucleotídicas que ocurren en el ADN, sólo aproximadamente un 30% origina un cambio en la secuencia de aminoácidos que cambia la carga neta del polipéptido, con la consecuente modificación de su movilidad electroforética y posibilidad de detección.

Por otro lado, se han encontrado dificultades en la interpretación de los zimogramas de algunas enzimas (Hattemer, 1991a):

- \* Presencia de *bandas múltiples*: los alelos de ciertos loci que codifican para IDH, LAP, 6PGDH y fosfatasa ácida en coníferas se observan como bandas dobles o triples (en el caso de 6PGDH).
- \* *Superposición de zonas*: se han observado excepciones a la regla general de mayor similitud de migración entre aloenzimas que entre isoenzimas, con la consecuente superposición de zonas que dificulta la asignación de la variación en una zona a la variación genética de un locus génico.
- \* *Interacciones entre genes*: en algunos sistemas los productos de diferentes loci forman *isoenzimas heterodímeras interlocus*, dificultando la interpretación de los zimogramas y la determinación de diferentes zonas.
- \* *Alelos nulos*: estos alelos codifican para enzimas con actividad reducida o nula *in vivo*, *in vitro* o en ambas situaciones. Dado que estos alelos son recesivos, en el caso de analizar tejido diploide, un individuo heterocigota tendrá el mismo fenotipo que el homocigota para el alelo activo, permaneciendo indetectable el alelo nulo. Esto lleva a una subestimación de la proporción de heterocigotas en una población. Más aún, la homocigosis para un alelo nulo podría ser letal, y por ende no ser detectada mediante esta técnica.

Las dificultades mencionadas más arriba resaltan la importancia y necesidad de realizar el *análisis genético* de las isoenzimas para su utilización como *marcadores génicos*, evitando de este modo interpretaciones equivocadas de la variación observada.

### 1.3. Principios básicos del análisis genético

El análisis genético de la variación fenotípica observada se remonta a los trabajos de Mendel (1866) y su metodología sigue aún en vigencia. Se pueden establecer cinco pasos principales en el procedimiento de análisis genético de una característica (Hattemer, 1991a):

1. *Control genético*: Debido a que sólo unas pocas características se expresan en forma totalmente independiente del ambiente, el primer paso es establecer si la característica en estudio se encuentra bajo estricto control genético. Para ello es importante que la característica en cuestión posea variación. Sólo las características variables permiten tomar decisiones sobre su grado de control genético. También es importante determinar la *estabilidad ontogenética* del carácter, ya que una condición necesaria para identificar inequívocamente a un individuo como portador de cierto gen es que éste exprese siempre el mismo fenotipo.
2. *Análisis del tipo de variación*: la distribución discreta de la característica genética en estudio indica un número bajo de genes controlándola, poca influencia ambiental o ambas cosas.
3. *Estudio de individuos relacionados por descendencia*: el control genético se manifiesta cuando diferentes genes se transmiten de los padres a la descendencia. No se puede inferir la herencia de un gen si entre los individuos estudiados no existe algún grado de parentesco que permita cierta asociación esperada de genes para poder formular las correspondientes hipótesis de segregación Mendeliana.
4. *Inferencia del modo de transmisión*: la transmisión materna o paterna de algunas características (especialmente aquellas codificadas en las organelas) puede ejercer influencias en la distribución de fenotipos.
5. *Inferencia del modo de acción génica*: el fenotipo es producto de la interacción de todos los genes activos desde la transcripción hasta la expresión de la característica. Por lo tanto, los efectos fisiológicos de la actividad de un único gen no pueden ser medidos en forma aislada, sino integrados con el resto del genoma.

Este procedimiento brinda información sobre el *modo de herencia*, es decir el modo de transmisión y el modo de acción génica. El conocimiento del modo de

herencia junto con el grado de control genético constituye la información más completa sobre la variación de una característica genética (Hattemer, 1991a).

En angiospermas, el análisis genético de la variación isoenzimática observada requiere el estudio de la descendencia de cruzas controladas, lo cual en especies arbóreas es técnicamente complejo de realizar. Para evitar la necesidad de cruzas controladas, Gillet & Hattemer (1989) desarrollaron un método alternativo que consiste en el análisis de fenotipos isoenzimáticos de árboles individuales y de muestras de su descendencia de polinización abierta. La ventaja de este método recae en prescindir de cruzas controladas, y se basa en la estabilidad ontogenética de las isoenzimas lo que permite analizar distintos tejidos en los progenitores y la descendencia.

Entre las Fagaceae, el modo de herencia de los marcadores génicos isoenzimáticos ha sido analizado usando cruzas controladas en algunas especies como, por ejemplo, *Fagus sylvatica* (Thiebaut et al., 1982; Müller-Starck & Starke, 1993); *Quercus petraea* (Müller-Starck et al., 1996); *Q. robur* (Zanetto et al., 1996). En otros casos, se ha utilizado el análisis de árboles individuales y su descendencia, como en *Castanea sativa*, en donde se aplicó el método de Gillet & Hattemer (1989) (Fineschi et al., 1990) y en *Fagus sylvatica* (Merzeau et al., 1989). Sin embargo, en la gran mayoría de los trabajos publicados sobre genética poblacional de especies arbóreas, la base genética de la variación observada es inferida directamente de los zimogramas y comparada con las de otras especies sin realizar el análisis genético cualitativo y cuantitativo necesario para identificar variantes génicas. En dichos trabajos los loci son considerados como putativos. Sin embargo, se han reportado grandes diferencias entre los fenotipos observados para una misma enzima en distintas especies pertenecientes a una misma familia (Pastorino & Gallo, 1998; Pastorino, 2001).

En *Nothofagus nervosa*, se ha descrito el análisis genético de seis loci isoenzimáticos (*Adh*, *Idh-A*, *Mdh-B*, *Mdh-C*, *Pgi-B*, *Pgm-A*) (Godoy, 1994). Sin embargo, parte de las semillas utilizadas en dicho trabajo fue sembrada en pruebas de progeñie observándose individuos híbridos entre esta especie y *N. obliqua* en algunas de las familias (Gallo, 1995). La presencia de alelos pertenecientes a *N. obliqua* interfirió en la interpretación genética de los zimogramas analizados por Godoy (1994). Por esta razón, fue necesario realizar nuevamente el análisis genético utilizando árboles pertenecientes a una zona pura de *N. nervosa*. Por otro lado, se

analizaron también individuos de *N. obliqua* para determinar marcadores específicos de especie y poder identificar individuos híbridos y la variación proveniente de esta especie.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Material analizado**

Se recolectaron yemas y semillas de polinización abierta de 53 árboles madre pertenecientes a dos poblaciones puras de *N. nervosa* ubicadas en las cuencas de los lagos Tromen y Huechulafquen, Argentina (Fig. III.2). Por otro lado, con el fin de determinar la especificidad de dos marcadores génicos (*Adh* y *Pgi*) previamente descritos como posibles marcadores diagnósticos entre *N. nervosa* y *N. obliqua* (Gallo et al., 1997a; 1997b), se recolectaron yemas de 47 árboles más de *N. nervosa* de la población de Tromen, 110 árboles de una población pura de *N. obliqua* (Las Lagunas del Epulafquen) y 190 árboles (100 de *N. obliqua* y 90 de *N. nervosa*) de la zona de simpatría (Lago Lácar) (Fig. III.2). Las semillas se mantuvieron a 4° C y las yemas a -20° C hasta que fueron utilizadas en los análisis electroforéticos.

### **2.2. Extracción de las isoenzimas**

Debido a la presencia de resinas que interfieren durante la migración electroforética, las yemas fueron peladas y lavadas en acetona pura durante 5 min. con agitación, enjuagándose luego con agua destilada. Para la extracción de proteínas se utilizó el buffer de extracción Vegetativo I de Cheliak & Pitel (1984) (Apéndice II), tanto para las semillas como para las yemas. Se probaron otros buffers de extracción como el buffer de extracción de semillas de Cheliak & Pitel (1984) y el descrito por Müller- Satrck (1985a), pero no fueron tan efectivos para ambos tejidos como el

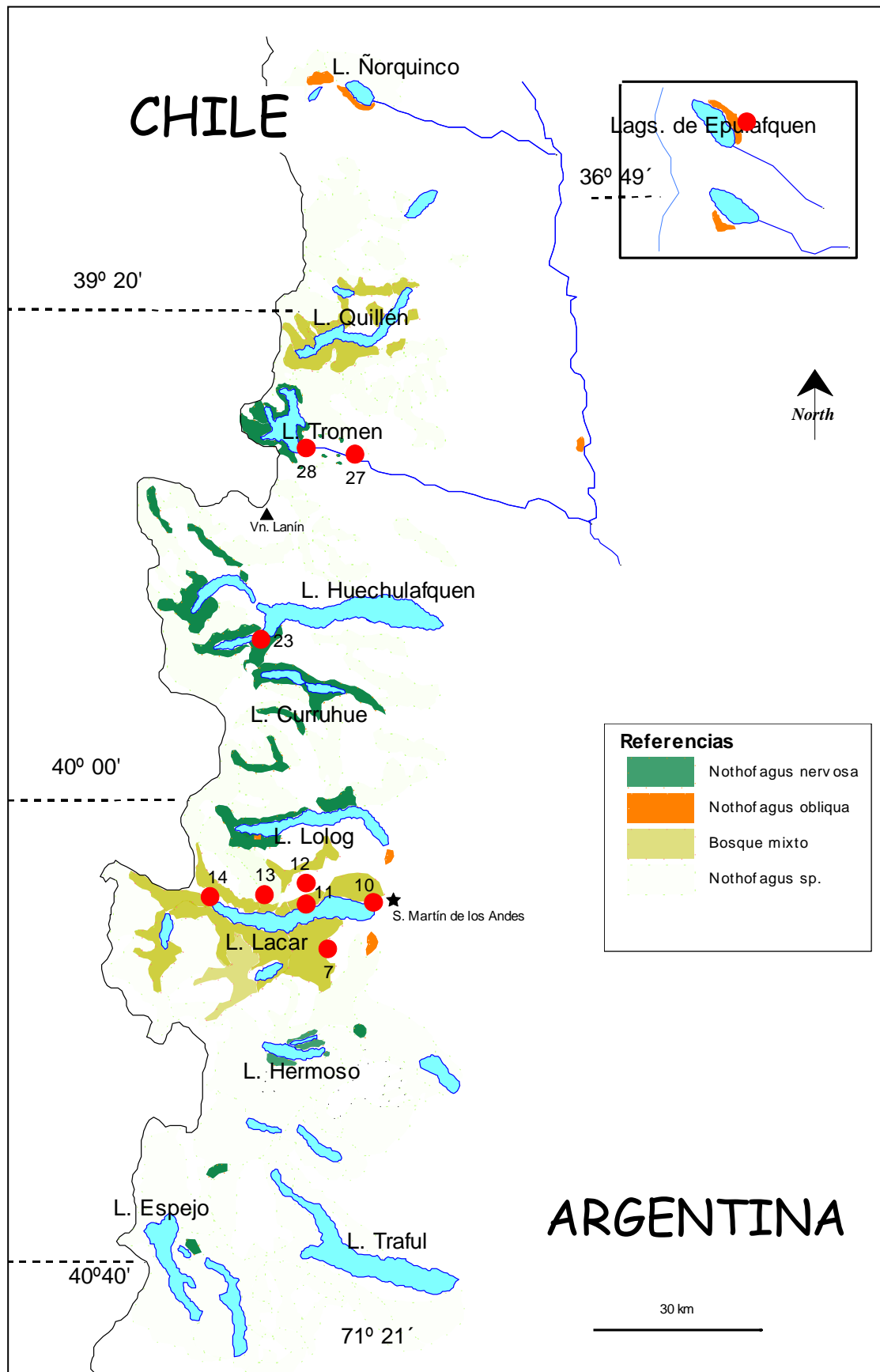


Figura III.2: Ubicación geográfica de las poblaciones utilizadas para el análisis genético de los marcadores génicos isoenzimáticos.

mencionado arriba. La homogeneización se realizó con mortero eléctrico y las yemas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min., utilizándose el sobrenadante. La electroforesis se realizó al día siguiente, manteniéndose las muestras a 4° C. Para la siembra del gel, papel tipo Whatmann 3mm en rectángulos de 9 x 3 mm fue embebido con cada homogenato, secado durante aproximadamente 15 minutos y “sembrado” en el corte de siembra del gel.

### 2.3. Electroforesis

La separación de las enzimas se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de almidón, a una densidad aproximada del 11 %. Los buffers de electrodo y de gel, así como las condiciones de la electroforesis y las enzimas analizadas se presentan en la Tabla III.1.

Tabla III.1: Sistemas enzimáticos, buffers de electrodo y de gel y condiciones de la electroforesis.

Sistema enzimático	Sistema de buffers
Alcohol deshidrogenasa (ADH) E.C.1.1.1.1	1
Fosfatasa alcalina (ALP) E.C.3.1.3.1	1
Catalasa y Peroxidasa (CAT)(PER) E.C.1.11.1.6 and 1.11.1.7	2
Diaforasa (DIA) E.C.1.6.4.3	2
Fumarasa (FUM) E.C.4.2.1.2	1
Glutamato deshidrogenasa (GDH) E.C.1.4.1.3	2
Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) E.C.2.6.1.1	2
Isocitrato deshidrogenasa (IDH) E.C.1.1.1.42	1
Leucina-amino peptidasa (LAP) E.C.3.4.11.1	2
Malato deshidrogenasa (MDH) E.C.1.1.1.37	1
Nicotinamida adenina dinucleotido deshidrogenasa (NADHDH) E.C.1.6.99.3	2
Fosfoglucosa isomerasa (PGI) E.C.5.3.1.9	2
Shikimico deshidrogenasa (SDH) E.C.1.1.1.25	1

1: Electrodo 0,13 M Tris – 0,04 M ácido cítrico pH 7; gel: buffer de electrodo diluído (1:2,5). Condiciones de corrida: 4 hs. 155 mAmp.

2: Electrodo 0,3 M Acido bórico – 0,06 M NaOH pH 8,2 (Poulik, 1959); gel: 0,07 M Tris – 0,008 M ácido cítrico pH 8,7. Condiciones de corrida: 5 hs. 65 mAmp.

En cada enzima se indican la abreviatura y el número otorgado por la Enzyme Commission.

Luego de la electroforesis los geles se cortaron en tres fetas horizontales cada uno, para poder revelar tres sistemas enzimáticos. Las soluciones de revelado fueron preparadas de acuerdo a Cheliak & Pitel (1984) con pequeñas modificaciones (Apéndice II). El revelado se realizó en estufa a 37 °C, en oscuridad, variando el

tiempo según el sistema enzimático (ver en cada receta, Apéndice II). La tinción específica de las enzimas se verificó mediante la omisión de los sustratos y las coenzimas paralelamente a la tinción regular. El procedimiento detallado y las recetas de los distintos buffers y sustancias de revelado se presentan en el Apéndice II.

#### 2.4. Análisis genético y designación de las isoenzimas

El análisis genético se realizó siguiendo el método descrito por Gillet & Hattemer (1989), el cual está basado en tres requisitos generales:

- 1) segregación meiótica regular;
- 2) fertilización al azar de los óvulos por cada variante genética del polen;
- 3) ausencia de selección de viabilidad en la descendencia previo a la investigación.

En el marco de un modo de herencia de un único locus codominante (Tabla III.2) así como en el caso de un único locus con presencia de un alelo nulo recesivo y codominancia entre los alelos activos, las hipótesis pueden ser evaluadas cuali y cuantitativamente con tejido de cada árbol madre y de una muestra aleatoria de su descendencia proveniente de polinización abierta. De acuerdo con Gillet & Hattemer (1989), para un locus único con herencia codominante, se establecen las siguientes condiciones:

$$P(A_l A_m) = \text{probabilidad de que un cigoto tenga el genotipo no ordenado } A_l A_m \\ = [P(A_l^{\ominus} A_m^{\ominus}) + P(A_m^{\ominus} A_l^{\ominus})] * \frac{1}{2} (2 - \delta_{lm})$$

donde  $\delta_{lm} = 1$  si  $l = m$  o  $\delta_{lm} = 0$  si  $l \neq m$  y

$N_{lm}$  = número de descendientes con fenotipo  $A_l A_m$  observados.

Si el genotipo materno es:

- 1)  $A_i A_i$  entonces cada descendiente debe tener un alelo  $A_i$
- 2)  $A_i A_j$  ( $i \neq j$ ) entonces cada descendiente debe tener un alelo  $A_i$  o  $A_j$  y se establece

que:

$$P(A_i^{\ominus} A_i^{\ominus}) = P(A_j^{\ominus} A_i^{\ominus}) \text{ y } P(A_i^{\ominus} A_j^{\ominus}) = P(A_j^{\ominus} A_j^{\ominus}) \\ \rightarrow P(A_i A_j) = P(A_i A_i) + P(A_j A_j)$$

$$P(A_i^{\ominus} A_k^{\ominus}) = P(A_j^{\ominus} A_k^{\ominus}) \rightarrow P(A_i A_k) = P(A_i A_k)$$

Dado que sólo se pueden inferir genotipos no ordenados deben combinarse las dos probabilidades de genotipos ordenados (Gillet & Hattemer, 1989). Estas probabilidades se pueden utilizar para probar estadísticamente el número observado de descendientes portadores de cada genotipo no ordenado con las proporciones esperadas, como se muestra en la Tabla III.2.

Tabla III.2: Análisis genético según modo de herencia de un locus único con alelos codominantes (tomado de Gillet & Hattemer, 1989).

Genotipo materno propuesto	Genotipos posibles de la descendencia	Relaciones esperadas entre los fenotipos observados en la descendencia.
$A_i A_i$	$A_i A_i$ $A_i A_k (k \neq i)$	
$A_i A_j (i \neq j)$	$A_i A_i$ $A_j A_j$ $A_i A_j$ $A_i A_k$ $A_j A_k (k \neq i, j)$	$N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ $N_{ik} = N_{jk} (k \neq i, j)$

Para probar estadísticamente la hipótesis de segregación 1:1 en la descendencia es necesario que el genotipo del árbol madre sea heterocigota para cada sistema enzimático a estudiar. Por este motivo, previo al análisis de la descendencia, se analizaron las madres para buscar aquellas que presentaban zimogramas que podían ser de genotipos heterocigotas. Posteriormente, se analizaron al menos 100 embriones de las semillas de cada árbol considerado “a priori” como heterocigota.

Los zimogramas se subdividieron en zonas dentro de las cuales la variación fenotípica observada parecía estar controlada por un locus génico. Los sistemas enzimáticos fueron designados con sus abreviaturas convencionales y las zonas en orden decreciente de movilidad relativa, ambos con letras mayúsculas. Los loci se denominaron por el nombre de la enzima y la zona en letras itálicas y los alelos con números en orden decreciente de movilidad relativa. Por ejemplo, *Mdh-C-1* indicaría que se está mencionando el alelo 1 (aquel con mayor migración electroforética) del locus asociado a la tercera zona de actividad según su movilidad relativa.

Se evaluó estadísticamente la segregación de las variantes isoenzimáticas y su herencia monogénica aplicando la prueba estadística de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) ( $\alpha = 0,05$ ).



La hipótesis de nulidad planteada fue el cumplimiento de la relación  $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$  entre los fenotipos de la descendencia de una madre con genotipo heterocigota. Si se cumple esta relación se puede inferir la existencia de segregación 1:1 de los alelos maternos.

### 3. Resultados y discusión

Previo al análisis de las yemas, se probaron distintos sistemas enzimáticos buscando aquellos que tuvieran buena resolución y fueran polimórficos. Entre las enzimas analizadas, algunas se descartaron por diferentes motivos: ausencia de actividad con los buffers utilizados (CAT (PER) y NADH/DH); bandas tenues con mala resolución (GDH, DIA, ALP, PGM y SDH); buena resolución, pero ausencia de polimorfismo (FUM, 81 semillas y yemas de 18 árboles). Además, no se observó migración catódica en los árboles analizados para ninguna de las enzimas, ni se detectó actividad inespecífica cuando se omitieron los sustratos y las coenzimas.

Los sistemas enzimáticos MDH, IDH, ADH, GOT, PGI y LAP tuvieron buena resolución en tejido embrionario, pero, en general, la actividad fue débil o nula en las yemas. Tanto en GOT como en LAP, el patrón de bandas relativamente simple y la condición de medios hermanos de las semillas utilizadas permitieron que, a pesar de la ausencia de actividad en las yemas, se pudiera especular con un modo de herencia y probar estadísticamente la hipótesis de segregación esperada. En cambio, la complejidad de los zimogramas obtenidos en la zona MDH-A sumada a la ausencia de actividad en las yemas, impidió su análisis genético y por lo tanto, no fue posible determinar sus variantes como marcadores génicos, descartándose los mismos en el análisis poblacional posterior. En el caso de MDH-D, que tampoco mostró actividad en las yemas, la ausencia de variación en todas las semillas analizadas impidió también el análisis genético y su posterior utilización como marcador génico. En los otros sistemas y zonas analizados (MDH-B; MDH-C; IDH-A; ADH-A; PGI-A y PGI-B), se observaron los mismos patrones electroforéticos en yemas y semillas, pudiéndose realizar el análisis genético. Los zimogramas observados tanto para semillas como para yemas se esquematizan en la Figura III.3.

#### 3.1. Descripción de los fenotipos

Previo al análisis estadístico de la segregación en la descendencia se realizó una interpretación intuitiva de los zimogramas observados en las yemas de los árboles madre (Figura III.3) buscando aquellos fenotipos probablemente heterocigotas.

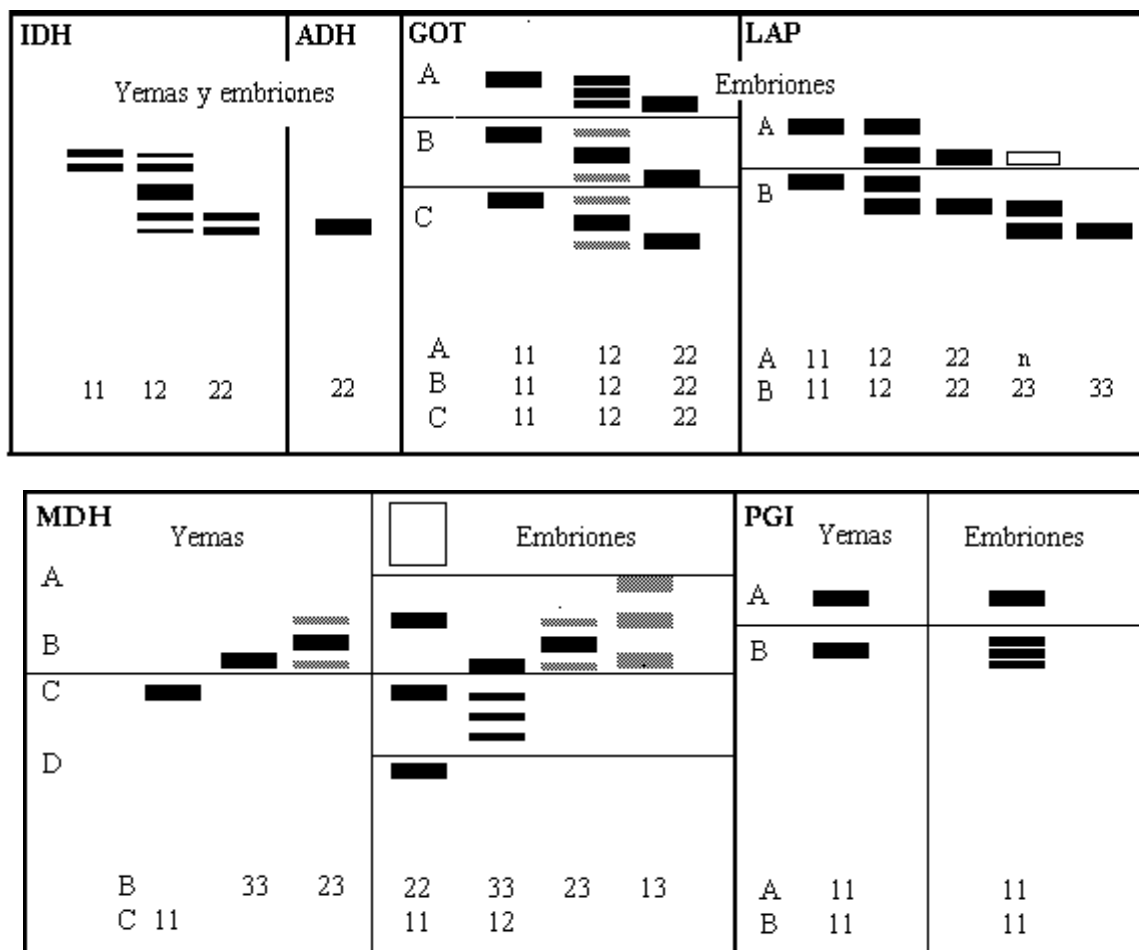


Figura III.3: Fenotipos observados en yemas y embriones de *Nothofagus nervosa* en los sistemas enzimáticos analizados.

**IDH:** En esta enzima se observó una zona de actividad con dos fenotipos de banda doble y uno de cinco bandas, tanto en yemas como en semillas. Las bandas observadas en ambos tejidos tuvieron la misma movilidad relativa (Fig. III.3 y III.4). Estos resultados coinciden por lo encontrado por Godoy (1994), quién también encontró una segunda zona de menor actividad que no pudo ser observada en este trabajo. En *Nothofagus dombeyi*, *N. betuloides* y *N. nitida* esta enzima fue asumida como monomórfica presentando también un fenotipo de doble banda (Premoli, 1994).

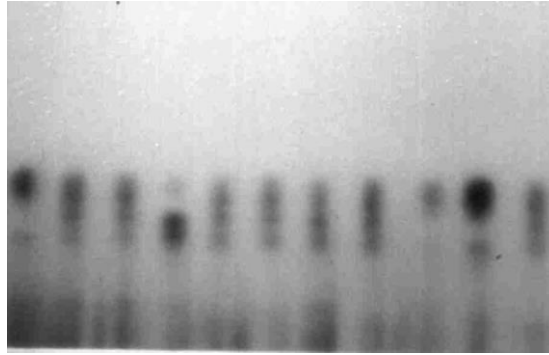


Figura III.4: Ejemplo de zimograma observado en embriones de *Nothofagus nervosa* para el sistema enzimático IDH. Las yemas presentaron el mismo patrón.

**MDH:** En semillas se observaron cuatro zonas para esta enzima, pero sólo dos mostraron actividad en yemas: las zonas B y C. Sin embargo, la actividad en la zona B fue muy débil, observándose bandas tenues sólo en algunos de los árboles madre analizados. Entre las yemas se encontraron dos fenotipos distintos, uno de banda única y otro de tres bandas, mientras que en las semillas se detectaron dos fenotipos de banda única y dos de banda triple (Fig. III.3 y III.5).

La zona C no presentó variación entre las madres analizadas mostrando en todas ellas una banda única. Sin embargo, entre la descendencia se observó en muy baja frecuencia un fenotipo de tres bandas.

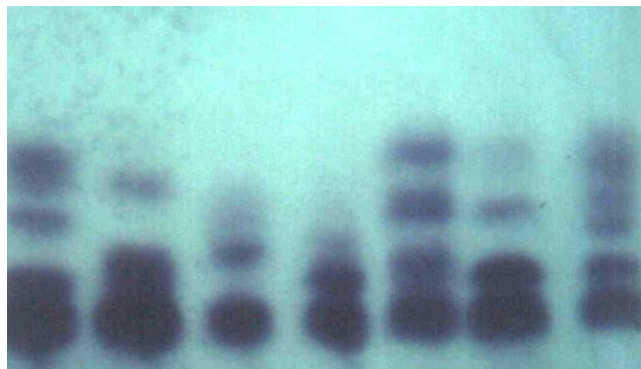


Figura III.5: Ejemplo de zimograma observado en embriones de *Nothofagus nervosa* para el sistema enzimático MDH.

La zona más anódica, observada únicamente en embriones, MDH-A, fue difícil de interpretar debido quizás a solapamiento con la zona B. Dado que no pudo realizarse una interpretación del modo de herencia, esta zona fue descartada. Por último, la zona más catódica, MDH-D, presentó un fenotipo de banda única invariante.

En hojas de especies siempreverdes de *Nothofagus* (*N. dombeyi*, *N. betuloides* y *N. nitida*) se observaron tres zonas para esta enzima (Premoli, 1996) y dos en el caso de *N. truncata* (Haase, 1992).

**GOT:** No se detectó actividad en las yemas, mientras que los embriones mostraron tres zonas variables (GOT-A, GOT-B y GOT-C), cada una con dos fenotipos de banda única y uno de banda triple (Fig. III.3 y III.6). Dado que esta enzima no ha sido analizada en especies de *Nothofagus* se comparará con fenotipos encontrados entre las Fagaceae. Tres zonas también se describieron para esta enzima en *Fagus sylvatica* (Thiebaut et al., 1982), aunque sólo una fue analizada genéticamente. Dos zonas fueron descritas en distintos tejidos de la misma especie (embriones, yemas y hojas jóvenes) (Müller-Starck & Starke, 1993). También en *Quercus petraea* y *Q. robur* se observaron tres zonas de actividad en yemas, embriones y radículas, aunque una de las zonas no pudo ser analizada debido a problemas de visualización en uno de los tejidos utilizados (Müller-Starck et al., 1996; Zanetto et al., 1996).



Figura III.6: Ejemplo de zimograma observado en embriones de *Nothofagus nervosa* para el sistema enzimático GOT.

**LAP:** En este sistema enzimático tampoco se pudo detectar actividad en las yemas, presentando las semillas dos zonas activas. La zona más anódica presentó dos fenotipos de banda única, uno de banda doble y otro con ausencia de bandas, mientras que la otra zona (LAP-B), presentó cinco fenotipos diferentes: tres de banda única y dos de banda doble (Fig. III.3 y III.7). Al igual que en el sistema enzimático GOT, se comparará con especies de la familia Fagaceae por no contar con datos en *Nothofagus*. Dos zonas fueron descritas para esta enzima en yemas, embriones y

radículas de *Quercus petraea* (Müller-Starck et al., 1996) y *Q. robur* (Zanetto et al., 1996); en yemas, semillas, hojas jóvenes y polen de *Fagus sylvatica* (Müller-Starck & Starke, 1993) y en yemas de *Populus tremula* y *P. tremuloides* (Gallo & Geburek, 1991). En *Fagus sylvatica* la actividad fue muy débil en yemas y hojas jóvenes para el locus *Lap-B* y también se presentaron dificultades en la visualización de la actividad en uno de los tejidos analizados en *Q. petraea* (Müller-Starck & Starke, 1993).

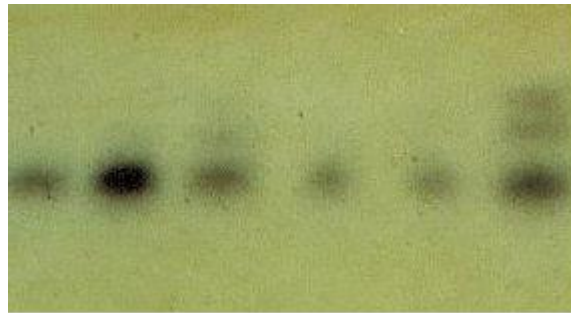


Figura III.7: Ejemplo de zimograma observado en embriones de *Nothofagus nervosa* para el sistema enzimático LAP

### 3.2. Marcadores específicos de especie

**ADH:** Tanto las semillas como las yemas de los árboles utilizados para el análisis genético presentaron el mismo fenotipo de una única banda invariante. Las yemas de *N. obliqua* analizadas mostraron también un fenotipo de banda única invariante, pero con una movilidad relativa mayor a la detectada en *N. nervosa*. Entre los árboles analizados de ambas especies pertenecientes a la zona de simpatría algunas yemas de *N. obliqua* presentaron un fenotipo de tres bandas (Fig. III.8 y III.9). Dos zonas variables fueron descritas en *N. dombeyi* y *N. betuloides* y dos fenotipos invariantes de banda única en *N. nitida* (Premoli, 1996).

**PGI:** En esta enzima se revelaron dos zonas invariantes tanto en las yemas como en las semillas de los individuos de *N. nervosa* de las poblaciones puras. El patrón de bandas no fue exactamente el mismo en yemas y semillas ya que estas últimas presentaron un fenotipo de tres bandas invariantes con la misma movilidad relativa que la de las yemas (Fig. III.3). En *N. obliqua* se observaron patrones similares sólo que con una movilidad relativa menor. Similarmente a lo observado en el sistema ADH, se detectaron, entre las yemas de los árboles analizados de la zona de simpatría, algunos individuos con fenotipos de tres bandas (Fig. III.9). Dos zonas (una

invariante) se observaron en *N. betuloides*, *N. dombeyi* y *N. nitida* (Premoli, 1996). También se observaron dos zonas en especies de *Nothofagus* de Nueva Zelanda (Haase, 1993), siendo este locus muy polimórfico en *N. truncata* (Haase, 1992).

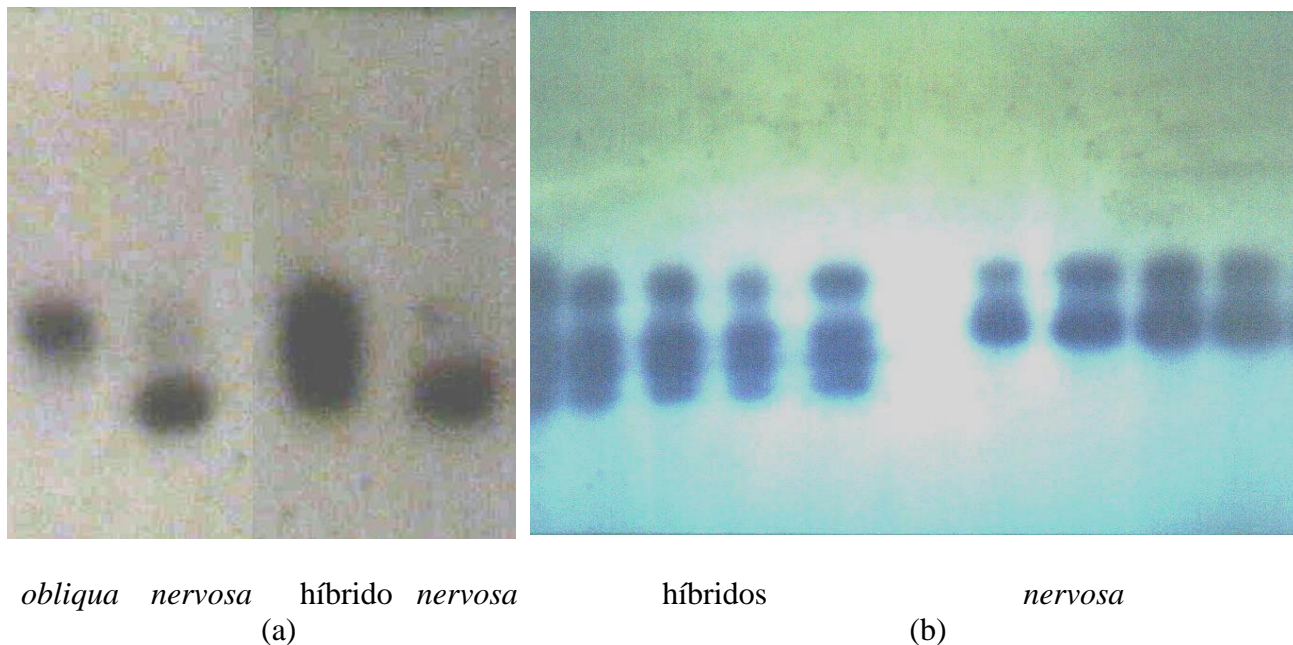


Figura III.8: Ejemplo de zimogramas observados en embriones y yemas de *Nothofagus nervosa* y *N. obliqua* para los sistemas enzimáticos a) ADH (embriones y yemas presentan el mismo patrón) y b) PGI (yemas).

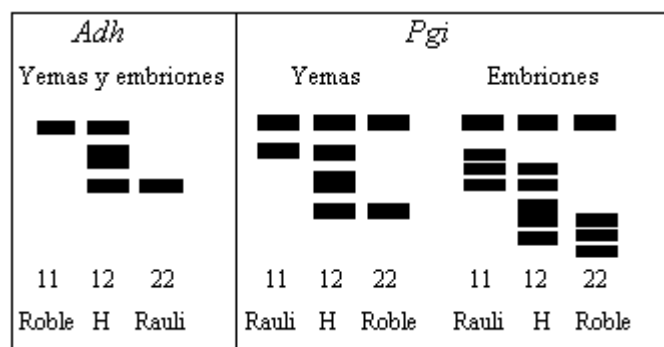


Figura III.9: Esquema de los zimogramas observados en *Nothofagus nervosa* y *N. obliqua* para los sistemas enzimáticos *Adh* y *Pgi* en yemas y embriones.

### 3.3. Análisis genético

En todos los casos, dado que no se cuenta con el análisis genético de estos marcadores en especies de *Nothofagus*, se compararán los resultados obtenidos en *N. nervosa* con aquellos descritos en especies de la familia Fagaceae en las cuales se realizó el análisis genético de las variantes fenotípicas encontradas ya sea mediante el

análisis de segregación en la descendencia de cruzas controladas o aplicando el método empleado en este trabajo.

**IDH:** Entre los árboles analizados, ocho presentaron el fenotipo de cinco bandas, presumiblemente heterocigota: seis pertenecientes a la población de Lago Tromen y dos a la de Lago Huechulafquen. Se analizaron 100 semillas de la descendencia de cada uno de estos ocho árboles para determinar el modo de herencia de las variantes enzimáticas. Se evaluó el modo de herencia codominante (Tabla III.3) observándose el cumplimiento de las condiciones cualitativas ya que todas las semillas tenían un alelo materno y entre la descendencia de árboles homocigotas no se observó la presencia del otro alelo en estado homocigota. El análisis cuantitativo entre los valores observados y esperados en la descendencia bajo la hipótesis de segregación 1:1 de los alelos maternos planteada a priori, no se rechazó en cuatro de los árboles analizados.

Tabla III.3: Análisis genético de la enzima IDH.

Arbol Madre	Genotipo materno	Genotipo de la descendencia			$\Sigma$	$\chi^2$ gl=1
		N <sub>11</sub>	N <sub>12</sub>	N <sub>22</sub>		
21 H	12	59	39	2	100	4,84 *
24 H	12	68	49	6	123	5,08*
3 T	12	39	51	10	100	0,04 ns
6 T	12	40	50	15	105	0,24 ns
17 T	12	54	40	6	100	4,00 *
21 T	12	46	44	10	100	1,44 ns
24 T	12	51	46	12	109	2,65 ns
30 T	12	50	40	10	100	4,00 *
7 T	11	41	2	0	43	
10 T	11	43	10	0	53	
25 T	22	0	20	16	36	

Hipótesis evaluada:  $N_{11} + N_{22} = N_{12}$ .  $\Sigma$ : tamaño de la muestra. H: Población del Lago Huechulafquen; T: Población del Lago Tromen. ns: no significativo; \*  $P < 0,05$ .

El análisis cuali-cuantitativo de la segregación de las variantes enzimáticas coincide con un modo de herencia codominante de locus único para una estructura de proteína dimérica, verificándose la presencia de dos alelos.

El mismo tipo de herencia planteado aquí fue reportado en *Fagus sylvatica* (Merzeau et al., 1989; Müller-Starck & Starke, 1993), en *Quercus petraea* (Müller-

Starck et al., 1996) y en *Q. robur* (Zanetto et al., 1996). En todos estos casos se utilizó material de cruza controladas. Resultados similares se describieron en *Castanea sativa* (Fineschi et al., 1990) usando el mismo método estadístico empleado aquí. Dos alelos se observaron en *C. sativa*, tres y cuatro en *F. sylvatica* y cinco en ambos *Quercus*.

**MDH:** En este sistema enzimático se observó actividad en las yemas sólo para las zonas B y C.

Entre los árboles madre analizados no se detectó variación en el locus C, por lo que no se pudo realizar el análisis genético. Sin embargo, se observó una variante isoenzimática en muy baja frecuencia ( $p = 0,0085$ ) entre la descendencia de algunos árboles, siempre en condición supuestamente heterocigota: 12 de 1405 embriones analizados presentaron esta variante. De acuerdo con estos resultados, se podría sugerir para la zona MDH-C un modo de herencia codominante de locus único, aunque dada la ausencia de variación en las yemas no se puede corroborar esta hipótesis.

Con respecto a la zona MDH-B, la actividad en las yemas fue muy baja y sólo se observaron bandas en algunos de los árboles analizados (Tabla III.4). De estos árboles, cuatro presentaban un patrón supuestamente heterocigota, comprobándose la hipótesis de segregación planteada para las dos variantes enzimáticas más frecuentes en todos ellos. El análisis de la descendencia mostró la presencia de una tercer variante enzimática, en menor frecuencia (MDH-B-1), cuya segregación sólo pudo comprobarse en una familia. Adicionalmente, se analizó la descendencia de cuatro árboles que, dados los fenotipos observados en la descendencia, eran supuestamente heterocigotas. En las cuatro familias se cumplió la hipótesis cualitativamente y en una de ellas se verificó en forma cuantitativa y estadística. En los otros casos la segregación se cumplió para dos de las variantes enzimáticas (Tabla III.4).

Estos resultados sugirieron para esta zona de actividad la acción de un locus único (*Mdh-B*) con tres alelos codominantes. Una posible explicación a que la hipótesis no se cumpla con todos los alelos es la existencia de fertilización no al azar, en cuyo caso no se estaría cumpliendo uno de los requerimientos del análisis genético.



Tabla III.4: Análisis genético de la zona enzimática MDH-B.

Arbol madre	Genotipo materno	Genotipos de la descendencia					$\Sigma$	$\chi^2_1$ N <sub>22</sub> +N <sub>33</sub> =N <sub>23</sub>	$\chi^2_2$ N <sub>12</sub> =N <sub>13</sub>	$\chi^2_{1+2}$ gl=2
		N <sub>12</sub>	N <sub>13</sub>	N <sub>22</sub>	N <sub>23</sub>	N <sub>33</sub>				
21 H	23	0	1	18	72	37	128	2,28 ns	1 ns	3,27 ns
24 H	23	0	11	28	47	40	126	3,83 ns	11 *	14,83 *
3 T	?	10	4	49	25	16	104	17,78 *	2,57 ns	20,35 *
6 T	23	3	22	16	37	19	97	0,06 ns	14,44 *	14,50*
10 T	?	1	3	24	6	11	45	20,51 *	1,00 ns	21,51*
17 T	?	6	8	35	40	4	93	0,01 ns	0,29 ns	0,30 ns
24 T	?	3	1	29	54	2	89	6,22 *	1,00 ns	7,22 *
30 T	23	0	43	5	25	34	107	3,06 ns	43,00 *	46,06*
21 T	?	0	10	0	30	60	100			

Hipótesis evaluada:  $N_{22} + N_{33} = N_{23}$  y  $N_{12} = N_{13}$ .  $\Sigma$ : tamaño de la muestra. H: Población del Lago Huechulafquen; T: Población del Lago Tromen. ns: no significativo; \*  $P < 0,05$ .

Desviaciones significativas de la segregación Mendeliana esperada se observaron en *Quercus robur* (Zanetto et al., 1996), relacionándose esta falta de ajuste a un exceso del alelo más común, debido probablemente a la ocurrencia de selección de viabilidad en estadios tempranos de las plántulas. Una situación similar se observó en *Q. petraea*, dónde se propuso la presencia de selección pre y postcigótica (Müller-Starck et al., 1996).

De las cuatro zonas detectadas en los embriones, la más rápida, *Mdh-A*, no fue incluida en el análisis dado que la lectura de los zimogramas fue muy complicada y su interpretación denotó inconsistencias. La zona más lenta, *Mdh-D*, fue monomórfica para todos los embriones analizados, descartándose de este modo su utilización como marcador génico.

Los zimogramas obtenidos para esta enzima fueron diferentes a los observados por Godoy (1994) en semillas que, en un ensayo de progenies realizado en forma paralela a dicho estudio, se comprobó que eran híbridas entre esta especie y *N. obliqua*. Las diferencias principales fueron detectadas en los loci B y C, dónde la presencia de más bandas fue evidente en las semillas híbridas lo cual llevó a una interpretación distinta del modo de herencia. Estas bandas adicionales observadas en las semillas híbridas podrían pertenecer a *N. obliqua*, dado que los fenotipos observados en esta especie tienen una movilidad relativa que se superpondría con las bandas de *N. nervosa*. Esto pudo observarse tanto en las yemas de los individuos de

*N. obliqua* analizados en este trabajo como en embriones de esta especie (datos no publicados).

**GOT:** Dada la ausencia de actividad en las yemas, pero con la ventaja de contar con medios hermanos, se analizó cualitativamente la descendencia de todos los árboles para detectar aquellos en los cuales se pudiera inferir un genotipo materno supuestamente heterocigota. En función de esto, la determinación del modo de herencia de la zona GOT-A se realizó mediante el análisis de la descendencia de nueve árboles madre supuestos heterocigotas, comprobándose la segregación 1:1 de las variantes fenotípicas observadas en cuatro de ellos. Por otro lado, se analizó también la progenie de seis árboles madre donde no se detectó uno de los fenotipos supuestamente homocigotas, confirmándose la hipótesis cualitativamente (Tabla III.5a).

El análisis genético de las zonas de actividad GOT-B y GOT-C, se realizó en la descendencia de cinco árboles madre supuestos heterocigotas. En todos ellos se comprobó estadísticamente la segregación 1:1 esperada para las dos variantes enzimáticas observadas (Tabla III.5b).

La confirmación estadística de la hipótesis de segregación 1:1 planteada para cada zona de actividad de este sistema enzimático, sugiere que cada una de ellas estaría controlada por un locus con dos alelos. Se definen de este modo tres loci en este sistema (*Got-A*, *Got-B* y *Got-C*), en cada uno de los cuales hay dos alelos con un efecto codominante.

La mayoría de los embriones analizados presentaron una variación conjunta para los loci *Got-B* y *Got-C*, es decir, ambos en estado homocigota o ambos en estado heterocigota. La presencia de algunos embriones con combinación de ambos estados confirmó la variación independiente y la existencia de dos loci distintos. La elevada frecuencia de las combinaciones mencionadas al principio (homocigosis o heterocigosis en ambos loci) sugiere que, si bien no se observaron los genotipos parentales, estas combinaciones genotípicas corresponderían al tipo parental, siendo aquellas combinaciones de los estados homocigota y heterocigota las recombinantes.

Se podría sugerir que, dadas las frecuencias tan bajas de tipos recombinantes, estos dos loci estarían ligados. Ligamiento entre loci de este sistema enzimático se reportó en álamos (Müller-Stark, 1992).

Tabla III.5: Análisis genético de la enzima GOT.

a)

Arbol	Genotipo de la descendencia			$\Sigma$	$\chi^2$ gl=1
	11	12	22		
9 H	24	52	24	100	0,16 ns
10 H	30	56	14	100	1,44 ns
24 H	60	37	3	100	6,76 *
29T	45	54	8	107	0,00 ns
21T	17	47	36	100	0,36 ns
24T	44	40	16	100	4,00*
21 H	67	22	9	98	29,76*
17T	68	29	4	101	18,31*
30T	55	34	11	100	10,24*
3T	0	18	21	39	
13T	83	22	0	105	
16 H	67	27	0	94	
6T	39	25	0	64	
16T	35	17	0	52	
10T	27	12	0	39	

b)

Arbol				$\Sigma$	$\chi^2$ gl=1	<i>Got-C</i>			$\Sigma$	$\chi^2$ gl=1
	N <sub>11</sub>	N <sub>12</sub>	N <sub>22</sub>			N <sub>11</sub>	N <sub>12</sub>	N <sub>22</sub>		
9 H	3	45	56	104	1,88 ns	2	46	56	104	1,38 ns
10 H	8	53	43	104	0,04 ns	8	53	43	104	0,04 ns
16 H	4	44	52	100	1,44 ns	4	44	52	100	1,44 ns
24 H	3	53	46	102	0,16 ns	3	50	49	102	0,04 ns
13T	2	53	45	100	0,36 ns	2	54	45	101	0,49 ns
29T	12	87	1	100	54,76*	12	88	0	100	
6T	0	4	59	63		0	4	55	59	
16T	0	20	33	53		0	20	31	51	
17T	0	1	103	104		0	1	103	104	
21T	0	1	102	102		0	1	102	103	
24T	0	0	86	86		0	0	86	86	
21 H	0	0	92	92		0	0	99	99	
30T	0	0	105	105		0	0	105	105	
3T	0	0	38	38		0	0	38	38	
10T	0	0	37	37		0	0	33	33	
25T	0	1	21	22		0	1	20	21	

Hipótesis evaluada:  $N_{11}+N_{22}=N_{12}$ .  $\Sigma$ : tamaño de la muestra. H: Población del Lago Huechulafquen; T: Población del Lago Tromen. a) *Got-A*; b) *Got-B* y *Got-C*. ns: no significativo; \*  $P < 0,05$ .

**LAP:** Al igual que en el sistema GOT, no se observó actividad en las yemas, analizándose la descendencia de 14 individuos supuestamente heterocigotas. En ambas zonas, la presencia de fenotipos de banda única o doble concuerda con la estructura monomérica descrita para esta enzima (e.g. Cheliak & Pitel, 1984). Este tipo de estructura fue observada también en otras especies arbóreas (e.g. *Fagus*

*sylvatica*, Müller-Starck & Starke, 1993; *Quercus petraea*, Müller-Starck et al., 1996; *Q. robur*, Zanetto et al., 1996).

En la zona LAP-A, se detectaron tres variantes enzimáticas, una de ellas mostrando ausencia de actividad, pudiendo corresponder a un alelo nulo. En este sistema enzimático se observaron alelos nulos en otras especies arbóreas como *Fagus sylvatica* (Kim, 1979), *Quercus robur* (Zanetto et al., 1996), *Populus tremula*, *P. tremuloides* y sus híbridos (Gallo & Geburek, 1991). Se evaluó la hipótesis de segregación 1:1 con un efecto génico codominante entre las dos variantes con actividad y con efecto recesivo en el caso del supuesto alelo nulo, de acuerdo a lo propuesto por Gillet & Hattemer (1989) para estos casos. Aunque la hipótesis fue cualitativamente satisfecha, la elevada frecuencia de la variante sin actividad llevó a su rechazo al probarla estadísticamente. La mayoría de los embriones analizados no presentó actividad para esta zona (no se detectaron bandas), lo cual supondría un estado de homocigosis para el supuesto alelo nulo, o presentó la variante enzimática 2, sin poderse determinar si su estado era de homocigosis o si estaba asociado al alelo nulo (Tabla III.6a).

En la zona LAP-B se observaron tres variantes enzimáticas asociadas en fenotipos de banda única o doble, todas con actividad. Se evaluó la hipótesis de segregación 1:1 en la descendencia de los 14 individuos analizados, pero no se pudo comprobar la misma en ninguno de ellos.

Si bien ambas zonas parecerían estar controladas por diferentes loci y se podría sugerir un modo de herencia, al no poder comprobarse estadísticamente la segregación esperada y ante la ausencia de actividad en tejido materno, se descartan ambas zonas de actividad como posibles marcadores génicos. Por lo tanto, este sistema no será utilizado en los análisis posteriores de genética poblacional.

### **3.4. Determinación de marcadores específicos de especie**

**ADH:** Todos los árboles de *N. nervosa* de poblaciones puras analizados y la descendencia de aquellos en que se cosechó semilla (1208 embriones) presentaron una

Tabla III.6: Genotipos observados en la descendencia de algunos árboles para las isoenzimas LAP-A (a) y LAP-B (b).

a)

Arbol madre	Genotipo				N
	1-	12	2-	Nulo	
3T	0	9	19	71	99
6T	0	6	24	58	88
13T	0	3	27	71	101
16T	0	2	27	22	51
17T	0	7	23	53	83
21T	11	10	31	47	99
24T	0	14	28	27	69
29T	2	13	55	42	112
30T	0	3	12	88	103
9BA	13	0	20	75	108
10BA	5	4	28	56	93
16BA	0	1	44	57	102
21BA	0	2	20	86	108
24BA	0	32	78	44	154

b)

Arbol madre	Genotipo					N
	11	12	22	23	33	
3T	0	3	86	7	3	96
6T	1	2	79	6	0	88
13T	0	5	80	15	0	100
16T	0	1	49	2	0	52
17T	0	3	74	6	0	83
21T	0	2	67	20	10	89
24T	0		53	14	2	67
29T	1	4	99	7	0	111
30T	0		74	21	8	95
9BA	0	3	89	13	3	108
10BA	0	7	81	10	6	104
16BA	0	1	91	7	1	100
21BA	14	8	77	9	0	108
24BA	1	7	145	1	0	154

misma variante enzimática, sin variación, aparentemente en estado homocigota. A su vez, los árboles analizados de la zona pura de *N. obliqua* mostraron únicamente fenotipos supuestamente homocigotas para otra variante enzimática de mayor movilidad electroforética.

En algunos casos no se detectó actividad en las yemas. Esto puede deberse a la fecha de cosecha de las mismas (febrero en el caso de *N. obliqua* de zona pura; principios de marzo en la zona de simpatría y mediados de abril en la zona pura de *N. nervosa*), ya que posteriormente se comprobó que yemas de *N. obliqua* recolectadas avanzado el otoño presentan mejores resultados. Debido a la imposibilidad de acceder a la zona de Las Lagunas del Epulafquen (zona pura de *N. obliqua*) en esa época del año se analizó únicamente el material recolectado en febrero.

El análisis de los árboles adultos de la zona de simpatría mostró algunos individuos con fenotipos supuestamente heterocigotas para las variantes observadas en ambas especies (Tabla III.7). Estos resultados sugieren fuertemente la presencia de distintos alelos en cada especie los cuales se podrían considerar como específicos de especie, siendo híbridos los individuos heterocigotas.

Si bien la frecuencia de individuos heterocigotas es baja, indica la presencia de hibridación entre ambas especies. La hibridación también fue confirmada en una situación particular mediante el análisis de un individuo de *N. nervosa* rodeado por individuos de *N. obliqua*, aislado de otros individuos de su especie. En dicho trabajo se analizó cada individuo y su descendencia observándose la especificidad de las aloenzimas así como también la dirección principal de la hibridación en el sentido *nervosa* x *obliqua* (es decir, *nervosa* como receptor del polen de *obliqua*) (Gallo et al., 1997b).

**PGI:** Similarmente a lo encontrado en el sistema ADH, los individuos de *N. nervosa* presentaron todos una única variante enzimática en estado supuestamente homocigota; a su vez, los individuos de *N. obliqua* mostraron un estado homocigota para otra variante de menor movilidad electroforética. Todos los embriones analizados pertenecientes a madres de zona pura de Raulí presentaron el fenotipo materno (2129 embriones). Por otro lado, en la zona de simpatría, se observó que 14 individuos clasificados fenotípicamente (según la corteza) como *N. obliqua*, presentaron fenotipos supuestamente heterocigotas para ambas variantes enzimáticas (Tabla III.7). Esto sugiere la presencia de dos aloenzimas distintas, una en cada

especie, con actividad especie – específica: en Raulí correspondería al alelo 1, dada su mayor movilidad relativa, y en Roble Pellín, al alelo 2.

Tabla III.7: Determinación de marcadores específicos de especie en árboles adultos de *Nothofagus nervosa* y *N. obliqua* de poblaciones puras y de zona de simpatría.

Loci Población	<i>Pgi</i>			<i>Adh</i>				<i>Mdh</i>					
	11	12	22	11	12	22	12	22	23	33	24	44	45
<i>N. obliqua</i> Zona pura	0	2	99	32	0	0	3	78	3	2	0	0	0
<i>N. obliqua</i> Zona simpatría	0	14	78	21	0	0	6	78	3	0	2	0	0
<i>N. nervosa</i> Zona simpatría	89	0	0	0	0	67	0	0	0	0	0	87	2
<i>N. nervosa</i> Zona pura	114	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	114	1

Es interesante destacar que Godoy (1994) no pudo verificar el análisis genético de ADH y PGI debido a que, en los dos casos, los árboles madre analizados no presentaban variación. Sin embargo, entre su descendencia aparecían embriones heterocigotas y, en ningún caso el homocigota para el otro alelo.

Si bien muchos de los individuos no pudieron ser analizados para el locus *Adh* debido a la ausencia de actividad en sus yemas, la presencia de un individuo heterocigota para *Pgi* y homocigota para *Adh*, permitió confirmar la independencia de ambos loci. Esta independencia pudo comprobarse extensivamente entre las semillas analizadas en las poblaciones (Capítulo IV) y sugiere la posibilidad de retrocruzas entre el híbrido (F<sub>1</sub>) y sus parentales.

Es importante destacar que entre los individuos adultos de Raulí utilizados para el análisis genético no se detectó la presencia de ningún embrión híbrido, sugiriendo la pureza específica del material analizado.

**MDH:** Si bien en este sistema no siempre la hibridación se detectó con un genotipo característico, se observó la presencia de alelos distintos en cada especie. Por otra parte, en una prueba de progenies de raulí entre las cuales parte de la descendencia resultó híbrida, se observó una elevada heterocigosis en este sistema en aquellas familias en las que la proporción de híbridos era mayor (Gallo et al., 1997b). Es interesante destacar que el material analizado fueron hojas, observándose dos zonas en *N. obliqua* y una zona en *N. nervosa*. La complejidad de los zimogramas en *N. obliqua* por la superposición de ambas zonas impidió la homologación con los zimogramas observados en yemas.

El análisis de las yemas de ambas especies (Tabla III.7) reveló la existencia de distintos alelos, con preponderancia del alelo 2 en *N. obliqua* y del alelo 4 en *N. nervosa*. La presencia de una única zona en el tejido analizado (yemas) facilitó el análisis; sin embargo, la complejidad de los zimogramas obtenidos en semillas híbridas por la superposición con la zona B (Capítulo IV) impidió asignar inequívocamente un genotipo a cada embrión. Por lo tanto, si bien aquí se enumeraron los alelos de ambas especies en forma correlativa, en el análisis poblacional se tomarán sólo los de *N. nervosa*, denominándolos alelos *Mdh-C-1* y *Mdh-C-2*. En dicho capítulo se explicará la asignación de genotipos tentativos para las semillas híbridas.

En otras especies de *Nothofagus* se observaron bandas diagnósticas dentro de estos mismos tres sistemas enzimáticos que permitieron diferenciar entre *N. nitida*, *N. betuloides* y sus híbridos (Premoli, 1994). Similarmente en especies de *Nothofagus* de Nueva Zelandia se observaron bandas especie-específicas en *Pgi-2* y *Mdh-1* (Haase, 1993). En el género *Prosopis*, el locus *Adh* también presentó bandas diagnósticas entre algunas especies (Saidmann, 1986; Saidmann & Vilardi, 1987). En el caso de *Prosopis flexuosa* y *P. chilensis* donde se realizó el análisis genético previo, se observaron alelos específicos de especie en *Adh* mostrando los híbridos ambos alelos parentales (Verga, 1995).

#### **4. Conclusiones**

El análisis genético del modo de herencia de las variantes isoenzimáticas observadas debería realizarse siempre para poder determinar en forma inequívoca los marcadores génicos, que sólo así pueden luego ser utilizados en estudios de variación genética. Por ejemplo, si en este trabajo no se hubieran analizado las madres y su descendencia de polinización abierta, no se hubiera podido separar la variación genética inherente a la zona B del sistema MDH de la zona A, dada la superposición de bandas de los zimogramas en embriones. Sin embargo, la comparación con los fenotipos maternos permitió el análisis separado de ambas zonas de actividad y el análisis genético de una de ellas. En caso contrario, posiblemente se hubiera llegado a una interpretación errónea del control genético. Más aún, la complejidad de los zimogramas observados en embriones habría hecho imposible la determinación correcta de los marcadores génicos utilizando sólo muestras de semillas provenientes



de poblaciones naturales. Por otro lado, la presencia de bandas dobles y triples en los sistemas IDH y PGI en individuos homocigotas, podría haber llevado a una interpretación errónea del modo de herencia de no haberse observado variación y haber analizado la segregación de las variantes.

La mejor forma de realizar el análisis genético en angiospermas es mediante el análisis de segregación en la descendencia de cruzas controladas. Dado que este procedimiento presenta en general muchas dificultades y el número de individuos obtenidos en la descendencia es escaso para fines estadísticos, el método desarrollado por Gillet & Hattemer (1989) empleado en este trabajo es una buena alternativa. Debido a la falta de actividad en tejido de yemas para algunos sistemas enzimáticos, este método no pudo ser aplicado en forma cualitativa en todas las zonas segregantes. En aquellas zonas donde no hubo actividad en yemas, la descripción cualitativa de los fenotipos observados permitió elaborar en forma intuitiva un modo de herencia, que es el procedimiento empleado en la mayoría de los trabajos en donde no se cuenta con cruzas controladas. Dado que el material analizado correspondía, en cada caso, a la descendencia de una misma madre conocida, es decir eran familias de medios hermanos, la hipótesis planteada tiene un peso mayor que en el caso de analizar progenie de ambos padres desconocidos. Más aún, el análisis cuantitativo posterior con cumplimiento estadístico de la hipótesis de segregación planteada permite sugerir con cierto grado de certeza el modo de herencia de las variantes observadas y hablar, en definitiva, de marcadores génicos. Este es el caso de los tres loci observados en el sistema enzimático GOT, los cuales serán utilizados como marcadores en el análisis poblacional. Por el contrario, en el sistema enzimático LAP, la hipótesis de segregación planteada en función de la variación fenotípica observada no pudo ser comprobada estadísticamente, por lo que en este caso no se debe hablar de marcadores génicos. Por ende, la variación observada en las zonas de actividad LAP-A y LAP-B debe ser considerada como fenotípica, no pudiendo ser utilizadas estas dos isoenzimas como marcadores génicos en estudios poblacionales.

En algunos sistemas, se observaron desviaciones de las proporciones esperadas en los fenotipos de la descendencia de algunos árboles, indicando que podría haber selección durante la reproducción. En el caso del locus *Mdh-B*, la segregación del alelo 1 no siempre pudo ser comprobada en relación a los otros alelos. Más aún, se observó una mayor frecuencia de los genotipos *13* en relación a los *12*, sugiriendo una posible selección en contra de estos últimos. Al usar embriones como

material de estudio, se evita la selección postcigótica, por ende, podría estar actuando una selección precigótica o una fertilización no al azar. Si este fuera el caso, uno o dos de los requisitos generales del método (números 2 y 3) (Gillet & Hattemer, 1989) no se cumplen completamente. Sin embargo, según Hattemer (1991a), las desviaciones en la segregación no influyen en la inferencia genética, dado que la compatibilidad cuantitativa de los datos con una hipótesis de segregación tiene una importancia menor.

En todos los casos en que el análisis genético pudo comprobarse, se confirmó la herencia de un monocus con alelos codominantes. En los sistemas MDH, GOT y ADH los homocigotas mostraron una única banda y los heterocigotas tres, confirmando una estructura dimérica para estas enzimas. Lo mismo se aplica para IDH y PGI, aunque los homocigotas presentaron banda doble y triple respectivamente y los heterocigotas cinco bandas. LAP, en cambio, tendría una estructura monomérica, coincidiendo con lo que se ha reportado para esta enzima.

En general, se observaron más zonas activas en embriones que en yemas. Lo mismo ocurrió en hojas, donde los zimogramas presentaron menos zonas que en los embriones (Gallo et al., 1997a; 1997b), sugiriendo que las semillas constituyen un material más adecuado para la determinación de marcadores génicos. Por otro lado, la ausencia de actividad en algunos sistemas enzimáticos en las yemas puede deberse a la fecha de cosecha de las mismas (fin del verano), ya que se observó que tienen actividad si se las recolecta en otoño o invierno. La inaccesibilidad de algunas de las poblaciones analizadas para este estudio durante la época invernal hicieron imposible la recolección del material en dicho momento del año.

Por último, los resultados presentados en este capítulo enfatizan la importancia de recolectar material de poblaciones puras de la especie en estudio para una determinación fehaciente de los marcadores génicos. La hibridación es un proceso común entre especies forestales de un mismo género y puede llevar a interpretaciones equivocadas del modo de herencia de las isoenzimas dentro de determinada especie. Por otro lado, material proveniente de poblaciones puras puede ayudar a estudiar la ocurrencia de marcadores específicos de especie que permiten estudiar procesos de hibridación, introgresión y flujo génico.

## Capítulo IV

# Diversidad y diferenciación genéticas en poblaciones de Raulí detectada mediante marcadores isoenzimáticos

## 1. Introducción

En el capítulo I se discutió la importancia del estudio de la diversidad genética y su implicancia en la conservación de los recursos genéticos de una especie, con especial referencia a *Nothofagus nervosa*. Se entiende por *diversidad genética* a la variación inherente a cada población o a cada especie (Smitinand, 1995), la cual refleja el número de tipos genéticos diferentes dentro de las mismas. La *variación genética* de una población es la existencia de diferentes variantes genéticas, que indican una condición de heterogeneidad, pero no los procesos que llevaron a esta condición. Las bases de esta variación son el número de loci polimórficos en conjunto con el número de alelos y sus distribuciones de frecuencias. En cambio, la *variabilidad genética* es el potencial de una población para producir individuos con distintos genotipos. Este potencial está basado en el grado de variación genética de la población y en su sistema genético (sistema de flujo génico, sistema de apareamiento, etc.) (Hattemer, 1991b). Por último, la *diferenciación genética* corresponde a la variación entre distintas poblaciones o subpoblaciones de una especie.

En este capítulo se analizarán los distintos factores que afectan la diversidad genética, se presentarán los resultados en las poblaciones estudiadas y se discutirá en función de ellos qué factores están influyendo en el patrón de distribución genética observado; también se hará una comparación en la diversidad y diferenciación genéticas con tres poblaciones de Chile. Asimismo se estimará la variación temporal en la estructura genética analizando nueve poblaciones cosechadas durante dos temporadas.

### 1.1. Factores que afectan la generación y distribución de la variación genética

Las especies arbóreas mantienen niveles de variación intraespecífica e intrapoblacional más elevados que otros taxones dentro del reino vegetal (Hamrick et al., 1992). Esta capacidad de mantener altos niveles de diversidad genética les confiere la posibilidad de adaptarse a un ambiente cambiante, lo cual está en estrecha

relación con su condición de especies longevas. Existen distintas fuerzas evolutivas que determinan la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de una especie. La evolución, entendida como un cambio de la estructura genética de una población, actúa sobre las frecuencias alélicas de las poblaciones a través de cuatro factores principales: *mutación*, *deriva genética*, *flujo génico* y *selección natural*. Si bien estas fuerzas tienen distintos efectos, todas contribuyen en conjunto a formar el patrón de variación genética de una especie.

La *mutación* es el único de estos procesos que genera nuevas variantes. Puede ser un cambio puntual en la secuencia nucleotídica o la delección o duplicación de secuencias cortas (*mutación génica*); puede modificar un arreglo cromosómico donde secuencias largas de ADN o partes de un cromosoma son afectados (traslocación, inversión, fusión y fisión) (*mutación cromosómica*); o puede implicar la duplicación, triplicación, etc. de todo el genoma, generando individuos poliploides (*mutación genómica*). La recombinación genética, durante la meiosis, genera también variación al producir nuevas combinaciones de genes. Si bien en general no se la considera estrictamente como un proceso que provoque mutaciones, existen casos en los que éstas ocurren. Por ejemplo, cuando la recombinación se da a nivel intragénico la secuencia del gen se modificará si los cromosomas son portadores de distintos alelos para el gen involucrado, dando lugar a nuevas variantes. Asimismo, si el apareamiento de los cromosomas homólogos no es perfecto se producen alteraciones que originan la duplicación de la secuencia mal apareada en uno de los cromosomas y la consecuente pérdida de la misma en su homólogo (Futuyma, 1986). Otro mecanismo que genera mutaciones es la acción de transposones, los cuales constituyen secuencias de ADN móviles que pueden insertarse en cualquier parte del genoma alterando su constitución. Su efecto es mayor cuando la inserción ocurre dentro de la secuencia de un gen estructural (gen que codifica para la síntesis de una proteína) o de un gen regulador (gen que participa en el control de la transcripción de uno o varios genes estructurales). Aunque las tasas de mutación son generalmente bajas, variando entre genes y entre organismos, nuevas mutaciones aparecen continuamente en las especies y constituyen la base sobre la cual actúa la evolución. La tasa de mutación por locus varía, en general, entre  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$ . Es importante destacar que esta tasa es distinta según el tipo de ADN (nuclear o citoplasmático). El genoma cloroplástico, por ejemplo, tiene tasas de mutación muy bajas, estimadas en el orden de  $10^{-9}$  en el caso de sustituciones sinónimas (es decir que no modifican la

proteína producto del gen) (en Clegg et al., 1991). Por otra parte, el efecto de la mutación será distinto según si ésta ocurre en secuencias codificantes o no codificantes del genoma. Las mutaciones en estas últimas secuencias no tienen una implicancia adaptativa inmediata importante, por lo que dichas regiones generalmente acumulan mutaciones. Por el contrario, las secuencias codificantes tienen una presión de selección que puede llegar a ser muy fuerte. Una simple sustitución puede llevar a un cambio drástico en la proteína codificada con consecuencias funcionales que alteren la sobrevivencia y reproducción del individuo que la porta. Por lo tanto, esas mutaciones tenderán a perderse al ser seleccionadas en contra o a fijarse en el caso en que posean valor adaptativo. Estas consideraciones son importantes en relación al tipo de marcadores génicos utilizados en un estudio de genética poblacional y a las conclusiones que se deriven de la variación observada.

En una población finita las frecuencias alélicas fluctúan de una generación a otra simplemente por efecto del azar en un proceso conocido como *deriva genética*. La fluctuación puede ser insignificante en poblaciones grandes, pero adquiere mucha importancia en poblaciones fragmentadas y aisladas de tamaño reducido, pudiendo en esos casos perderse algunos alelos y fijarse otros. Las consecuencias evolutivas más importantes de la deriva genética son la pérdida de variación genética dentro de las poblaciones y la diferenciación entre poblaciones. La reducción drástica en el número poblacional debido a algún factor externo de tipo catastrófico genera un aumento en el efecto de la deriva genética con la consiguiente disminución de la diversidad debido a que unos pocos individuos darán lugar a la siguiente generación (efecto conocido como “cuello de botella”). Al finalizar el último período glaciario, las especies pasaron por sucesivos cuellos de botella al recolonizar las zonas previamente glaciadas (Hewitt, 1999; 2000), generando una disminución en la riqueza alélica a mayores distancias desde el supuesto refugio glaciario (e.g. Conkle, 1992; Konnert & Bergmann, 1995; Zanetto & Kremer, 1995; Machon et al., 1996; Tomaru et al., 1997; Ledig, 2000; Comps et al., 2001). En tal sentido, las últimas glaciaciones afectaron el área de distribución actual de los bosques Andino-patagónicos, causando una reducción significativa no sólo en el tamaño poblacional sino también en el número de poblaciones. La recolonización, al retirarse los hielos, a partir de grupos reducidos de individuos puede haber llevado a sucesivos “cuellos de botella” en las especies de la región. Asimismo, el efecto antrópico puede haber causado una reducción en la variación genética al disminuir el número poblacional en aquellas áreas donde la

explotación forestal fue muy intensa. En el caso de *Nothofagus nervosa*, ambos procesos pueden haber afectado la variación genética de las poblaciones dado que, por un lado, las poblaciones actuales son producto de migración a partir de uno a varios refugios glaciarios y, por el otro, esta especie fue intensamente explotada en el pasado con serias reducciones en el tamaño poblacional en algunos sitios. Asimismo, algunas poblaciones se encuentran relativamente aisladas del resto de la distribución (por ejemplo la población 1 de Lago Espejo) con la posibilidad de una reducción en la variación genética por efecto de la deriva genética y la endogamia (ver más adelante).

Muchas poblaciones naturales constituyen en realidad redes de poblaciones con flujo de información genética entre ellas, lo que se conoce como “metapoblación”. El consiguiente traslado de genes entre poblaciones es conocido como *flujo génico*. Las plantas tienen la capacidad de dispersar sus genes en dos niveles principales: gamético (a través del polen) y genotípico (a través de las semillas). El efecto de este factor es contrario al de la deriva genética dado que tiende a homogeneizar la variación genética entre poblaciones, llegando a unificarlas si es muy extensivo. De hecho, la delimitación de poblaciones y el grado de diferenciación que pueden alcanzar depende de la cantidad de flujo génico que exista entre ellas y de las frecuencias alélicas relativas de las poblaciones participantes. En especies dispersadas y polinizadas por viento, como la mayoría de las especies de ecosistemas templados, este proceso puede verse limitado cuando la dispersión de las semillas o la del polen no alcanza grandes distancias. El flujo génico es considerado como uno de los factores decisivos en la distribución espacial de la diversidad genética (Hamrick & Nason, 2000) y se han descrito varios modelos de acuerdo a la estructura poblacional. Entre estos modelos los más frecuentes son el denominado “continente - isla” donde el movimiento de genes es en una única dirección desde una población grande (continental) hacia una pequeña aislada; el de “islas”, en el cual el flujo génico ocurre al azar entre un grupo de poblaciones pequeñas; el “stepping stone” donde cada población aislada recibe genes sólo de algunas poblaciones vecinas y a su vez actúa de “puente genético” hacia otras; y el de “aislamiento por distancia” donde el flujo solamente ocurre entre aquellas poblaciones más cercanas pertenecientes a una especie distribuida en forma continua.

En regiones como la que ocupan los bosques Andino-patagónicos, la presencia de cordones montañosos puede ejercer una barrera al flujo génico entre poblaciones, favoreciendo la diferenciación genética entre las mismas. A nivel regional, la

Cordillera de los Andes puede constituir una barrera importante, pero también a escala local los cordones montañosos transversales a la Cordillera pueden determinar cierto grado de aislamiento entre las poblaciones de una especie. Más aún, los valles situados entre estos cordones pueden convertirse en corredores de flujo génico entre poblaciones de un mismo valle. Todo esto sugiere la existencia de poblaciones que podrían quedar relativamente aisladas de otras de su especie por barreras geográficas que impiden el intercambio genético.

Como ya fuera mencionado en el Capítulo I, la distribución natural de *Nothofagus nervosa* restringida a los valles transversales de las cuencas lacustres de origen glacial, sugiere la posibilidad de un patrón de diferenciación en sentido latitudinal. A su vez, los fuertes vientos en sentido oeste-este constituyen aproximadamente el 70 % de los vientos totales durante el período de polinización (octubre – noviembre) y el 58 % durante la etapa de dispersión de las semillas (febrero – marzo), siguiendo en frecuencia en ambos períodos las etapas de calma (ausencia de vientos) (Servicio Meteorológico Nacional, Estación Aeropuerto San Carlos de Bariloche). Esta marcada tendencia de los vientos sugiere la ocurrencia de flujo génico unidireccional dentro de las cuencas, limitándolo quizás entre cuencas vecinas. Dependiendo del marcador génico que se utilice se pueden estudiar diferentes niveles de flujo génico. Con los marcadores nucleares, como las isoenzimas, se puede analizar el flujo del polen y de la semilla. En cambio, con los marcadores citoplasmáticos de herencia materna, como el ADN de cloroplasto en el caso de angiospermas, se detecta exclusivamente el flujo a nivel seminal.

La *selección natural* actúa en forma directa sobre la sobrevivencia y capacidad de reproducirse de los diferentes genotipos de una población. Existen diferentes niveles en los cuales la selección puede ejercer su efecto. A nivel *génico*, la tasa de reproducción de un gen puede ser distinta que la del organismo que lo lleva, fenómeno conocido como “deriva meiótica”. A nivel *poblacional*, diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones pueden llevar a distintas tasas de extinción o establecimiento de nuevas poblaciones. Finalmente, a nivel de *especie*, las tasas de especiación y extinción estarán afectadas por la presencia o no de una característica particular en la especie. La selección sólo tiene posibilidades de actuar si existen diferencias fenotípicas que determinen cambios en las tasas de supervivencia o reproducción causadas, al menos en parte, por diferencias genéticas. Existen tres tipos principales de selección: si los fenotipos intermedios son favorecidos por una

adaptación superior la selección es *estabilizadora*; si por el contrario el mejor adaptado es el fenotipo extremo la selección es *direccional*; por último si dos o más fenotipos extremos tienen mayor supervivencia y los intermedios son desfavorecidos, la selección es *disruptiva*. Cuando los fenotipos seleccionados corresponden a genotipos homocigotas, la selección tiende a reducir la variación genética con la posibilidad de llegar a la fijación de un alelo. Por el contrario, cuando los individuos heterocigotas tienen una adaptación mejor con la consecuencia directa de una mayor supervivencia y capacidad de dejar descendencia, la selección natural mantiene la variación genética. En *Nothofagus nervosa*, la distribución dentro de algunas cuencas abarca un gradiente pluviométrico que, si bien no es tan marcado como el de otras especies que llegan a la estepa (como *Austrocedrus chilensis*) es al menos considerable, variando de más de 3500 mm anuales hacia el oeste hasta aproximadamente 1500 mm en el este (por ejemplo en la cuenca del Lago Lácar). La adaptación de la especie a estas condiciones ambientales distintas puede implicar un proceso de selección natural. Por otro lado, la selección artificial realizada en el pasado por la extracción selectiva de los mejores individuos, puede haber ejercido también un efecto en la variación genética remanente, sobre todo en aquellas poblaciones más afectadas por la explotación.

Además de los cuatro factores evolutivos mencionados antes existen otros procesos genéticos de gran importancia en la determinación de los patrones de variación genética. En el caso particular del Raulí el sistema de apareamiento y la hibridación natural con Roble Pellín aparecen “a priori” como algunos de ellos.

El sistema de apareamiento de una especie puede favorecer un aumento en la deriva genética, dado que el número efectivo de individuos que participan en la reproducción puede verse reducido por fertilidad diferencial de los potenciales progenitores. Como este proceso puede tener lugar incluso en poblaciones grandes sólo parte de la población contribuye genéticamente a la nueva generación. Además, si la relación de sexos no está balanceada el tamaño efectivo de la población se verá aún más reducido. Por otra parte, en la mayoría de las especies arbóreas los individuos se aparean con sus congéneres más cercanos lo cual implica un apareamiento selectivo (no al azar) entre grupos reducidos de individuos. Esto lleva, en sucesivas generaciones, a un aumento en la endogamia (reproducción entre individuos emparentados), lo cual contribuye a disminuir la variación genética, generando una estructura genética espacial en “mosaico”. Por último, la autofecundación también



reduce la variación genética por un aumento del número de homocigotas, si bien en especies arbóreas su efecto sería mínimo ya que existen barreras fenológicas tendientes a reducirla. En Raulí, la existencia de ciclos en la producción de semillas (Marchelli & Gallo, 1999; Capítulo II) podría generar un aumento en el efecto de la deriva genética aún en poblaciones grandes cuando pocos individuos participan en la reproducción. A su vez, como ya se mencionó, en algunas poblaciones geográficamente más aisladas de la distribución principal, como la población de Lago Espejo, el efecto sería mayor.

Por último, un proceso frecuente en especies arbóreas de un mismo género, y que para el caso particular del Raulí debe ser considerado entre los factores que afectarían la distribución de su variación genética, es la *hibridación interespecífica*. Existen especies en estados de especiación intermedios en las cuales las barreras de aislamiento reproductivo son parciales y la existencia de zonas híbridas permite el cruzamiento interespecífico. El aislamiento geográfico es en muchos casos la barrera más fuerte al intercambio génico entre especies dado que las mismas hibridan si entran en contacto. En el caso de *Nothofagus nervosa*, el proceso de hibridación con *N. obliqua* podría estar afectando la distribución de la variación genética actual. Ambas especies se encuentran en simpatría en las cuencas de los lagos Lácar y Quillén (Fig. I.4). Si bien ocupan distintos nichos determinados por la altitud, forman masas boscosas en relación 1:1 en la zona de contacto (aproximadamente a los 800 m snm). Más aún, *N. nervosa* desciende a altitudes menores en algunas regiones ingresando en el área de distribución predominante de *N. obliqua*. La introgresión principalmente de *N. obliqua* en el pool génico de *N. nervosa* (Gallo, et al., 1997a, 1997b; Gallo et al., 2000a, 2000c; Gallo, 2000) podría estar ejerciendo una influencia aún mayor en la distribución de la variación genética en *N. nervosa* que los otros procesos genéticos mencionados más arriba.

## 1.2. Variación geográfica

La variación ecológica y geográfica a que está sujeta una especie a lo largo de su área de distribución natural influye en la cantidad y distribución de la variación genética. Se ha observado que la diversidad genética es mayor en especies de amplia distribución que en aquellas de área reducida; a su vez, las especies de distribución endémica son en general las menos diversas. En estas últimas, por el contrario, se observa mayor diferenciación entre poblaciones (Hamrick et al., 1992).

El paisaje de tipo montañoso genera una variedad de hábitats importante, donde la altitud juega un rol fundamental en la separación de nichos. A su vez, como ya fuera discutido, en estos ambientes existen barreras importantes al flujo génico entre poblaciones. Más aún, la adaptación de las especies a distintos microhábitats implica un proceso de selección natural que, al igual que el impedimento al intercambio genético, favorece la diferenciación entre poblaciones. Por el contrario, en ambientes más uniformes se espera una mayor homogeneidad en la variación genética entre poblaciones.

Numerosos trabajos han descrito la relación entre patrones de variación isoenzimáticos y la distribución geográfica en especies forestales. Por ejemplo entre las Fagaceae y las Nothofagaceae, Comps et al. (1990); Müller-Starck & Ziehe (1991); Zanetto & Kremer (1995); Haase (1992); Premoli (1997, 1998). En *N. nervosa*, estos marcadores se han utilizado en Chile (Carrasco & Eaton, 1997) y en algunas poblaciones de Argentina (Marchelli & Gallo, 2001). Dadas las características del paisaje de tipo montañoso en el que se distribuye la especie, el cual ofrece numerosos microhábitats, y la posibilidad de que existan corredores de flujo génico (ver sección anterior) resulta difícil imaginar “a priori” el patrón de diferenciación genética de la especie. Por este motivo es importante analizar un gran número de poblaciones para detectar la mayor parte de la variación genética y poder asociarla a la distribución geográfica.

### **1.3. Sistema de apareamiento y variación temporal**

En especies longevas que ocupan áreas relativamente amplias y diversas, el establecimiento de cohortes en las poblaciones a lo largo del tiempo puede llevar a una diferenciación genética no sólo en sentido espacial sino también temporal. Tanto la estructura genética de las distintas clases de edades como la estructura genética de la nueva generación producida cada año y representada en las semillas puede variar. El sistema de apareamiento influye en gran medida en la variación genética temporal que puede existir en una población. En el caso de *Nothofagus nervosa*, cada temporada se producen enormes cantidades de semillas de las cuales una gran proporción son vanas (ver Capítulo II). Entre las restantes, sólo una pequeña cantidad germinará y unas pocas llegarán a edad reproductiva. Más aún, la periodicidad en la producción de semillas determina probablemente pulsos regenerativos, dado que se observó que el porcentaje de germinación es mayor en años de producción abundante

(Marchelli & Gallo, 1999; Capítulo II). Por otra parte, el tamaño efectivo de la población, es decir el número de individuos que participan en la reproducción, varía de año en año en estrecha relación con la periodicidad en la producción seminal. Se ha observado que en años de producción abundante no sólo la cantidad de semillas que produce cada individuo es mayor sino también el número de árboles que las produce. En años de producción escasa producen sólo los “buenos semilleros” y en cantidad reducida (Gallo, com. pers.). Por lo tanto, como ya se mencionó en el Capítulo II, es lógico suponer que en años de producción abundante el tamaño efectivo de la población es mayor que en años de producción escasa y, por ende, la constitución genética de la población adulta y de su potencialidad evolutiva estará mejor representada en la nueva generación que en años de escasa producción seminal. Es de esperar consecuentemente, que existan diferencias en las frecuencias génicas en la generación seminal perteneciente a distintos años por la participación de un número mayor o menor de individuos adultos.

En conclusión, dado que la producción de semillas en *Nothofagus nervosa* es cíclica es de esperar que la estructura genética en las semillas sufra cambios temporales en función de los árboles que fructifican cada año. Si existen diferencias genéticas significativas entre los individuos que se reproducen cada año, existirán lógicamente diferencias entre las estructuras genéticas de las semillas que se forman. Por otro lado, y por la misma razón, la composición del flujo génico entre poblaciones puede también ser distinta de un año a otro.

A pesar de lo razonable que aparentan ser estas hipótesis y de la importancia del sistema de apareamiento sobre la variación genética existen pocos estudios dónde se analice la variación temporal en la estructura genética de especies arbóreas; por ejemplo en *Pinus ponderosa* (Linhart et al., 1981), en *Pinus sylvestris* (Müller-Starck, 1985b) y en *Fagus sylvatica* (Gregorius et al., 1986; Merzeau et al., 1994).

Cuantificar la variación temporal es de fundamental importancia antes de realizar generalizaciones sobre la diversidad genética y la potencialidad evolutiva de una población y sobre la diferenciación entre poblaciones de una especie. Es importante determinar también cual de los dos componentes (el espacial o el temporal) tiene un efecto mayor en la estructura de la variación genética.

## 1.4. Hipótesis

*Los patrones de distribución de la variación aloenzimática en *Nothofagus nervosa* están determinados principalmente por el flujo génico, el área de distribución geográfica de la especie, la deriva genética durante la migración postglacial, la hibridación interespecífica y el sistema de apareamiento.*

Teniendo en cuenta la distribución geográfica particular del Raulí, si el flujo génico ocurre en sentido unidireccional dentro de cada cuenca lacustre y es muy extensivo, las poblaciones ubicadas dentro de una misma cuenca tendrán una estructura genética similar diferenciándose de aquellas situadas en otras cuencas. Esto generará una variación aloenzimática en sentido latitudinal.

Si durante la migración postglacial las poblaciones pasaron por sucesivos cuellos de botella, aquellas situadas en o cerca de los posibles refugios tendrán una riqueza alélica mayor. Esta riqueza se irá perdiendo por efecto de la deriva genética en poblaciones pequeñas a lo largo de los caminos migratorios.

Si la hibridación con *N. obliqua* aporta nuevos alelos, las poblaciones ubicadas en el área de simpatría tendrán una mayor diversidad génica.

Si la proporción de los diferentes genotipos a reproducirse cada año varía, existirá variación temporal en el sistema de apareamiento y por lo tanto en la estructura genética de la generación seminal.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Material de estudio

La variación genética de la generación seminal de una población es un indicador estimativo de su variabilidad genética (potencialidad evolutiva), lo cual está en estrecha relación con su capacidad de adaptación a cambios ambientales. Las diferencias entre la estructura genética de la población adulta y la de la nueva generación radican fundamentalmente en la posible presencia de nuevas variantes genéticas ocurridas por mutación y recombinación o provenientes de otra población (flujo génico). Asimismo es de esperar mayores frecuencias de alelos raros que por presiones de selección en contra puedan perderse al no llegar a edad reproductiva. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la estructura genética de la población adulta responde principalmente a las condiciones ambientales del momento en que se estableció las cuales, en el caso del Raulí luego de 150 – 200 años, pueden ser

distintas a las actuales. Si bien la nueva generación contiene la información genética de la población parental, no necesariamente la representa plenamente. Si la población estuviera en equilibrio de Hardy-Weinberg las frecuencias alélicas se mantendrían constantes. Sin embargo, las condiciones que presupone este equilibrio raramente se cumplen en poblaciones naturales. En tal sentido, la producción cíclica de semillas y la observación de árboles que semillan todos los años independientemente del resto de la población, lo cual se ha observado en especies de *Nothofagus* (Donoso, 1993), indica una reproducción diferencial que se aleja del supuesto de panmixia requerido en dicho modelo. Esta característica del sistema de apareamiento implica que podrían existir diferencias en las capacidades reproductivas de los distintos genotipos.

En general, en los estudios en que se utilizan semillas se caracteriza la variación genética de cada población y se obtienen parámetros para la especie mediante el análisis de entre 100 y 200 semillas producidas durante una sola temporada (e.g. Müller-Starck & Gregorius, 1986; Bergmann et al., 1990; Turok, 1993; Zanetto et al., 1994; Zanetto & Kremer, 1995). Similarmente, al estudiar la población adulta generalmente se toma una muestra de ésta, mucho menor que en el caso anterior, que no necesariamente incluye todas las variantes genotípicas. El número de individuos analizados es variable en distintos estudios, pero en general oscila entre 30 y 50. El promedio de los trabajos citados a continuación da un número de 43 individuos analizados (e.g. Comps et al., 1990; Comps et al., 1991; Lumaret & Michaud, 1991; Villani et al., 1991; Haase, 1992, 1993; Samuel et al., 1995; Tomaru et al., 1997; Premoli, 1997, 1998; Premoli et al., 2000a; Demesure et al., 2000). De este número muestral depende la probabilidad de captar alelos en baja frecuencia. Por ejemplo, con una muestra de 40 individuos la posibilidad de captar aquellos genotipos que en la población real se hallan con una frecuencia del 10 %, es menor al 95 % y, por lo tanto, poco aceptable estadísticamente (Hattemer et al., 1993).

Las ventajas de utilizar semillas como material de estudio no sólo radican en la posibilidad de obtener una muestra grande con un esfuerzo relativamente menor al del muestreo de árboles adultos. Desde el punto de vista genético, a igual tamaño muestral de ambos tipos de material, existen ventajas y desventajas para ambos. La población adulta actual responde a condiciones del pasado que, como ya se discutió, pueden haberse modificado y, a su vez, dicha población estuvo sujeta a un proceso de selección natural desde su establecimiento. Por el contrario, las semillas ofrecen la posibilidad de evaluar procesos actuales como el flujo génico y la hibridación. Más

aún, la posibilidad de analizar la variabilidad, que representa la potencialidad evolutiva de la población y que sólo puede medirse en material seminal, es de fundamental importancia en programas de conservación. Por ejemplo, si existiera el caso de dos poblaciones, una relativamente aislada y la otra con aportes de flujo génico por parte de otras poblaciones cercanas, el análisis de los individuos adultos podría no mostrar diferencias en las estructuras genéticas, mientras que, por el contrario, el análisis de la descendencia evidenciaría una mayor variación en la población que recibe aportes génicos, siendo por ende, más importante desde el punto de vista de su conservación (Gallo, com. pers.).

La situación ideal para el estudio de todos los procesos evolutivos sería analizar la población adulta, su descendencia representada en la generación seminal y la regeneración natural de distintas edades, lo que permitiría seguir el efecto de la selección natural bajo las condiciones actuales. Sin embargo, tal estudio requiere un tiempo y esfuerzo que sería prácticamente imposible de realizar con un número elevado de poblaciones. Por lo tanto, el material a utilizar deberá ser aquel que mejor responda a las hipótesis planteadas en cada estudio.

Por todos estos motivos, resulta evidente que el muestreo de las poblaciones seminales no sólo favorece una determinación estadística más exacta de la diversidad y diferenciación genéticas sino que además permite inferir procesos genéticos actuales de importancia evolutiva. Esto, sumado al interés de producir plantas para futuros trabajos genecológicos sobre la variación en características morfométricas en ensayos de procedencias (“jardines comunes”), motivó la utilización de semillas como material de estudio.

## **2.2. Medición de la variación genética**

**2.2.1. Estructura genética:** el primer paso antes de calcular los distintos parámetros de variación intra e inter poblacional, es determinar la estructura genética de la población. En tal sentido, se obtienen las frecuencias alélicas y genotípicas en cada locus para cada población. La existencia de diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas entre poblaciones debe ser probada estadísticamente antes de analizar la diferenciación entre las mismas, dado que si existe homogeneidad no tiene sentido hablar de poblaciones distintas. En este trabajo se utilizó el test de  $\chi^2$  ( $\alpha = 0,05$ ) para tal fin. La misma prueba estadística se empleó para comparar las

frecuencias alélicas entre las semillas de distintos años y la estructura genética de la generación seminal con respecto a la parental.

## **2.2.2. Medidas de variación intrapoblacional**

**2.2.2.1. Proporción de loci polimórficos:** se han definido dos criterios por los cuales un locus puede ser considerado como polimórfico: si la frecuencia del alelo más común no supera el 95 o el 99 %. Sin embargo, estos criterios son artificiales y arbitrarios, dado que la detección de un locus polimórfico depende del tamaño de la muestra. Por este motivo, Berg & Hamrick (1997) han sugerido tomar como polimórfico todo locus en el que se observen más de una variante, independientemente de su frecuencia. La determinación de marcadores génicos requiere la existencia de variantes fenotípicas que puedan ser inequívocamente asociadas a la acción directa de un gen. Es decir, para realizar el control genético de la variación isoenzimática observada es necesario tener al menos dos variantes. Como en el presente trabajo sólo se tienen en cuenta marcadores génicos, todos los loci considerados son polimórficos según el criterio de Berg & Hamrick (1997). Cabe aclarar que el polimorfismo se da a nivel de la especie, pudiendo ser algunos loci monomórficos a nivel poblacional cuando sólo se observa una de las variantes alélicas.

**2.2.2.2. Caracterización de los perfiles genéticos:** Lewontin (1985) realizó una clasificación de los perfiles de frecuencias genéticas comúnmente observados en isoenzimas:

- \* *Monomorfismo*: fijación para un único alelo.
- \* *Polimorfismo menor*: un alelo predominante, al menos un alelo raro, ausencia de alelos en frecuencias intermedias.
- \* *Polimorfismo mayor*: más de un alelo predominante, sin alelos raros, ausencia de alelos en frecuencias intermedias.
- \* *Polimorfismo mayor extendido*: polimorfismo mayor con al menos un alelo raro.

Gregorius & Bergmann (1995) han señalado numerosas causas evolutivas por las que se pueden dar cada uno de estos perfiles, las cuales deben explicar la

existencia de alelos predominantes y raros. Las causas sugeridas para cada tipo de perfil se resumen en la Tabla IV.1.

Un problema que surge para clasificar un perfil es el límite que debe tomarse para considerar a un alelo como raro o predominante. Este límite es en cierto modo subjetivo y arbitrario e incluso la detección de alelos raros puede depender del tamaño de la muestra considerada. Se ha sugerido una frecuencia mayor o igual al 20 % para considerar un alelo como predominante (Finkeldey, 1993). Pastorino (2001), realizó un desarrollo de la curva de diversidad (v, Gregorius, 1978) para un locus dialélico encontrando el punto de inflexión de la curva en una frecuencia de 0,789. A partir de este punto, a igual cambio en las frecuencias alélicas, el cambio es menor hacia la derecha (frecuencias mayores a 0,789) que hacia la izquierda. Esta frecuencia (cerca al 80 %), coincide con el límite establecido por Finkeldey (1993) e indica que el *polimorfismo menor* requiere la presencia de un alelo en una frecuencia que supere el 20 % (o sea el complemento de 80 %). A su vez, el *polimorfismo mayor* requiere que más de un alelo superen esta frecuencia.

**Tabla IV.1: Causas sugeridas para los perfiles genéticos isoenzimáticos más frecuentes (tomado de Gregorius & Bergmann, 1995).**

Tipo de perfil genético	Causas sugeridas
Perfil sin alelos raros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sólo un número limitado de productos génicos alternativos funcionales son posibles por mutación y los restantes mutantes son letales.</li> <li>• Tamaño de muestra insuficiente.</li> </ul>
Perfil con alelos raros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutaciones recurrentes deletéreas o no recurrentes, cuyos productos pueden tolerar modificaciones moderadas (e.g. enzimas monoméricas).</li> <li>• Migración adaptativamente inferior.</li> </ul>
<i>Monomorfismo y polimorfismo menor</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selección dirigida.</li> <li>• Deriva genética debido a tamaño poblacional reducido.</li> </ul>
<i>Polimorfismo mayor y mayor extendido</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ventaja del heterocigota, preferiblemente en presencia de dos alelos predominantes, causados por:               <ol style="list-style-type: none"> <li>a) heterogeneidad ambiental temporal,</li> <li>b) heterogeneidad ambiental espacial con sobredominancia marginal,</li> <li>c) diferenciación ontogenética de la función.</li> </ol> </li> <li>• Diferenciación local adaptativa con aislamiento reproductivo suficiente entre las subpoblaciones.</li> <li>• Selección negativa dependiente de la frecuencia.</li> </ul>



Los alelos en menor frecuencia son los que corren el riesgo mayor de perderse por efecto de la deriva genética. Una distribución uniforme con igual proporción de todos los tipos genéticos es la que presentaría el menor riesgo de pérdida de alelos, por lo que el perfil genético más estable es el que se aproxima más a la distribución uniforme. El límite considerado para determinar la rareza de un alelo fue establecido en 10 % por Brown (1978), pero otros autores fijaron límites inferiores, como por ejemplo 2 % (Conkle, 1992; Finkeldey, 1992). La importancia de los alelos en menor frecuencia no radica en establecer un límite para su clasificación, sino en la influencia que ejercen los mismos en los parámetros de genética poblacional calculados con las frecuencias alélicas observadas. En tal sentido, la presencia de alelos en baja frecuencia afecta en mayor medida a la heterocigosis esperada (He, Nei, 1973), ya que estos alelos se encuentran generalmente en estado heterocigota, y a la multiplicidad alélica, pero no modifican mayormente a la diversidad génica (v, Gregorius, 1978) la cual corresponde al número efectivo de alelos (ver más adelante).

Al trabajar con muestras de poblaciones es importante determinar la capacidad de las mismas de detectar todos los alelos presentes en una población, sobre todo si se quieren realizar estudios de flujo génico o analizar la variabilidad de la población a los fines de su conservación. Gregorius (1980) y posteriormente Bergmann et al. (1990) y Finkeldey & Gregorius (1994) propusieron la utilización de un límite inferior  $\alpha$ , el cual correspondería al valor que garantiza con una probabilidad  $1 - \phi$  que todos los alelos de la población con frecuencia mayor que o igual a  $\alpha$  aparecen al menos una vez en una muestra de tamaño  $N$  ( $\phi$  se establece en 0,05 o 0,01, Gregorius, 1980). Por ejemplo, dado un  $N$  de 100 genotipos (200 gametas), aquellos alelos presentes en la población en una frecuencia igual o mayor al 3,2 % ( $\alpha$ ) aparecerán al menos una vez en la muestra, con una probabilidad del 95 %. El poder de detección de la muestra es muy relevante cuando se analizan los alelos raros para distinguir las causas de los perfiles genéticos, por ejemplo entre flujo génico o mutaciones no recurrentes o mutaciones recurrentes deletéreas. Si un alelo en probabilidad menor a  $\alpha$  aparece en algunas poblaciones y no en otras simplemente por error de detección, llevará a suponer una diferenciación entre poblaciones que no es tal.

En este trabajo se utilizará la clasificación de Lewontin (1985) para distinguir los perfiles enzimáticos, tomando como límite arbitrario para definir alelos raros,

aquellos en frecuencias menores al 10 %. Se establecerá el límite  $\alpha$  con  $\phi = 0,05$  para determinar el poder de detección de cada muestra.

**2.2.2.3. Multiplicidad alélica y número medio de alelos por locus:** la multiplicidad se refiere al número de variantes, en este caso el número de alelos de un gen en una población (Hattemer, 1991b). Si se considera un número  $L$  de loci, la multiplicidad alélica promedio (número medio de alelos por locus) ( $A_L$ ) equivale a la media aritmética de las multiplicidades alélicas en cada locus para la población:

$$A_L = 1/L \sum_{l=1}^L A_l$$

siendo  $A_l$  el número de alelos presentes en cada locus en una población.

**2.2.2.4. Diversidad ( $\nu$ ):** la diversidad equivale al “número efectivo de tipos genéticos” (Gregorius, 1987). En el caso de diversidad génica, este parámetro equivale al número efectivo de alelos (Gregorius, 1978), y mide la uniformidad en la distribución de las frecuencias alélicas en un locus. Se calcula, para cada locus, a partir de las frecuencias alélicas:

$$\nu = \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^{-1}$$

donde  $\nu_l$  es la diversidad génica en el locus  $l$  y  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  en dicho locus.

La diversidad para el pool génico se calcula como la media armónica de la diversidad en cada locus:

$$\nu = \left( 1/L \sum_{l=1}^L 1/\nu_l \right)^{-1}$$

donde  $\nu_l$  es la diversidad génica en cada locus y  $L$  es el número total de loci.

**2.2.2.5. Heterocigosis observada ( $H_o$ ):** corresponde a la proporción de individuos heterocigotas observados en cada locus. La heterocigosis del pool génico para cada población corresponde a la media aritmética de las heterocigosis en cada locus.

**2.2.2.6. Heterocigosis esperada ( $H_e$ ):** es la proporción esperada de loci heterocigotas por individuo en una población si esta se hallara en equilibrio de Hardy-Weinberg. A

pesar de que refiere a estructuras genotípicas, está basado en frecuencias alélicas. Generalmente se lo denomina diversidad génica o genética (Nei, 1973) y se calcula según la fórmula siguiente, promediando a través de todos los loci:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ .

### 2.2.3. Medidas de variación entre poblaciones

Si bien los parámetros más comúnmente estimados para analizar la distancia genética y diferenciación entre poblaciones son aquellos descritos por Nei (1972, 1973) y Wright (1978), se han realizado críticas con fuertes argumentos científicos en contra de los mismos. Gregorius (1974) señaló la inexactitud de la distancia genética desarrollada por Nei (1972) ya que la misma no cumple los requisitos mínimos de una distancia (en particular el requisito de desigualdad triangular, ver próxima sección). Por otro lado, Gregorius & Roberds (1986) resaltan el uso indebido de los índices de fijación desarrollados por Wright (1978), en particular el  $F_{ST} = G_{ST}$  (Nei, 1973), como medidas de diferenciación entre poblaciones. Asimismo, proponen como alternativa el uso de un estimador de la diferenciación genética entre cada población y su complemento (conjunto de las restantes poblaciones) ( $\delta$ ) basado en la distancia genética. Resulta curioso que si bien otros autores reconocen las falencias del índice de fijación  $F_{ST}$  como medida de diferenciación (Wright (1978) resalta las debilidades del mismo, Berg & Hamrick (1997) lo discuten también), este estimador se sigue utilizando simplemente por ser el más generalizado. En este trabajo se utilizaron los parámetros desarrollados por Gregorius (1974) y Gregorius & Roberds (1986) que se describen a continuación. Dada la amplia difusión del  $F_{ST}$ , se lo calculó también para permitir la comparación con otros trabajos.

**2.2.3.1. Distancia genética ( $d_0$ ):** si se consideran dos poblaciones  $X$  e  $Y$  la distancia genética ( $d_0$ ) entre ambas fue definida por Gregorius (1974) como:

$$d_{0(x,y)} = 1/2 \sum_{i=1}^{nk} |x_i^k - y_i^k|$$

donde  $x_i^k$  e  $y_i^k$  son las frecuencias del alelo  $i$  en el locus  $k$  en las dos poblaciones  $X$  e  $Y$ . Esta distancia corresponde a la distancia alélica, pudiéndose también calcular la distancia a nivel genotípico.

La distancia entre dos estructuras genéticas es la proporción de tipos genéticos por los cuales las dos poblaciones difieren. Por lo tanto,  $d_0$  varía entre 0 y 1, siendo  $d_0 = 0$  sólo si dos poblaciones tienen una estructura genética idéntica y  $d_0 = 1$  sólo si no tienen tipos genéticos en común.

Existen cinco requisitos que una distancia genética debe cumplir (Gregorius, 1974):

- a)- ser un valor no negativo
- b)- no tener direccionalidad ( $d_{(x,y)} = d_{(y,x)}$ )
- c)-  $d_0 = 0$  sólo si dos poblaciones tienen idéntica composición genética ( $x=y$ )
- d)- debe cumplir la desigualdad triangular ( $d_{(x,z)} + d_{(z,y)} \geq d_{(x,y)}$ ).
- e)-  $d_0 = 1$  sólo si dos poblaciones no tienen alelos en común.

En este sentido, la distancia genética definida por Gregorius cumple los cinco requisitos mencionados arriba.

La distancia genética para el pool génico corresponde a la media aritmética entre las distancias de cada locus.

La significancia de la distancia entre poblaciones ( $\alpha = 0,05$ ) se calculó mediante el programa GDA\_NT (Degen, B., sin publicar).

**2.2.3.2. Diferenciación entre poblaciones ( $D_j$  y  $\delta$ ):** La cantidad de diferenciación entre una población y el conjunto de las restantes poblaciones ( $D_j$ ) es la proporción de tipos genéticos (alelos, genotipos) por los cuales esta población difiere de las restantes poblaciones tomadas en conjunto (complemento) (Gregorius, 1985; Gregorius & Roberds, 1986). Se calcula en función de la distancia genética ( $d_0$ ):

$$D_j = 1/2 \sum_i \left| p_i^{(j)} - \overline{p_i^{(j)}} \right|$$

donde  $p_i^{(j)}$  es la frecuencia relativa del alelo  $i$  en la población  $j$  y  $\overline{p_i^{(j)}}$  la misma frecuencia en el conjunto de las poblaciones restantes (complemento), la cual se calcula de la siguiente manera:

$$p_i^{(j)} = \sum_{k \neq j}^k p_i^{(k)} \cdot c_k / (1 - c_j)$$

donde  $k$  es una población distinta de  $j$  y  $c_k$  indica el tamaño relativo de la población  $k$  con respecto a las otras. En el caso de considerarse a las poblaciones como infinitas (poblaciones grandes) se toma un  $c_j$  igual para cada una. En esta tesis se calculó de dicha manera.

La diferenciación media entre poblaciones ( $\delta$ ) se define como:

$$\delta = \sum_{j=1}^m c_j \cdot D_j$$

donde  $c_j$  representa el tamaño relativo de cada población, con  $\sum c_j = 1$  y  $m$  es el número de poblaciones analizadas. La diferenciación también varía entre 0 y 1, siendo 0 si la población es idéntica a su complemento y 1 si está totalmente diferenciada. La diferenciación media para el pool génico corresponde a la media aritmética de la diferenciación en cada locus. La diferenciación puede calcularse tanto a nivel génico ( $\delta_{ge}$ ) como genotípico ( $\delta_{go}$ ) (Gregorius & Roberds, 1986).

Una manera gráfica de ver la diferenciación entre poblaciones es mediante los “caracoles de diferenciación” (Gregorius & Roberds, 1986). En estos gráficos cada porción representa una población, el radio de la porción es proporcional al valor de diferenciación ( $D_j$ ) y el ángulo al tamaño de la población ( $c_j$ ). El círculo punteado representa el valor medio de diferenciación ( $\delta$ ).

Dado que la gran mayoría de los trabajos utiliza el  $F_{ST}$  (Wright, 1978) como medida de diferenciación, se calculó también esta medida a modo comparativo, según la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = 1 - H_S / H_T$$

donde  $H_S$  es el promedio de la heterocigosis esperada en condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg a través de todas las poblaciones y  $H_T$  corresponde a la heterocigosis total (diversidad génica) cuando todas las poblaciones se toman en conjunto.

**2.2.4. Dendrogramas (análisis de clusters):** Los dendrogramas se construyeron según el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method of clustering using

Averages) utilizando las distancias genéticas de Gregorius. Según este método, en el primer paso se agrupan aquellas dos poblaciones con la menor distancia genética, las cuales son consideradas como una única población que presenta una distancia con cada una de las restantes poblaciones equivalente al promedio de las distancias iniciales. En el paso siguiente se agrupa a aquellas poblaciones con menor distancia y se calcula nuevamente la matriz. Así sucesivamente hasta la última población.

**2.2.5. Correlaciones:** las relaciones entre las distancias genéticas y geográficas se analizaron mediante el test de Mantel (Mantel, 1967). La correlación entre las variables genéticas (frecuencias alélicas, diversidad y heterocigosis esperada) y la latitud se evaluó mediante la correlación de Spearman (test no paramétrico) ya que las variables no presentaban distribución normal. Se utilizó la transformación arcsen para las frecuencias alélicas por ser la más apropiada en el caso de proporciones y porcentajes (Sokal & Rohlf, 1969).

**2.2.6. Programas utilizados:** Para los cálculos de los distintos parámetros se emplearon los programas GSED (Genetic Structures from Electrophoresis Data, Gillet, 1994); GDA\_NT (Genetic Data Analysis & Numerical Tests, Degen, B., sin publicar); POPGENE (Yeh & Boyle, 1997), SAS General Lineal Models Procedure (SAS Institut Inc., 1999).

### **2.3. Poblaciones analizadas**

De acuerdo a lo descripto en el Capítulo II, se recolectaron semillas en 28 poblaciones de *Nothofagus nervosa* abarcando toda el área de distribución natural de la especie en Argentina durante los años 1994 a 1997. En función de su ubicación geográfica y los resultados preliminares de entre 16 y 30 semillas, se eligieron para el análisis 20 poblaciones que representaran a la especie (Figura IV.1).

Dado que en la mayoría de las poblaciones se contaba con material de al menos dos años, se utilizaron para el análisis las semillas provenientes del año de producción más abundante, ya que sugiere la presencia de más árboles involucrados en el proceso reproductivo y, por ende, la mejor representatividad de todos los genotipos posibles (Capítulo II; Marchelli & Gallo, 1999). Cabe aclarar que en la recolección del año 1994 se colocó un número menor de redes por población (4 redes en cada una) que en los años subsiguientes donde el número se elevó a 8 o más redes.

Por lo tanto, el número de árboles productores de semillas captados durante 1994 se podría estimar en aproximadamente 20, mientras que dicho número se elevó a, como mínimo, 40 árboles en los siguientes años. Por este motivo, si bien algunas poblaciones pueden haber tenido una producción de semillas mayor durante 1994, no se utilizaron semillas de este año en el análisis por considerarse que la representatividad de la población era menor. Por otro lado, la cantidad de árboles contribuyentes a la nube polínica se podría estimar en aproximadamente 120, si consideramos que cada árbol madre puede haber recibido polen de al menos tres árboles vecinos distintos a los 40 productores de semillas. Es decir, que el número mínimo estimado de árboles que contribuyeron con su información genética a la población seminal analizada es de aproximadamente 160.

De acuerdo a los datos de producción seminal mostrados en la Tabla II.1, se analizó un mínimo de 100 semillas de los años de máxima producción de semillas en cada población:

Año 1995: poblaciones 1, 17, 18, 19.

Año 1996: 10, 11, 12, 14.

Año 1997: 4, 5, 6, 8, 16, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 30.

La estimación de la variación temporal se realizó en nueve poblaciones en las cuales se analizaron semillas de dos años de producción (Tabla IV.2). En los casos en que la cantidad de semillas era suficiente se analizó un mínimo de 100 por población y por año, de lo contrario se utilizaron todas las disponibles (mínimo 60 semillas).

Las semillas provenientes de Chile corresponden a tres localidades (Fig. IV.1): Neltume, Malalcahuello y Nahuelbuta. Si bien son sólo tres poblaciones, cubren groseramente el área de distribución del Raulí en Chile. La recolección de las semillas se realizó durante 1998 en el marco del proyecto FONDEF D96/1052 (Universidad Austral de Chile, Instituto Forestal) cosechándose 10 árboles individuales en cada población. Se analizaron 100 semillas por población, mezclando los distintos árboles para hacer comparativos los resultados con los de Argentina.

Tanto las semillas recolectadas en Argentina como las provenientes de Chile se mantuvieron a 4 ° C hasta su utilización en los análisis electroforéticos.

#### **2.4. Análisis electroforético**

El primer paso en el estudio de la variación genética de una especie es la determinación de marcadores génicos con los cuales monitorear dicha variación (Ver

Capítulo III). De acuerdo al análisis genético realizado y detallado en dicho capítulo, se utilizaron los siguientes marcadores en las poblaciones de Raulí en estudio: *Mdh-B*, *Mdh-C*, *Idh*, *Adh*, *Got-A*, *Got-B*, *Got-C* y *Pgi-B*. Por otro lado, también se registraron dos zonas virtualmente monomórficas (*Mdh-D* y *Pgi-A*) y dos zonas en el sistema enzimático LAP y una en MDH (zona A) que ante la imposibilidad de realizar el análisis genético no fueron incluidos en el estudio de variación. Por ese motivo, de los 13 loci putativos sólo se incluyen en el análisis poblacional los ocho que, mediante el análisis genético de la segregación de sus variantes alélicas, pudieron ser determinados como loci marcadores. Las condiciones generales de extracción de proteínas, preparación de homogenatos, buffers de gel y de electrodo y condiciones de corrida ya fueron descriptas (Capítulo III).

Tabla IV.2: Años comparados en cada población en el análisis de la variación temporal.

Población	Años analizados
5	1994 y 1997
11	1994 y 1996
12	1996 y 1997
14	1994 y 1996
16	1996 y 1997
17	1995 y 1996
18	1995 y 1996
19	1995 y 1996
26	1996 y 1997

## 2.5. Niveles de análisis de la variación genética

La variación genética se midió dentro (diversidad) y entre (diferenciación) poblaciones. Este análisis se llevó a cabo en tres niveles:

- Poblaciones
- Grupos de poblaciones según su ubicación en las siguientes cuencas lacustres:
  - L. Espejo
  - L. Hermoso
  - L. Lácar



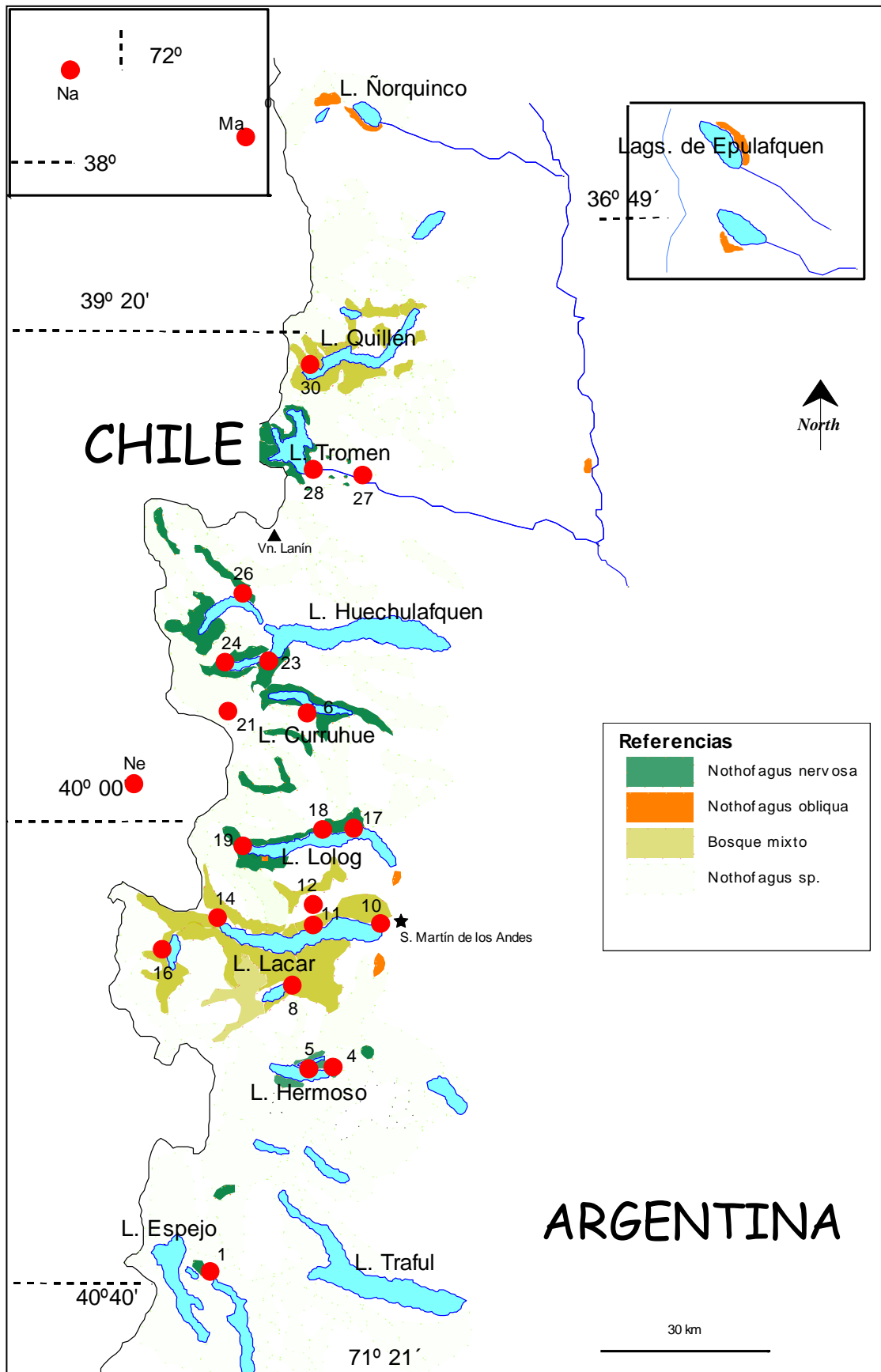


Figura IV.1: Ubicación geográfica de las poblaciones de Raulí estudiadas.

- L. Lolog
- L. Huechulafquen y Curruhue
- L. Tromen y Quillén.
- Comparación entre años.

Las tres poblaciones de Chile se analizaron por separado a modo comparativo, dado que al no constituir una muestra representativa de la distribución de la especie en dicho país, estaría sobremuestreado el sector Argentino.

### 3. Resultados

#### 3.1. Diversidad genética

Todas los sistemas enzimáticos analizados en este trabajo pertenecen al Grupo I (Bergmann, 1991) que está formado por enzimas constitutivas que participan en el metabolismo primario. De los ocho loci estudiados, seis presentaron *polimorfismo menor*, mientras que sólo dos se clasificaron como *polimorfismo mayor o mayor extendido* (*Mdh-B* y *Got-A*) en la mayoría de las poblaciones. La comparación de los perfiles genéticos entre poblaciones mostraron, en general, el mismo tipo de perfil para cada locus en todas las poblaciones. Las excepciones más notables fueron en tres de los loci con *polimorfismo menor* (*Mdh-C*, *Adh* y *Pgi*) en los cuales varias poblaciones presentaron *monomorfismo* y en *Idh* donde cuatro poblaciones tuvieron perfiles de tipo *polimorfismo mayor* (Tabla 1, Apéndice III, Tabla IV.3).

El nivel de detección de la muestra,  $\alpha$ , osciló entre 2,3 y 3,2 %, variando según el locus y la población por pequeñas diferencias en el tamaño de las muestras. Los alelos en frecuencias por debajo de este valor podrían estar presentes en otras poblaciones y no haber sido detectados en el muestreo. Las frecuencias alélicas observadas (Tabla 2, Apéndice III) denotan la presencia, en algunos loci, de alelos en frecuencias menores al nivel de detección que, sin embargo, aparecieron en varias poblaciones, en algunas de las cuales superaron este nivel. Tal es el caso por ejemplo de los alelos *Mdh-B-1* y *Mdh-C-2*. Se observaron también alelos exclusivos, como por ejemplo el alelo *Got-C-3* en la población 1 y el alelo *Got-A-3* en la población 19 (sólo en el año 1996), ambos en frecuencias por debajo del nivel de detección. Asimismo, en los loci *Got-B* y *Got-C*, se observó un alelo en cada caso con una frecuencia relativamente alta (10 %, *Got-B-6* y *Got-C-4*) en la población 14, los cuales sólo aparecieron nuevamente en una semilla en la población 12. Tanto el alelo *Got-C-3*

como el *Got-C-4* presentaron migración catódica (Fig. 1, Apéndice III). En el locus *Got-B* también se detectaron alelos en muy baja frecuencia en dos poblaciones (14 y 26). Por otro lado, se observó la presencia de alelos provenientes de *Nothofagus obliqua* no sólo en los loci específicos de especie (*Adh* y *Pgi-B*), sino también en *Mdh-B* (alelos 6, 7 y 8, este último sólo en la población 17 del año 1996), *Mdh-C* (alelo 7) y, probablemente en *Got-A* (alelo 6). La superposición de bandas en el sistema MDH (zonas B y C) dificultó la interpretación de los zimogramas en el caso de semillas híbridas (Fig. 2, Apéndice III), aunque en todos los casos la presencia de alelos de *Nothofagus obliqua* fue inequívocamente detectada.

El número medio de alelos por locus ( $A_L$ ) para la especie fue de 3,38 siendo la diversidad génica ( $\nu$ ) de 1,29 (Tabla IV.3). Este valor fue variable entre las poblaciones, incluso entre aquellas pertenecientes a una misma cuenca lacustre, y en ninguna población se encontraron todos los alelos (Fig. IV.2; Tabla IV.4), siendo el promedio entre poblaciones de 1,98. Este valor es más alto que el número efectivo de alelos ( $\nu$ ) que osciló entre 1,13 y 1,32, lo cual denota la presencia de polimorfismo menor con un alelo muy común y otros en baja frecuencia.

Tabla IV.3: Diversidad genética media en poblaciones argentinas y chilenas de Raulí.

	Locus	$A_L$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	PPP	$n$
Argentina (20 poblaciones)	<i>Mdh-B</i>	5	1,97	0,45	0,52	1,00	4596
	<i>Mdh-C</i>	3	1,02	0,01	0,02	0,45	4850
	<i>Idh</i>	2	1,24	0,17	0,19	1,00	4572
	<i>Adh</i>	2	1,01	0,01	0,01	0,25	4672
	<i>Got-A</i>	3	1,78	0,39	0,46	1,00	4408
	<i>Got-B</i>	6	1,15	0,12	0,13	1,00	4430
	<i>Got-C</i>	4	1,15	0,12	0,13	1,00	4436
	<i>Pgi</i>	2	1,01	0,01	0,01	0,45	4896
	Media	3,38	1,29	0,16	0,18		4608
	Desvío	1,51		0,17	0,20		
Chile (3 poblaciones)	<i>Mdh-B</i>	3	1,86	0,46	0,46	1,00	626
	<i>Mdh-C</i>	3	1,02	0,03	0,02	1,00	632
	<i>Idh</i>	2	1,13	0,11	0,11	1,00	640
	<i>Adh</i>	2	1,02	0,02	0,02	1,00	624
	<i>Got-A</i>	3	1,73	0,39	0,41	1,00	614
	<i>Got-B</i>	2	1,06	0,05	0,06	1,00	596
	<i>Got-C</i>	2	1,05	0,05	0,05	1,00	610
	<i>Pgi</i>	2	1,04	0,04	0,04	1,00	618
	Media	2,38	1,24	0,14	0,15		620
	Desvío	0,52		0,18	0,18		

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



Tabla IV.4: Diversidad genética en las poblaciones de Raulí estudiadas.

Pob.	Locus																												
	<i>Mdh-B</i>			<i>Mdh-C</i>			<i>Idh</i>			<i>Adh</i>			<i>Got-A</i>			<i>Got-B</i>			<i>Got-C</i>			<i>Pgi</i>			Pool génico				
	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$P$	$A_L$	$\nu$	$H_o$	$H_e$
1	1,94	0,49	0,49	1,00	0,00	0,00	1,12	0,10	0,11	1,00	0,00	0,00	1,91	0,43	0,48	1,12	0,10	0,11	1,19	0,16	0,16	1,01	0,01	0,01	75,0	1,88	1,20	0,16	0,17
4	2,04	0,61	0,51	1,01	0,01	0,01	1,06	0,06	0,06	1,00	0,00	0,00	1,54	0,18	0,35	1,01	0,01	0,01	1,01	0,01	0,01	1,00	0,00	0,00	75,0	1,88	1,13	0,11	0,12
5	2,10	0,56	0,52	1,00	0,00	0,00	1,69	0,45	0,41	1,00	0,00	0,00	1,81	0,52	0,45	1,06	0,06	0,06	1,05	0,05	0,04	1,00	0,00	0,00	62,5	1,75	1,23	0,20	0,19
6	1,79	0,40	0,44	1,00	0,00	0,00	1,13	0,10	0,12	1,00	0,00	0,00	1,96	0,35	0,49	1,08	0,08	0,08	1,08	0,08	0,08	1,00	0,00	0,00	62,5	1,75	1,18	0,13	0,15
8	1,97	0,37	0,49	1,02	0,02	0,02	1,05	0,05	0,05	1,00	0,00	0,00	1,66	0,40	0,40	1,08	0,08	0,08	1,08	0,08	0,08	1,01	0,01	0,01	87,5	1,88	1,16	0,13	0,14
10	1,85	0,47	0,46	1,07	0,04	0,07	1,08	0,06	0,08	1,05	0,04	0,05	1,89	0,46	0,47	1,12	0,11	0,10	1,12	0,11	0,10	1,06	0,04	0,06	100	2,38	1,21	0,17	0,17
11	1,91	0,47	0,48	1,03	0,03	0,03	1,19	0,14	0,16	1,04	0,03	0,04	1,61	0,36	0,38	1,05	0,05	0,05	1,05	0,05	0,05	1,06	0,03	0,06	100	2,25	1,18	0,14	0,16
12	1,88	0,32	0,47	1,00	0,00	0,00	1,34	0,19	0,25	1,00	0,00	0,00	1,76	0,37	0,43	1,20	0,18	0,17	1,20	0,18	0,17	1,00	0,00	0,00	62,5	1,75	1,23	0,16	0,19
14	2,02	0,40	0,50	1,01	0,01	0,01	1,05	0,05	0,04	1,01	0,01	0,01	1,83	0,48	0,45	1,81	0,45	0,45	1,86	0,44	0,46	1,01	0,01	0,01	100	2,75	1,32	0,23	0,24
16	2,00	0,44	0,50	1,06	0,06	0,06	1,13	0,12	0,11	1,00	0,00	0,00	1,92	0,51	0,48	1,19	0,14	0,16	1,20	0,15	0,17	1,00	0,00	0,00	75,0	1,75	1,23	0,18	0,19
17	2,09	0,59	0,52	1,00	0,00	0,00	1,03	0,03	0,03	1,04	0,04	0,04	1,35	0,25	0,26	1,10	0,10	0,09	1,10	0,09	0,09	1,00	0,00	0,00	75,0	1,88	1,15	0,14	0,13
18	1,97	0,43	0,49	1,00	0,00	0,00	1,19	0,15	0,16	1,00	0,00	0,00	1,74	0,32	0,43	1,09	0,09	0,08	1,06	0,06	0,06	1,02	0,00	0,00	62,5	1,75	1,18	0,13	0,15
19	2,01	0,52	0,50	1,02	0,00	0,02	1,59	0,38	0,37	1,01	0,01	0,01	1,54	0,36	0,35	1,22	0,20	0,18	1,21	0,19	0,18	1,01	0,01	0,01	100	2,38	1,25	0,21	0,20
21	1,94	0,31	0,48	1,00	0,00	0,00	1,14	0,14	0,13	1,00	0,00	0,00	1,87	0,41	0,47	1,27	0,22	0,21	1,26	0,21	0,20	1,01	0,01	0,01	75,0	1,88	1,23	0,16	0,19
23	1,58	0,28	0,37	1,00	0,00	0,00	1,12	0,11	0,11	1,00	0,00	0,00	1,90	0,34	0,47	1,15	0,14	0,13	1,15	0,14	0,13	1,00	0,00	0,00	62,5	1,75	1,16	0,13	0,15
24	2,02	0,53	0,50	1,02	0,02	0,02	1,30	0,24	0,23	1,00	0,00	0,00	1,95	0,48	0,49	1,09	0,09	0,09	1,09	0,08	0,08	1,00	0,00	0,00	75,0	2,13	1,21	0,18	0,18
26	1,95	0,47	0,49	1,06	0,06	0,06	1,20	0,10	0,17	1,00	0,00	0,00	1,55	0,32	0,35	1,09	0,06	0,08	1,06	0,04	0,05	1,00	0,00	0,00	75,0	2,25	1,18	0,13	0,15
27	2,17	0,46	0,54	1,02	0,02	0,02	1,53	0,31	0,35	1,00	0,00	0,00	1,97	0,40	0,49	1,06	0,05	0,05	1,06	0,05	0,05	1,02	0,02	0,02	87,5	2,13	1,23	0,16	0,19
28	2,11	0,41	0,53	1,00	0,00	0,00	1,52	0,29	0,34	1,00	0,00	0,00	1,85	0,36	0,46	1,06	0,06	0,06	1,07	0,07	0,06	1,00	0,00	0,00	62,5	1,75	1,22	0,15	0,18
30	2,14	0,52	0,53	1,00	0,00	0,00	1,39	0,28	0,28	1,00	0,00	0,00	1,98	0,38	0,50	1,17	0,14	0,14	1,17	0,14	0,14	1,01	0,01	0,01	75,0	1,88	1,25	0,18	0,20
Ne	1,77	0,54	0,43	1,04	0,04	0,04	1,06	0,06	0,06	1,01	0,01	0,01	1,85	0,44	0,46	1,08	0,05	0,07	1,07	0,05	0,07	1,01	0,01	0,01	100	2,25	1,17	0,15	0,14
Ma	2,01	0,44	0,50	1,01	0,01	0,01	1,16	0,13	0,13	1,02	0,02	0,02	1,35	0,29	0,26	1,07	0,07	0,07	1,05	0,05	0,05	1,02	0,02	0,02	100	2,13	1,15	0,13	0,13
Na	1,80	0,41	0,44	1,02	0,02	0,02	1,16	0,15	0,14	1,02	0,02	0,02	1,99	0,43	0,50	1,04	0,04	0,04	1,04	0,04	0,04	1,08	0,08	0,08	100	2,00	1,19	0,15	0,16

Diversidad génica ( $\nu$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) (Nei, 1973), porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ) y número medio de alelos por locus ( $A_L$ ) para cada locus y para el pool génico en poblaciones de Argentina y Chile (Ne: Neltume, Ma: Mallalcahuello, Na: Nahuelbuta).

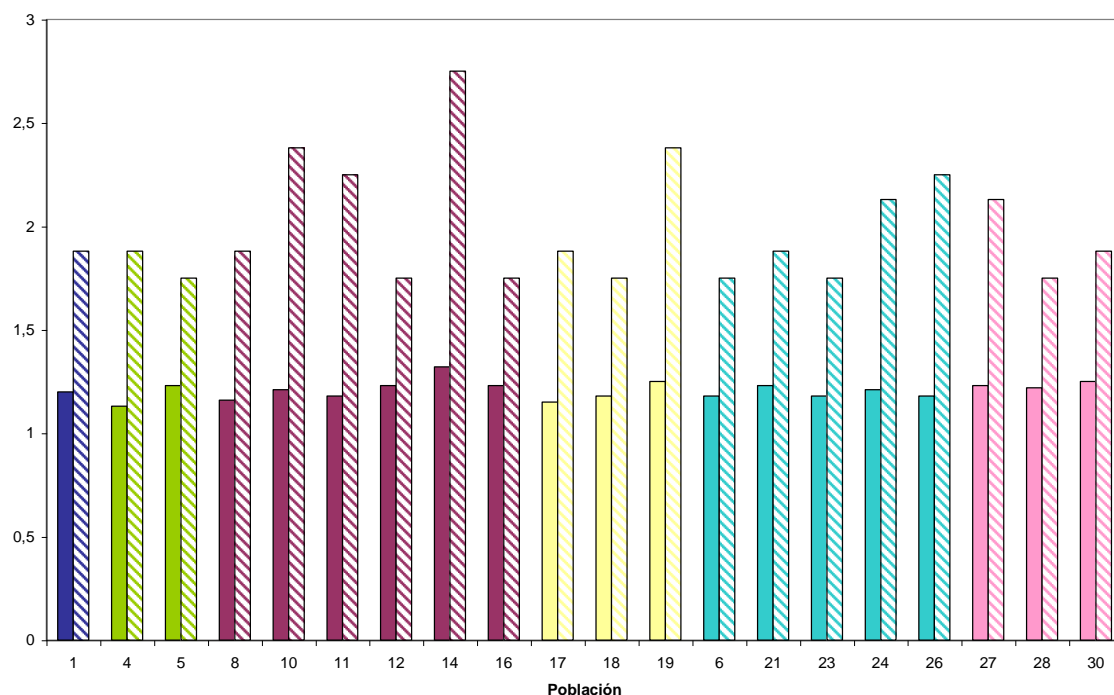


Figura IV.2: Variación entre poblaciones en la diversidad génica (número efectivo de alelos, color lleno) y en el número medio de alelos (color rayado) del pool génico. Cada color representa a poblaciones de una misma cuenca

La heterocigosis media observada fue de 15,9 %, aunque este valor fue muy variable entre los distintos loci analizados, siendo los más polimórficos *Mdh-B* y *Got-A* (Tabla IV.3). La heterocigosis para el pool génico fue muy variable no sólo entre poblaciones sino también dentro de las cuencas (Fig. IV.3; Tabla IV.4), alcanzando valores de hasta 23 %. La heterocigosis esperada, denominada por Nei (1973) *diversidad génica*, equivale a la heterocigosis cuando la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los supuestos de este modelo desarrollado para organismos diploides incluyen reproducción sexual con apareamiento al azar, ausencia de fuerzas evolutivas (mutación, flujo génico, selección y deriva genética), ausencia de generaciones superpuestas e igualdad en las frecuencias alélicas entre sexos. Si bien muchas de estas condiciones difícilmente se cumplan todas juntas en la naturaleza, este modelo se utiliza como referencia para comparar los resultados obtenidos en poblaciones naturales. En tal sentido, los valores de  $H_e$  calculados no difieren en general de los observados, indicando estructura de Hardy-Weinberg. En los casos en que se observaron desviaciones significativas en la heterocigosis esperada, éstas se debieron a un exceso de individuos homocigotas y fueron: locus *Mdh-B*: poblaciones 8, 12, 14, 21, 23 y 28; *Got-A*: 4, 6, 18, 23, 28, 30. Un exceso de homocigotas se asocia generalmente a la ocurrencia de endogamia, es decir

apareamiento entre individuos emparentados. Las frecuencias genotípicas se muestran en la Tabla 3, Apéndice III.

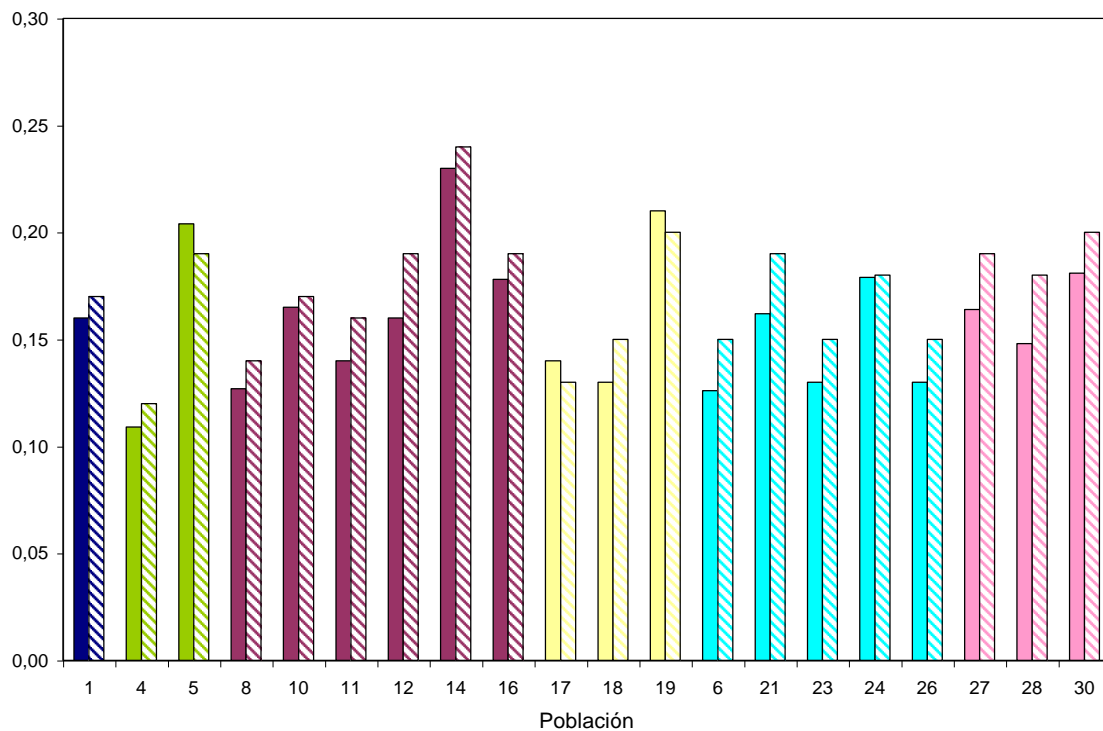


Figura IV.3: Variación entre poblaciones en la heterocigosis observada ( $H_o$ , color lleno) y esperada ( $H_e$ ; Nei, 1973, color rayado). Cada color representa a poblaciones de una misma cuenca.

### 3.2. Diferenciación entre poblaciones

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

La mayor distancia genética para el pool génico se encontró entre las poblaciones 5 y 14 ( $d_o = 0,152$ ) y la menor entre las 27 y 28 ( $d_o = 0,017$ ) (ambas de la cuenca del Lago Tromen) (Tabla 4, Apéndice III). La significación estadística de las diferencias encontradas entre las distancias genéticas se muestra en la matriz de probabilidades calculada con el programa GDA\_NT (Tabla 5, Apéndice III), siendo en su mayoría significativamente diferentes. El análisis de cluster del pool génico separa por completo la población 14 (cuenca del Lago Lácar) y agrupa, separado del resto, a las poblaciones 19 y 30 (Fig. IV.4). Los grupos que se forman no tienen relación con la ubicación de las poblaciones en las cuencas lacustres. El test de Mantel tampoco denotó una asociación entre las distancias genéticas y las geográficas. Las distancias genéticas entre las poblaciones dentro de una misma cuenca lacustre

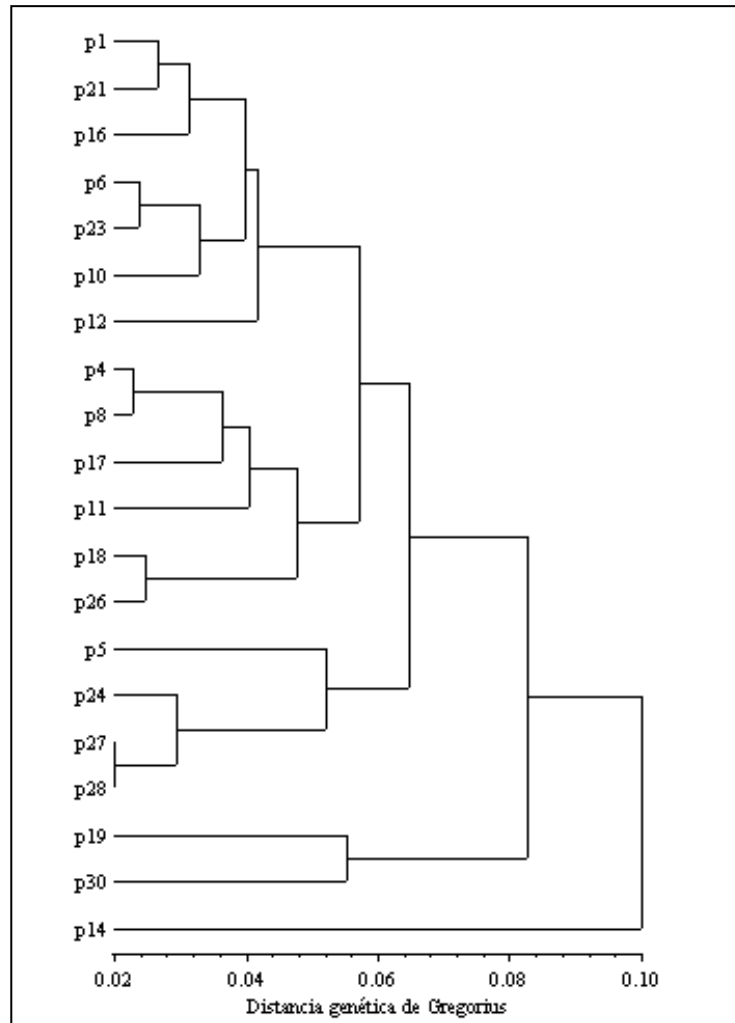


Figura IV.4: Dendrograma obtenido con el método UPGMA utilizando las distancias de Gregorius para el pool de loci analizados.

resultaron significativamente diferentes. Asimismo, se observan agrupamientos interesantes en los loci específicos de especie (*Adh* y *Pgi*), donde se separan las poblaciones que presentaron semillas híbridas. En *Mdh-C*, donde las distancias son muy pequeñas, se separa la población 10 y se agrupan las poblaciones 16 y 26 ubicadas al oeste (Fig. 3, Apéndice III). En el caso de la población 10, la separación es por la presencia de semillas híbridas, mientras que en las otras poblaciones la diferenciación se debe a una elevada frecuencia del alelo 2.

Los valores de diferenciación entre cada población y su complemento ( $D_j$ ) para el pool génico variaron entre 2,4 y 8,1 % (Tabla IV.5), siendo las poblaciones 5, 14, 19 y 30 las más diferenciadas. El nivel medio de diferenciación génica ( $\delta_{ge}$ ) para el pool de loci analizados fue de 4,7 % ( $F_{ST} = 5,2$  %). El locus más diferenciado fue *Mdh-B*, con diferencias en el 10 % del número efectivo de genes.

En los “caracoles de diferenciación” (Fig. IV.5) se pueden observar las diferencias en el grado de diferenciación entre poblaciones de una misma cuenca las



Tabla IV.5: Diferenciación entre poblaciones.

Población	$D_j$								Pool
	<i>Mdh-B</i>	<i>Mdh-C</i>	<i>ldh</i>	<i>Adh</i>	<i>Got-A</i>	<i>Got-B</i>	<i>Got-C</i>	<i>Pgi</i>	
1	0,051 0,108	0,008 0,015	0,053 0,089	0,004 0,007	0,044 0,070	0,011 0,024	0,029 0,059	0,001 0,001	<b>0,025</b>
4	0,011 0,182	0,004 0,006	0,080 0,136	0,004 0,007	0,128 0,236	0,066 0,124	0,065 0,123	0,005 0,009	<b>0,045</b>
5	0,021 0,120	0,008 0,015	0,188 0,336	0,004 0,007	0,331 0,402	0,038 0,069	0,046 0,085	0,005 0,009	<b>0,080</b>
6	0,148 0,173	0,008 0,015	0,050 0,086	0,004 0,007	0,089 0,103	0,016 0,025	0,016 0,024	0,005 0,009	<b>0,042</b>
8	0,027 0,086	0,004 0,009	0,086 0,148	0,004 0,007	0,081 0,092	0,028 0,049	0,028 0,049	0,003 0,008	<b>0,033</b>
10	0,122 0,152	0,029 0,041	0,071 0,127	0,023 0,039	0,020 0,093	0,013 0,019	0,013 0,021	0,027 0,046	<b>0,040</b>
11	0,121 0,131	0,014 0,031	0,022 0,039	0,018 0,028	0,114 0,125	0,045 0,082	0,044 0,081	0,026 0,036	<b>0,051</b>
12	0,120 0,195	0,008 0,015	0,043 0,056	0,004 0,007	0,036 0,043	0,034 0,080	0,034 0,083	0,005 0,009	<b>0,035</b>
14	0,056 0,075	0,005 0,011	0,088 0,153	0,001 0,003	0,011 0,104	0,240 0,412	0,249 0,411	0,001 0,002	<b>0,081</b>
16	0,080 0,107	0,027 0,054	0,048 0,073	0,004 0,007	0,049 0,132	0,030 0,047	0,035 0,059	0,005 0,009	<b>0,035</b>
17	0,079 0,165	0,008 0,015	0,098 0,173	0,019 0,039	0,206 0,275	0,018 0,029	0,022 0,037	0,005 0,009	<b>0,057</b>
18	0,126 0,146	0,008 0,015	0,022 0,030	0,004 0,007	0,044 0,077	0,033 0,059	0,038 0,069	0,005 0,009	<b>0,035</b>
19	0,273 0,281	0,005 0,014	0,147 0,256	0,000 0,002	0,129 0,142	0,040 0,092	0,040 0,093	0,001 0,001	<b>0,079</b>
21	0,065 0,157	0,008 0,015	0,040 0,056	0,004 0,007	0,009 0,018	0,064 0,123	0,057 0,113	0,001 0,001	<b>0,031</b>
23	0,233 0,315	0,008 0,015	0,054 0,084	0,004 0,007	0,036 0,061	0,010 0,032	0,010 0,034	0,005 0,009	<b>0,045</b>
24	0,020 0,120	0,007 0,013	0,029 0,071	0,004 0,007	0,079 0,128	0,023 0,039	0,027 0,047	0,005 0,009	<b>0,024</b>
26	0,171 0,205	0,026 0,051	0,014 0,070	0,004 0,007	0,125 0,159	0,040 0,087	0,042 0,088	0,005 0,009	<b>0,053</b>
27	0,035 0,077	0,001 0,004	0,134 0,224	0,004 0,007	0,092 0,099	0,044 0,081	0,044 0,080	0,003 0,008	<b>0,045</b>
28	0,017 0,082	0,008 0,015	0,119 0,180	0,004 0,007	0,012 0,022	0,040 0,073	0,035 0,062	0,005 0,009	<b>0,030</b>
30	0,284 0,358	0,008 0,015	0,065 0,123	0,004 0,007	0,113 0,117	0,019 0,033	0,019 0,035	0,000 0,002	<b>0,064</b>
$\delta$	<b>0,103</b> 0,162	<b>0,010</b> 0,019	<b>0,072</b> 0,125	<b>0,006</b> 0,011	<b>0,087</b> 0,125	<b>0,043</b> 0,079	<b>0,045</b> 0,083	<b>0,006</b> 0,010	<b>0,047</b>
$F_{ST}$	0,052	0,017	0,069	0,017	0,052	0,045	0,049	0,016	<b>0,052</b>
Ne	0,297 0,347	0,022 0,043	0,043 0,081	0,005 0,010	0,026 0,085	0,009 0,010	0,012 0,014	0,021 0,041	<b>0,054</b>
Ma	0,046 0,063	0,011 0,022	0,02 0,030	0,002 0,005	0,246 0,317	0,007 0,023	0,002 0,005	0,012 0,024	<b>0,043</b>
Na	0,252 0,285	0,011 0,022	0,023 0,056	0,003 0,006	0,233 0,281	0,016 0,026	0,01 0,014	0,033 0,065	<b>0,072</b>
$\delta$	<b>0,198</b> 0,232	<b>0,014</b> 0,029	<b>0,029</b> 0,055	<b>0,003</b> 0,007	<b>0,168</b> 0,228	<b>0,011</b> 0,020	<b>0,008</b> 0,011	<b>0,022</b> 0,044	<b>0,057</b>
$F_{ST}$	0,088	0,007	0,007	0,001	0,074	0,002	0,001	0,014	<b>0,064</b>

Diferenciación entre cada población y su complemento ( $D_j$ ) y diferenciación media entre poblaciones ( $\delta$ ) a nivel génico y genotípico (en números más chicos) en poblaciones de Argentina y Chile, analizadas como dos conjuntos distintos. Ne: Neltume, Ma: Mallalcahuello, Na: Nahuelbuta.

cuales se representaron con un mismo color. Al considerar el pool de loci analizados se destacan como más diferenciadas las poblaciones 14 (de la cuenca del Lago Lácar), 5 (de la cuenca del Lago Hermoso), 19 (de la cuenca del Lago Lolog), y 30 (de la cuenca del Lago Tromen – Quillén). Por otro lado, resaltan como menos diferenciadas las poblaciones 1 (del límite sur de la distribución de la especie en Lago Espejo) y la 24 (en la cuenca del Lago Huechulafquen).

La diferenciación a nivel genotípico,  $\delta_{go}$ , fue en todos los casos mayor que a nivel génico (Tabla IV.5). Esto indica que la organización de gametas en genotipos implica mayores niveles de diferenciación (Gregorius & Roberds, 1986).

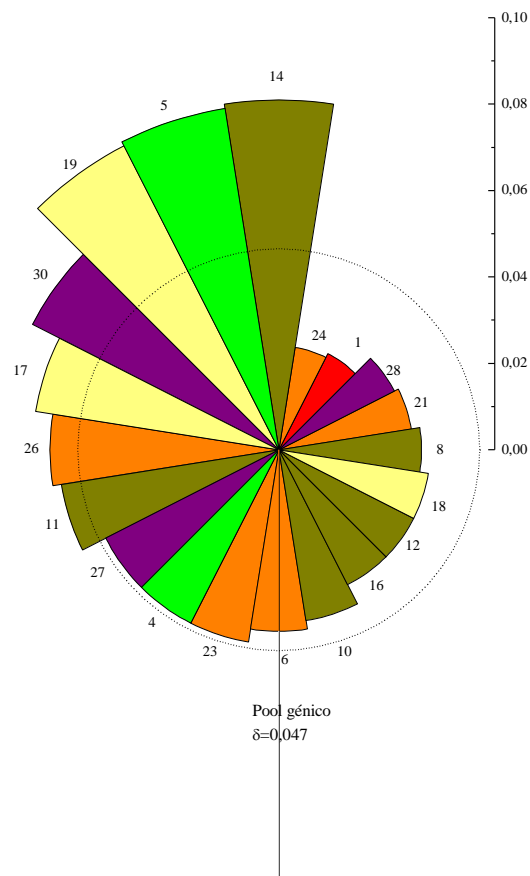
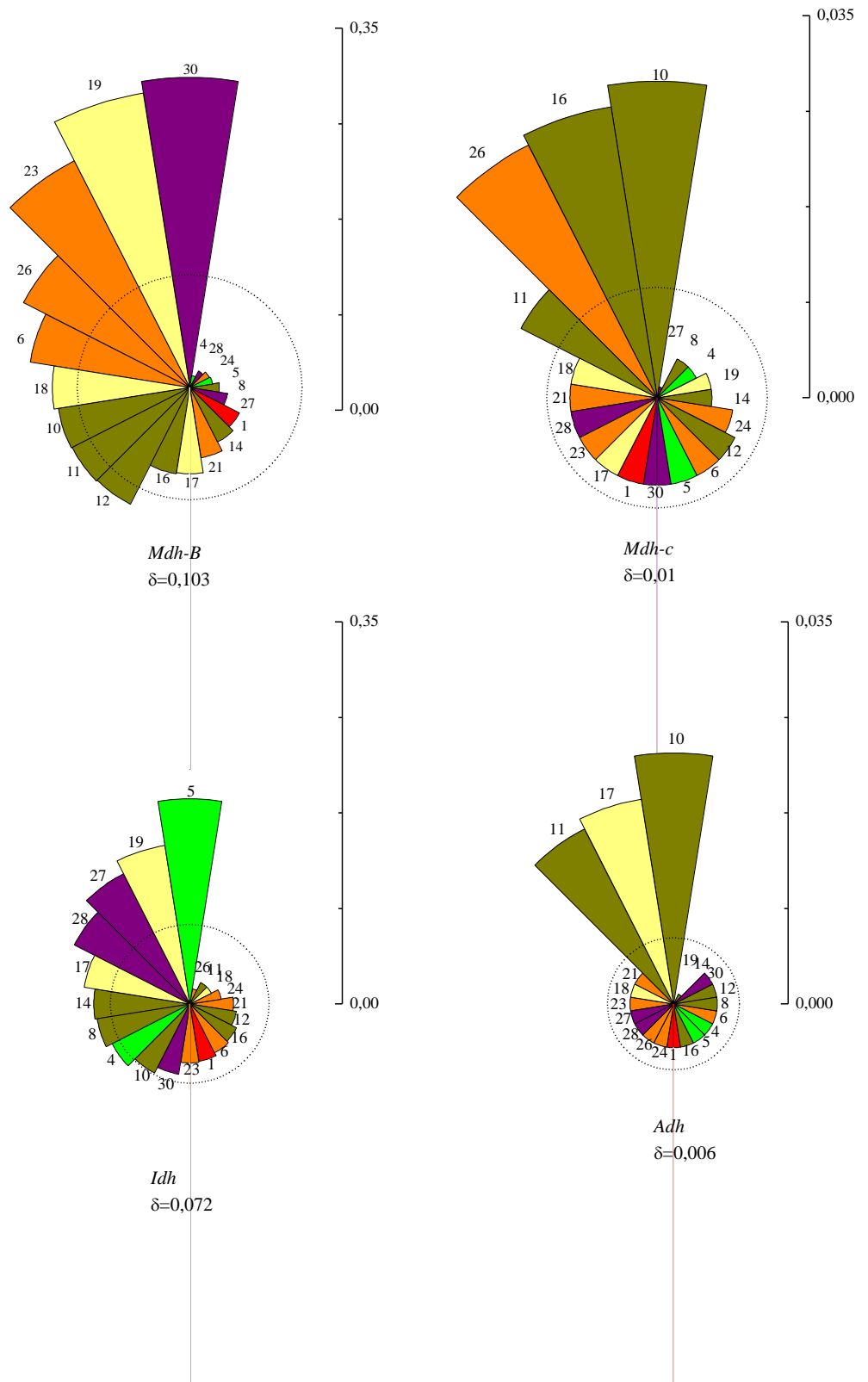


Figura IV.5: “Caracoles de diferenciación”, según Gregorius & Roberds (1986) para el pool génico y los ocho loci analizados. Cada sección corresponde a una población y cada color a poblaciones de una misma cuenca lacustre. El radio de cada sección representa la diferenciación de dicha población con respecto a su complemento ( $D_j$ ) y el ángulo representa el tamaño proporcional de cada población ( $c_j$ ).

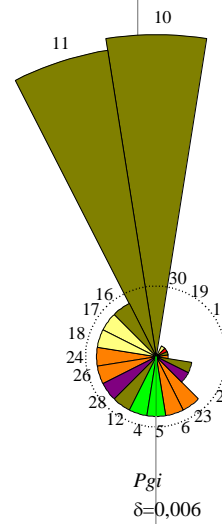
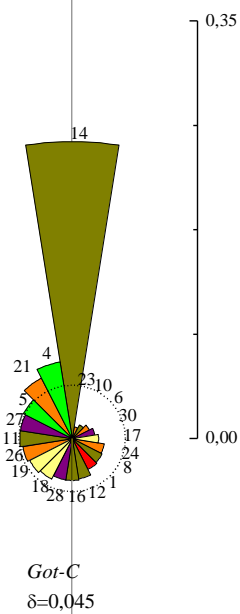
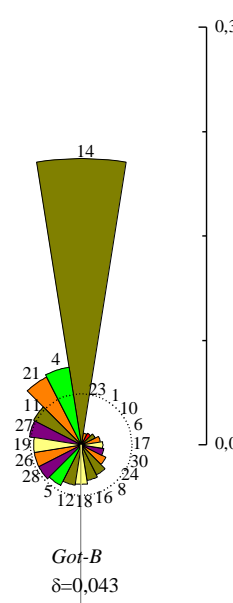
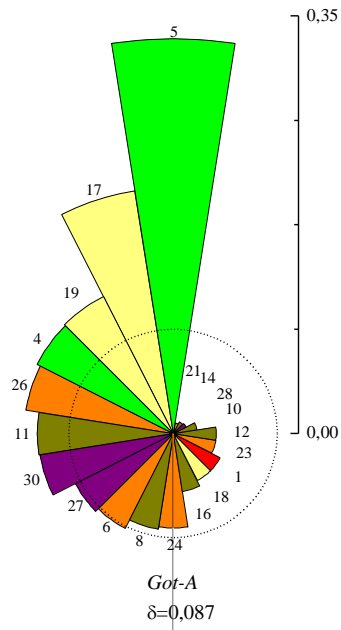
El círculo en línea punteada corresponde al nivel de diferenciación media entre poblaciones ( $\delta$ ).

Figura IV.5: continuación.



Nota: Para una mejor visualización se asignaron dos escalas distintas. Los loci menos diferenciados (*Mdh.C*, *Adh* y *Pgi*) se graficaron a una escala 10 veces mayor que el resto.

Figura IV.5: continuación.



### 3.3. Análisis entre cuencas y variación geográfica

Como primer paso se probó la homogeneidad de las frecuencias alélicas entre poblaciones dentro de cada cuenca, resultando en todos los casos diferencias significativas en las frecuencias alélicas en al menos tres de los ocho loci. Comparaciones de todos los pares de poblaciones posibles dentro de cada cuenca también revelaron diferencias significativas tanto en las frecuencias alélicas como en las distancias genéticas para el pool génico (Tablas 5 y 6, Apéndice III). Se pueden observar, sin embargo, grupos de poblaciones dentro de las cuencas con mayor similitud entre los que hay homogeneidad en las frecuencias alélicas de varios loci. En tal sentido, y teniendo en cuenta tanto la homogeneidad entre las frecuencias alélicas como la significación de las distancias genéticas, no habría diferencias significativas entre los pares de poblaciones 6 - 23 y 6 - 24 de la cuenca del lago Huechulafquen, y 27 - 28 de la cuenca del lago Tromen.

Por otro lado, se calcularon los valores de diferenciación entre poblaciones dentro de cada cuenca lacustre, los cuales también fueron muy elevados, indicando la heterogeneidad de las poblaciones (Tabla IV.6). En algunos casos el nivel de diferenciación fue mayor que entre las 20 poblaciones, por lo que una comparación entre cuencas agrupando las poblaciones de cada una en un conjunto es totalmente inválido.

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

### 3.4. Variación temporal de la estructura genética

El análisis poblacional de la descendencia en semillas cosechadas durante dos años distintos en nueve poblaciones reveló la existencia de diferencias significativas entre las frecuencias alélicas en al menos un locus. Las mayores diferencias se detectaron en las poblaciones 5, 17, 18 y 19, en las cuales las frecuencias alélicas de cinco loci fueron significativamente distintas (Tabla 7, Apéndice III).

Los valores de diversidad génica ( $\nu$ ), número medio de alelos ( $A_L$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) también denotaron, en la mayoría de los casos, una variación temporal (Tabla IV.7). En general, el número medio de alelos por locus fue mayor en el año de mayor producción. Esto comprueba la hipótesis de mejor representatividad de las muestras tomadas en dichos años. Por el contrario, en dos de

**Tabla IV.6: Diferenciación entre poblaciones dentro de las distintas cuencas para cada locus y el pool génico.**

Cuenca	$\delta$								
	<i>Mdh-B</i>	<i>Mdh-C</i>	<i>Idh</i>	<i>Adh</i>	<i>Got-A</i>	<i>Got-B</i>	<i>Got-C</i>	<i>Pgi</i>	Pool
Hermoso (2)	2,8	0,4	25,4	0,0	43,5	2,6	1,8	0,0	<b>9,6</b>
Lácar (6)	9,1	1,8	4,2	1,2	5,6	8,2	8,4	1,5	<b>5,0</b>
Lolog año 1995 (3)	18,4	0,5	13,1	1,3	7,8	3,9	4,0	0,3	<b>6,2</b>
Lolog año 1996 (3)	11,1	0,8	5,4	7,8	11,4	14,9	13,5	0,7	<b>8,2</b>
Huechulafquen (5)	12,9	1,2	3,2	0,0	7,2	3,4	3,1	0,2	<b>3,9</b>
Tromen –Quillén (3)	16,3	0,5	3,6	0,0	5,9	3,3	3,2	0,4	<b>4,2</b>

Entre paréntesis se indica el número de poblaciones.

las poblaciones (17 y 18 de la cuenca del Lago Lolog), se observó que todos los parámetros de variación intrapoblacional fueron mayores en el año 1996, en que la producción de semillas fue menor. Sin embargo, es interesante destacar que el aumento de la diversidad en estas poblaciones en 1996 se debió a un aumento en la proporción de semillas híbridas que redundó en un mayor número de alelos tanto en el locus *Adh* como en *Mdh-C* (Tabla 7, Apéndice III). La diferencia en el porcentaje de semillas híbridas para el locus *Adh* fue significativa en ambas poblaciones, siendo aún más notable en la población 18 donde pasó de 0 % en 1995 a 22,7 % en 1996. Más aún, se observó en dicho año un 3,6 % de semillas con genotipo tipo “Roble Pellín” en el locus *Adh* (homocigosis para el alelo 1). Por otro lado, todas las semillas híbridas o con genotipo tipo Roble Pellín, fueron tipo Raulí para el locus *Pgi* (homocigosis para el alelo 2), indicando la ocurrencia de retrocruzas entre la F<sub>1</sub> y los parentales, lo cual se discutirá más adelante.

Las distancias genéticas calculadas para el pool génico entre años (“distancias temporales”) fueron significativamente distintas en ocho de las nueve poblaciones analizadas (excepto la población 11), observándose también valores de diferenciación altos en algunos loci (e.g. el locus *Got-A* en la población 5; Tabla IV.8).

Si se comparan las distancias genéticas entre la descendencia en distintos años de una misma población (“distancias temporales”) con las distancias entre poblaciones en un mismo año (“distancias espaciales”), los resultados varían. En el caso de las poblaciones 11, 12 y 26 la “distancia temporal” es en todos los casos menor que el promedio de las “distancias espaciales”. Por el contrario, en las poblaciones 5, 17 y 18, la variación temporal es tan grande que supera al promedio de la espacial. Finalmente, en las poblaciones 14, 16 y 19 los resultados varían dado que

Tabla IV.7: Variación temporal en nueve poblaciones de Raulí.

Locus	Población																	
	5		11		12		14		16		17		18		19		26	
	1994	1997	1994	1996	1996	1997	1994	1996	1996	1997	1995	1996	1995	1996	1995	1996	1996	1997
$v$	1,856	2,098	1,697	1,913	1,877	2,074	2,038	2,018	1,940	1,999	2,092	2,076	1,974	1,835	2,005	2,214	1,950	2,265
$H_o$	0,470	0,557	0,433	0,470	0,322	0,564	0,472	0,396	0,309	0,442	0,590	0,480	0,427	0,427	0,523	0,413	0,505	0,473
$H_e$	0,461	0,523	0,411	0,477	0,467	0,518	0,509	0,504	0,485	0,500	0,522	0,518	0,493	0,455	0,501	0,548	0,559	0,487
					*				*		*	*			*	*		
$v$	1,000	1,000	1,070	1,034	1,000	1,010	1,000	1,009	1,000	1,063	1,000	1,030	1,000	1,019	1,016	1,000	1,060	1,186
$H_o$	0,000	0,000	0,067	0,034	0,000	0,010	0,000	0,009	0,000	0,061	0,000	0,029	0,000	0,019	0,000	0,000	0,172	0,058
$H_e$	0,000	0,000	0,065	0,033	0,000	0,010	0,000	0,009	0,000	0,059	0,000	0,029	0,000	0,019	0,015	0,000	0,157	0,056
															*			
$v$	1,252	1,688	1,084	1,185	1,335	1,050	1,633	1,046	1,250	1,128	1,026	1,430	1,186	1,252	1,589	1,205	1,203	1,153
$H_a$	0,227	0,450	0,080	0,137	0,193	0,049	0,078	0,045	0,206	0,121	0,026	0,291	0,153	0,209	0,375	0,188	0,143	0,102
$H_e$	0,201	0,408	0,077	0,156	0,251	0,048	0,388	0,044	0,200	0,114	0,026	0,301	0,157	0,201	0,371	0,170	0,133	0,169
					*		*											*
$v$	1,000	1,000	1,072	1,043	1,000	1,000	1,000	1,009	1,000	1,000	1,044	1,180	1,000	1,342	1,008	1,000	1,000	1,000
$H_o$	0,000	0,000	0,069	0,025	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,043	0,167	0,000	0,227	0,008	0,000	0,000	0,000
$H_e$	0,000	0,000	0,067	0,041	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,042	0,153	0,000	0,255	0,008	0,000	0,000	0,000
				*														
$v$	1,148	1,809	1,797	1,612	1,759	1,785	1,988	1,828	1,952	1,915	1,350	1,849	1,741	1,999	1,539	1,820	1,549	1,690
$H_o$	0,108	0,518	0,394	0,363	0,370	0,517	0,470	0,482	0,392	0,509	0,252	0,371	0,321	0,541	0,358	0,427	0,306	0,319
$H_e$	0,129	0,447	0,443	0,380	0,432	0,440	0,497	0,453	0,488	0,478	0,259	0,459	0,426	0,500	0,350	0,451	0,408	0,354
				*					*				*				*	
$v$	1,630	1,063	1,069	1,050	1,201	1,287	1,248	1,846	1,756	1,192	1,104	1,606	1,091	1,569	1,215	1,044	1,086	1,020
$H_o$	0,397	0,061	0,066	0,049	0,184	0,203	0,156	0,455	0,451	0,142	0,099	0,333	0,086	0,379	0,196	0,014	0,020	0,055
$H_e$	0,387	0,060	0,064	0,047	0,167	0,223	0,199	0,458	0,431	0,161	0,094	0,377	0,083	0,363	0,177	0,042	0,020	0,079
							*	*								*		*
$v$	1,687	1,046	1,062	1,050	1,201	1,287	1,223	1,863	1,756	1,203	1,095	1,541	1,062	1,524	1,213	1,044	1,056	1,010
$H_o$	0,431	0,045	0,061	0,049	0,184	0,203	0,147	0,441	0,451	0,150	0,091	0,291	0,060	0,351	0,194	0,014	0,010	0,036
$H_e$	0,407	0,044	0,059	0,047	0,167	0,223	0,182	0,463	0,431	0,169	0,087	0,351	0,058	0,344	0,176	0,042	0,010	0,053
								*								*		*
$v$	1,000	1,000	1,066	1,062	1,000	1,008	1,000	1,009	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,020	1,008	1,000	1,000	1,000
$H_o$	0,000	0,000	0,064	0,026	0,000	0,008	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,008	0,000	0,000	0,000
$H_e$	0,000	0,000	0,062	0,058	0,000	0,008	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,008	0,000	0,000	0,000
				*														
<i>Pool</i>																		
$A_L$	1,750	1,750	2,125	2,25	1,750	2,250	2,125	2,750	1,630	1,750	1,875	2,375	1,750	2,125	2,375	1,875	2,000	2,250
$v$	1,247	1,227	1,185	1,183	1,228	1,225	1,285	1,322	1,341	1,227	1,148	1,377	1,179	1,369	1,251	1,186	1,176	1,192
$H_o$	0,204	0,204	0,154	0,144	0,157	0,194	0,165	0,231	0,226	0,178	0,138	0,245	0,131	0,272	0,208	0,132	0,145	0,130
$H_e$	0,198	0,185	0,156	0,155	0,186	0,184	0,222	0,244	0,254	0,185	0,129	0,274	0,152	0,270	0,201	0,157	0,161	0,150

$v$ : diversidad,  $A_L$ : número medio de alelos por locus,  $H_o$ : heterocigosis observada y  $H_e$  heterocigosis esperada. \*: desvío significativo a un nivel de 0,05 de la estructura Hardy-Weinberg

en algunas comparaciones es mayor la “distancia espacial” que la “temporal” mientras que en otras se da lo contrario (Tabla IV.9). Cabe destacar que tanto las “distancias temporales” como las “espaciales” son significativamente distintas entre sí ( $\alpha = 0,05$ ) en la casi totalidad de las poblaciones analizadas (Tabla IV.9).

Tabla IV.8: Valores de diferenciación génica ( $D_j$ ) entre años para nueve poblaciones analizadas.

Población	<i>Mdh-B</i>	<i>Mdh-C</i>	<i>Idh</i>	<i>Adh</i>	<i>Got-A</i>	<i>Got-B</i>	<i>Got-C</i>	<i>Pgi</i>	Pool
5	0,177 *	0,000 M	0,171 *	0,000 M	0,593 *	0,231 *	0,262 *	0,000 M	0,179 *
11	0,066 ns	0,017 ns	0,045 ns	0,014 ns	0,092 ns	0,009 ns	0,006 ns	0,002 ns	0,031 ns
12	0,083 ns	0,005 ns	0,123 *	0,000 M	0,011 ns	0,035 ns	0,035 ns	0,004 ns	0,037 *
14	0,069 ns	0,004 ns	0,240 *	0,005 ns	0,123 *	0,185 *	0,201 *	0,004 *	0,104 *
16	0,101 ns	0,030 *	0,052 ns	0,000 M	0,027 ns	0,225 *	0,221 *	0,000 M	0,082 *
17	0,057 ns	0,015 ns	0,172 *	0,062 *	0,204 *	0,203 *	0,182 *	0,000 M	0,112 *
18	0,227 *	0,010 ns	0,028 ns	0,150 *	0,206 *	0,203 *	0,191 *	0,010 ns	0,128 *
19	0,230 *	0,008 ns	0,152 *	0,008 ns	0,111 *	0,077 *	0,076 *	0,004 ns	0,083 *
26	0,115 *	0,057 *	0,022 ns	0,000	0,056 ns	0,031 ns	0,022 ns	0,000	0,038 *

\* significativo a un nivel de 0,05 ns: no significativo, M: locus monomórfico en ambos años.

Por otra parte, dado que se contaba con material de árboles adultos en cuatro poblaciones, se analizaron en las mismas cuatro loci enzimáticos. Se compararon las estructuras genéticas de los individuos adultos con las semillas provenientes de cada una de dichas poblaciones, del año de mejor producción. En la mayoría de las comparaciones no hubo diferencias significativas entre ambas generaciones, excepto en la población 1 para el locus *Idh* y en la población “Lácar” (árboles de las poblaciones 10, 11 y 12) en el locus *Mdh-C* (Tabla IV.10).

### 3.5. Diversidad y diferenciación en tres poblaciones de Chile

Si bien sólo se analizaron tres poblaciones, éstas cubren un amplio rango de la distribución natural del Raulí en Chile. En ellas no se observaron alelos distintos a los encontrados en las poblaciones de Argentina (Tabla 2, Apéndice III), aunque es interesante destacar la relativamente alta frecuencia del alelo *Got-A-3* en la población de Neltume, el cual fue encontrado en sólo una semilla de la cosecha 1996 en la población 19 de Argentina (Tabla 7, Apéndice III).



**Tabla IV.9: Distancias genéticas de Gregorius entre años y entre poblaciones para el pool de loci estudiados en las nueve poblaciones analizadas dos años. En negrita se indican las distancias entre años de un misma población.**

	5 97	11 96	12 96	14 96	16 97	17 95	18 95	19 95	26 97	5 94	11 94	12 97	14 94	16 96	17 96	18 96	19 96	26 96
5 97		0,099	0,090	0,152	0,093	0,112	0,089	0,113	0,106	<b>0,179</b>	0,107	0,104	0,064	0,128	0,128	0,126	0,073	0,102
11 96			0,044	0,116	0,073	0,040	0,049	0,094	0,050	0,107	<b>0,031</b>	0,062	0,106	0,118	0,098	0,111	0,041	0,054
12 96				0,093	0,049	0,059	0,053	0,073	0,071	0,091	0,051	<b>0,037</b>	0,064	0,084	0,065	0,086	0,047	0,071
14 96					0,071	0,106	0,088	0,121	0,108	0,106	0,107	0,058	<b>0,104</b>	0,065	0,081	0,100	0,087	0,105
16 97						0,072	0,038	0,077	0,053	0,131	0,066	0,041	0,047	<b>0,082</b>	0,094	0,103	0,041	0,052
17 95							0,059	0,094	0,060	0,098	0,056	0,051	0,110	0,122	<b>0,112</b>	0,131	0,054	0,065
18 95								0,069	0,022 <sup>ns</sup>	0,133	0,056	0,055	0,062	0,106	0,111	<b>0,128</b>	0,022 <sup>ns</sup>	0,031 <sup>ns</sup>
19 95									0,056	0,137	0,120	0,085	0,055	0,136	0,114	0,152	<b>0,083</b>	0,089
26 97										0,132	0,073	0,075	0,079	0,126	0,128	0,146	0,039	<b>0,038</b>
5 94											0,124	0,101	0,150	0,076	0,081	0,099	0,125	0,140
11 94												0,057	0,110	0,119	0,099	0,108	0,050	0,068
12 97													0,073	0,076	0,075	0,093	0,047	0,067
14 94														0,097	0,098	0,108	0,070	0,090
16 96															0,058	0,064	0,098	0,127
17 96																0,048	0,100	0,127
18 96																	0,119	0,147
19 96																		0,030 <sup>ns</sup>
26 96																		

ns: diferencias no significativas a un nivel de 0,05.

**TablaIV.10 : Comparación de las frecuencias alélicas y la heterocigosis observada (H<sub>o</sub>) de individuos adultos y la descendencia para cuatro loci en cuatro poblaciones analizadas.**

Locus	$\chi^2$	Población 1		$\chi^2$	Población "Lácar"		$\chi^2$	Población 23		$\chi^2$	Población 27	
		H <sub>o</sub>			H <sub>o</sub>			H <sub>o</sub>			H <sub>o</sub>	
		Adultos	Semillas		Adultos	Semillas		Adultos	Semillas		Adultos	Semillas
<i>Mdh-C</i>	M	0,0 (93)	0,0 (143)	*	2,2 (89)	2,3 (352)	M	0,0 (24)	0,0 (146)	ns	0,0 (90)	1,5 (129)
<i>Idh</i>	*	1,3 (78)	9,9 (142)	-	-	-	ns	9,5 (21)	11,1 (144)	ns	23,3 (30)	33,3 (123)
<i>Pgi</i>	ns	1,0 (100)	0,8 (132)	ns	0,0 (89)	2,3 (349)	M	0,0 (24)	0,0 (130)	ns	0,0 (90)	1,5 (133)
<i>Adh</i>	-	-	-	ns	0,0 (67)	2,0 (353)	M	0,0 (7)	0,0 (145)	M	0,0 (21)	0,0 (134)
<i>d<sub>o</sub>pool</i>	0,017			0,017			0,002			0,007		

M: locus monomórfico, \*: significativo a un nivel de 0,05, ns: no significativo, *d<sub>o</sub>pool*: distancia genética para el pool. Los números entre paréntesis indican el tamaño de la muestra.

Las frecuencias alélicas de las poblaciones de Argentina y de Chile, tomadas como dos únicas poblaciones, fueron significativamente distintas entre sí en seis de los ocho loci analizados ( $\alpha = 0,05$ ). Las medidas de diversidad calculadas en las poblaciones de Chile (número medio de alelos, diversidad génica y heterocigosis) fueron menores a las obtenidas en las poblaciones de Argentina. En las tres poblaciones todos los loci analizados fueron polimórficos (Tablas IV.3 y IV.4). En cuanto a la heterocigosis esperada, las poblaciones mostraron la misma tendencia que las analizadas al este de la Cordillera ya que hubo sólo un caso de desviación de las frecuencias esperadas bajo estructura de Hardy-Weinberg: en la población de Neltume se observó un exceso significativo de heterocigotas en el locus *Mdh-B*.

Las frecuencias alélicas fueron significativamente distintas entre poblaciones para cuatro de los ocho loci analizados: *Mdh-B*, *Mdh-C*, *Got-A* y *Pgi* ( $\alpha = 0,05$ ). Análisis de a pares mostraron frecuencias alélicas más homogéneas entre las poblaciones ubicadas al norte (Mallalcahuello y Nahuelbuta).

Las distancias genéticas del pool génico entre estas tres poblaciones fueron significativamente distintas en todas las combinaciones posibles. Las poblaciones de Nahuelbuta y Neltume resultaron más diferentes entre sí que con Mallalcahuello (Tablas 4 y 5, Apéndice III).

Los valores de diferenciación fueron levemente mayores a los encontrados en Argentina ya que oscilaron entre el 4 y el 7 %, siendo el promedio de 5,7 %. La población más diferenciada es la ubicada en la Cordillera de Nahuelbuta ( $\delta = 7$  %) (Tabla IV.5). Es interesante destacar, sin embargo, que si se toman sólo tres poblaciones de Argentina al azar, los valores de diferenciación son iguales o mayores que entre las poblaciones chilenas. Se probaron 20 combinaciones de 3 poblaciones tomadas al azar resultando un valor de  $\delta$  promedio de 6,19 % ( $\pm 1,51$  %). Más aún, si entre dichas combinaciones se eligen aquellas que representan la distribución de Raúlí en Argentina, es decir aquellas que podrían haber sido elegidas en un muestreo que sólo tomara tres poblaciones, el valor de diferenciación media entre 10 combinaciones fue de 6,48 % ( $\pm 1,19$  %). Esto sugiere que al este de la Cordillera de los Andes, donde el área de distribución es más restringida y fragmentada, la diferenciación entre poblaciones es similar o mayor que al oeste.

## 4. Discusión

### 4.1. Perfiles genéticos, variación alélica y alelos raros

Los perfiles genéticos encontrados en Raulí fueron en su mayoría del tipo *polimorfismo menor*, de acuerdo a Lewontin (1985), coincidiendo con lo reportado por Gregorius & Bergmann (1995) como tipos de perfiles genéticos más comúnmente observados en especies arbóreas. Dado que, en general, en cada locus las poblaciones comparten no sólo los alelos predominantes sino también los raros, la causa más probable de que esto se mantenga es por mutaciones deletéreas recurrentes (Gregorius & Bergmann, 1995). Entre las causas sugeridas por estos autores para explicar los perfiles genéticos más observados, no se encuentra la hibridación que, en el caso de Raulí, tiene que ser considerada ya que tanto en *Adh* como en *Pgi* el perfil genético cambia entre *monomorfismo* y *polimorfismo menor* según existan o no individuos híbridos.

Como ya fuera mencionado, existen dos grupos de enzimas: el Grupo I está conformado por enzimas que actúan en el metabolismo primario usando un único sustrato y el Grupo II por aquellas que lo hacen en reacciones secundarias o cuya función se desconoce, las cuales utilizan más de un sustrato (Bergmann, 1991). Estos dos grupos difieren generalmente en su variabilidad genética, siendo el grupo II más variable. A su vez, las enzimas poliméricas deben mantener complejas estructuras cuaternarias que requieren interacciones específicas de los aminoácidos, por lo cual una mutación puede generar alteraciones en la función. Por esta razón, las enzimas poliméricas tienden a mostrar menos variación que las enzimas monoméricas (Bergmann, 1991). La variación encontrada en los sistemas enzimáticos analizados en Raulí es relativamente grande si se tiene en cuenta que todas son enzimas dimericas pertenecientes al Grupo I, es decir las que deberían presentar la menor variación. La permanencia de distintos alelos en frecuencias mayores a las esperadas por mutación, tanto en el caso de *polimorfismo mayor extendido* como en el de *polimorfismo menor* en este tipo de enzimas, sugiere que estas variantes no son selectivamente neutras sino que podrían tener algún valor adaptativo. Dado que no se puede determinar en qué etapa evolutiva se encuentran las poblaciones, aquellos alelos en baja frecuencia podrían también estar en un proceso de eliminación por selección en contra.

En especies con áreas de distribución mucho mayores que *Nothofagus nervosa* se han reportado variantes enzimáticas en estrecha relación con cambios en el

ambiente. Por ejemplo, en *Abies alba* se observó una variación clinal en la frecuencia de dos aloenzimas del sistema IDH relacionados con un gradiente de temperatura. El polimorfismo observado fue interpretado como adaptación a regímenes de altas temperaturas (Bergmann & Gregorius, 1993). Si bien en Raulí no se detectaron clines en las frecuencias alélicas y sólo se observó una asociación significativa entre la diversidad del locus *Idh* y la latitud, esto puede deberse a su distribución reducida. Un estudio más amplio incluyendo más poblaciones de Chile que cubran toda el área de distribución podría llegar a detectar algún tipo de variación clinal. Es interesante destacar la elevada frecuencia del alelo 2 del locus *Idh* en las tres poblaciones de la cuenca norte (Tromen – Quillén), y sólo en la población 19 (cuenca Lolog) y en la 5 (cuenca del Lago Hermoso) hacia el sur. Asimismo, el alelo 1 del locus *Mdh-B* se observó en alta frecuencia ( $p = 0,112$ ) en el norte de la distribución (población 30). La zona norte tiene temperaturas más altas y menor cantidad de precipitaciones, por lo que las diferencias encontradas podrían sugerir algún tipo de adaptación al medio. A su vez, la relativa uniformidad de las poblaciones del norte y su diferenciación con respecto a las del sur, estaría relacionada con las rutas de migración postglaciarias y el vulcanismo que se discutirán en el capítulo final.

Por otro lado, existe también una variación en sentido longitudinal en las frecuencias alélicas de algunos loci. Por ejemplo, en el locus *Mdh-B* el alelo 3 presenta una tendencia a aumentar en frecuencia a medida que se avanza hacia el este en las poblaciones de las cuencas Lácar, Lolog y Huechulafquen. Si bien son pocas poblaciones se detectó una correlación significativa ( $P < 0,0003$ ) entre la frecuencia de este alelo y la longitud en las cuencas Lácar ( $r = -0,986$ ) y Lolog ( $r = -1$ ). Lo mismo se observa en los alelos *Got-B-2* y *Got-C-1* en Lolog. Resultados similares con variación en sentido longitudinal en las frecuencias alélicas y en presencia/ausencia de alelos raros se observaron en *Austrocedrus chilensis* (Pastorino, 2001).

Las frecuencias alélicas denotan la presencia de alelos raros y, en algunos casos, exclusivos de alguna o algunas poblaciones. La existencia de un gran número de alelos raros ( $p < 0,02$ ) es bastante común en especies arbóreas (Conkle, 1992). La importancia de los alelos raros en la adaptación de una población es un tema en debate y en general se considera que constituyen una carga genética. Cabe destacar que, aunque se encontraron alelos raros en muchas poblaciones, la mayoría de los loci estudiados, al igual que en otras especies, son virtualmente monomórficos en muchas poblaciones o presentan *polimorfismo menor* con un alelo en elevada frecuencia. Por

otra parte, las especies forestales pueden tolerar altos niveles de “carga genética” debido a su profuso sistema reproductivo con grandes cantidades de semillas que se producen en cada generación y a la alta presión de selección que deja que sólo una proporción muy pequeña llegue a la edad reproductiva. Por otro lado, la importancia de estos alelos en la adaptabilidad de una población, es decir la adaptación potencial, está en estrecha relación con este sistema reproductivo. La capacidad de “soportar” una elevada carga genética confiere a las especies arbóreas la posibilidad de adaptarse en una sola generación a cambios ambientales (Gregorius & Bergmann, 1995). Cabe destacar que tal como es esperable, todos los alelos raros se encontraron en estado heterocigota, desconociéndose su efecto sobre la aptitud reproductiva (fitness) del individuo. Se ha descrito en otras especies que muchos alelos raros son letales en estado homocigota (Hartl & Clark, 1989), por lo que pueden permanecer en la población a pesar de la selección en contra enmascarados en los individuos heterocigotas. Si bien el análisis de semillas evita la selección que puede actuar en contra de estas variantes alélicas, también se observaron entre los individuos adultos estudiados algunos de los alelos raros, por ejemplo los específicos de especie así como también *Mdh-C-2*. Muchos de los alelos raros se detectaron en el sistema GOT, el cual no presentó actividad en yemas recolectadas a finales del verano, por lo que no se pudo corroborar su presencia en los árboles adultos. Es importante destacar, por otra parte, que en las cuatro poblaciones en las que se analizaron tanto árboles adultos como semillas, la estructura alélica entre estas dos generaciones no fue, en general, significativamente distinta para los cuatro loci estudiados.

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

Si bien no hubo patrones marcados en las frecuencias alélicas con respecto a variables geográficas como la latitud (excepto en la diversidad del locus *Idh*), en todos los loci las frecuencias fueron significativamente distintas entre poblaciones e incluso dentro de una misma cuenca lacustre, entre poblaciones distantes a unos pocos

kilómetros una de otra. Más aún, se observaron diferencias entre dos poblaciones situadas a diferentes altitudes en una misma transecta (poblaciones 11 y 12 de la cuenca del lago Lácar), lo cual está en estrecha relación con el proceso de hibridación y será mencionado más adelante. La variación observada entre las poblaciones de Argentina, independientemente de su asociación a condiciones climáticas, es grande y puede tener implicancias adaptativas.

#### 4.2. Diversidad

En la mayoría de las especies forestales polinizadas y dispersadas por viento, existe una tendencia a homogeneizar la variación genética entre poblaciones por un flujo génico extensivo. Siguiendo este patrón general, la variación genética observada en *Nothofagus nervosa* fue mayor dentro de las poblaciones que entre ellas. Los valores de diversidad observados (*sensu* Gregorius) fueron similares a los descriptos en otras especies. Por ejemplo la diversidad ( $v$ ) en *Quercus robur* y *Q. petraea* fue de 1,4 (Müller-Starck et al., 1993), en *Fagus sylvática*, de 1,55 (Gregorius et al., 1986). Como ya fuera discutido en la sección anterior, estos valores de diversidad relativamente bajos denotan la presencia de *polimorfismo menor* con un alelo en alta frecuencia y otro/s alelos raros o en muy baja frecuencia. Similarmente, la diferencia encontrada entre el número medio de alelos y la diversidad (número efectivo de alelos) refleja este *polimorfismo menor*.

Los parámetros de variación intrapoblacional son, en su mayoría, influidos por el número de loci analizados y la inclusión o no de los loci monomórficos. Esto es particularmente válido tanto para el número medio de alelos como para la heterocigosis observada y esperada. En especial la inclusión o no de loci monomórficos dificulta la comparación con otros trabajos, sobre todo si estos loci representan la mayoría de los loci analizados. El valor de heterocigosis esperada (comúnmente llamado *diversidad génica*) calculado en el presente trabajo a través de todos los loci polimórficos para la especie se podría comparar con la *Diversidad génica total* ( $H_T$ ; Nei, 1973), dado que en este parámetro se utilizan sólo los loci polimórficos, calculando un promedio de la diversidad para la especie. Considerando esto, la comparación con los resultados de otros trabajos sobre *Nothofagus* de América del Sur es posible, aunque teniendo en cuenta que en ellos no fue realizado el control genético de la variación observada y, por lo tanto, se trata sólo de loci

putativos. El valor encontrado en Raulí (18,1 %) es comparable entonces al obtenido en *N. pumilio* (18,2 %) (Premoli, 1998) y *N. nitida* (15,6 %) (Premoli, 1997). En ambos casos las poblaciones analizadas cubrían el área de distribución de las especies, aunque en *nitida* se estudiaron sólo 4 poblaciones. El tamaño de la distribución de Raulí en Argentina se asemeja más al de *nitida*, siendo aún menor que éste. Esto sugiere que los niveles de variación genética observados en poblaciones argentinas de Raulí son elevados en relación a su área de distribución y a otros *Nothofagus*. Por otra parte, en un estudio de 18 poblaciones chilenas de Raulí cubriendo el área de distribución de la especie en ese país, se observaron niveles de variación intrapoblacional mayores a los detectados en el presente trabajo, ya que el número medio de alelos entre poblaciones fue de 3,04 y la heterocigosis esperada promedio fue de 22,8 % para 10 loci putativos polimórficos (Carrasco & Eaton, enviado). Dado que incluso la comparación entre poblaciones de la misma localidad analizadas en ambos trabajos reflejan diferencias significativas, éstas pueden en gran medida deberse a que la mayoría de las enzimas analizadas por Carrasco & Eaton pertenecen al Grupo II de enzimas que actúan en el metabolismo secundario y son, por ende, más variables, y/o quizás a la mayor variación que equivocadamente se interpreta de los zimogramas cuando no se realiza el control genético.

### 4.3. Diferenciación entre poblaciones

La diferenciación de cada población respecto a su complemento, formado por el “pool” de las poblaciones restantes, varió entre 2,4 % y 8,1 % con un promedio de 4,7 % siendo mayor para las poblaciones 5, 14, 19 y 30. Un estudio previo con sólo 11 poblaciones reveló niveles similares de diferenciación ( $\delta = 4,6$  %, Marchelli & Gallo, en prensa). Es interesante destacar que tanto la población 14 como la 19 fueron muy diversas con presencia de alelos exclusivos. Según Wright (1978) un valor de  $F_{ST}$  menor a 5 % corresponde a un nivel bajo de diferenciación; mientras que por encima de este valor y hasta un 15 % se considera moderado. Si bien el valor de diferenciación media de las poblaciones es relativamente bajo ( $\delta = 4,7$  %;  $F_{ST} = 5,2$  %), la mayoría de las distancias genéticas entre poblaciones fueron significativamente diferentes. Esto indicaría que la diferenciación es importante, compensándose probablemente los valores individuales de las distintas proporciones alélicas al estimarse el parámetro de diferenciación media.

Cuando se dan valores de diferenciación entre poblaciones de una especie, en general, no se considera el tamaño ni las particularidades de su área de distribución. Una especie ampliamente distribuida que pueda ocupar diversos hábitats tendría mayores probabilidades de diferenciación que una de rango reducido con flujo génico equivalente. Ante el supuesto de que la selección natural fuera la principal fuerza modeladora, diversidad ambiental y flujo génico restringido originaría mayor diferenciación. Los valores de diferenciación obtenidos en el presente trabajo para Raulí son similares a los reportados en otras especies de áreas de distribución o de área de estudio más amplia. El grado de diferenciación entre poblaciones de Chile, donde la distribución es mayor y más continua, fue de 5,1 % ( $F_{ST}$ ) (Carrasco & Eaton, enviado).

Resultaría interesante contar con un parámetro de diferenciación que reflejara al mismo tiempo la diversidad ecológica y las restricciones en el intercambio de información genética entre las poblaciones de una especie (Gallo, com. pers.). Sólo así podría estimarse el valor relativo de diferenciación entre distintas especies. Este parámetro debería explicar la variación en función de los factores que afectan la distribución y generación de la diversidad genética mencionados al comienzo de este capítulo (mutación, deriva genética, flujo génico y selección natural) así como aquellos factores ecológicos que influyen en la diversidad genética. Entre estos últimos estarían por ejemplo, el área de distribución de la especie, no sólo considerando su tamaño sino también su topografía, dado que una especie con distribución amplia en un ambiente de fisionomía compleja podrá ocupar una diversidad de hábitats mayor que una especie con la misma distribución, pero en un ambiente uniforme. Es de esperar en tales circunstancias que en el primero de los casos la diferenciación entre poblaciones de la especie sea mayor que en el segundo caso, no sólo por las posibilidades de adaptación a diversos hábitats, sino también por las restricciones en el flujo génico y el grado de aislamiento de las poblaciones en un ambiente complejo. En tal sentido, otros factores de importancia son el grado de fragmentación y aislamiento de las poblaciones de una especie y el tamaño efectivo de las poblaciones, dado que el efecto de la deriva genética y la endogamia será mayor en aquellas especies con distribuciones fragmentadas y número efectivo reducido. Asimismo, el grado de simpatría con especies interfértiles también ejercería un efecto importante en el nivel de diferenciación entre poblaciones, sobre todo si la simpatría se da en parte y no en toda el área de distribución. Por otro lado, este



parámetro también debería reflejar características inherentes a cada especie como, por ejemplo, el sistema de apareamiento, el modo de polinización y dispersión de las semillas, el tipo de reproducción, dado que es de esperar que aquellas especies con reproducción sexual y fecundación cruzada sean más diversas que las que sostengan cierto grado de autofecundación. A su vez, la polinización y dispersión de semillas anemófila conlleva un menor grado de diferenciación entre poblaciones por las mayores posibilidades de flujo génico en dichos sistemas que en aquellos con polinización entomófila, por ejemplo. Finalmente, la historia evolutiva de la especie también juega un rol importante y equivalente a todos los factores mencionados antes, dado que si la especie, por ejemplo, ha experimentado recientemente sucesivos cuellos de botella, la variación genética actual sería reducida, independientemente de su área de distribución.

Dado que todas las características mencionadas influyen en gran medida en la diferenciación entre poblaciones de una especie, la comparación de un parámetro de diferenciación como el  $\delta$  o el  $F_{ST}$  entre especies con hábitats muy distintos resulta totalmente abstracta. Teniendo en cuenta especies de una misma región, asumiendo un ecosistema común con tipos de hábitats similares, se podría considerar en forma muy grosera como factor de diversidad ecológica al tamaño del área de distribución o de estudio, asumiendo que, si todos los otros factores mencionados antes son iguales, la diferenciación ( $\delta$ ) será mayor a mayor tamaño del área de distribución. Comparando distintos trabajos realizados en especies de los bosques Andino-patagónicos, se observó, en general, que a mayor área de distribución, mayor es el nivel de diferenciación entre poblaciones. Al comparar las distintas especies surge con más énfasis que la diferenciación encontrada en poblaciones argentinas de Raulí es elevada, dado que es comparable a los valores calculados en *Nothofagus nitida* y en *Austrocedrus chilensis*, ambas especies con áreas de distribución más amplias (Tabla IV.11). La menor diferenciación en relación al área encontrada en poblaciones de Chile por Carrasco & Eaton (enviado) podría estar relacionada al tipo de distribución más continua que en Argentina. Es importante aclarar que en algunos casos el número de poblaciones analizado en relación al área de estudio no era muy elevado. Si en el caso de Raulí se redujera el número de poblaciones, la diferenciación sería distinta, dependiendo de las poblaciones elegidas. Tomando cinco poblaciones que representan la distribución geográfica, las cuales podrían haber sido seleccionadas en un trabajo

que incluyera sólo dicho número de poblaciones, (poblaciones 5, 10, 14, 18 y 27) el valor de diferenciación media fue de 7,3 %, lo cual eleva aún más la diferencia con otras especies. La diferenciación entre poblaciones en especies de *Nothofagus* de

Tabla IV.11: Relación entre la diferenciación y el área de distribución estimada en distintas especies arbóreas de los bosques templados de América del Sur.

Especie	Nº Poblaciones	Nº loci	Diferenciación (%)	Area de distribución	Referencia
<b>Angiospermas</b>					
<i>Nothofagus nervosa</i>	20 (Argentina)	8	4,7 <sup>1</sup> 5,2 <sup>2</sup>	Muy restringida y fragmentada	Esta tesis
<i>Nothofagus nervosa</i>	3 (Chile)	8	5,7 <sup>1</sup>	Restringida y continua	Esta tesis
<i>Nothofagus nervosa</i>	11 (Argentina)	8	4,6 <sup>1</sup>	Muy restringida y fragmentada	Marchelli & Gallo, en prensa.
<i>Nothofagus nervosa</i>	18 (Chile)	10	5,1 <sup>2</sup>	Restringida y continua	Carrasco & Eaton, enviado.
<i>Nothofagus dombeyi</i>	5	15	7,4 <sup>3</sup>	Extensa	Premoli, 1997
<i>Nothofagus betuloides</i>	4	15	12 <sup>3</sup>	Extensa	Premoli, 1997
<i>Nothofagus nitida</i>	4	15	4,7 <sup>3</sup>	Restringida	Premoli, 1997
<i>Nothofagus pumilio</i>	17	14	17,1 <sup>3</sup>	Extensa	Premoli, 1998
<b>Gimnospermas</b>					
<i>Austrocedrus chilensis</i>	16	12	4,3 <sup>1</sup>	Extensa y fragmentada	Pastorino, 2001
<i>Fitzroya cupresoides</i>	24	21	7,9 <sup>3</sup>	Restringida	Premoli et al., 2000a

<sup>1</sup>:  $\delta$ ; <sup>2</sup>:  $F_{ST}$ ; <sup>3</sup>:  $G_{ST}$

Nueva Zelandia también fue muy baja y con tendencia a aumentar en relación al área de distribución (Haase, 1992, 1994).

Los resultados presentados en este capítulo concuerdan con la distribución de la variación genética que se observó en otras especies forestales dispersadas y polinizadas por viento, dado que en la mayoría de ellas los valores de  $F_{ST}$  resultaron ser menores a 0,10 (Comps et al., 1991; Hamrick et al., 1992). Entre las especies de *Nothofagus* también se reportó mayor variación intrapoblacional que interpoblacional (Haase, 1993; Premoli, 1997; Carrasco & Eaton, 1997; Premoli, 1998; Marchelli & Gallo, en prensa). Mayores niveles de diversidad genética fueron reportados en dos especies ampliamente distribuidas en relación con una tercera cuya distribución es reducida (*Nothofagus betuloides*, *N. dombeyi* y *N. nitida* respectivamente, todas de

Sudamérica) (Premoli, 1997). Similares resultados se obtuvieron entre especies de Nueva Zelandia (Haase, 1993).

#### **4.4. Variación en tres poblaciones de Chile**

Si bien hay que recordar que sólo se analizaron tres poblaciones a fines comparativos, se puede decir que los valores de diversidad encontrados al oeste de la Cordillera de los Andes son menores que los observados al este. Cuando se consideró el mismo número de poblaciones en ambos sectores de la distribución (ver sección 3.5.), la diferenciación media observada entre las tres poblaciones chilenas resultó menor ( $\delta_{\text{Chile}} = 5,7 \%$ ,  $\delta_{\text{Argentina}} = 6,48 \%$ ). Este resultado se reflejó también en la comparación de las estructuras alélicas en ambas regiones. Las poblaciones de Argentina fueron significativamente distintas en todos los loci analizados, mientras que en las poblaciones de Chile esto se dio únicamente en cuatro de los ocho loci, lo cual indicaría una mayor homogeneidad. En Chile la distribución del Raulí es mucho mayor y más continua que en Argentina. Estos resultados concuerdan con numerosos estudios dónde especies de distribución más amplia y continua presentan valores menores de diferenciación (Hamrick et al., 1992). El tipo de distribución fragmentada del Raulí en Argentina, que constituye ingresos en pasos bajos hacia el este de la Cordillera de los Andes, sugiere una mayor diferenciación por un grado de aislamiento mayor entre poblaciones.

Cabe destacar, sin embargo, que el año de recolección de semillas en Chile (1998) correspondió, al menos en Argentina, a un año de producción escasa. Dados los resultados obtenidos al analizar la variación temporal, la diversidad genética detectada en estas poblaciones de Chile podría estar subestimada por no tratarse de un año de producción abundante.

También es importante tener en cuenta que la explotación del Raulí en Chile fue mucho más intensa que en Argentina, devastándose grandes áreas para la plantación de especies exóticas (Donoso & Lara, 1995). Esta gran explotación de tipo selectiva puede haber reducido en gran medida la variación genética.

Es interesante destacar la similitud (no hay diferencias significativas en las distancias genéticas del pool génico) entre las poblaciones 8, 10 y 11 (de la cuenca del lago Lacar) y la 6 (de la cuenca del lago Huechulafquen) con la población de Neltume, situada a una latitud intermedia del otro lado de la Cordillera (Tablas 4 y 5,

Apéndice III). Por otro lado, si bien la distancia genética entre esta población chilena y la 19, de la cuenca Lolog, es significativamente distinta, ambas poblaciones presentan un alelo que es exclusivo de ellas y se encuentra en mayor frecuencia en Neltume. Esto sugiere o bien un mismo origen o una conexión actual. El Paso Pirihueico (1.455 m), en el lago Lolog, podría ser un posible corredor que conecte ambas poblaciones.

Otro dato interesante en este análisis es la mayor diferenciación observada en la población de Nahuelbuta, situada en la Cordillera de la Costa. No sólo esta población se encuentra separada de la distribución principal de Raulí que se da a lo largo de la Cordillera de los Andes, sino que además dicha región fue descrita como posible refugio durante las últimas glaciaciones (Villagrán, 1991). Esto también se retomará en la discusión final.

#### **4.5. Variación geográfica y flujo génico**

El área de distribución geográfica es uno de los factores que más influyen en la diversidad y diferenciación genéticas de una especie (Hamrick et al., 1992). Como ya fuera mencionado en el Capítulo I, *Nothofagus nervosa* puede considerarse como una especie de distribución endémica. En tal sentido, los niveles de diferenciación encontrados coinciden con lo observado para este tipo de especies dado que las mismas poseen valores de diferenciación entre poblaciones relativamente más altos que otras especies (Hamrick et al., 1992; Müller-Starck et al., 1992).

Los altos niveles de diferenciación observados entre poblaciones de una misma cuenca llevan al rechazo de la hipótesis inicial de variación en sentido latitudinal con diferencias entre cuencas y con posibilidad de considerar a cada cuenca como un grupo homogéneo. Dentro de algunas de las cuencas, sin embargo, se observaron grupos de poblaciones con frecuencias alélicas similares. Más aún, en la cuenca del Lago Lácar, donde el número de poblaciones analizadas fue el mayor (6 poblaciones), se observó un aumento de la distancia genética en concordancia con el aumento de la distancia geográfica entre las poblaciones situadas más al oeste (poblaciones 14 y 16) y las restantes. La población 14 resultó ser la más diferenciada, lo cual concuerda con un flujo génico unidireccional hacia el este. Esto estaría estrechamente asociado a la dirección de los vientos, indicando la importancia de los mismos en el transporte polínico y con él de la información genética.

Existen métodos indirectos y directos para estimar el flujo génico. Dentro del primer grupo, uno de los más usados calcula el número de inmigrantes a través del índice de fijación de Wright,  $F_{ST}$  (Wright, 1978), según la siguiente expresión:

$$Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$$

donde  $Nm$  es el número de inmigrantes por generación ( $N$  es el tamaño efectivo de la población receptora y  $m$  es la tasa de flujo génico). Este método asume un modelo de flujo génico de islas y el mismo valor de  $F_{ST}$  para cada alelo. En el caso de un modelo de tipo “stepping-stone”, el flujo génico calculado de esta manera está subestimado. Un método alternativo desarrollado por Slatkin (1985), requiere la presencia de alelos exclusivos en las poblaciones analizadas. Si bien estimaciones realizadas con ambos métodos dan valores similares de flujo génico, es preferible el cálculo a través del  $F_{ST}$  dado que utiliza todos los datos de frecuencias alélicas y todos los loci polimórficos, mientras que en el método de los alelos exclusivos se requiere un número razonable de estos, lo cual no siempre es posible en estudios con isoenzimas en poblaciones naturales (Slatkin & Barton, 1989).

Los métodos directos abarcan desde la observación del movimiento de polen o semillas a través de los vectores de dispersión (por ejemplo animales), lo cual no puede aplicarse en especies anemófilas, hasta la marcación del polen o las semillas con pinturas, tinturas o elementos radioactivos y posterior monitoreo del movimiento. La disponibilidad de marcadores codominantes como las isoenzimas o los microsatélites es la forma más certera de determinar de manera directa el flujo génico. Para este método se requiere el seguimiento de alelos exclusivos de un individuo o grupo de individuos y su descendencia. Para una revisión detallada de las ventajas y desventajas de los distintos mecanismos de determinación de la tasa de flujo génico ver la revisión de Hamrick & Nason (2000).

El método de los alelos exclusivos desarrollado por Slatkin (1985) no puede ser aplicado en el presente trabajo ya que requiere un número elevado de dichos alelos en las poblaciones analizadas. Sin embargo, la existencia en la población 14 de dos alelos exclusivos en elevada frecuencia en dos loci del sistema GOT (*Got-B-6*,  $p = 0,103$  y *Got-C-4*,  $p = 0,108$ ) y la presencia de una única semilla con dichos alelos en la población 12 ( $p = 0,004$ ), ubicada aproximadamente a 16 km de la población 14 en

el sentido de los vientos en la cuenca del Lago Lácar, sugiere intuitivamente que el flujo génico entre estas dos poblaciones para el año analizado fue de, al menos, un individuo o grano de polen. Cabe aclarar que al ser dos los alelos considerados, la probabilidad de que los mismos se hayan originado por mutación en la población 12 es muy baja. La estimación de  $Nm$  a través del índice  $F_{ST}$  entre las poblaciones involucradas para los dos loci mencionados arriba, indica, por el contrario, un flujo génico ( $Nm$ ) de 7,79 entre las poblaciones 14 y 12. Este valor de flujo génico puede ser considerado como muy alto, dado que valores mayores a 1 ya indican flujo génico considerable (Yeh, 2000). El indicio directo de la migración de un individuo o gameta sugiere, a diferencia de lo observado con el método indirecto, que el flujo génico entre estas dos poblaciones es bajo o moderado. Teniendo en cuenta esto, sería razonable suponer que entre las poblaciones situadas en los extremos oeste y este de la cuenca Lácar el flujo génico podría resultar muy limitado o nulo. Lo mismo podría estar ocurriendo en otras cuencas. Esto coincide con lo reportado para especies endémicas en donde el flujo génico es significativamente menor al de especies ampliamente distribuidas (Hamrick et al., 1992). Sin embargo, hay que destacar que los resultados presentados constituyen sólo una inferencia ya que para poder establecer fehacientemente un valor de flujo génico deberíamos contar con más alelos exclusivos o aplicar otro tipo de marcadores como los microsatélites, en donde el número de alelos es significativamente mayor.

Por otra parte, los valores de diferenciación de cada población con su complemento y el análisis de los dendrogramas para cada locus y el pool génico revelaron una tendencia de diferenciación entre poblaciones en sentido oeste - este en algunas cuencas lacustres (Hermoso, Lácar y Lolog) (Fig.IV.4; Fig. 3, Apéndice III). Dada la unidireccionalidad del viento, en presencia de flujo génico extensivo se esperaría encontrar todas las variantes alélicas observadas en las poblaciones del oeste entre aquellas situadas al este. Si bien la diferenciación entre poblaciones dentro de las cuencas lacustres es alta, la mayor diferenciación se observa hacia el oeste, lo cual coincide con que dichas poblaciones son “fuente” de flujo génico y no recibirían aportes de otras poblaciones, suponiendo que la Cordillera de los Andes actúe como una barrera importante. Esta mayor diferenciación hacia el oeste estaría confirmando la ocurrencia de flujo génico mayormente unidireccional dentro de cada cuenca lacustre, aunque no muy extensivo. Por otro lado, si en las poblaciones situadas hacia el este surgieran nuevas variantes, éstas no se transmitirían a las poblaciones del

oeste, favoreciendo la diferenciación este–oeste. Este hecho se observó en las poblaciones de la cuenca Lolog cuando se analizaron semillas del año 1996. La gran proporción de híbridos observada en las poblaciones del este determinó una gran diferenciación de las mismas. Asimismo en la cuenca del Lago Lácar se observa una mayor proporción de semillas híbridas en las poblaciones del este. En este caso, la diferenciación estaría en parte determinada por los vientos y su influencia en el grado de flujo génico, pero en gran medida por el proceso de hibridación con *Nothofagus obliqua*, lo cual se discutirá en mayor detalle en las próximas secciones.

#### **4.6. Variación temporal**

Las diferencias significativas encontradas en las frecuencias alélicas de las semillas de distintos años analizadas en nueve poblaciones indican la existencia de variación temporal en el sistema de apareamiento y por consiguiente en la estructura genética de la generación seminal. Si bien no se analizaron los mismos dos años en las nueve poblaciones, todas mostraron diferencias estadísticamente significativas. Como ya se mencionó antes, algunas características observables del sistema de apareamiento sugieren la ocurrencia de esta variación temporal. Principalmente el número variable de individuos involucrados en la producción cíclica de semillas puede redundar en una estructura genética distinta cada año. Es probable que los años en que la producción de semillas es mayor la estructura genética de la población esté mejor representada en la descendencia, dado que un mayor número de individuos adultos participan en el sistema reproductivo. Por otra parte, cambios climáticos durante el período de polinización, como primaveras más lluviosas o más cálidas que lo habitual, también pueden modificar los ciclos fenológicos de los individuos provocando una fertilidad diferencial. Notablemente, en siete de las poblaciones analizadas dos años, se observó un número medio de alelos por locus igual o mayor en el año de mayor producción de semillas, confirmando la hipótesis formulada. La presencia de más alelos implica una diferencia muy grande de tipo cualitativo. En las poblaciones 17 y 18 de la cuenca Lolog, se observaron grandes diferencias en la proporción de semillas híbridas entre los años analizados, lo cual elevó el número medio de alelos. En ambos casos, el porcentaje de hibridación fue mucho mayor en el año de menor producción de semillas (1996) lo cual se discutirá en la próxima sección.

Además del aumento en el número medio de alelos por locus (diferencia cualitativa) los cambios en las frecuencias de los alelos predominantes (diferencia

cuantitativa) también estarían mostrando una diferencia en la estructura genética de los individuos adultos participantes. La comparación entre individuos adultos y la generación seminal reveló que, a pesar de que tres de los cuatro loci analizados corresponden a los menos variables, no existen diferencias significativas (salvo pocas excepciones) entre ambas generaciones. Esto sugiere que la muestra de semillas representa bien la estructura genética de la población adulta y posee además las ventajas adicionales mencionadas en el ítem “Material utilizado”.

Estudios realizados en otras especies demostraron también la ocurrencia de variación temporal aunque en todos ellos se analizaron pocas poblaciones. Por ejemplo, Müller-Starck (1985b) describió la existencia de variación temporal en la estructura genética de las semillas producidas por dos huertos semilleros de *Pinus sylvestris* en dos años distintos. En *Fagus sylvatica*, el análisis de las semillas producidas en dos poblaciones durante dos años, reveló que la variación espacial fue más importante que la temporal (Gregorius et al., 1986). Similares resultados se obtuvieron en árboles adultos de *Pinus ponderosa*, donde se analizaron cuatro clases de edades en una población subdividida en seis grupos espaciales, encontrándose mayores diferencias a nivel espacial que temporal (Linhart et al., 1981). Sin embargo, en el caso de este último trabajo hay que tener en cuenta la selección que ocurrió desde la etapa seminal. Asimismo, Merzeau et al. (1994) encontraron muy poca variación temporal entre dos clases de edades (juveniles y adultos) en tres poblaciones de *F. sylvatica*.

La gran mayoría de los trabajos en los que se utilizan semillas para caracterizar genéticamente una población, no tienen en cuenta la posibilidad de variación temporal. Dado que en Raulí la variación temporal fue significativa y casi similar a la espacial, sería muy interesante aumentar el número de poblaciones y de años para estudiar más a fondo esta tendencia. El resultado presentado aquí es importante para tener en cuenta que la mejor caracterización de la estructura genética se logra en el año de mayor producción de semillas o, mejor aún, unificando los datos disponibles de varios años.

#### **4.7. Influencia de la hibridación con Roble Pellín sobre la variación genética**

El proceso de hibridación entre Raulí y Roble Pellín está ejerciendo un efecto muy importante sobre el grado y distribución de la variación genética en Raulí. La detección de semillas híbridas en algunas de las poblaciones les confiere a las mismas



una mayor variación genética por las nuevas variantes alélicas aportadas por la otra especie que elevan significativamente la multiplicidad alélica y el número medio de alelos por locus.

El mayor porcentaje de semillas híbridas se observó en las poblaciones situadas al este de la cuenca del lago Lolog. En esta cuenca con distribución casi exclusiva de Raulí, se encontró recientemente una pequeña población de *N. obliqua* en la margen sur del lago cerca de la cabecera oeste (Alfredo Retta, com. pers.). Es interesante destacar que, como se mencionó en la sección anterior, el porcentaje de hibridación se modificó significativamente según el año analizado. En las tres poblaciones de esta cuenca se utilizaron semillas de los años 1995 y 1996. Dos de las poblaciones (17 y 18, ambas hacia el este de la distribución) presentaron un alto porcentaje de semillas híbridas heterocigotas para el locus *Adh* y homocigotas para el locus *Pgi* (alelo de *N. nervosa*). Esto no sólo confirma la independencia de ambos loci, sino que demuestra la fertilidad de los individuos híbridos, ya que tales resultados sólo pueden ser explicados mediante la ocurrencia de retrocruzas entre la  $F_1$  y alguno de los parentales (Gallo et al., 2000a). Dado que en esta cuenca no se detectaron semillas heterocigotas para ambos loci marcadores, el cruzamiento debe estar ocurriendo entre la  $F_1$  y *N. nervosa*. Si esto es así, deberíamos encontrar individuos  $F_1$  adultos en las poblaciones. En tal sentido, observaciones a campo denotaron la presencia de individuos de corteza y hojas intermedias entre ambas especies, tanto en la pequeña población descubierta recientemente como entre los individuos de las poblaciones 17 y 18. Esto debería confirmarse mediante la genotipificación de todos los individuos de estas poblaciones. La proporción de semillas híbridas por probable retrocruza fue significativamente mayor en el año 1996. Una posible explicación a este fenómeno son las características climáticas particulares del año 1995, en el cual luego de un invierno muy frío y con cantidades extraordinarias de precipitaciones níveas siguió una primavera más cálida y seca que los registros habituales<sup>4</sup>. Estas condiciones atípicas pueden haber alterado los ciclos fenológicos de las especies permitiendo un solapamiento de los mismos con la consecuente posibilidad de hibridación.

---

<sup>4</sup> Promedio de precipitaciones (1981-1996): invierno: 124,6 mm, primavera: 42,08 mm  
Promedio de 1995: invierno: 202,9 mm. Primavera: 22,8 mm.  
Promedio temperaturas (1981-1996): primavera: 8,5 °C. Promedio 1995: 10,2 °C.  
Datos de la estación meteorológica del INTA EEA Bariloche.

Además de la pequeña población de Roble Pellín descubierta recientemente en la margen sur del lago, un indicio de la existencia de posibles híbridos en el pasado lo muestra también los registros de extracción de madera entre 1945 y 1947. En este período, en una misma parcela de la cuenca, se extrajeron 3442,97 m<sup>3</sup> de madera de Raulí y se registran sólo 2,71 m<sup>3</sup> (seguramente un sólo árbol) de Roble Pellín (Gonzalez Peñalba et al., 1997), lo que muy probablemente se tratara de un híbrido.

La ausencia de individuos heterocigotas para el locus *Pgi* podría estar indicando algún tipo de selección en contra de este genotipo, dado que en las retrocruzas entre la F<sub>1</sub> (heterocigota para este locus) y *N. nervosa* (homocigota para el alelo 2) se esperaría encontrar un 50 % de individuos heterocigotas entre la descendencia. Si bien es posible que no se detecten heterocigotas por deficiencia del muestreo, resulta curioso dada la gran cantidad de híbridos para el locus *Adh*.

En la cuenca del Lago Lácar, ambas especies se encuentran en relación 1:1 en la zona de contacto de su distribución altitudinal (aproximadamente a los 800 m snm). Las poblaciones analizadas en esta cuenca están situadas entre los 900 y 980 m snm, excepto la población 11 que se encuentra al nivel del lago (650 m snm), donde un apéndice de la población de Raulí (de distribución altitudinal mayor) ingresa en el bosque de Roble. Es interesante destacar que los mayores niveles de hibridación se detectaron en esta población situada a menor altitud. Por otro lado, la población 10, que se encuentra situada al este de la distribución en la cuenca Lácar, en el límite de la distribución y donde las precipitaciones son menores, también presentó valores altos de hibridación. Condiciones climáticas distintas pueden influir en la fenología alterando los períodos de floración de ambas especies, permitiendo el solapamiento de los mismos y favoreciendo de este modo la hibridación (Gallo, 2000). En estas poblaciones se observaron tanto semillas características de la F<sub>1</sub> (dobles heterocigotas para los dos loci específicos) como con genotipo de *N. obliqua* para el locus *Adh* y heterocigotas para el locus *Pgi*, lo cual está mostrando muy probablemente, al igual que en la cuenca del Lago Lolog, la ocurrencia de retrocruzas entre la F<sub>1</sub> y los parentales; en este caso, ambas retrocruzas podrían estar ocurriendo. Estos resultados demuestran que ambas especies son interfértiles y que, si bien existen barreras, éstas deben ser o bien postcigóticas o por competencia del polen específico (Gallo et al., 2000a; Gallo, 2000). En tal sentido, se ha observado un elevado porcentaje de plantas híbridas en la descendencia de árboles individuales el cual no coincide con las observaciones de escasos individuos adultos morfológicamente intermedios en las

poblaciones naturales (Gallo et al., 1997b; Gallo et al., 2000a; Capítulo III de esta tesis). Sin embargo, las familias con un número elevado de plantas híbridas corresponden a la descendencia de árboles relativamente aislados de otros de su especie y, más aún, rodeados de ejemplares de *N. obliqua*, lo que favorecería la habilidad competitiva del polen de esta especie (Gallo, 2000). Por otro lado, la mortalidad de individuos híbridos por daño ocasionado por heladas observada en ensayos de vivero (Crego, 1999) puede estar representando una de las barreras postcigóticas (Gallo, 2000). Se observó que los individuos híbridos presentaban una gran variación en cuanto a la fecha de cierre del crecimiento, siendo este, en promedio, más tardío que en las especies parentales, exponiéndose de este modo al daño por heladas tempranas (Crego, 1999).

Las diferencias encontradas en relación a la hibridación entre las poblaciones de las cuencas Lácar y Lolog, sugiere que ambas cuencas estarían en estadios evolutivos distintos con respecto a este proceso (Gallo et al., 2000a; Marchelli & Gallo, en prensa a). En la cuenca Lolog, donde el porcentaje de retrocruzas es mayor, se podría asumir una etapa más avanzada en la hibridación (o introgresión) de estas especies.

Los patrones de variación observados responden en parte a los procesos actuales que se discutieron (flujo génico, hibridación), pero están también en gran medida determinados por procesos del pasado reciente como las últimas glaciaciones. Los cambios climáticos asociados al avance arrasador de los hielos durante esta época fueron muy grandes y alteraron, sin lugar a dudas, la distribución de la variación genética en todas las especies de la zona. El posible efecto de las glaciaciones en la distribución de la variación genética en *N. nervosa* será discutido en el Capítulo VI, luego de analizar los resultados obtenidos con marcadores moleculares en ADN de cloroplasto.

## Capítulo V

### **Diferenciación genética en poblaciones de Raulí detectada mediante marcadores de ADN de cloroplasto**

Las características generales de los marcadores moleculares y, en particular del ADN de cloroplasto, ya fueron mencionadas en el Capítulo I. En este capítulo se describirá la técnica utilizada y se presentarán los resultados del análisis de las poblaciones de *Nothofagus nervosa* utilizando marcadores de ADN de cloroplasto.

#### **1. Introducción**

En especies longevas como los árboles, la estructura genética actual puede aún reflejar el efecto de la migración postglacial (Newton et al., 1999). Como la migración en plantas con reproducción sexual ocurre a través de la semilla, los marcadores heredados en forma exclusivamente materna son los más adecuados para describir rutas de recolonización y diferenciación entre poblaciones (Gugerli et al., 2001). La elevada conservación del ADN de cloroplasto con tasas de mutación muy bajas (estimadas en el orden de  $10^{-9}$  en el caso de sustituciones sinónimas, en Clegg et al., 1991) y la herencia clonal uniparental (materna en angiospermas) favorecen la diferenciación entre poblaciones, ya que si ocurre una mutación entre los individuos de una población, la escasa dispersión de las semillas evitará que la misma se propague a otras poblaciones de la especie. La baja tasa de mutaciones en este ADN sugiere que los posibles polimorfismos observados en la actualidad se hayan originado hace muchos años, miles quizás. Si, por ejemplo, se produjo una mutación entre los individuos de una población que se encontraba “refugiada” durante las últimas glaciaciones en determinado lugar, las poblaciones derivadas de dicho refugio tendrán un *haplotipo* (tipo de ADN de cloroplasto) distinto a las provenientes de otro refugio glaciario. De este modo, la detección de polimorfismos en el ADN de cloroplasto a nivel intraespecífico permite estudiar la historia glacial y postglacial de las especies y trazar las rutas migratorias que siguieron en el proceso de recolonización cuando se retiraron los hielos (Kremer & Petit, 1993) (ver Capítulo I). Numerosos trabajos han descripto la utilidad de estos marcadores en dichos estudios

(e.g. Petit et al., 1993; Tsumura et al., 1994; Ferris et al., 1995; Demesure et al., 1996; Dumolin-Lapègue et al., 1997b; Mátyás & Sperisen, 2001).

El objetivo principal de esta sección de la tesis es aplicar las propiedades de los marcadores de ADN de cloroplasto para estudiar la historia glacial y postglacial de *Nothofagus nervosa*. En particular, probar las hipótesis de existencia de uno o varios refugios glaciarios donde sobrevivieron las poblaciones que dieron lugar a la distribución actual de Raulí en Argentina.

Parte de este estudio se realizó en el Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Grosshansdorf, Alemania perteneciente al Centro Federal de Investigaciones Forestales (BFH), bajo la dirección de la Dra. Birgit Ziegenhagen.

## **2. Fundamentos teóricos de la técnica**

En el estudio del ADN de cloroplasto de Raulí se empleó la técnica conocida como PCR-RFLP, que es una combinación de dos metodologías: PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RFLP (Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción). Si bien este método puede ser aplicado en cualquier tipo de ADN (nuclear, cloroplástico o mitocondrial), aquí se lo utilizó para el análisis de secuencias cloroplásticas únicamente.

### **2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El desarrollo de la técnica de PCR en 1985 (Saiki et al., 1985) marcó un cambio fundamental en los estudios genómicos. Sucesivas mejoras a la técnica desde su descripción inicial y su uso en combinación con otros métodos permiten que la misma sea utilizada en diversas aplicaciones que abarcan el diagnóstico de enfermedades, análisis de paternidad, estudios de diversidad y diferenciación genéticas, etc. Existen numerosos métodos derivados de la PCR y nuevas variantes con distintas aplicaciones aparecen día a día. La descripción de las mismas escapa a la temática de esta tesis, pero para revisiones detalladas ver Karp et al., (1998); Parker et al., (1998); Gillet (1999); Glaubitz & Moran (2000).

El número de copias de un determinado gen o fragmento de ADN obtenido al cabo de una extracción de ADN genómico es muy bajo y, por ende, no detectable. El procedimiento tradicional utilizado para aumentar el número de copias del gen o fragmento a estudiar incluye la inserción del mismo en el ADN de vectores como

plásmidos, cósmidos, etc. (transformación de vectores), los cuales son luego incorporados por bacterias hospedantes que, al duplicarse, duplican también el ADN de estos vectores amplificando así el número de copias del fragmento de ADN de interés. La verificación de la incorporación del vector transformado se realiza mediante la exposición de las bacterias a determinados antibióticos para los cuales sólo son resistentes o sensibles, dependiendo de la transformación realizada, las que han incluido al vector transformado. Este procedimiento denominado “clonación” es muy laborioso, y requiere varios días de trabajo con resultados no siempre satisfactorios, dado que puede fallar tanto la transformación del vector como la incorporación del mismo por parte de la bacteria.

La utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa permite obtener cantidades detectables de ADN que pueden luego ser utilizadas en diversos estudios, en un procedimiento sencillo y que sólo implica unas pocas horas. El principio de esta reacción es muy simple y se basa en la función de la enzima ADN polimerasa, la cual *in vivo* cataliza la reacción que permite la replicación semiconservativa del ADN. Cabe recordar que la replicación del ADN es semiconservativa porque cada cadena de la molécula sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria, estando la nueva molécula formada por una cadena “vieja” y una “nueva”. A partir de una molécula de ADN que sirve de molde (template) se pueden obtener cantidades detectables de una secuencia determinada. El fragmento a amplificar puede tener una longitud que va desde 100 pares de bases nucleotídicas hasta unas pocas miles, aunque el desarrollo reciente de la “long distance PCR” permite la amplificación de fragmentos de hasta 40 kb. (en Aert et al., 1998). La secuencia de ADN a amplificar se determina mediante la identificación y secuenciación de los sitios que la flanquean. Artificialmente se sintetizan secuencias cortas (18 – 25 bases) de ADN de cadena simple denominados cebadores o más comúnmente “primers”, con las bases complementarias a los sitios identificados de modo que se apareen con ellos y marquen el inicio reconocible de la duplicación por parte de la ADN polimerasa. Estos “primers” se designan de a pares de modo tal que se unan a cadenas complementarias del ADN, a una distancia corta uno de otro. El segmento de ADN ubicado entre los “primers” será amplificado durante la reacción de la PCR. La elección de los “primers”, por ende, representa un punto crítico en cualquier estudio que emplee esta técnica e implica el conocimiento de las secuencias nucleotídicas flanqueantes. Cabe aclarar que existen algunas técnicas derivadas de la PCR que no

tienen este requisito, ya que emplean primers cortos de secuencias aleatorias los cuales se unen en diversos sitios complementarios a lo largo del genoma (por ejemplo la técnica conocida como RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar)).

Cuando se desarrolló la técnica de PCR se utilizaba el fragmento Klenow de la enzima ADN polimerasa I de *Escherichia coli* para la amplificación del ADN. Dado que esta enzima no soporta las temperaturas elevadas requeridas para la desnaturalización del ADN (ver más adelante), la misma debía adicionarse nuevamente en cada ciclo. El reemplazo de esta enzima por la *Taq* polimerasa obtenida de una bacteria termófila (*Thermus aquaticus*) constituyó una de las mejoras a la técnica original (Saiki et al., 1988), ya que permite la aplicación de ciclos sucesivos sin necesidad de agregar nuevamente la enzima al comienzo de cada uno, pues la misma soporta exposiciones reiteradas a altas temperaturas (95 ° C).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en tres pasos que se repiten en ciclos sucesivos y que ocurren a distintas temperaturas (Fig. V.1). La reacción comienza con la **desnaturalización** del ADN a una temperatura de 94 °C. El paso siguiente consiste en el **“pegado”** (annealing) de los primers, lo cual ocurre a una temperatura específica según el tamaño y la composición de bases del primer. A mayor contenido de bases C (citosina) y G (guanina), mayor será la temperatura de annealing. Esta temperatura puede variar entre 50 y 65 ° C y pequeñas modificaciones pueden llevar a una mejor amplificación del producto deseado (ver más adelante en la sección “Factores que afectan la PCR”). Una vez que se pegaron los primers, comienza el paso de **elongación** en el cual la enzima agrega nucleótidos al extremo 3' de la cadena que se va formando, complementaria al ADN molde. Este paso se lleva a cabo a una temperatura de 72° C, que corresponde a la temperatura óptima de la enzima. Este ciclo de tres pasos se repite aproximadamente 30 veces, al cabo de lo cual se obtienen billones de copias del fragmento deseado, lográndose una cantidad detectable en el proceso posterior. Sólo después del tercer ciclo se obtienen fragmentos del tamaño especificado por los primers (Fig. V.1). En las dos cadenas del ADN molde están los sitios de inicio, pero no los de terminación. Los sitios iniciales de pegado se convertirán en sitios de terminación en la cadena complementaria sintetizada durante el segundo ciclo. Es por eso que recién al tercer ciclo el fragmento tiene el tamaño apropiado. En este punto de la reacción, habrá dos copias de este fragmento por cada molécula de ADN molde que había originalmente en la reacción. Si bien la producción es exponencial, hay diversos factores que llevan a que la síntesis

alcance un límite, por lo que sólo los primeros ciclos son verdaderamente exponenciales (Aert et al., 1998).

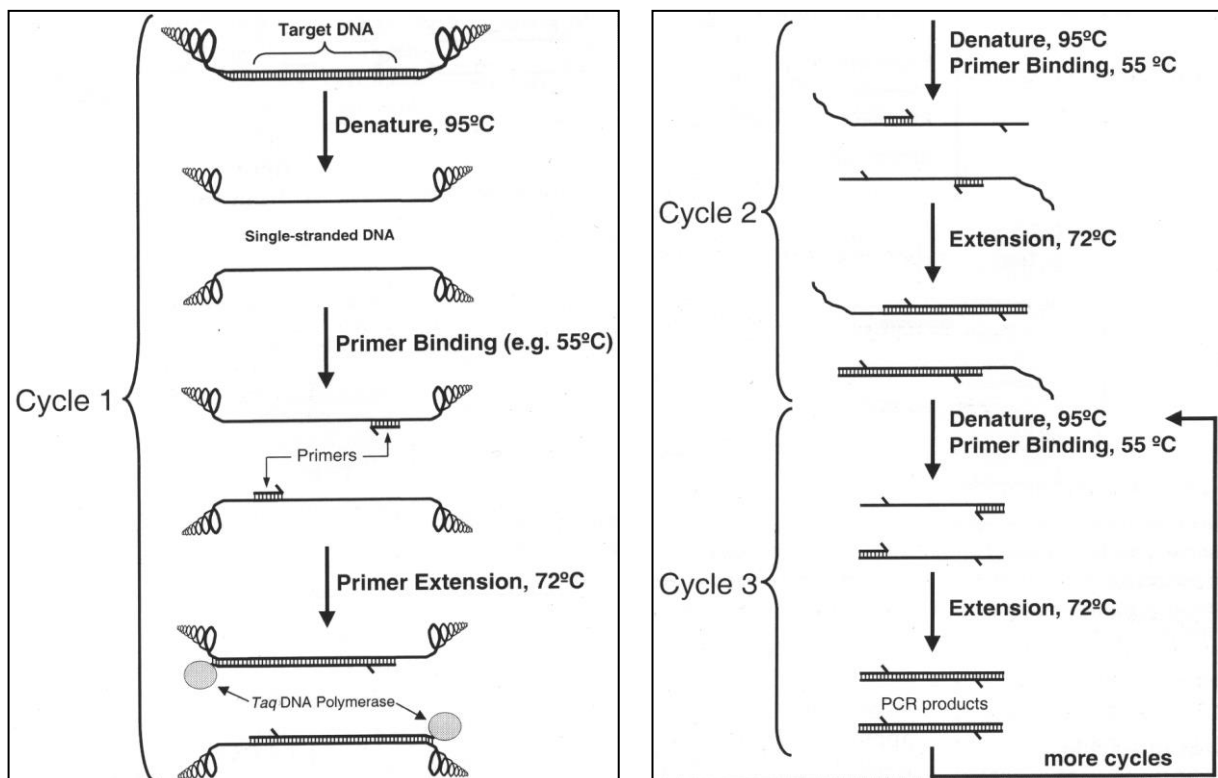


Figura V.1: Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Cada ciclo comprende tres pasos: desnaturalización, pegado (annealing) de los primers y extensión. A partir del ciclo tres los fragmentos tienen el largo definido por los primers (tomado de Glaubitz & Moran, 2000).

### 2.1.1. Factores que afectan a la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Es importante destacar que si bien la PCR es una técnica robusta, hay ciertos factores que influyen mucho en la obtención de productos de buena calidad (Aert et al., 1998). Estos factores incluyen:

- \* Características del ADN a amplificar: contenido de bases C y G, tamaño, concentración, condiciones de extracción.
- \* Características del termociclador: exactitud de la temperatura, uniformidad de la temperatura dentro del tubo y a lo largo del bloque, tiempo para elevar la temperatura.
- \* Propiedades de la enzima *Taq* polimerasa: estabilidad, concentración.
- \* Concentración de los nucleótidos (dNTP).



- \* Ambiente iónico: MgCl<sub>2</sub>, KCl.
- \* Perfil de temperaturas: temperatura y tiempo de pegado, tiempo de elongación, número de ciclos.
- \* Primers: tamaño, composición, secuencia, pureza.

Entre estos factores, la concentración de Mg<sup>2+</sup> es crítica y generalmente se debe establecer la concentración óptima para cada combinación ADN-primer.

La temperatura de pegado también juega un rol crítico. A menor temperatura la especificidad de unión será menor y el primer podrá pegarse en otro/s sitios, amplificando más de un fragmento. Por otro lado, si a la temperatura empleada no se obtiene ningún producto o este se encuentra en baja concentración, se puede mejorar la reacción disminuyendo la temperatura de annealing.

### **2.1.2. Primers**

La necesidad de conocer la secuencia específica para el pegado de los primers puede ser una limitante importante cuando no se cuenta con los medios necesarios para secuenciar el ADN de la especie en estudio. Sin embargo, gracias al auge que han tenido estas técnicas en los últimos años, se han desarrollado numerosos “**primers universales**” que permiten la amplificación de fragmentos de ADN en organismos de distintas especies. Esto es particularmente válido en el caso del ADN de cloroplasto, dadas sus características de alta conservación entre taxones muy distantes (ver Capítulo I). Para el caso de estudios intraespecíficos son recomendables los primers que amplifican regiones no codificantes (Petit et al., 1998). En tal sentido, se ha demostrado que la mayoría de los primers universales desarrollados para otras especies y que amplifican regiones no codificantes del genoma cloroplástico (Taberlet et al., 1991; Demesure et al., 1995; Dumolin-Lapègue et al., 1997a) funcionan bien en *Nothofagus nervosa* dando fragmentos de amplificación de tamaños similares a los reportados para las Fagaceae en que fueron probados originalmente (Marchelli et al., 1998).

### **2.2. Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP)**

Esta técnica, desarrollada a finales de los años 70, se basa en la acción de las *endonucleasas de restricción*. Estas enzimas de origen bacteriano cortan el ADN en

secuencias específicas que varían entre un tamaño de 4 a 6 bases dependiendo de la enzima. La digestión del ADN con estas enzimas produce una serie de “**fragmentos de restricción**”, los cuales pueden diferir en su tamaño en distintos individuos o especies, “**polimorfismo en el largo**”. En el método más empleado, la detección de estos polimorfismos se realiza mediante la separación en un gel de agarosa de los fragmentos de digestión obtenidos y la transferencia de los mismos a una membrana de nylon o nitrocelulosa (Southern blotting). Posteriormente se incuba la membrana, que tiene los fragmentos de ADN adheridos, en una solución que contiene una *sonda* específica marcada. Esta sonda es una secuencia de ADN complementaria a una parte del gen a analizar y puede estar marcada radioactivamente, con compuestos fluorescentes o con antígenos específicos. De este modo se producirá una *hibridación*, ya que la sonda se “pegará” al gen a detectar, haciéndolo “visible” entre todos los fragmentos de ADN obtenidos (Fig. V.2).

Los tipos de polimorfismo que se pueden detectar mediante esta técnica son dos:

- \* pérdida o creación de un **sitio de corte** por mutación de una base en la secuencia detectada por la enzima utilizada (Fig. V.3a).
- \* **inserción/delección** de un fragmento entre dos sitios de corte (Fig. V.3b).

En ambos casos el resultado es una diferencia en el largo de los fragmentos obtenidos.

Cuando se analizan patrones de RFLP de ADN nuclear, estos marcadores presentan herencia codominante. Una revisión detallada de la técnica y su protocolo de laboratorio se puede encontrar en Brettschneider (1998).

### 2.3. PCR - RFLP

La combinación de las dos técnicas descriptas en las secciones precedentes tiene una serie de ventajas que la hacen muy útil en estudios de diversidad y diferenciación, donde se analiza un número grande de muestras.

El primer paso implica la elección de primers universales como los descritos anteriormente con los cuales amplificar los fragmentos, en este caso de ADN de cloroplasto. Una vez obtenido el producto, el mismo es digerido con enzimas de restricción, preferentemente con aquellas cuya secuencia de corte implica sólo cuatro

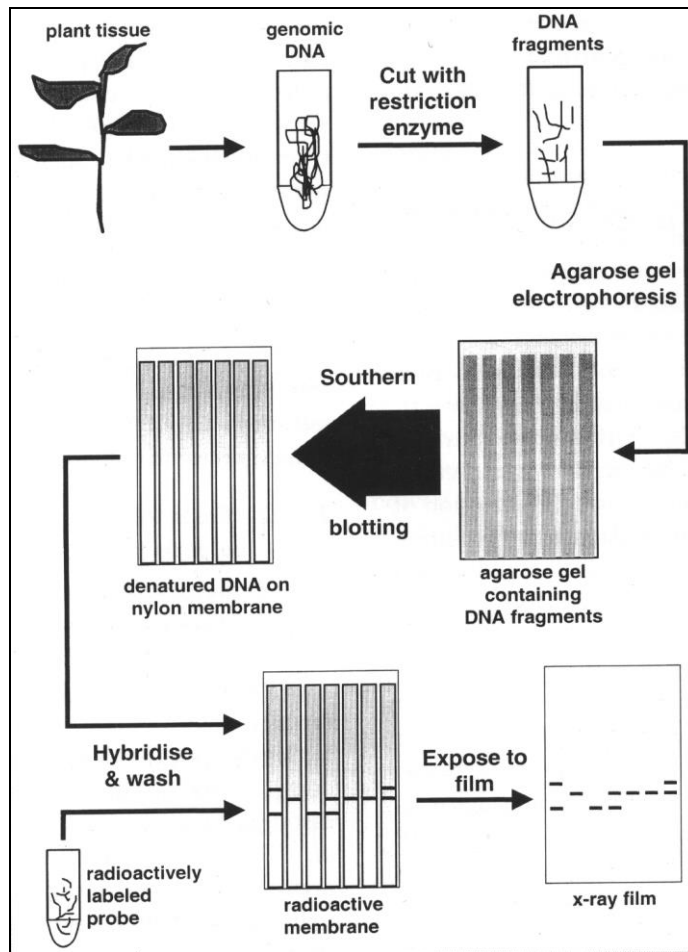


Figura V.2: Esquema del procedimiento de obtención de los Polimorfismos del largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP) (tomado de Glaubitz & Moran, 2000).

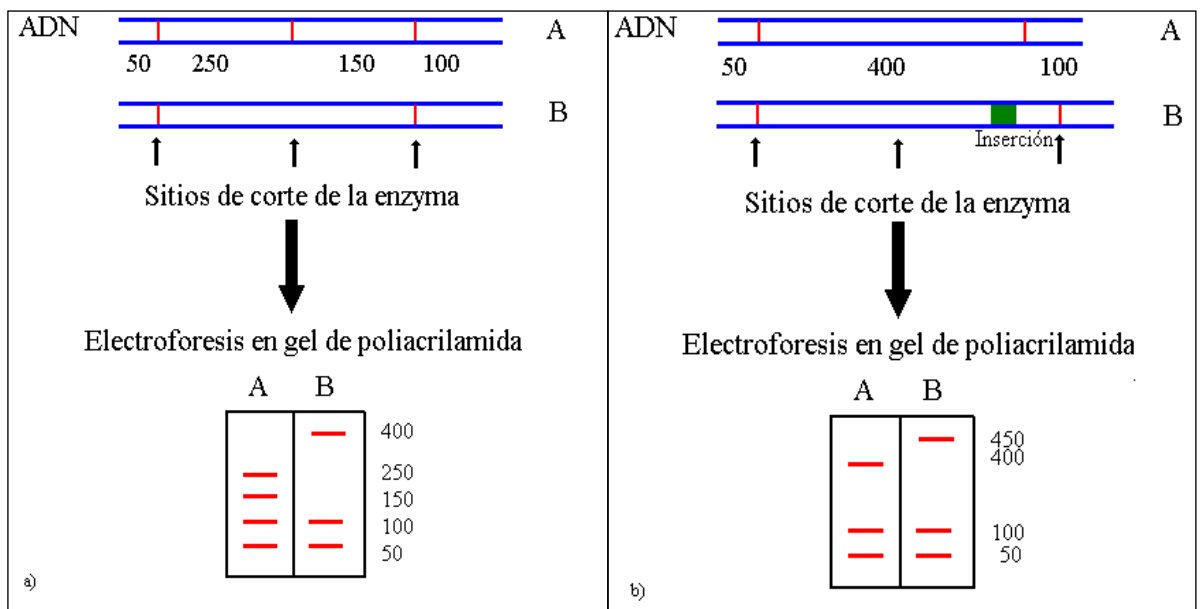


Figura V.3: Tipos de polimorfismos detectados con la técnica RFLP. a) Mutación en un sitio de corte, b) Inserción/delección de un fragmento.

bases, ya que la posibilidad de encontrar sitios de corte y por ende polimorfismos, será mayor. Finalmente los fragmentos de digestión obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida (dependiendo del tamaño de los fragmentos y de las diferencias entre los mismos).

Las ventajas de esta combinación de técnicas con respecto al método tradicional de RFLP no sólo recaen en la utilización de la reacción de PCR para amplificar la región de ADN a estudiar. También se evita un paso laborioso y con requerimientos adicionales de equipamiento que es la visualización de los fragmentos luego de la hibridación con sondas específicas. La presencia de polimorfismo simplemente se determina mediante la visualización sobre luz ultravioleta luego de tinción con bromuro de etidio de los fragmentos separados por electroforesis. Esto permite el análisis de numerosas muestras como las requeridas en estudios de genética de poblaciones.

### **3. Materiales y Métodos**

**3.1. Poblaciones:** se utilizaron las 20 poblaciones estudiadas con marcadores isoenzimáticos, incluyéndose también las tres de Chile (Fig. IV.1). De estas poblaciones se analizaron embriones, plántulas recién germinadas y yemas de árboles adultos. Los embriones y las yemas fueron congelados con nitrógeno líquido y mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la extracción de ADN. Los cotiledones y hojas se cortaron momentos antes de su utilización y también fueron congelados con nitrógeno líquido para facilitar la homogeneización. Se analizaron 20 yemas de árboles individuales pertenecientes a dos poblaciones para estudiar el tipo de herencia del cloroplasto. Se estudiaron dos regiones de ADN de cloroplasto (*trnD-trnT* y *psaA-trnS*, Demesure et al., 1995) en 10 embriones o 10 plántulas provenientes de 10 poblaciones (poblaciones 5, 6, 10, 16, 17, 19, 21, 24, 27 y 28). Al no encontrarse variación intrapoblacional la muestra se redujo a dos individuos por población para analizar otras 14 regiones de ADN de cloroplasto en esas mismas poblaciones. En las restantes 13 poblaciones se analizaron únicamente los fragmentos que resultaron polimórficos.

#### **3.2. Extracción de ADN total:**

- \* Embriones: se probaron dos métodos de extracción: DNeasy Plant Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) y el procedimiento descrito por Ziegenhagen et al.(1993) (Apéndice IV).
- \* Cotiledones y hojas: se empleó el procedimiento descrito por Dumolin et al. (1995) con pequeñas modificaciones (Apéndice IV).
- \* Yemas: se utilizaron tanto el método de DNeasy Plant Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) como el protocolo descrito por Dumolin et al. (1995).

Se comprobó la presencia y calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (migración a 80 V durante 2 hs). Se calculó la concentración de ADN mediante la comparación de la intensidad de la banda obtenida con ADN de fago Lambda digerido con *HindIII*.

**3.3. PCR:** Los primers utilizados en este estudio son los descriptos por Taberlet et al., (1991) (sólo primer TF); Demasure et al. (1995) y Dumolin-Lapègue et al. (1997a). En la Tabla 2 (Apéndice IV) se muestran los primers con sus respectivas temperaturas de annealing y las enzimas con que fueron digeridos los fragmentos obtenidos. La amplificación fue realizada en un volumen total de 25 µl conteniendo aproximadamente 40 ng de ADN, 2,5 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 100 µM de cada nucleótido (dNTP), 0,2 µM de cada primer y 0,25 U de *Taq* polimerasa con su respectivo buffer. El programa de temperaturas y tiempos fue el descrito por Demasure et al. (1995) y se detalla en el Apéndice IV. El termociclador utilizado en Alemania fue un Touch-Down™ Thermal System (Hybaid Limited, Teddington, UK) y el utilizado en el Laboratorio de Genética Forestal del INTA EEA Bariloche un Uno-Thermo Block de Biometra. Los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 %, durante 2 hs a 90 V y se visualizaron mediante tinción posterior en bromuro de etidio y observación sobre luz ultravioleta.

**3.4. Digestión:** 5 µl de los productos de PCR fueron digeridos con 5 U de endonucleasa de restricción de acuerdo a diferentes combinaciones de primer/enzima en un volumen total de 20 µl (Tabla 2 y protocolo en Apéndice IV). La digestión se realizó a 65 °C durante 3 hs para el caso de la enzima *TaqI* y a 37 °C de 4 hs a una noche para las enzimas *HaeIII* y *HinfI*. Al final del tiempo indicado se agregaron 2 µl

de stop buffer (Apéndice IV), se centrifugaron los tubos y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El volumen total de la digestión se sembró en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8 % y se corrió durante 3 a 4 hs a 300 V. Los fragmentos se visualizaron sobre luz ultravioleta luego de tinción con bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron con un equipo Polaroid.

**3.5. Análisis de la variación:** Los fragmentos polimórficos se numeraron en orden decreciente de tamaño según lo observado en los geles de poliacrilamida, de acuerdo al método descrito por Demasure et al. (1996). Los haplotipos se definieron de acuerdo a las distintas combinaciones de variantes de tamaño.

## 4. Resultados

**4.1. Extracción de ADN:** La presencia de altos niveles de polisacáridos en embriones y de resinas en yemas dificultan la extracción de ADN en Raulí. Existen pocos reportes de extracción de ADN en esta especie (por ejemplo, en hojas, Manos (1997)). En un estudio previo se extrajo ADN a partir de yemas en *N. nervosa* y *N. obliqua* con el método descrito por Ziegenhagen et al. (1993) obteniéndose buenos resultados (Gallo, 1996, informe interno). En este trabajo se probaron distintos protocolos de extracción con distintos tejidos, obteniéndose diferentes resultados en cada uno (Tabla 1, Apéndice IV). En cada tejido se logró obtener ADN de buena calidad (sin degradación), observándose mayores cantidades al trabajar con hojas (Fig. V.4 ).

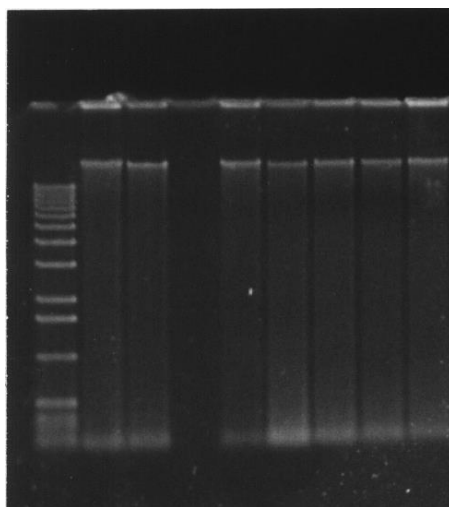


Figura V.4: Extracción de ADN genómico en Raulí. Visualización de bandas en gel de agarosa al 0,8 %. La calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular.

**4.2. Productos de PCR:** De los 16 pares de primers empleados (Tabla 2, Apéndice IV), 10 (marcados con \*) dieron un fragmento de amplificación claro, aunque en algunos casos el tamaño fue distinto al reportado para otras especies (Dumolin-Lapègue et al., 1997a) (Tabla V.1). De los seis primers restantes, con QR se obtuvieron dos fragmentos de amplificación y con K<sub>2</sub>Qr tres, mientras que los cuatro restantes no dieron buenos resultados con las temperaturas de annealing probadas. Cabe destacar que se probaron distintas temperaturas de annealing para tratar de mejorar la amplificación sin obtener resultados favorables. Los fragmentos visualizados en geles de agarosa no mostraron diferencias en tamaño entre individuos o poblaciones (Fig. V.5).

Tabla V.1: Tamaño aproximado de los productos de amplificación obtenidos en *Nothofagus nervosa* de acuerdo a lo detectado en geles de agarosa al 1,2 % y comparación con lo reportado en *Quercus robur*.

Par de primers	Tamaño del producto de amplificación en pares de bases (pb)	
<i>trnD-trnT</i>	1100	1213
<i>psaA-trnS</i>	3000	3681
<i>trnF-trnVr</i>	3000	3492
<i>trnT-trnF</i>	1600	1754
<i>trnC-trnD</i>	3000	3169
<i>trnM-rbcL</i>	3000	2900
<i>trnH-trnK</i>	1800	1831
<i>rpoC1-trnCr</i>	4500	4795
<i>trnK<sub>1</sub>-trnK<sub>2</sub></i>	2500	2585
<i>trnV-rbcLr</i>	3800	3850
<i>trnQ-trnRr</i>	3100/1900	3086
<i>trnK<sub>2</sub>-trnQr</i>	3000/2000/1400	3075
<i>trnS-trnT</i>	1300	1386
<i>trnS-trnfM</i>	1600	1254
<i>trnT-psbCr</i>	3500	3236
<i>trnfM-psaAr</i>	5000/1200/1100	5108 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>: En algunos primers otras especies tienen el mismo tamaño que *Quercus robur* (ver Dumolin-Lapègue et al., 1997a).

<sup>2</sup>: En las especies analizadas con este primer tampoco se obtuvo una buena amplificación.

**4.3. Digestión de los productos de PCR:** De las combinaciones de primer/enzima probadas, tres detectaron polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción

(DT/*Hae*III, DT/*Taq*I y FV/*Taq*I) (Fig. V.6). La designación de haplotipos en función de estas combinaciones se muestra en la Tabla V.2. Como ya fuera mencionado en la sección 3 (Materiales y Métodos) todas las combinaciones primer/enzima se probaron en 10 poblaciones, en las restantes sólo se analizaron aquellas polimórficas. Sin embargo, en 12 de las poblaciones restantes no se pudo obtener un buen producto de amplificación con el primer FV, por lo que la combinación FV/*Taq*I sólo se evaluó en 11 poblaciones.

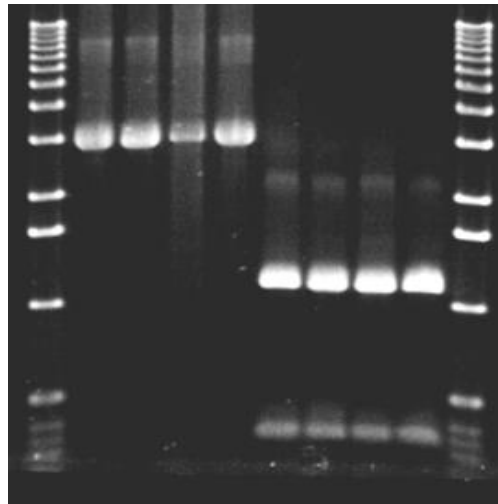


Figura V.5: Fragmentos obtenidos luego de amplificación con los primers *trnF-trnV* (calles 2 a 5) y *trnD-trnT* (calles 6 a 9). Calles 1 y 10: Marcador de peso molecular (1 Kb).

Los resultados de las tres combinaciones fueron consistentes, definiendo 2 haplotipos diferentes (Tabla V.2). La distribución de estos haplotipos marcó una clara diferenciación en sentido norte - sur entre las poblaciones de Argentina. En Chile se observaron los mismos haplotipos, siendo la población del sur (Neltume) y la de la costa (Cordillera de Nahuelbuta) igual a las del sur de Argentina y la población del norte en la Cordillera de los Andes (Mallalcahuello), como las del norte de Argentina (Fig. V 7).

**4.4. Tipo de herencia del ADN de cloroplasto:** los 20 individuos analizados pertenecientes a dos poblaciones, no presentaron variación por lo que no se pudo comprobar el tipo de herencia del ADN de cloroplasto. En consecuencia se asumió que, como en la gran mayoría de las angiospermas, la herencia es materna (Hagemann & Schröder, 1989).



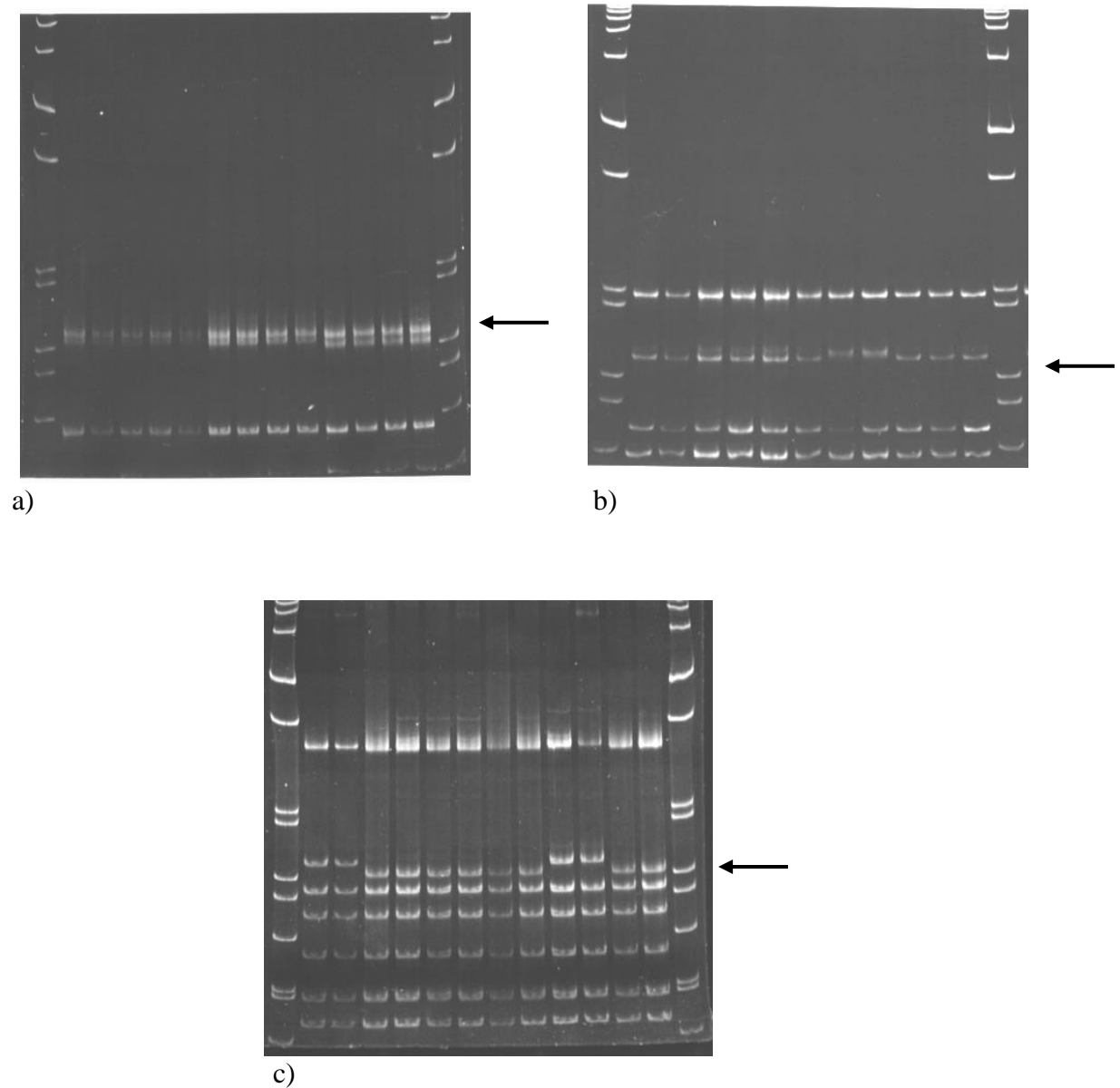


Figura V.6: Patrones de restricción observados para las regiones de cloroplasto amplificadas con el primer DT y digeridas con las enzimas *TaqI* (a) y *HaeIII* (b) y con el primer FV digerido con la enzima *TaqI* (c). En las tres figuras las calles de los lados corresponden al marcador de peso molecular (1 Kb). La migración es en sentido vertical de arriba hacia abajo, de modo que los fragmentos más grandes son los que quedan en la parte superior del gel. Las flechas señalan las bandas polimórficas. El haplotipo I (sur) corresponde en a) a las dos bandas más juntas (es decir la segunda banda es más grande); en b) a la banda más chica y en c) a la más grande.

Tabla V.2: Fragmentos polimórficos marcados en orden decreciente de tamaño y haplotipos definidos en 20 poblaciones de Argentina y tres de Chile. Ne: Neltume, Ma: Mallalcahuello, Na: Nahuelbuta.

Población	DT <i>TaqI</i> Banda 2	DT <i>Hae III</i> Banda 2	FV <i>TaqI</i> Banda 2	Haplotipo
1	1	2	-	I
4	1	2	-	I
5	1	2	1	I
6	1	2	1	I
8	1	2	-	I
10	1	2	1	I
11	1	2	-	I
12	1	2	-	I
14	1	2	-	I
16	1	2	1	I
17	1	2	1	I
18	1	2	-	I
19	1	2	1	I
21	1	2	1	I
23	1	2	-	I
24	1	2	1	I
26	2	1	-	II
27	2	1	2	II
28	2	1	2	II
30	2	1	2	II
Ne	1	2	-	I
Ma	2	1	-	II
Na	1	2	-	I

## 5. Discusión

La obtención de fragmentos de amplificación de tamaño definido con diez de los 16 pares de primers probados demuestra la conservación del ADN de cloroplasto y la universalidad de la técnica PCR-RFLP. Constituye también un resultado importante cuando no se cuenta con los medios para desarrollar primers específicos para la especie, metodología muy laboriosa y costosa que requiere equipamiento especial. La posibilidad de utilizar primers universales abre todo un campo de estudios en las especies nativas que pueden brindar conocimientos complementarios a los ya obtenidos con isoenzimas.

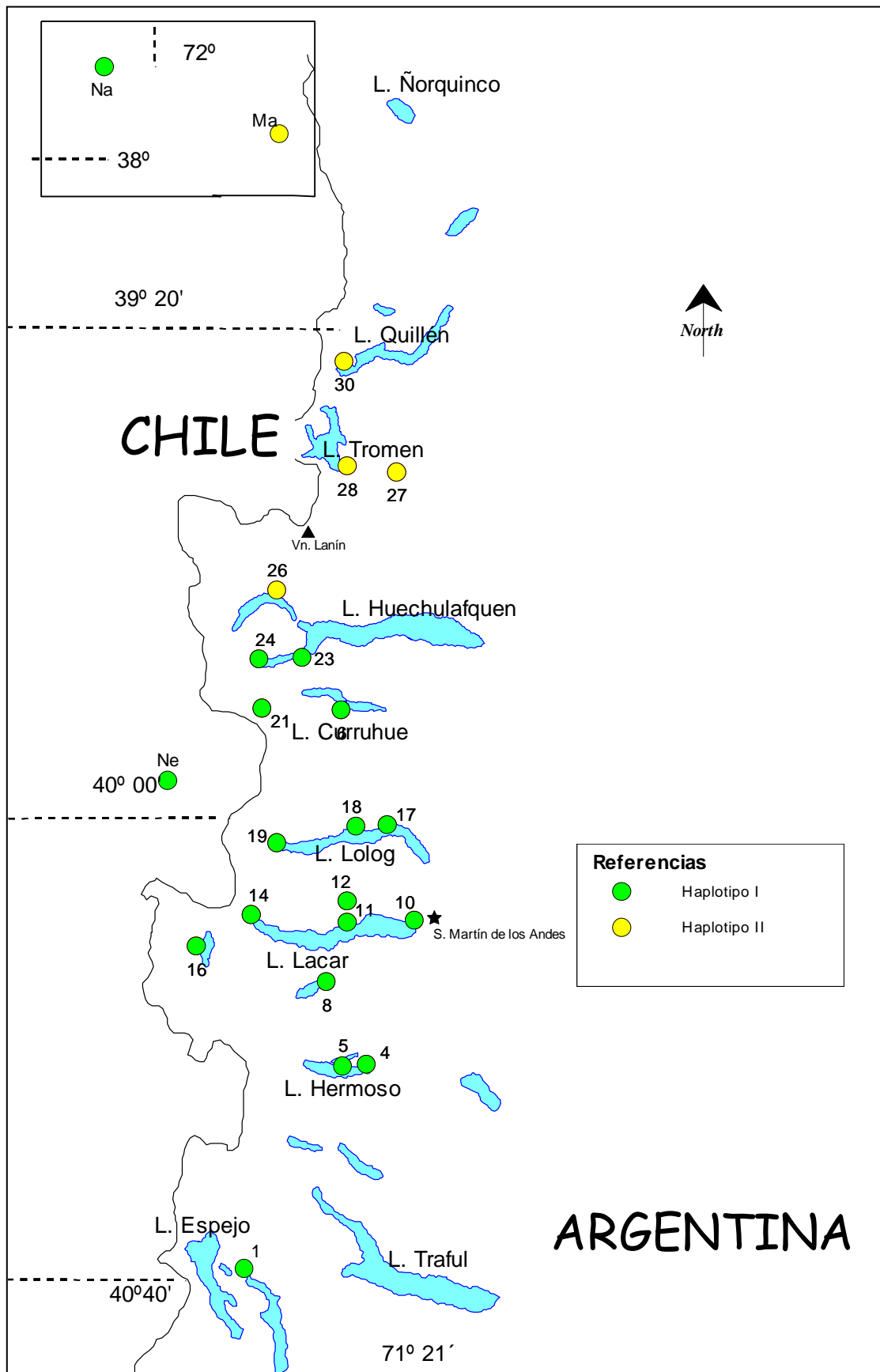


Figura V.7: Ubicación geográfica de los dos haplotipos encontrados entre las poblaciones de *Nothofagus nervosa* de Argentina y Chile.

El análisis de 11 poblaciones en un principio (Marchelli et al., 1998) constituyó, según nuestro conocimiento, el primer estudio de variación intraespecífica con marcadores de ADN de cloroplasto en *Nothofagus nervosa*.

El polimorfismo detectado en dos regiones del cloroplasto de Raulí (*trnF-trnV* y *trnD-trnT*) fue del tipo inserción/delección ya que las variaciones observadas fueron en el largo de los fragmentos y no en la ausencia o presencia de un sitio adicional de corte. Sin embargo, la diferencia en los tamaños fue muy pequeña, sobre todo en los productos de digestión del fragmento obtenido con el primer DT. Esto sugiere la posibilidad de cambios conformacionales en la molécula de ADN que modifican la migración en el gel debido a una mutación de tipo inversión. De todos modos, tampoco se puede descartar la alternativa de una inserción/delección (Dumolin-Lapègue & Petit, com. pers.). Si bien las mutaciones más frecuentemente encontradas en el genoma del cloroplasto son cambios en sitios de corte de enzimas de restricción o inserciones/delecciones, se ha reportado la existencia de un fragmento invertido en cinco especies de *Abies* y dos de *Tsuga* (Tsumura et al., 2000). Por otro lado, las dos enzimas utilizadas para digerir el fragmento amplificado por el primer DT revelaron polimorfismo, dividiendo las poblaciones en dos grupos. Más aún, para cada enzima de restricción, estos grupos presentaban un patrón de bandas polimórficas opuesto (Tabla V.2), lo cual sugiere la posibilidad de que haya dos mutaciones. La secuenciación de este fragmento revelaría cuántas mutaciones hay y de qué tipo son.

A pesar del área de distribución extremadamente reducida, se pudo detectar un polimorfismo en el genoma del cloroplasto de las 20 poblaciones de Argentina analizadas, el cual se manifestó de igual forma en tres poblaciones de Chile. Los dos fragmentos polimórficos detectados definieron dos haplotipos que permitieron una clara diferenciación entre poblaciones. Más aún, estos dos haplotipos están geográficamente separados encontrándose el haplotipo I en el sur y el II en el norte. Es interesante destacar que en las poblaciones analizadas provenientes de Chile no sólo se observaron los mismos haplotipos, sino que estos presentaron, además, el mismo tipo de distribución en las dos poblaciones cercanas a la Cordillera de los Andes. Por otro lado, la población de la Cordillera de la Costa (Nahuelbuta), presentó el mismo haplotipo que las poblaciones del sur (Fig. V.7).

En el primer análisis realizado, que sólo incluía 11 poblaciones, se especuló con la posibilidad de que el cordón montañoso que incluye al volcán Lanín y que se extiende hacia el oeste en Chile representara una barrera geográfica, dado que los

haplotipos se encontraban distribuidos al sur y al norte de esa cadena (Marchelli et al., 1998). Sin embargo, la inclusión de las restantes poblaciones demostró que la población 26, ubicada en el faldeo sur de la cadena montañosa, presentaba el mismo haplotipo que las poblaciones del norte. Esto implica que o bien el cordón montañoso transversal a la cordillera no representó una barrera para la migración, o que la migración se produjo desde Chile.

Es importante destacar la variación encontrada dada la reducida distribución de la especie y la herencia materna del ADN de cloroplasto. En gimnospermas, donde la herencia es de tipo paterna, la variación intrapoblacional es generalmente mayor, sobre todo porque el polen puede recorrer grandes distancias. En especies con semillas muy grandes y por ende poco dispersadas como en el género *Quercus*, en cambio, hay mayor tendencia a diferenciación entre poblaciones (e.g. Petit et al., 1993; Dumolin-Làpegue et al., 1997b). La diferenciación entre poblaciones observada en Raulí denota la escasa dispersión de las semillas y refleja también la influencia de un paisaje de tipo montañoso, que puede estar ejerciendo un rol importante en la diferenciación genética al mantener relativamente aisladas a las poblaciones.

Muchos trabajos reportaron una estructuración geográfica en los polimorfismos de ADN de cloroplasto, los cuales fueron relacionados con las rutas de migración que siguieron las especies luego de las glaciaciones. En *Abies mariesii* se observó variación clinal en las frecuencias de dos haplotipos en un área de distribución muy reducida de Japón, la cual se asoció a la dispersión de la especie luego del último período glacial (Tsumura et al., 1994). Similarmente, en *A. alba* se reportó la existencia de dos haplotipos en poblaciones de Europa, uno de los cuales predomina en el este-sudeste y el otro lo hace en el oeste-sudoeste determinando un posible cline geográfico de ambos citotipos (Ziegenhagen et al., 1995). Asimismo, la identificación de 11 haplotipos en *Argania spinosa* y su distribución geográfica permitió dividir el área de distribución natural de la especie en Marruecos en dos zonas (El Mousadik & Petit, 1996). Ferris et al. (1993) reportaron polimorfismo intraespecífico en dos especies de *Quercus* en Europa lo cual posibilitó la determinación de dos haplotipos cuya distribución este-oeste se asoció a la existencia de al menos dos refugios glaciarios.

Como se mencionó en el Capítulo I, las glaciaciones en el Hemisferio Sur no tuvieron la misma forma que las del Hemisferio Norte, donde una gran masa de hielo cubrió grandes extensiones y las especies fueron empujadas hacia latitudes más bajas.

Por el contrario, en el Hemisferio Sur se ha reportado la existencia de áreas libres de hielo donde las especies pudieron refugiarse, incluso a altas latitudes (Markgraf et al., 1995). La o las mutaciones que dieron lugar a la existencia de dos haplotipos distintos entre las poblaciones de Raulí tienen que haber ocurrido antes o durante las últimas glaciaciones, dada la amplia distribución de las mismas entre las poblaciones analizadas y el lapso de tiempo relativamente corto transcurrido desde el último máximo glacial (aproximadamente 20.000 años). Una posibilidad es que la mutación haya ocurrido entre los individuos que sobrevivían en un refugio y se haya dispersado a partir de los mismos en la migración postglacial. La existencia de dos haplotipos entre las poblaciones de Raulí sugiere migración a partir de al menos dos refugios distintos luego de las glaciaciones. La observación de los mismos haplotipos en las poblaciones de Chile sugiere también la posibilidad de refugios comunes, aunque más poblaciones y más combinaciones primer/enzima deberían estudiarse para corroborar esta hipótesis. Esto se estudiará en los próximos dos años en el marco de un proyecto binacional “Estudio de la variación genética en Raulí y Roble Pellín” entre INIA Quilamapu (Chile) e INTA EEA Bariloche.

La discusión biogeográfica de la distribución de los haplotipos se realizará en el Capítulo VI en conjunto con los datos isoenzimáticos. En dicho capítulo se analizarán también las hipótesis de posible ubicación de los refugios glaciares.

## Capítulo VI

### Discusión

#### 1. Niveles de análisis de la variación genética

La información genética se puede analizar en distintos niveles, cada uno con una implicancia adaptativa diferente. Los marcadores morfométricos son sin duda los que mejor se relacionan con características adaptativas, estando en general fuertemente influenciados por el ambiente. Sin embargo, como se discutió, son escasos los marcadores de este tipo disponibles en especies forestales (Hattemer, 1991a). Las características seminales analizadas en este trabajo están asociadas a procesos adaptativos y al sistema de apareamiento de la especie. En tal sentido, estudiar la periodicidad en la producción de semillas y la variación geográfica asociada, no sólo brinda información sobre el sistema de apareamiento sino también acerca de la posible influencia de factores ambientales sobre el mismo. La existencia de poblaciones con producción de semillas relativamente constante y abundante en el tiempo (Marchelli & Gallo, 1999; Capítulo II), sugiere condiciones óptimas de dichas poblaciones en el ambiente en el que se encuentran. Por otro lado, el peso de las semillas está en estrecha relación con la viabilidad de las mismas, y se ha comprobado en *Nothofagus nervosa* que hay una correlación positiva del mismo con la capacidad germinativa (Breitembücher, 1998). La periodicidad en la producción, con menor proporción de semillas dañadas por insectos y mayor peso de las mismas en los años de producción abundante y su consecuente efecto en una mayor capacidad germinativa, corrobora los pulsos regenerativos evidenciados en algunas poblaciones por grupos de renovales con distinta edad.

Las semillas representan la futura generación potencial de una población. Dado que de la inmensa cantidad que se producen cada año sólo una pequeña proporción germina y mucho menor aún es la cantidad que prospera y llega a edad reproductiva, las poblaciones que produzcan mayores cantidades de semillas y de mayor peso, no sólo tendrán mejores probabilidades de regeneración natural, sino que esta regeneración representará mejor genéticamente a la población que le dio origen y a su variación. Como ya ha sido discutido en el Capítulo IV, niveles altos de variación genética contribuyen a la adaptación potencial de una población y, por lo tanto, a la estabilidad del ecosistema.

La condición de neutralidad de las isoenzimas está todavía en discusión. Si bien se acepta en general que son marcadores selectivamente neutros, se ha observado lo contrario en muchos casos (Bergmann et al., 1990; Gregorius & Bergmann, 1995) (ver Capítulo IV). Aunque las mutaciones puedan ocurrir en forma selectivamente neutral, al ser las enzimas el producto de genes estructurales cuya función es vital para el organismo, tienen también cierta importancia adaptativa. Una mutación desfavorable para el organismo que la porta podrá permanecer en la población enmascarada en los individuos heterocigotas. Si la mutación tiene un efecto neutral y no afecta la función de la enzima también es probable que perdure e incluso aumente su frecuencia. Más aún, si la mutación confiere a la enzima una mayor capacidad catalítica y si, a su vez, los individuos portadores de la misma ven incrementada su aptitud reproductiva, esta nueva variante aumentará de frecuencia en la población sensiblemente. También puede ocurrir que una variante enzimática confiera una mejor adaptación a los individuos portadores en determinados ambientes. El caso extremo de alelos predominantes distintos en ambientes diferentes sería un ejemplo claro de adaptación, pero también una mayor variación alozímica en ciertas regiones puede ser producto de un proceso adaptativo. La variación encontrada con los marcadores génicos isoenzimáticos reveló tendencias en las frecuencias alélicas tanto en sentido oeste–este como también un aumento de ciertos alelos en la zona norte. Esta variación geográfica puede estar implicando algún tipo de adaptación ya que tanto al este como al norte las condiciones climáticas son distintas, con menores precipitaciones y, en el caso de la zona norte, temperaturas algo más elevadas. La mayor homogeneidad en la zona norte y la presencia de alelos en frecuencias más elevadas que entre las poblaciones del sur también podría estar asociada a la historia reciente de las poblaciones y la región en que se encuentran, lo cual será discutido en las próximas secciones.

Finalmente, el estudio de secuencias no codificantes del ADN no tiene implicancia adaptativa dado que incluso en muchos casos se desconoce la función de este tipo de ADN. La acumulación de mutaciones en estas secuencias no tienen aparentemente ningún efecto selectivo, por lo que se las considera neutras. Tal es el caso de las mutaciones que puedan acumularse en las regiones no codificantes del genoma cloroplástico. La información que brinda esta variación no está relacionada con mecanismos adaptativos, pero permite estudiar la historia evolutiva reciente de las especies, como por ejemplo su migración post – glacial.



Por lo expuesto, de los tres niveles de información genética analizados en esta tesis, uno tiene importancia adaptativa, el otro podría tenerla y el tercero no. El grado de variación detectado tanto en características seminales como con los marcadores isoenzimáticos y de ADN de cloroplasto puede considerarse como alto, dada la reducida distribución de *Nothofagus nervosa* en Argentina. Es importante destacar que, si bien el muestreo realizado en el presente trabajo podría considerarse excesivo para un área de distribución tan reducida, un número menor de poblaciones no hubiera detectado la gran diferenciación existente, manifestada incluso entre poblaciones muy cercanas.

## **2. Variación genética detectada en *Nothofagus nervosa***

### **2.1. Variación geográfica**

La distribución de *Nothofagus nervosa* en Argentina, restringida a las cuencas lacustres de origen glacial, sugiere la posibilidad de diferenciación genética entre poblaciones en sentido latitudinal. Más aún, los fuertes vientos en sentido oeste–este asociados a esta distribución llevaron a proponer la hipótesis de diferenciación a nivel de cuencas, con la posibilidad de un flujo génico muy extensivo que homogeneizara la variación dentro de las mismas. Sin embargo, la variación genética observada entre las poblaciones de Raulí presentó un patrón de distribución más complejo con altos grados de variación incluso entre poblaciones dentro de las distintas cuencas lacustres.

La baja tasa de mutaciones del genoma cloroplástico (estimada en  $10^{-9}$  para sustituciones sinónimas, en Clegg et al., 1991) sumada a su herencia clonal y uniparental, determinan que dicha molécula sea muy conservada. Por lo tanto, encontrar variación en una especie con escasa dispersión de sus semillas (máximo 100 m, Donoso, 1993) y en un área natural tan reducida resultó por demás interesante. La variación genética detectada con estos marcadores moleculares que determinó la identificación de dos haplotipos entre las poblaciones analizadas es la que define el patrón geográfico más contundente con la separación de dos grupos de poblaciones. Más aún, la distribución norte–sur de los dos haplotipos encontrados confirma la suposición de variación en sentido latitudinal y plantea posibles rutas migratorias de la especie luego de las últimas glaciaciones (ver más adelante).

Por otra parte, tanto las características seminales como los marcadores génicos isoenzimáticos mostraron altos niveles de variación. Dada la herencia nuclear de las isoenzimas y la posibilidad de acción de poligenes e influencia ambiental en el caso

de las características seminales es de esperar que tengan mayor variación que el genoma cloroplástico, aunque con patrones no tan determinantes. El patrón de variación del peso de las semillas en sentido latitudinal coincidió con la diferenciación detectada a través de los marcadores de ADN de cloroplasto, ya que el peso de las semillas resultó ser significativamente mayor en las poblaciones del norte. Resultados similares se encontraron en poblaciones de Chile donde la distribución es más extensa (Werner, 1987, cit. en Donoso, 1987). Un mayor peso en las semillas implica una mayor cantidad de reservas, lo cual puede estar relacionado con una adaptación a climas más secos y cálidos tales como los característicos de la zona norte de la distribución de Raulí, sobre todo en Chile. Esta tendencia general de las semillas de orígenes geográficos más secos ha sido encontrada en varias especies arbóreas (Wright, 1976).

Además del patrón de variación latitudinal detectado por los marcadores moleculares y el peso de las semillas, tanto en las características seminales como en los marcadores génicos isoenzimáticos se observaron altos niveles de variación entre poblaciones pertenecientes a una misma cuenca lacustre. La marcada diferenciación entre poblaciones ubicadas en los extremos de algunas de las cuencas, agregan el componente longitudinal en la variación geográfica. Esta tendencia de diferenciación oeste–este dentro de cada transecta latitudinal es particularmente evidente en las cuencas de los lagos Lolog y Lácar, donde la población más diferenciada de cada una es aquella situada en la cabecera oeste (poblaciones 14 y 19). Incluso se detectó una mayor presencia de alelos raros en poblaciones más occidentales (por ejemplo en las poblaciones 1, 14, 16, 19, 26). En las cuencas de los lagos Lolog, Lácar y Huechulafquen fue evidente una tendencia creciente hacia el este en las frecuencias de algunos alelos. Como ya fuera discutido en el Capítulo IV, esta tendencia longitudinal se evidencia con un aumento en las frecuencias de algunos alelos más comunes hacia el este (dirección de los vientos). Esto estaría más relacionado con un flujo génico moderado que con un proceso adaptativo por selección natural. A su vez, las poblaciones del oeste están más diferenciadas por no recibir aportes génicos de otras poblaciones y ser “fuente” de flujo génico.

Esta variación en sentido longitudinal también fue observada en características seminales, con la existencia de una correlación positiva y significativa entre el consumo de semillas por parte de los insectos y la longitud. El grado de ataque está en estrecha relación con el ciclo biológico y las características demográficas inherentes a

la población del insecto. Un aumento en el porcentaje de semillas dañadas disminuirá lógicamente la disponibilidad de semillas en la población con la posibilidad de una reducción en la variación genética de las semillas remanentes, particularmente por eliminación de alelos raros. Dado que los insectos han llegado a consumir hasta un 80 % del total de semillas producidas, la pérdida de genotipos en años de producción escasa puede ser muy importante.

## **2.2. Variación temporal e hibridación**

La variación temporal se manifestó tanto en las características seminales analizadas como en las frecuencias alélicas de los marcadores isoenzimáticos. Todas las características seminales revelaron variación anual asociada a la producción cíclica de semillas, lo cual está en estrecha relación con el sistema reproductivo (sistema de flujo génico, sistema de apareamiento, función sexual, etc.). Por su lado, las diferencias genéticas observadas entre las semillas producidas en distintos años no sólo reflejan variación en las frecuencias alélicas sino también en la presencia/ausencia de variantes alélicas presentes en baja frecuencia y que generalmente se consideran una carga genética, pero que constituyen el potencial adaptativo de una población. Las grandes cantidades de semillas producidas cada año y que pueden permanecer como reserva constituyendo un banco de semillas en el suelo implica, a su vez, un banco genético disponible para la población renovable año a año. Esto posee grandes ventajas desde el punto de vista adaptativo por la acumulación de genotipos diferentes. En tal sentido, la gran cantidad de alelos raros observados en general en especies arbóreas (Conkle, 1992), está asociada a su particular sistema reproductivo que produce enormes cantidades de semillas cada año de las cuales sólo una proporción mínima llegará a etapa adulta. La cantidad de genotipos distintos que se producen en cada generación pueden estar “disponibles” para la población y constituir un recurso inmediato ofreciendo enormes posibilidades de adaptación ante cambios ambientales.

Es importante recalcar la importancia de esta variación temporal dado que la gran mayoría de los trabajos que utilizan semillas para el análisis genético de una especie considera sólo semillas de una temporada de producción. La presencia de alelos raros distintos en algunas poblaciones según el año considerado y las diferencias en las frecuencias de los alelos predominantes, sugiere como alternativa más adecuada para caracterizar la estructura genética de una población y estudiar

procesos genéticos en una especie, la utilización del conjunto de semillas provenientes de distintos años. Este conjunto reflejaría mejor el banco de semillas con el que cuenta una población. Ante la imposibilidad de cosechas sucesivas durante varios años, se debería elegir un año de producción abundante o extraordinaria.

Si bien la variación temporal fue muy marcada en la mayoría de las poblaciones estudiadas, el cambio más notable se observó en el porcentaje de semillas híbridas entre Raulí y Roble Pellín en las poblaciones 17 y 18 de la cabecera este del Lago Lolog. Estas poblaciones mostraron mayor variación tanto por un elevado número de alelos como por una alta proporción de heterocigosis y gran diferenciación en el año 1996. Estos altos niveles de variación se deben principalmente a la existencia de un porcentaje significativamente mayor de semillas híbridas entre Raulí y Roble Pellín en dicho año con respecto al año de producción abundante de semillas (1995). Esta marcada diferencia temporal en el proceso de hibridación puede deberse a cambios climáticos que favorezcan o no el solapamiento del período reproductivo de ambas especies. La ausencia de semillas dobles heterocigotas para los dos loci especie – específicos (*Adh* y *Pgi*) (dado que todas manifiestan heterocigosis sólo para el primero de estos loci), la escasa cantidad de individuos  $F_1$  que llega a la edad reproductiva y la muy baja tasa de autofecundación (6 %, Gallo et al., 1997b) confirma como muy probable la ocurrencia de retrocruzas (Gallo, 2000). En ensayos de vivero se ha observado que el cierre del período de crecimiento de los individuos con fenotipo híbrido ( $F_1$ ) fue muy variable y, en promedio, más tardío al de las dos especies parentales (Crego, 1999). Similarmente, se podría esperar que el período reproductivo de los individuos de la generación  $F_1$  se vea en cierto modo solapado con las especies parentales y que por la fragilidad que presupone su sistema reproductivo por la condición híbrida, éste sea más vulnerable a las modificaciones climáticas. En tal sentido, en el caso del año 1996, las condiciones climáticas de la primavera anterior, es decir aquellas de 1995, fueron atípicas ya que a un invierno muy riguroso con grandes nevadas siguió una primavera más seca y cálida que los registros habituales. Esto puede haber determinado un solapamiento en los ciclos fenológicos del híbrido ( $F_1$ ) y el Raulí que favoreció la polinización cruzada. Dadas las condiciones para que los ciclos reproductivos de ambas especies se solapen, la competencia de polen juega un rol principal (Gallo, 2000). En años de producción abundante de semillas el número de individuos que participan en la polinización es

mucho más elevado y, ante una bajísima proporción de individuos  $F_1$ , la competencia entre el polen de ambos favorecería proporcionalmente a los individuos de Raulí puro.

La existencia de hibridación entre estas dos especies también marca una variación longitudinal con una mayor proporción de semillas híbridas en las poblaciones situadas hacia el este tanto en la cuenca del Lago Lácar como en la del Lago Lolog.

Distintos factores pueden estar determinando la mayor proporción de híbridos hacia el este de la distribución. Quizás un factor importante y determinante para el proceso de hibridación sea el clima. La disminución gradual de las precipitaciones hacia el este puede afectar los ciclos fenológicos solapando el período de floración de ambas especies.

Por otro lado, la explotación forestal muy intensa en el pasado, puede haber ejercido un efecto relativamente importante en la formación de híbridos de dos formas principales. En primer lugar, la modificación del ambiente físico provocó una mayor entrada de luz por la apertura de vías de saca y caminos que puede haber originado la creación de hábitats híbridos requeridos por dichos individuos. En segundo lugar, el aumento de la proporción de polen de Roble en la nube polínica por la extracción selectiva de Raulí (Gallo, 2000). En tal sentido, la accesibilidad de la cabecera este de los lagos favoreció una mayor explotación en dicha zona, pudiendo ser otro de los factores que están determinando la gran proporción de híbridos en la franja oriental de la distribución. Asimismo, varios de los individuos adultos híbridos detectados en la cuenca del Lago Lácar se encontraban al costado de los caminos, zonas también alteradas antrópicamente. La falta de un hábitat adecuado muchas veces determina la mortandad de los individuos híbridos al no poder competir con las especies parentales, prosperando por el contrario en otros ambientes más favorables a su condición (Gallo et al., 1997b).

En el caso de la cuenca Lácar, se detectó además un alto número de semillas híbridas en la población 11. Si bien esta última se encuentra en el centro de la cuenca, debido a la altitud a la cual se ubica (650 m snm) la relación entre las dos especies no es equitativa siendo mayoritaria la presencia de Roble Pellín. En este caso, la posible causa de los mayores niveles de hibridación es una competencia polínica que ante la ausencia o escasez del polen de Raulí favorece al de Roble Pellín (Gallo, 2000). El porcentaje de hibridación en otras poblaciones de las cuencas de los lagos Lácar y

Quillén, donde ambas especies están en simpatria, es despreciable o inexistente, lo cual estaría de acuerdo con la hipótesis de competencia polínica.

La ausencia de híbridos hacia el oeste también podría estar determinada o favorecida por los vientos unidireccionales en sentido oeste–este, ya que los mismos impiden el flujo génico desde el este donde la formación de híbridos es más común.

La hipótesis general planteada al comienzo de esta tesis de variación en sentido latitudinal, se cumple en forma parcial, ya que, si bien no hay una diferenciación clara entre todas las cuencas, sí existe una separación norte–sur. La unidireccionalidad de los vientos dentro de cada cuenca lacustre, estaría también favoreciendo la diferenciación entre las poblaciones situadas en los extremos de las mismas. Dada la reducida distribución de la especie, los niveles de diferenciación resultan por demás sorprendentes y superan a los esperados al comienzo. Patrones de variación genética en sentido latitudinal también fueron observados en otras especies nativas de la zona. Por ejemplo en Ciprés de la Cordillera (*Austrocedrus chilensis*), se detectaron niveles bajos de variación y diferenciación entre poblaciones con una tendencia a diferenciación en sentido latitudinal entre tres transectas ubicadas en el área de distribución de la especie en Argentina y mayor variación en poblaciones relictuales (Pastorino, 2001). La variación en el peso de las semillas provenientes de las mismas poblaciones mostró la misma tendencia (Pastorino & Gallo, 2000). En *Nothofagus pumilio*, se registró una mayor diversidad total ( $H_T$ ) y diferenciación ( $G_{ST}$ ) entre poblaciones situadas al norte de su amplia distribución, aunque las poblaciones del sur presentaron un mayor número de alelos raros, grado de polimorfismo y heterocigosis (Premoli, 1998). En *Fitzroya cupressoides*, se encontró una diferenciación en sentido longitudinal entre poblaciones situadas a ambos lados de la Cordillera de los Andes, así como también, tanto al este como al oeste, diferencias en sentido latitudinal (Alnutt et al., 1999; Premoli et al., 2000b).

### **2.3. Variación genética total**

Como ya fuera discutido en el punto anterior, la enorme variación temporal observada, con presencia de alelos en diferente frecuencia e incluso la detección de nuevas variantes y distintos porcentajes de hibridación según el año analizado, sugieren que la variación intrapoblacional estará mejor representada si se incluyen los datos de todos los años disponibles. A tal fin, se realizó un nuevo análisis de las 20 poblaciones juntando los datos de dos años en nueve de ellas para determinar las

poblaciones más variables y diferenciadas, incluyéndose también las poblaciones de Chile. A su vez, dado que el ADN de cloroplasto separa dos grupos se analizaron los mismos por separado para determinar las poblaciones más variables dentro de cada uno. Este nuevo análisis reveló que las poblaciones más diversas y a su vez diferenciadas dentro del grupo sur fueron la 14, la 19 y la de Nahuelbuta, mientras que entre el grupo norte la más diferenciada resultó ser la 30. Cabe destacar que el valor de diferenciación media ( $\delta$ ) prácticamente no se modificó (Tabla VI.1; Fig. VI.1).

Tabla VI.1: Relación entre la ubicación geográfica y los distintos niveles de variación analizados.

Población	Ubicación	Peso 1000 semillas (g)	Haplotipo	ADN nuclear (loci aloenzimáticos)					
				$A_L$	$\nu$	$H_o$	$H_e$	$D_j$	
1	Sur	4,579	I	1,88	1,20	0,16	0,17	0,021	
4		8,013		1,88	1,13	0,11	0,12	0,054	
5		7,745		1,75	1,28	0,20	0,22	0,049	
6		7,119		1,75	1,18	0,13	0,15	0,040	
8		6,346		1,88	1,16	0,13	0,14	0,037	
10		7,258		2,38	1,21	0,17	0,17	0,034	
11		9,060		2,38	1,19	0,15	0,16	0,048	
12		7,427		2,25	1,23	0,18	0,19	0,023	
14		7,820		2,75	1,32	0,20	0,24	<b>0,064</b>	
16		6,782		1,75	1,29	0,20	0,23	0,050	
17		8,372		2,38	1,26	0,19	0,21	0,046	
18		6,034		2,25	1,28	0,20	0,22	0,036	
19		7,603		2,50	1,23	0,18	0,19	<b>0,058</b>	
21		9,187		1,88	1,23	0,16	0,19	0,019	
23		8,382		1,75	1,18	0,13	0,15	0,039	
24		7,893		2,13	1,21	0,18	0,18	0,034	
Ne		-		2,25	1,17	0,15	0,14	0,045	
Na		Costa		-	2,00	1,19	0,15	0,16	<b>0,072</b>
Media				7,476		2,1	1,22	0,17	0,18
26	Norte	7,422	II	2,25	1,19	0,14	0,16	0,041	
27		8,663		2,13	1,23	0,16	0,19	0,045	
28		8,325		1,75	1,22	0,15	0,18	0,033	
30		8,617		1,88	1,25	0,18	0,20	<b>0,063</b>	
Ma		-		2,13	1,15	0,13	0,13	0,053	
Media				8,257		2,03	1,21	0,15	0,17

Se incluyen semillas de dos años en nueve poblaciones de Argentina.  $A_L$ : número medio de alelos,  $\nu$ : diversidad,  $H_o$ : heterocigosis observada,  $H_e$ : heterocigosis esperada,  $D_j$ : diferenciación.

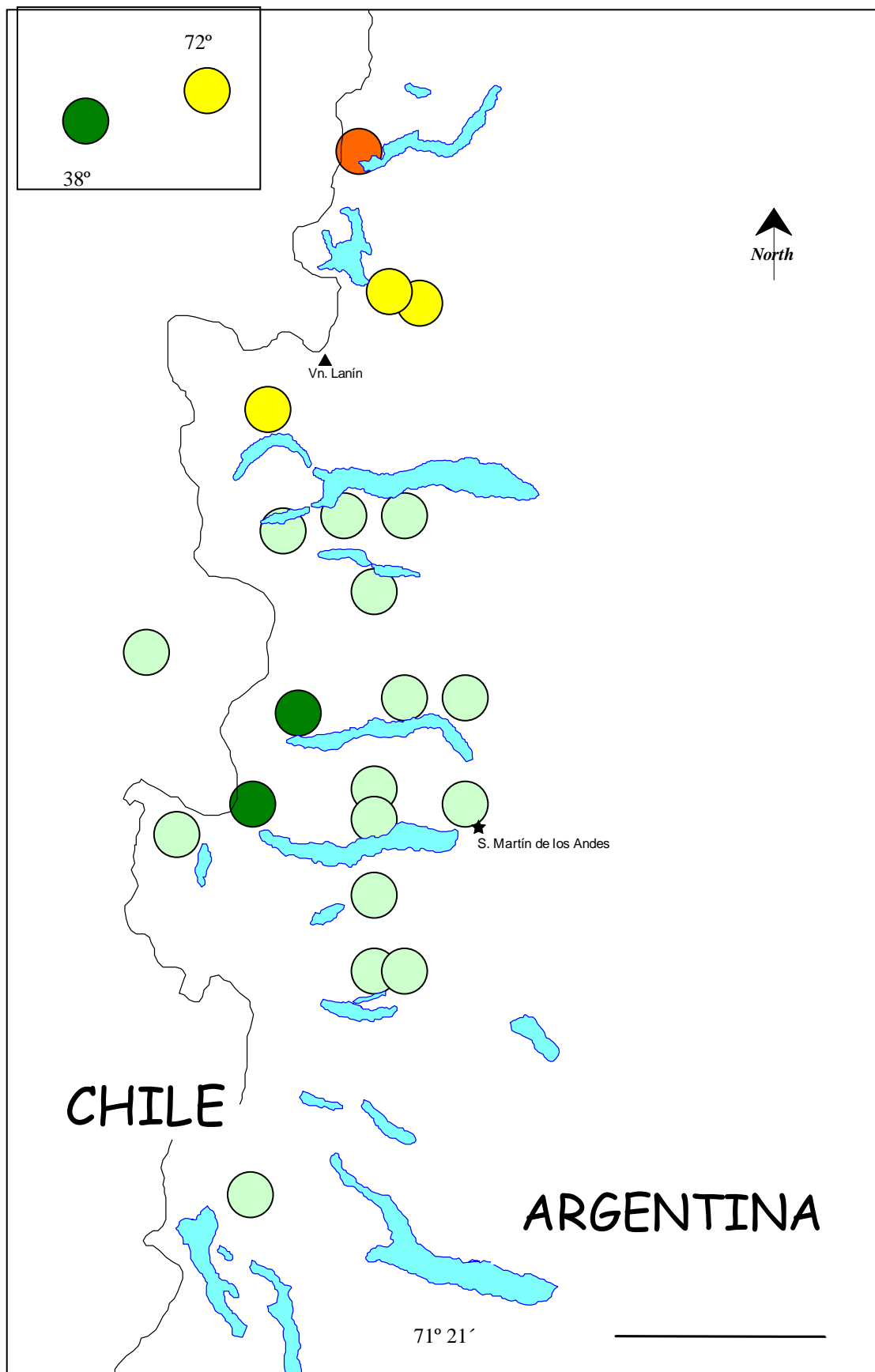


Figura VI.1: Diferenciación entre poblaciones según marcadores aloenzimáticos y moleculares. Las poblaciones en verde corresponden al haplotipo I, siendo las más oscuras aquellas más diferenciadas. Las poblaciones en amarillo corresponden al haplotipo II siendo la coloreada en naranja la más diferenciada del grupo.



Este análisis conjunto revela dos centros principales de diversidad genética: la zona de las poblaciones 14 y 19 (Hua Hum y Boquete) y la zona de la población 30 (Quillén).

### **3. Relación entre la variación genética y las glaciaciones del Cuaternario**

La existencia de dos haplotipos diferentes en el ADN de cloroplasto es una evidencia contundente que sugiere la supervivencia de esta especie en al menos dos refugios durante las últimas glaciaciones. La presencia de los mismos haplotipos en poblaciones de Chile no sólo indica que la mutación que dio origen a las dos variantes cloroplásticas es anterior a las glaciaciones, sino que también sugiere la posible coexistencia de las poblaciones que comparten un haplotipo en los mismos refugios. El patrón de distribución de estos haplotipos entre las poblaciones de Chile y Argentina resulta por demás interesante dado que revela, por un lado, una diferenciación norte-sur en las poblaciones cercanas a la Cordillera de los Andes, y por otro, agrupa la población de la Cordillera de Nahuelbuta (en la Cordillera de la Costa) con las poblaciones del sur. El análisis de otras regiones polimórficas podría revelar si realmente las poblaciones del sur sobrevivieron las glaciaciones en los refugios costeros. Ante la imposibilidad de detectar más regiones de ADN polimórficas en este trabajo, se puede utilizar la variación encontrada con isoenzimas. En tal sentido, como ya se mencionó, estos marcadores también revelan dos centros principales de variación: poblaciones 14 y 19 y población 30 (Tabla VI.1; Fig. VI.1).

Según los datos palinológicos, el bosque templado caducifolio, del cual *Nothofagus nervosa* forma parte, podría haber sobrevivido las últimas glaciaciones en refugios ubicados en la Cordillera de Nahuelbuta, Depresión Intermedia y faldeos de la Cordillera de los Andes (Villagrán, 1991; Heusser, 1984). Trazas de polen tipo *obliqua* fueron encontradas en el Tardiglacial (12.500 – 9.500 años AP) en la localidad de Rucañancu, a 39° 30' de latitud Sur, en la Cordillera de los Andes (Villagrán, 1991). Cabe recordar que el tipo de polen de *N. nervosa* no puede ser distinguido del de *N. obliqua*, por lo que los datos polínicos son para ambas especies tomadas en conjunto. De acuerdo a estos datos, los resultados obtenidos con ADN de cloroplasto concuerdan con el registro polínico dado que la población de Nahuelbuta

podría haber dado origen al grupo Sur y la región de Rucañancu, al norte de la población 30, al grupo Norte.

Sin embargo, la rápida expansión de los bosques al retirarse los hielos (Heusser et al., 1996; Moreno, 1997b) no concuerda con las distancias supuestamente recorridas por la especie desde un refugio en la zona de Nahuelbuta. La dispersión de las semillas en las especies del género *Nothofagus* es muy limitada. En especies de Nueva Zelandia se ha determinado que la mayoría de las semillas caen a 30 - 40 m del árbol madre, estando los límites normales no más allá de los 200 m (Wardle, 1984). Entre las especies nativas, *Nothofagus dombeyi* también presenta una dispersión limitada, dada la mayor proporción de regeneración post-incendio observada a aproximadamente 25 m de los árboles semilleros remanentes (Kitzberger & Veblen, 1999). En *N. nervosa* se ha reportado que la dispersión alcanza entre 50 y 80 m y, como raras excepciones, 100 m (Donoso, 1993).

Por otro lado, el tiempo transcurrido desde el comienzo de la expansión de la especie es de aproximadamente 9.500 años (Villagrán, 1991). Si suponemos una edad reproductiva de 20 - 30 años, desde el retiro de los hielos hubo alrededor de 400 generaciones. Aún en las mejores condiciones de reproducción, viabilidad de las semillas, establecimiento y supervivencia de las plántulas, la especie hubiera recorrido unos 40 km desde la expansión de los bosques al final del período glaciario. La distancia aproximada desde Nahuelbuta hasta la zona del Lago Lácar en línea recta es de 250 km. Por ende, resulta poco probable que las poblaciones actuales del sur de Argentina provengan de la expansión a partir de un refugio ubicado en la Cordillera de la Costa en la zona de Nahuelbuta.

Otra posibilidad es que el haplotipo I (encontrado en las poblaciones del sur y en Nahuelbuta) sea más antiguo que el II y haya tenido antes de las glaciaciones una distribución más amplia, compartiendo las poblaciones de distintos refugios el mismo haplotipo. Hay que tener en cuenta que la detección de haplotipos distintos sugiere refugios distintos, pero la observación de un mismo haplotipo no necesariamente implica la supervivencia en un mismo refugio.

La variación genética detectada con los marcadores aloenzimáticos en las poblaciones de Argentina tampoco concuerda con un origen a partir de la zona de Nahuelbuta. Aunque esta población comparte el mismo haplotipo que las poblaciones del grupo Sur, presenta niveles de variación aloenzimática intrapoblacional iguales o menores a dicho grupo, y varios de los alelos presentes entre las poblaciones del Sur

no se detectaron en la zona de Nahuelbuta. Entre las pocas poblaciones de Chile analizadas es la más diferenciada, lo cual coincide con su ubicación aislada de la distribución central con la consecuente reducción de flujo génico. Por otra parte, al comparar las poblaciones de Chile y Argentina en conjunto, esta población tiene un nivel de diferenciación relativamente alto y semejante a las poblaciones más diferenciadas de la Argentina ( $D_j = 0,069$ ). Sin embargo, si las poblaciones de Argentina, hubieran derivado del refugio costero, deberían tener niveles de variación menores que el observado en dicha región, por los sucesivos cuellos de botella supuestamente ocurridos a lo largo de una migración a largas distancias.

Villagrán (1991) propone la expansión hacia el sur por el sector andino desde la zona de Rucañancu, en cercanías del Lago Quillén. Dicha expansión sería más lógica que desde la Cordillera de la Costa. Sin embargo, esto no coincide con los datos de ADN de cloroplasto, que separa las poblaciones hacia el sur como provenientes de otro sitio. La formación del volcán Lanín en épocas recientes (Pleistoceno tardío-Holoceno, es decir posterior a las glaciaciones) con tres episodios volcánicos durante el Cuaternario (Rabassa et al., 1990), sugieren una inestabilidad en la zona poco propicia para el desarrollo y expansión de los bosques. Esta inestabilidad puede haber ejercido algún tipo de restricción a la migración hacia al sur, determinando que sólo llegara hasta la zona de Paimún.

Una expansión a partir de uno o más refugios ubicados en el centro-sur de la distribución actual de Chile y Argentina, y que compartiera el mismo tipo de ADN de cloroplasto que la zona de Nahuelbuta respondería a la rápida expansión de los bosques y coincidiría con los resultados obtenidos.

El posible refugio podría estar situado tanto en la costa Chilena, zona no glaciada, como en algún sector de la Depresión Central de Chile o, incluso, al este de la Cordillera.

Las distancias desde la costa hasta la Cordillera de los Andes, en línea recta, son de aproximadamente 150 km., lo cual nos lleva nuevamente a la inconsistencia con la rápida expansión.

Entre las poblaciones analizadas, la ubicada en la zona de Neltume sería la más cercana a la región de la Depresión Central de Chile. Esta población no presentó grandes niveles de variación intrapoblacional y diferenciación. A su vez, no mostró diferencias significativas con muchas de las poblaciones de los Lagos Lácar y Huechulafquen (Tabla 1, Apéndice V), lo que podría sugerir un origen común. No se

puede descartar un refugio en la Depresión Central dado que sólo se analizó una población cercana a dicha zona, con un muestreo distinto al realizado en Argentina y en un año de producción de semillas escasa, por lo que se podría estar subestimando la variación genética real. Por otro lado, no hay que subestimar el efecto de la explotación forestal que en Chile fue devastador (Donoso & Lara, 1995). Es posible que muchas poblaciones hayan desaparecido y las remanentes sólo tengan parte de su variación genética original. Sin embargo, la gran variación intrapoblacional detectada en Hua Hum y Boquete (poblaciones 14 y 19) y el alto grado de diferenciación no coinciden con una expansión a partir de Neltume o una región cercana.

Si bien no existen evidencias palinológicas de refugios para *Nothofagus nervosa* en la región oriental de los Andes en latitudes intermedias, se ha señalado la posibilidad de que la representatividad de los taxa pertenecientes a los bosques templados haya sido muy baja como para que el polen sea detectable (Markgraf et al., 1996). La región correspondiente a las latitudes intermedias (36° - 44°) se caracterizó durante las últimas glaciaciones por poseer la menor amplitud de cambios, donde incluso en los tiempos de máxima expansión de los hielos tanto *Nothofagus* como la flora Magallánica persistieron en sitios favorables (Markgraf, 1997). En Lago Morenito (41° de latitud Sur, en Argentina), se registró polen de *Nothofagus* tipo *obliqua* correspondiente a 13.000 años antes del presente, aunque según la autora, este dato debe ser tomado con precaución dado que por las características de este tipo de polen, puede ser confundido con restos de algas; de ser polen, correspondería probablemente a *Nothofagus obliqua* (Markgraf, 1984). Polen tipo *obliqua* fue detectado en la zona norte de la distribución de los bosques en Argentina, a 37° (Markgraf, 1987), sitio donde se encuentra *N. obliqua* hoy en día. Por otra parte, hacia el sur, alrededor de los 41° S, la evidencia palinológica sugiere la presencia de poblaciones de taxa arbóreos (*Nothofagus* tipo *dombeyi* y Cupresaceas, posiblemente *Austrocedrus chilensis*) al final de las glaciaciones. Los registros polínicos en sitios estudiados al este de los Andes (Mallín Book, Lago Morenito, Markgraf, 1983, 1984; Lago Mascardi, Lago El Trebol, Bianchi, 1999; Mallín Aguado, Markgraf & Bianchi, 1999), revelan situaciones similares y relativamente sincrónicas a las descritas para la Región de los Lagos en Chile (Heusser et al., 1996; Moreno, 1997a; 1997b). Todos los estudios coinciden con una expansión rápida de los bosques hace aproximadamente 13.000 – 14.000 años. Más aún, se ha registrado la presencia de *Nothofagus* durante el máximo glacial (entre 20.200 y 14.800 años antes del presente)

y su rápida expansión a partir de los 14.800 años A.P. en el Canal de la Puntilla ( $40^{\circ} 57'09''$  S,  $72^{\circ} 54'18''$  O, Chile) (Moreno, 1997b). Este último estudio revela la rápida expansión de los taxa de la selva Valdiviana hace 14.000 años.

Trabajos realizados al este de la Cordillera sugieren que la expansión podría haber ocurrido a partir de numerosas poblaciones reducidas que permanecieron en áreas protegidas (Markgraf et al., 1995; Bianchi, 1997, 1999). Las últimas glaciaciones en esta zona fueron de tipo “valle” y, según Flint & Fidalgo (1964), quedaron elevaciones por encima del hielo (nunatacks), el cual alcanzó en algunos sitios una altura de hasta 1.500 m. (ver Fig. 2, Apéndice I). Dada la aridez de estas altas cumbres es poco probable que en las mismas pudieran sobrevivir especies con altos requerimientos de humedad como el Raulí. Sin embargo, y analizando las cartas topográficas de la zona, se puede sugerir que las elevaciones ubicadas al norte de la cuenca del Lago Lácar (cercanías de las poblaciones 14 y 19) que superan los 1.700 m, podrían haber ejercido algún tipo de barrera a los hielos, dejando los flancos orientados al noreste al descubierto. En tal sentido, se ha sugerido que la compleja topografía de la zona habría permitido la existencia de numerosos microhábitats donde las especies pueden haberse refugiado (Markgraf et al., 1996).

Datos preliminares de esta tesis nos llevaron a sugerir la existencia de al menos dos refugios glaciarios para la especie, probablemente ubicados en la Cordillera de los Andes (Marchelli et al., 1998). Los resultados aquí no sólo confirman los datos previos sino que además sugieren la posible ubicación de dichos refugios. Si bien como ya fuera discutido previamente los datos palinológicos no confirman fehacientemente esta hipótesis, los siguientes estudios de variación genética realizados en ésta y otras especies nativas también sugieren la presencia de refugios glaciarios múltiples. En Raulí, datos de variación isoenzimática en poblaciones de Chile llevaron a sugerir la expansión a partir de cuatro refugios distintos, dos ubicados en la Cordillera de los Andes y dos en la Cordillera de la Costa en el sur ( $40^{\circ} 27'$  -  $41^{\circ} 02'$ ) (Carrasco & Eaton, enviado). Altos niveles de variación genética y escasa diferenciación en tres especies de *Nothofagus* (*N. betuloides*, *N. dombeyi* y *N. nitida*) fueron interpretados como evidencia de una presencia continua de estas especies durante el Pleistoceno, con *N. nitida* probablemente aislada de las otras dos (Premoli, 1997). En Lenga, *N. pumilio*, los niveles de variación genética observados sugieren la supervivencia en refugios situados en las regiones norte y sur de la distribución actual (Premoli, 1998). Estudios recientes en otras especies avanzan

más en la hipótesis de refugios múltiples sugiriendo la posibilidad de que los mismos hayan estado ubicados al Este de la Cordillera de los Andes. La variación detectada mediante marcadores moleculares (RAPDs) en Alerce (*Fitzroya cupressoides*), reveló la existencia de refugios múltiples sugiriendo la persistencia de la especie tanto en la costa de Chile como al este de la Cordillera de los Andes durante las últimas glaciaciones (Allnutt et al., 1999). Más aún, la variación isoenzimática detectada en poblaciones que abarcan toda el área de distribución actual del Alerce en Chile y Argentina, ha sido interpretada en función de la expansión de la especie a partir de al menos dos refugios que podrían haber estado ubicados en la Costa de Chile y, en Argentina, en las laderas de los Andes a una latitud de 42° (Premoli et al., 2000b). Recientemente se ha propuesto en otra conífera nativa (*Austrocedrus chilensis*) la recolonización luego de las glaciaciones a partir de poblaciones que permanecieron en la estepa Patagónica, levemente al este de la distribución actual de la especie, dado el presunto carácter relictual de las poblaciones situadas en el límite de la distribución actual (Pastorino, 2001). En dicho trabajo se sugiere también la existencia de otro refugio entre los lagos Traful y Meliquina, a una latitud entre 41° 20' y 41° 50'. Por último, en Pehuén (*Araucaria araucana*) se observó una leve diferenciación Norte – Sur entre poblaciones cercanas a la Cordillera de los Andes en Argentina y Chile, diferenciándose éstas de las situadas en la Cordillera de la Costa (Bekessy et al., enviado).

Es notable en todos los trabajos que incluyen poblaciones de la Cordillera de la Costa en Chile, la diferenciación entre las mismas y las poblaciones situadas en las proximidades de la Cordillera de los Andes. Este patrón general tan marcado sumado a la gran variación detectada en las poblaciones de los Andes, es un argumento muy fuerte para sugerir que los bosques Andino-patagónicos habrían sobrevivido las últimas glaciaciones en zonas libres de hielo situadas no sólo en la Cordillera de la Costa sino también en ambas laderas de la Cordillera de los Andes.

#### **4. Efecto antrópico**

El impacto causado por las glaciaciones, no sólo por la reducción drástica de los bosques ante el avance de los hielos sino también por las condiciones climáticas a las que tuvieron que adaptarse las poblaciones remanentes, y el vulcanismo, sobre todo en la zona del volcán Lanín de formación muy reciente, son probablemente los

principales factores que determinan la distribución de la variación genética actual de *Nothofagus nervosa*. Sin embargo, hay que tener presente también el efecto de la explotación selectiva y desmesurada realizada en el pasado. Si bien es de esperar que el impacto sea menor al de las glaciaciones, es importante tenerlo en cuenta al momento de analizar patrones actuales de distribución de la variación genética. En tal sentido, al menos habría que recordar que la mayor variación en las poblaciones de Argentina podría deberse a una explotación relativamente menor de la especie a la ocurrida en Chile, donde extensas superficies de bosques nativos fueron taladas y los mismos reemplazados por especies exóticas (Donoso & Lara, 1995). Los niveles bajos de variación en la población de Nahuelbuta, zona donde los bosques permanecieron durante las glaciaciones, pueden también estar respondiendo a una disminución drástica en el tamaño poblacional en tiempos más recientes, con el consecuente efecto de la deriva genética y el aumento de la endogamia. Es incluso posible que el impacto de la explotación sea más intenso en esta población dada su ubicación fragmentada del resto de la distribución, donde la posibilidad de recibir aportes genéticos (tanto de polen como de semillas) de otras poblaciones es limitado sino nulo. Sería por demás interesante poder muestrear más poblaciones de la zona o más individuos para tratar de confirmar los valores registrados de variación genética.

En el caso de las poblaciones de Argentina, si bien la explotación puede haber ejercido un efecto importante en la reducción de la variación genética, resulta poco probable que se hayan perdido en todas las poblaciones alelos que se encuentran en frecuencia elevada en una única población (la población 14). Si bien es posible que esta población no haya sufrido una explotación demasiado intensa por su ubicación relativamente inaccesible, esta situación es también válida para otras poblaciones que, sin embargo, no son tan diversas (por ejemplo en la cuenca del lago Curruhué donde, según los registros de Parques Nacionales, no hubo explotación (González Peñalba, com. pers.).

Quizás el mayor efecto de la explotación fue la creación de hábitats adecuados (“hábitats híbridos”) por la alteración del ambiente para el establecimiento de individuos híbridos en determinadas regiones, como la cabecera este de los lagos y los costados de los caminos, o por el aumento de la competencia polínica de Roble Pellín como consecuencia de la extracción preferencial de Raulí en aquellas poblaciones de simpatria ecológica (Gallo, 2000).

En conclusión, la intervención antrópica debe considerarse como importante sobre todo en algunas regiones, pero sin duda fue mayor el efecto causado por las glaciaciones.

## **5. Modelo de migración postglacial**

En base a lo expuesto en los puntos anteriores y teniendo en cuenta sólo los datos isoenzimáticos y moleculares de las poblaciones de Argentina, surgen dos sitios posibles a partir de los cuales pueden haberse expandido las poblaciones actuales de Raúl de Argentina.

Estos sitios corresponden a la zona de Rucañancu en cercanías del Lago Quillén y a la región central de la distribución ( a los 40° S), posiblemente en la zona cercana a Hua Hum (población 14) y Boquete (población 19) entre las cuencas de los lagos Lácar y Lolog (Fig. VI.2). En función de las frecuencias alélicas, las distancias genéticas y las posibilidades o no de flujo génico tanto polínico como por migración de semillas, se trazan las posibles rutas de migración a partir de dichos refugios hacia las poblaciones actuales.

Las poblaciones que comparten el haplotipo II (zona Norte) provienen de un mismo refugio glacial, aquel situado en Rucañancu-Quillén. Las distancias genéticas calculadas con los datos isoenzimáticos (Tabla 1, Apéndice V), coinciden con esta ubicación, dado que la población más cercana es la 30 y las distancias genéticas desde la misma hacia las restantes coinciden con las distancias geográficas (Fig. VI.2). Si bien no hubo grandes diferencias entre las poblaciones del grupo Norte, la población 30 presentó el mayor porcentaje de heterocigosis y resultó ser la más diferenciada.

Las poblaciones que comparten el haplotipo I se dispersaron a partir del refugio situado en la zona cercana a la cabecera oeste del Lago Lácar (Fig. VI.2). La población más variable de este grupo (14) sería el origen de las restantes. Las distancias genéticas de esta población a las ubicadas en la misma cuenca lacustre son significativamente

diferentes, siendo menor con la población 12, la más próxima en el sentido de los vientos, y aumentando las distancias hacia el este.

La expansión hacia el sur (cuencas de los lagos Hermoso y Espejo) puede haber ocurrido a partir de la población 8 dado que tiene una distancia genética muy baja con las poblaciones 1 y 4. Hacia el Norte, la distancia genética con la población 19 es menor que con Neltume, coincidiendo con las distancias geográficas, si bien el



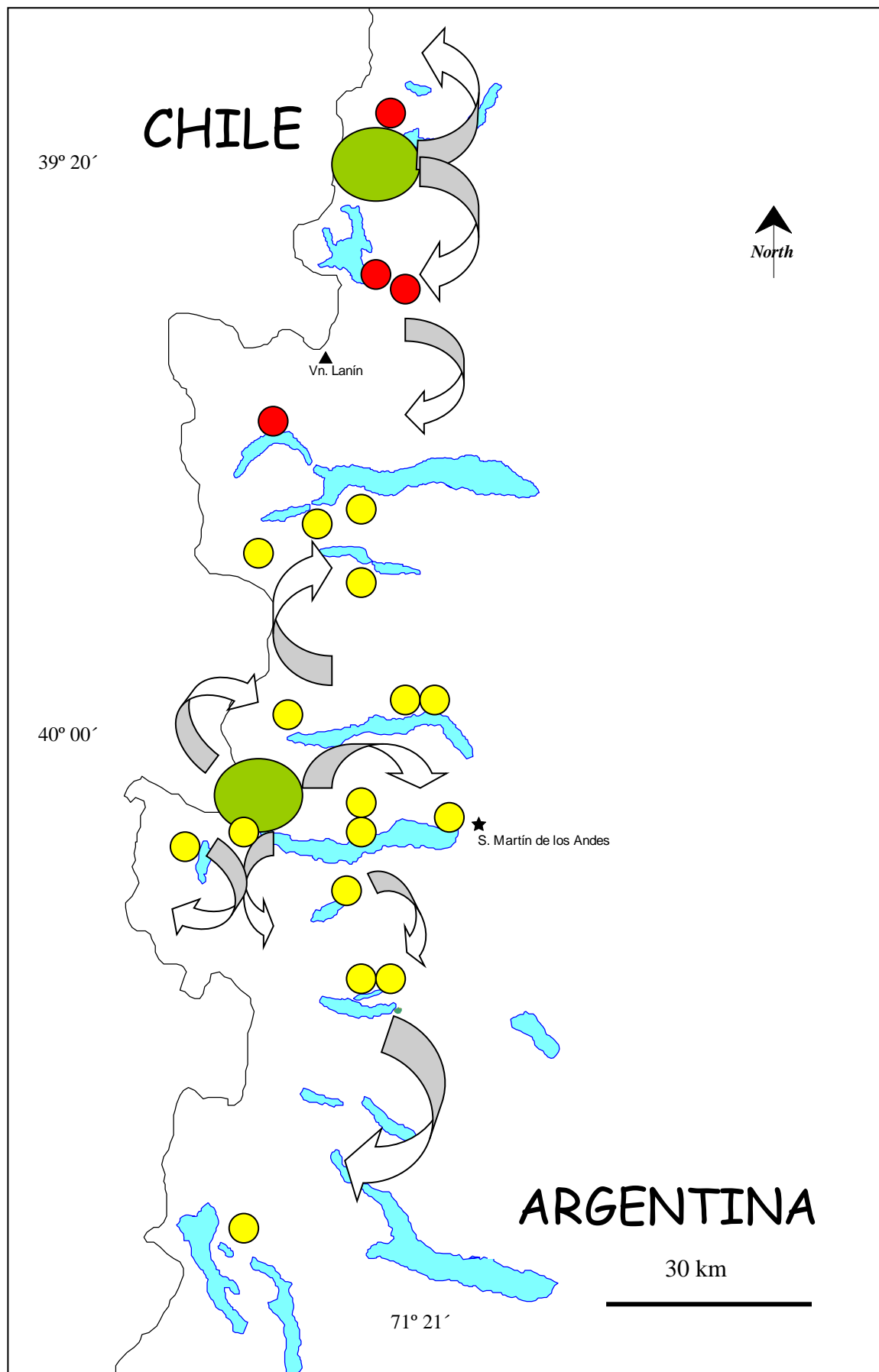


Figura VI.2: Ubicación de los refugios glaciares y posibles rutas migratorias propuestos en este trabajo

patrón no es del todo claro hacia la cuenca Huechulafquen, donde podrían converger corrientes migratorias provenientes de la zona sur (cercañas de la población 14) y de Chile, en la Depresión Central, dadas las similitudes genéticas entre las poblaciones de esta cuenca y la población situada en Neltume.

## 6. Consideraciones finales

La variación genética observada entre poblaciones de Raulí de Argentina es considerablemente alta en relación a su reducida área de distribución, y consistente con patrones encontrados en otras especies de la región. Esta variación debe tenerse en cuenta en los programas de conservación de la especie así como también en los planes de manejo silvícola y los programas de mejoramiento genético que se están realizando. Mantener estos niveles elevados de variación es de gran importancia en la subsistencia del ecosistema del que Raulí forma parte, otorgándole, además, mayores posibilidades de adaptación ante cambios ambientales. Por otro lado, es fundamental para evitar el agotamiento rápido de los programas de mejoramiento.

Los centros de alta variación surgen como zonas importantes para la conservación *in situ* de la especie y como fuentes de semillas para su conservación *ex situ*. Más aún, la utilización de semillas de estas poblaciones para plantaciones con fines comerciales permitiría establecer sistemas productivos más estables que disminuirían la carga actual de la zona aprovechada. Dado que la madera de Raulí representa un recurso natural importante, de alto valor económico y muy solicitado en los mercados locales, comenzar a cultivarlo no sólo reduciría el impacto en el bosque nativo, sino que representaría una fuente de ingresos importante para la comunidad. A tal fin, son de fundamental importancia los datos de ensayos de progenies y procedencias que están siendo evaluados como parte del “Programa de conservación y utilización de los recursos genéticos forestales patagónicos” del INTA Bariloche (Gallo, 1993).

Por último, los resultados obtenidos en este trabajo dejan numerosos interrogantes para futuras investigaciones. Es evidente la importancia de un estudio de toda el área de distribución de la especie, es decir Chile y Argentina, con el cual se tendría un conocimiento global de la cantidad y distribución de la variación genética en *N. nervosa*, pudiéndose establecer mejor las zonas de alta variación y posibles refugios glaciares. Dicho estudio ya se ha puesto en marcha tanto para Raulí como

para Roble Pellín a través de un proyecto conjunto entre el INIA Quilamapu (Chile) y el INTA Bariloche. Otra línea de investigación que se abre a partir de los resultados de hibridación obtenidos en la cuenca Lolog, con elevados porcentajes de retrocruzas, es el estudio de la dinámica del proceso de hibridación entre ambas especies. Si bien parte de este proceso se ha comenzado a estudiar (Gallo et al., 1997a, b; Crego, 1999; Gallo et al., 2000a; 2000c), y un modelo de hibridación ha sido propuesto (Gallo, 2000) un análisis detallado genotipificando los individuos en poblaciones de esa cuenca aportaría datos interesantísimos al estudio de este proceso. Asimismo, las diferencias temporales en las frecuencias alélicas encontradas en unas pocas poblaciones analizadas, sugieren la necesidad de corroborar esta tendencia en un número mayor de poblaciones en estudios concernientes a evaluar la variación temporal del sistema reproductivo de la especie. Estos interrogantes, puntos de partida para futuras investigaciones, representan el espíritu dinámico del conocimiento científico. En mi modesta opinión, las nuevas líneas de investigación que surgen a partir de este trabajo constituyen uno de los aportes más importantes de esta tesis.

## Referencias

- Ackerman RF & Gorman JR (1969): Effect of Seed Weight on the Size of Lodgepole Pine and White Spruce Container - Planting Stock. *Pulp & Paper*, 167-169.
- Adams WT (1983) Application of isozymes in tree breeding. In S.D. Tanksley & T.J. Orton (Eds.) *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. Elsevier Science Publishers B.V, Amsterdam, The Netherlands: 381-400
- Aert R, Voet M, Van Campenhout S, Vander Stappen J & Volckaert G (1998) Polymerase chain reaction. In A Karp, PG Isaac & DS Ingram (Eds.) *Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals*. Chapman & Hall, London, UK: 111-118
- Aichele J (1998) Morfología floral y antecedentes fenológicos de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp.et Endl.) Oerst) en un huerto semillero clonal. Tesis Ing. Forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad austral de Chile: 102 pp.
- Aizen MA & Woodcock H (1992): Latitudinal trends in acorn size in eastern North American species of *Quercus*. *Can.J.Bot.*, 70:1218-1222.
- Alley JC, Fitzgerald BM, Berben PH & Haslett SJ (1998): Annual and seasonal patterns of litter-fall of hard beech (*Nothofagus truncata*) and silver beech (*Nothofagus menziesii*). *New Zealand Journal of Botany*, 36:453-464.
- Allnutt TR, Newton AC, Lara A, Premoli AC, Armesto JJ, Vergara S & Gardner M (1999) Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Molecular Biology*, 8: 975-987.
- Armesto JJ, León-Lobos P & Kalin Arroyo M (1995) Los bosques templados del sur de Chile y Argentina: una isla biogeográfica. En Armesto JJ, C Villagran & M Kalin Arroyo (Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 23-28
- Arroyo KM, Cavieres L, Peñaloza A, Riveros M & Faggi AM (1995) Relaciones fitogeográficas y patrones regionales de riqueza de especies en la flora del bosque lluvioso templado de sudamérica. En Armesto JJ, C Villagran & M Kalin Arroyo (Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 71-100
- Avise JC (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York: 511 pp.
- Baker HG (1972): Seed Weight in Relation to Environmental Conditions in California. *Ecology*, 53:997-1010.
- Bartels H (1971) Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. *Planta (Berl)*, 99: 283-289.

- Bekessy SA, Allnutt TR, Premoli AC, Lara A, Ennos RA, Burgman MA, Cortes M & Newton AC (2001) Genetic variation in the monkey puzzle tree (*Araucaria araucana* (Molina) K.Koch), detected using RAPDs. (en prensa)
- Berg EE & Hamrick JL (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can.J.For.Res.*, 27: 415-424
- Bergmann F (1971) Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung.I. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Forstsaatgut. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 142: 278-280
- Bergmann F (1991) Isozyme Gene Markers. In Müller-Starck G & Ziehe M (Eds.) *Genetic Variation in European Populations of Forest Trees*. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main: 67-78
- Bergmann F & Gregorius HR (1993) Ecogeographical Distribution and Thermostability of Isocitrate dehydrogenase (IDH) Alloenzymes in European Silver Fir (*Abies alba*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 21: 597-605.
- Bergmann F, Gregorius HR & Larsen JB (1990) Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba*). Are they related to the species decline? *Genetica*, 82: 1-10.
- Bergmann F, Gregorius HR & Scholz F (1989) Isoenzymes, indicators of environmental impacts on plants or environmentally stable gene markers? In Scholz F, Gregorius HR & D Rudin (Eds.) *Genetic effects of air pollutants in forest tree populations* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 17-25
- Bergmann F & Hattermer HH (1998) Isozymes in forest genetics research. In AK Mandal & GL Gibson (Eds.) *Forest genetics and tree breeding*. CBS Publishers and Distributors, Daryaganj, New Delhi: 227-238
- Bewley JD & Black M (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. 2<sup>o</sup> Ed. Plenum Press, New York: 445 pp
- Bianchi MM (1997) Evidence of forest change during late glacial-holocene transition from lake sediment and peat bog pollen record at 41° South, east of the Andes. II Southern Connection Congress, Valdivia, Chile. *Noticiero de Biología*, 5: 91
- Bianchi MM (1999) Registros polínicos de la transición Glacial-Postglacial en el Parque Nacional Nahuel Huapi, noroeste de Patagonia, Argentina. *Asociación Paleontológica Argentina, Publicación especial* 6: 43-48.
- Breitembücher A (1998) Variación individual y geográfica en frutos y semillas de Raulí (*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Tesis de Licenciatura, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue 93 p
- Breitembücher A & Gallo LA (1995) Variación individual de la capacidad germinativa en Rauli (*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. IV Jornadas Forestales Patagónicas, San Martín de los Andes, Tomo I: 181-187

- Brettschneider R (1998) RFLP analysis. In A. Karp, PG Isaac & DS Ingram (Eds.) *Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals*. Chapman & Hall, London, UK: 83-95
- Brown AHD (1978) Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor Appl Genet*, 52: 145-157.
- Burschel NP, Gallegos GC, Martinez OM & Moll W (1976) Composición y dinámica regenerativa de un bosque virgen mixto de Raulí y Coigüe. *Bosque*, 1: 55-74
- Caldenius C (1932) Las glaciaciones cuaternarias en la Patagonia y Tierra del Fuego. *Geografiska Annaler*, 1-143
- Carrasco B & Eaton L (1997) Genetic considerations for the conservation of Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl. Oerst.)). II Southern Connection Congress, Valdivia, Chile. *Noticiero de Biología*, 5: 139-140
- Carrasco B & Eaton L. Natural history and genetic structure of Raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl. (Oerst.)). *Forest Genetics* Enviado.
- Chaisurisri K, Edwards DGW & El-Kassaby YA (1992): Genetic Control of Seed Size and Germination in Sitka Spruce. *Silvae Genetica*, 41:348-355.
- Chauchard L (1989) Plan de ordenación Quilanlahue. Municipalidad de Junín de los Andes-Administración de Parques Nacionales. San Martín de los Andes, Neuquén-Argentina.
- Chauchard L, Sbrancia R, Gonzales Peñalba M, Rabino A, Maresca L & Blacher C (1997) Dinámica y manejo del bosque de *Nothofagus*. Universidad Nacional del Comahue-Administración de Parques Nacionales-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Informe final de Proyecto: 93 pp
- Cheliak WM & Pitel JA (1984) Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service, Agriculture Canada. Information Report PI-X-42.
- Clegg MT, Learn GH & Golenberg EM (1991) Molecular evolution of chloroplast DNA. In RL Selander et al (Eds.) *Evolution at the Molecular Level*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts: 135-149
- Clegg MT, Gaut BS, Learn GH Jr & Morton BR (1994) Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 91: 6795-6801
- Comps B, Thiébaud B, Paule TL, Merzeau D & Letouzey J (1990) Allozymic variability in beechwoods (*Fagus sylvatica* L.) over central Europe: spatial differentiation among and within populations. *Heredity*, 65: 407-417
- Comps B, Thiébaud B & Merzeau D (1991) Genetic variation in European beech stands (*Fagus sylvatica* L.). In G Müller-Starck & M Ziehe (Eds.) *Genetic Variation in European Populations of Forest Trees*. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main: 110-124

- Comps B, Gömöry D, Letouzey J, Thiebaut B & Petit JR (2001): Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics*, 157:389-397.
- Conkle MT (1992) Genetic diversity-seeing the forest through the trees. *New Forests*, 6: 5-22
- Crego P (1999) Variación genética en el comportamiento fenológico y el crecimiento juvenil de progenies puras e híbridas de raulí, *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue. 105 pp
- Cruz CG (1981) Ciclo Biológico del Microlepidóptero perforador de semilla de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst). Tesis Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile.
- Demesure B, Sodzi N & Petit JR (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4: 129-131
- Demesure B, Comps B & Petit RJ (1996) Chloroplast DNA Phylogeography of the Common Beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 50: 2515-2520
- Demesure B, Le Guerroué B, Lucchi G, Prat D & Petit JR (2000) Genetic variability of a scattered temperate forest tree: *Sorbus terminalis* L. (Crantz). *Ann.For.Sci.*, 57: 63-71
- Dettmann ME, Pocknall DT, Romero EJ & Zamaloa MC (1990) *Nothofagidites* Erdtman ex Potonié, 1960; a catalogue of species with notes on the paleogeographic distribution of *Nothofagus* Bl. (Southern Beech). *New Zealand Geological Survey Paleontological Bulletin*, 60: 1-79
- Di Castri F & Hajek ER (1976) *Bioclimatología de Chile*. Vicerrectoría Académica, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Dimitri MJ & Milano VA (1950) El nombre botánico del "Raulí". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 3: 85-87
- Dimitri MJ (1959) Aspectos fitogeográficos del Parque Nacional Lanín. *Anales de Parques Nacionales*, 8: 95-109
- Dimitri MJ (1972) *La región de los bosques Andino-patagónicos*. Colección Científica del INTA, Buenos Aires, Argentina: 381 pp
- Dirección General de Parques Nacionales (1961) Límite meridional del área geográfica de "Raulí" *Nothofagus nervosa* (Phil) Dimitri et Milano (syn. *N. procera* (Poepp) Perst.). Informe Interno.
- Donoso C (1979) Genecological differentiation in *Nothofagus obliqua* (Mirb) Oerst. in Chile. *Forest Ecology and Management*, 2: 53-66

- 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*. Editorial Universitaria, Chile: 484 pp
- Donoso C & Atienza J (1983) Hibridación natural entre especies de *Nothofagus* siempreverdes en Chile. *Bosque*, 5: 21-34
- Donoso C & Atienza J (1984) Hibridación natural entre *N. betuloides* (Mirb.) Oerst. y *N. nitida* (Phil.) Krasser. *Medio Ambiente*, Vol. 7(1): 9-16
- 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. *Revista Chilena de Historia Natural*, 63: 49-60
- Donoso C & Lara A (1995) Utilización de los bosques nativos en Chile: pasado, presente y futuro. En Armesto JJ, C Villagrán & M Kalin Arroyo (Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 363-388
- Dumolin S, Demesure B & Petit RJ (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theor Appl Genet*, 91: 1253-1256
- Dumolin-Lapègue S, Pemonge MH & Petit RJ (1997a) An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, 6: 393-397
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V & Petit RJ (1997b) Phylogeographic Structure of White Oaks Throughout the European Continent. *Genetics*, 146: 1-13
- Dunlap JR & Barnett JP (1982): Influence of seed on germination and early development of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) germinants. *Can.J.For.Res.*, 13:40-44.
- Edwards DGW & Wang BSP (1995): *A training guide for laboratory analysis of forest tree seeds*. Canadian Forest Service, Canada.
- El Mousadik A & Petit JR (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Molecular Ecology*, 5: 547-555
- Feret PP & Bergmann F (1976) Gel electrophoresis of protein and enzymes. In JP Miksche (Ed.) *Modern methods in forest genetics*. Springer. Berlin, Heidelberg, New York.: 49-77
- Ferris C, Oliver RP, Davy AJ & Hewitt GM (1993) Native oak chloroplasts reveal an ancient divide across Europe. *Molecular Ecology*, 2: 337-344
- Ferris C, Oliver RP, Davy AJ & Hewitt GM (1995) Using chloroplast DNA to trace postglacial migration routes of oaks into Britain. *Molecular Ecology*, 4: 731-738



- Fidalgo F & Rabassa J (1984) Los depósitos cuaternarios. En *Relatorio del IX° Congreso Geológico Argentino*, San Carlos de Bariloche: 301-316
- Fineschi S, Gillet E & Malvolti ME (1990) Genetics of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.). III: genetic analysis of zymograms of single tree offspring. *Silvae Genetica*, 39: 188-194
- Finkeldey R (1992) Auswahlkriterien und Anlage genetischer Ressourcen bei der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.). *Forstarchiv*, 63: 25-32
- Finkeldey R (1993) Die Bedeutung allelischer Profile für die Konservierung genetischer Ressourcen bei Waldbäumen. *Göttinger Forstgenetischer Berichte*, 14: 1-175
- Finkeldey R & Gregorius HR (1994) Genetic resources: Selection criteria and design. In ZS Kim & Hattemer HH (Eds.) *Conservation and manipulation of genetic resources in forestry*. Kwang Moon Kag, Seoul: 322-347
- Flint RF & Fidalgo F (1963) Geología glacial de la zona de borde entre los paralelos 39° 10' y 41° 20' de latitud Sur en la Cordillera de los Andes, República Argentina. Ministerio de Economía de la Nación. Secretaría de Industria y Minería, Subsecretaría de Minería. Dirección Nacional de Geología y Minería. Boletín 93: 1-7
- Flint RF & Fidalgo F (1964) Glacial geology of the East flank of the Argentine Andes between Latitude 39°10'S and Latitude 41°20'S. *Geological Society of America Bulletin*, 75: 335-352
- Flint RF & Fidalgo F (1969) Glacial drift in the Eastern Argentine Andes between Latitude 41° 10' S and Latitude 43° 10' S. *Geological Society of America Bulletin*, 80: 1043-1052
- Futuyma DJ (1986) *Evolutionary biology*. 2° ed. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, USA. 600 pp
- Gallo LA (1993) Proyecto "Conservación y utilización de los recursos genéticos forestales patagónicos". GTZ (Sociudad Alemana de Cooperación Técnica), Proyecto N° 9348 "Nutzung und Konservierung patagonischer forstlicher Genressourcen", 7 pp
- Gallo LA (1995) Supuestos híbridos interespecíficos en progenies de Raulí. Actas XXVI Congreso Argentino de Genética, Bariloche, Argentina: 34
- Gallo LA (2000) Modelling natural inter-specific hybridisation between two mountain southern beeches (*Nothofagus* spp). Symposium "Modelling and experimental research on genetic processes in tropical and temperate forests". French Guiana. Abstracts book, p 31.
- Gallo LA & Geburek T (1991) Genetics of isozyme variants in *Populus tremula*, *P. tremuloides* and their hybrids. *Euphytica*, 53: 225-233

- Gallo LA, Marchelli P & Breitembücher A (1997a) Allozymic heterozygosity in families with natural hybrids between two southern beeches (*Nothofagus spp.*). II Southern Connection Congress., Valdivia, Chile. *Noticiero de Biología*, 5: 152
- Gallo LA, Marchelli P & Breitembücher A (1997b) Morphological and allozymic evidence of natural hybridization between two southern beeches (*Nothofagus spp.*) and its relation to heterozygosity and height growth. *Forest Genetics*, 4: 15-23
- Gallo LA, Marchelli P & Crego, P (2000a) Hybridisation dynamic between two southern beeches (*Nothofagus spp.*). XXI IUFRO World Congress, Kuala Lumpur, Malaysia. Abstracts book, Vol. 2: 43-44
- Gallo LA, Marchelli P, Crego P, Oudkerk L, Izquierdo F, Breitembücher A, Gonzalez M, Chauchard L, Maresca L, Cuerpo de Guardaparques de los Parques Nacionales Lanín y Nahuel Huapi & Mele U (2000b) Distribución y variación genética en características seminales y adaptativas de poblaciones y progenies de raulí en Argentina. En R Ipinza Carmona, B Gutiérrez Caro & V Emhart Schmidt (Eds.) *Domesticación y Mejora Genética de raulí y roble*. Universidad Austral de Chile-Instituto Forestal, Valdivia, Chile: 133-156
- Gallo LA, Marchelli P & Crego P (2000c) Dinámica de hibridación interespecífica entre raulí y roble pellín. En R Ipinza Carmona, B Gutiérrez Caro & V Emhart Schmidt (Eds.) *Domesticación y Mejora Genética de raulí y roble*. Universidad Austral de Chile-Instituto Forestal, Valdivia, Chile: 181-196
- Gillet E (1994) Genetic Structures from Electrophoresis Data. version 1.0
- Gillet E (1999) DNA Markers - Concepts and characteristics. In Gillet E. (Ed.) *Which DNA marker for which purpose?* Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Program Molecular Tools for Biodiversity. Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen, Göttingen, Alemania: 7-14 URL: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Gillet E & Hattermer HH (1989) Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. *Heredity*, 63: 135-141
- Glaubitz JC & Moran GF (2000) Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. In A Young, D Boshier & T Boyle (Eds.) *Forest Conservation Genetics*. CABI Publishing, Oxon, UK: 39-62
- Godoy M (1994) Determinación de isoenzimas y análisis genéticos en *Nothofagus nervosa* (Phil) Dim et Mil (raulí). Magister Thesis, Universidad Georg-August, Göttingen, Alemania.
- Gonzales Peñalba M, Chauchard L, Maresca L, Perez A, Iglesias G, Gross M, Raponi C, Vazquez M & Sbrancia R (1997) Plan de gestión ambiental de la cuenca del Lago Lolog. Relevamiento forestal de la cuenca del Lago Lolog en el área de Reserva Nacional. Primera Etapa. Municipalidad de San Martín de los Andes. Administración de Parques Nacionales. 25 pp

- Gregorius HR (1974) On the concept of genetic distance between populations based on gene frequencies. IUFRO Meeting, Stockholm, S.02.04.1-3: 17-26
- Gregorius HR (1978) The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Mathematical Biosciences*, 41: 253-271
- Gregorius HR (1980) The probability of losing an allele when diploid genotypes are sampled. *Biometrics*, 36: 643-652
- Gregorius HR (1985) Measurement of genetic differentiation in plant populations. In Gregorius HR (Ed.) *Population genetics in forestry*. Lectures notes in Biomathematica, 60: 276-285
- Gregorius HR (1987) The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theor. Appl. Genet.*, 74: 397-401
- Gregorius HR & Bergmann F (1995) Analysis of isoenzyme genetic profiles observed in forest tree populations. In Ph Baradat, Adams WT & Müller-Starck G (Eds.) *Population genetics and genetic conservation of forest trees*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands: 79-96
- Gregorius HR, Krauhausen J & Müller-Starck G (1986) Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in a stand of *Fagus sylvatica* L. *Heredity*, 57: 255-262
- Gregorius HR & Roberds JH (1986) Measurement of genetical differentiation among subpopulations. *Theor. Appl. Genet.*, 71: 826-834
- Gugerli F, Sperisen C, Büchler U, Magni F, Geburek T, Jeandroz S & Senn J (2001): Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial recolonization of the western Alps. *Molecular Ecology* 1255-1263., 10:1255-1263.
- Haase P (1992) Isozyme variability and biogeography of *Nothofagus truncata* (Fagaceae). *New Zealand Journal of Botany*, 30: 315-328
- Haase P (1993) Isozyme studies of New Zealand *Nothofagus* Species (Southern Beech) Using leaf extracts. *Silvae Genetica*, 42: 46-51
- Haase P (1994) Genetic relationships and inferred evolutionary divergence in the New Zealand taxa of *Nothofagus*- Results from isozyme analysis. *Australian Systematic Botany*, 7: 47-55
- Hagemann R & Schroder MB (1989) The cytological basis of the plastid inheritance in angiosperms. *Protoplasma*, 152: 57-64
- Hamrick JL, Godt MJW & Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6: 95-124
- Hamrick JL & Nason JD (2000) Gene flow in forest trees. In A Young, D Boshier & T Boyle (Eds.) *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. CABI Publishing., Oxon, UK: 81-90

- Harper JL, Lovell PH & Moore KG (1970) The shape and sizes of seeds. *Ann.Rev.Ecol.Syst.*, 1:327-356.
- Hartl DL & Clarck AG (1989) *Principles of population genetics*. 2° ed. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, 682 pp
- Hattermer HH (1991a) Genetic Analysis and Population Genetics. In Fineschi S, Malvolti ME, F Cannata & Hattermer HH (Eds.) *Biochemical markers in the population genetics of forest trees*. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands: 5-22
- Hattermer HH (1991b) Measuring genetic variation. In Müller-Starck G & Ziehe M (Eds.) *Genetic variation in European Populations of Forest Trees*. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main: 2-19
- Hattermer HH (1995) Concepts and requirements in the conservation of forest genetic resources. *Forest Genetics*, 2: 125-134
- Hattermer HH, Bergmann F & Ziehe M (1993) *Einführung in die Genetik*. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main: 492 pp
- Heusser CJ (1984) Late-glacial-Holocene climate of Lake District of Chile. *Quaternary Research*, 22: 77-90
- Heusser CJ, Lowell TV, Heusser LE, Hauser A & Björn G (1996) Full-glacial-late-glacial paleoclimate of the Southern Andes: evidence from pollen, beetle and glacial records. *Journal of Quaternary Science*, 11: 173-184
- Hewitt GM (1999) Post - glacial re - colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68:87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405:907-913.
- Hill RS (1992) *Nothofagus*: Evolution from a southern perspective. *TREE*, 7: 190-194
- Hill RS & Dettmann ME (1996) Origin and diversification of the genus *Nothofagus*. In TT Veblen, Hill RS & J Read (Eds.) *The ecology and biogeography of Nothofagus forest*. Yale University, New Haven & London: 11-24
- Hill RS & Jordan GJ (1993) The evolutionary history of *Nothofagus* (Nothofagaceae). *Australian Systematic Botany*, 6: 111-126
- Hill RS & Read J (1991) A revised infrageneric classification of *Nothofagus* (Fagaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 105: 37-72
- Hiroki S & Matsubara T (1995) Fluctuation of nut production and seedling appearance of a Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Ecological Research*, 10:161-169.
- INTA-APN (1995) Proyecto de investigación: Estudio de la variación genética en Raulí (*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil.) y Roble Pellín (*Nothofagus obliqua*

- (Mirb.) Oerst.). Primera etapa: ensayos de orígenes de raulí. IV Jornadas Forestales Patagónicas, San Martín de los Andes: 633-634
- Ipinza R & Espejo J (2000) Biología reproductiva en *Nothofagus*. En R Ipinza Carmona, B Gutiérrez Caro & V Emhart Schmidt (Eds.) *Domesticación y Mejora Genética de raulí y roble*. Universidad Austral de Chile-Instituto Forestal, Valdivia, Chile: 75-94
- ISTA (1976) International rules for seed testing. Rules and annexes. International Seed Testing Association, Seed Sci. and Technol. 4: 3-177
- Karp A, Isaac PG & Ingram DS (1998) *Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals*. Chapman & Hall, London, UK: 498 pp
- Kim ZS (1979) Inheritance of leucine aminopeptidase and acid phosphatase isoenzymes in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica*, 28: 68-71
- Kitzberger T & Veblen TT (1999) Fire-induced changes in northern Patagonian landscapes. *Landscape Ecology*, 14: 1-15
- Kodama KP, Rabassa J, Evenson EB & Clinch JM (1986) Paleomagnetismo y edad relativa del drift Pichileufu en su área tipo, San Carlos de Bariloche, Río Negro. *Asociación Geológica Argentina, Rev.*, XLI: 165-178.
- 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.
- Konnert M & Bergmann F (1995) The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution*, 196:19-30.
- Kremer A & Petit JR (1993) Gene diversity in natural populations of oak species. *Ann. Sci. For.*, 50: 186s-202s
- Langdon OG (1958) Cone and Seed Size of South Florida Slash Pine and Their Effects on Seedling Size and Survival. *Journal of Forestry*, 56:122-127.
- Lara A, Rutherford P, Montory C, Bran D, Perez A, Clayton S, Ayesa J, Barrios D, Gross M & Iglesias G (1999) Mapeo de la Eco-región de los bosques Valdivianos. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires. *Boletín Técnico de la Fundación Vida Silvestre Argentina*, 51: 1-27
- Ledgard NJ & Cath PW (1983) Seed of New Zealand *Nothofagus* species. Studies of seed weight, viability, shape and the effect of varying stratification periods. *New Zealand Journal of Forestry*, 28: 150-161
- Ledig FT (2000) Founder effects and the genetic structure of coulter pine. *The Journal of Heredity*, 91:307-315.

- Lennon JA, Martin ES, Stevens RA & Wigston DL (1987) *Nothofagus nervosa* (Phil) Dim. et Mil.-The correct name for rauli, Chilean southern beech, (*N. Procera*). *Arboricultural Journal*, 11: 323-332
- Lewontin RC (1985) Population genetics. *Ann.Rev.Gent.*, 19: 81-102
- Linder HP & Crisp MD (1995) *Nothofagus* and Pacific biogeography. *Cladistics*, 11: 5-32
- Linhart YB, Mitton JB, Sturgeon KB & Davis ML (1981) Genetic variation in space and time in a population of Ponderosa pine. *Heredity*, 46: 407-426
- Lumaret R & Michaud H (1991) Genetic variation in holm oak populations. In Müller-Starck G & Ziehe M (Eds.) *Genetic variation in European populations of forest trees*. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main: 167-172
- Machon N, Burel M, Lefranc M & Frascaria - Lacoste N (1996) Evidence of genetic drift in chestnut populations. *Can.J.For.Res*, 26:905-908.
- Manos PS (1997) Systematics of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on rDNA spacer sequences (ITS): Taxonomic congruence with morphology and plastid sequences. *American Journal of Botany*, 84: 1137-1155
- Manos PS, Nixon KC & Doyle JJ (1993) Cladistic analysis of restriction site variation within the chloroplast DNA inverted repeat region of selected Hamamelididae. *Systematic Botany*, 18: 551-562.
- Manos PS & Steele KP (1997) Phylogenetic analysis of "higher" Hamamelididae based on plastid sequence data. *American Journal of Botany*, 84: 1407-1419
- Marchelli P & Gallo LA (1995) Variación en el peso de las semillas de 15 procedencias de *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. IV Jornadas Forestales Patagónicas, San Martín de los Andes, Argentina, Tomo I: 188-193
- Marchelli P, Gallo LA, Scholz F & Ziegenhagen B (1998) Chloroplast DNA markers revealed a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 642-646
- Marchelli P & Gallo LA (1999) Annual and geographic variation in seed traits of Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *Forest Ecology and Management*, 121: 239-250
- Marchelli P & Gallo LA (2000a) Large scale hybridisation process between two *Nothofagus* species from South America temperate forests. III Southern Connection Congress, Canterbury, New Zealand., Wickliffe Press Ltd., New Zealand: 48
- Marchelli P & Gallo LA (2000b) Variación aloenzimática, de ADN de cloroplasto y de ADN nuclear en poblaciones y progenies de raulí en Argentina. En R Ipinza Carmona, B Gutiérrez Caro & V Emhart Schmidt (Eds.) *Domesticación y Mejora Genética de raulí y roble*. Universidad Austral de Chile-Instituto Forestal, Valdivia, Chile: 157-180

- Marchelli P & Gallo LA (2000c) Genetic analysis of isozyme variants in open pollinated families of Southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *Silvae Genetica*, 4: 90-98.
- Marchelli P & Gallo LA (2000d) Genetic differentiation among Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa*. Symposium "Modelling and experimental research on genetic processes in tropical and temperate forests". French Guiana. Book of Abstracts: 30
- Marchelli P & Gallo LA (2001) Genetic diversity and differentiation in a southern beech subjected to introgressive hybridisation. *Heredity*, 87: 284-293
- Markgraf V (1983) Late and postglacial vegetational and paleoclimatic changes in subantarctic, temperate, and arid environments in Argentina. *Palynology*, 7: 43-70
- Markgraf V (1984) Late Pleistocene and Holocene vegetation history of temperate Argentina: Lago Morenito, Bariloche. *Dissertationes Botanicae (Festschrift Welten)*, 72: 235-254
- Markgraf V (1987) Paleoenvironmental changes at the northern limit of the subantarctic *Nothofagus* forest, Lat. 37° S, Argentina. *Quaternary Research*, 28: 119-129
- Markgraf V (1989) Palaeoclimates in Central and South America since 18,000 BP based on pollen and lake-level records. *Quaternary Science Reviews*, 8: 1-24
- Markgraf V (1997) Character, timing and forcing of late quaternary climate change in southern South America. II Southern Connection Congress, Valdivia, Chile. *Noticiero de Biología*, 5: 62
- Markgraf V & Bianchi MM (1999) Paleoenvironmental changes during the last 17,000 years in western Patagonia: Mallín Aguado, Province of Neuquén, Argentina. In F Schäbitz & H Liebricht (Eds.) *Beiträge zur quartären Landschaftsentwicklung Südamerikas. Festschrift zum 65. Geburtstag von Professor Dr. Karsten Garleff.(= Bamberger Geographische Schriften 19)*, Bamberg: 175-193
- Markgraf V, McGlone M & Hope G (1995) Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems- a southern perspective. *TREE*, 10: 143-147
- Markgraf V, Romero EJ & Villagran C (1996) History and Paleoecology of South American *Nothofagus* forests. In TT Veblen, Hill RS & J Read (Eds.) *The ecology and biogeography of Nothofagus forests*. Yale University Press, New Haven & London: 354-386
- Martin PG & Dowd JM (1993) Using sequences of *rbcL* to study phylogeny and biogeography of *Nothofagus* species. *Australian Systematic Botany*, 6: 441-447
- Mátyás G & Sperisen C (2001) Chloroplast DNA polymorphisms provide evidence for postglacial re-colonisation of oaks (*Quercus* spp.) across the Swiss Alps. *Theor Appl Genet*, 102:12-20.

- Mendel G (1866) Versuche über Pflanzenhybriden. *Verh.Naturforsch.Ver.in Brünn*, 4: 3-47
- Mercer JH (1976) Glacial history of southernmost South America. *Quaternary Research*, 6: 125-166
- Merzeau D, Comps B, Thiébaud B, Cuguen J & Letouzey J (1994) Genetic structure of natural stands of *Fagus sylvatica* L. (beech). *Heredity*, 72: 269-277
- Merzeau D, Giusto F, Comps B, Thiébaud B, Letouzey J, & Cuguen J (1989) Genetic control of isozyme systems and heterogeneity of pollen contribution in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica*, 38: 195-201
- Metcalf I (1990) Allochthonous terrane processes in Southeast Asia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, 331: 625-640
- Montgomery DC (1997) *Design and analysis of experiments*. Jhon Wiley & Sons, New York.
- Moreno P (1997a) Vegetation and climate change during the last glacial maximum and the last termination in the Chilean lake district. II Southern Connection Congress, Valdivia, Chile. *Noticiero de Biología*, 5: 116
- Moreno P (1997b) Vegetation and climate near Lago Ilanquihue in the Chilean Lake district between 20200 and 9500 <sup>14</sup>C yr BP. *Journal of Quaternary Science*, 12: 485-500
- Müller-Starck G (1985a) Genetic differences between "tolerant" and "sensitive" beeches (*Fagus sylvatica* L.) in an environmentally stressed adult forest stand. *Silvae Genetica*, 34: 241-247
- Müller-Starck G (1985b) Reproductive success of genotypes of *Pinus sylvestris* L. in different environments. In HR Gregorius (Ed) *Population Genetics in Forestry*. Springer-Verlag. *Lecture Notes in Biomathematics*, 60: 118-133
- Müller-Starck G (1992) Genetic control and inheritance of isoenzymes in poplars of the Tacamahaca section and hybrids. *Silvae Genetica*, 41: 87-95
- Müller-Starck G, Baradat Ph & Bergmann F (1992) Genetic variation within European tree species. *New Forests*, 6: 23-47
- Müller-Starck G & Gregorius HR (1986) Monitoring genetic variation in forest tree populations. 18th IUFRO World Congress, Ljubljana. Division 2: 589-599
- Müller-Starck G & Starke R (1993) Inheritance of isoenzymes in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Journal of Heredity*, 84: 291-296
- Müller-Starck G, Zanetto A, Kremer A & Herzog S (1996) Inheritance of isoenzymes in sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) and offspring from interspecific crosses. *Forest Genetics*, 3: 1-12



- Müller-Starck G & Ziehe M (1991) Genetic variation in populations of *Fagus sylvatica* L., *Quercus robur* L. and *Q. petraea* Liebl. in Germany. In G Müller-Starck & M Ziehe (Eds.) *Genetic variation in European populations of forest trees*. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main: 125-140
- Muñoz C (1964) La justificación del nombre *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oersted, para el raulí. *Boletín de la Universidad de Chile*, 52: 59-61
- Nei M (1972) Genetic Distance Between Populations. *The American Naturalist*, 106: 283-292
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. of the National Academy of Sciences*, 70: 3321-3323
- Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ & Ennos RA (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology & Evolution*, 14:140-145.
- Nixon KC (1989) The origin of Fagaceae: evolution, systematics, and fossil history of the Hamamelidae. In PR Crane & S Blackmore (Eds.) *Systematic Association Special Vol. 40B* Clarendon Press, Oxford: 23-43
- Ordoñez A (1986) Germinación de las tres especies de *Nothofagus* siempreverdes (Coigües), y variabilidad en la germinación de procedencias de Coigüe común (*Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst.). Tesis Fac. de Cs. Forestales, U. Austral de Chile.
- Palmer JD (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *The American Naturalist*, 130, Supplement: S6-S29
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC & Fuerst PA (1998) What Molecules Can Tell Us About Populations: Choosing and using a molecular Marker. *Ecology*, 79: 361-382
- Pastorino MJ (2001) Genetic variation and reproduction system of *Austrocedrus chilensis* (D.Don) Florin et Boutelje, a cypress endemic to the Andean-Patagonian Forest. PhD Thesis, Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology. Georg-August University of Göttingen. Cuvillier Verlag, Göttingen: 166 pp
- Pastorino MJ & Gallo LA (1998) Inheritance of isozyme variants in *Austrocedrus chilensis* (D.Don) Florin et Boutelje. *Silvae Genetica*, 47: 15-20
- Pastorino MJ & Gallo LA (2000) Variación geográfica en peso de semilla en poblaciones naturales argentina de "Ciprés de la Cordillera". *Bosque*, 21: 95-109
- Petit JR, Demesure B & Dumolin S (1998) cpDNA and mtDNA primers in plants. In A Karp, PG Isaac & DS Ingram (Eds.) *Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals*. Chapman & Hall, London, UK: 256-261
- Petit JR, Kremer A & Wagner DB (1993) Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theor.Appl.Genet.*, 87: 122-128

- Poeppig, EF & Endlicher SL (1938) *Nova Genera ac Species Plantarum*, 2:68-69
- Porter SC (1981) Pleistocene glaciation in the southern Lake District of Chile. *Quaternary Research*, 16:263-292
- Poulik MD (1957) Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 180: 1477-1479
- Premoli AC (1991) Morfología y capacidad germinativa en poblaciones de *Nothofagus antarctica* (Foster) Oerst. del noroeste andino patagónico. *Bosque*, 12: 53-59
- Premoli AC (1994) Genetic, morphological, and ecophysiological variation in geographically restricted and widespread species of *Nothofagus* from southern South America. PhD Thesis, University of Colorado: 148 pp
- Premoli AC (1996a) Leaf architecture of South American *Nothofagus* (Nothofagaceae) using traditional and new methods in morphometrics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121:25-40.
- Premoli AC (1996b) Allozyme polymorphisms, outcrossing rates, and hybridization of South American *Nothofagus*. *Genetica*, 97: 55-64
- Premoli AC (1997) Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*. *Journal of Biogeography*, 24: 883-892
- Premoli AC (1998) Use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas for more widespread species. In International Foundation for Science (IFS) (Ed.) *Proceedings of an IFS Workshop: Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management*, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil: 157-177
- Premoli AC, Kitzberger T & Veblen TT (2000a) Conservation genetics of the endangered conifer *Fitzroya cupressoides* in Chile and Argentina. *Conservation genetics*, 1: 57-66
- Premoli AC, Kitzberger T & Veblen TT (2000b) Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography*, 27: 251-260
- Rabassa J, Evenson EB, Clinch JM, Schlieder G, Zeitler P & Stephens GC (1990) Geología del cuaternario del valle del Río Malleo, provincia del Neuquén. *Asociación Geológica Argentina, Rev.*, XLV: 55-68
- Rabassa J & Clapperton CM (1990) Quaternary glaciations in the southern Andes. *Quaternary Science Reviews*, 9: 153-174
- Ramírez C, Correa M, Figueroa H & San Martín J (1985) Variación del hábito y hábitat de *Nothofagus antarctica* en el Centro Sur de Chile. *Bosque*, 6: 55-73

- Rodríguez G (1990) Propagación de *Nothofagus* chilenos por medio de semillas. *Agro-Ciencia*, 6: 123-129
- Romero EJ (1986) Fossil evidence regarding the evolution of *Nothofagus* Blume. *Ann.Missouri Bot.Gard.*, 73: 276-283
- Rusch VE (1987) Estudio sobre la regeneración de la lenga (*Nothofagus pumilio*) en la cuenca del Río Manso Superior, Río Negro. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Buenos Aires. Sin publicar.
- Rusch VE (1993) Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 66: 131-141
- Saidman BO (1986) Isoenzymatic Studies of Alcohol Dehydrogenase and Glutamate Oxalacetate Transaminase in four South American Species of *Prosopis* and their Natural Hybrids. *Silvae Genetica*, 35: 3-10
- Saidman BO & Vilardi JC (1987) Analysis of the genetic similarities among seven species of *Prosopis* (Leguminosae: Mimosoideae). *Theor. Appl.Genet.*, 75: 109-116
- Saiki RK, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354
- Samuel R, Pinsker W & Ehrendorfer F (1995) Electrophoretic analysis of genetic variation within and between populations of *Quercus cerris*, *Q. pubescens*, *Q. petraea* and *Q. robur* (Fagaceae) from Eastern Austria. *Bot.Acta*, 108: 290-299
- San Martin J & Donoso C (1995) Estructura florística e impacto antrópico en el bosque Maulino de Chile. En Armesto JJ, C Villagran & M Kalin Arroyo (Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 153-168
- SAS (1999) Language guide for personal computers. SAS Institute Inc.
- Schemske DW, Husband BC, Ruckelhaus MH, Goodwillie C, Parker IM & Bishop JG (1994) Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*, 75: 584-606
- Schlegel FS, Veblen TT & Escobar RB (1979) Estudio ecológico de la estructura, composición, semillazón y regeneración del bosque de Lenga (*Nothofagus pumilio*) XI Región. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ingeniería Forestal, Serie Técnica.
- Setoguchi H, Ono M, Doi Y, Koyama H & Tsuda M (1997) Molecular phylogeny of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on the *atpB* - *rbcL* intergenic spacer of the chloroplast DNA. *J.Plant Res.*, 110: 469-484

- Shoulders E (1961) Effect of Seed Size on Germination, Growth, and Survival of Slash Pine. *J.For.*, 59:363-365.
- Silvertown J (1987) *Introduction to plant population ecology*. Longman Scientific & Technical, Singapore.
- Silvertown J (1989) The Paradox of Seed Size and Adaptation. *TREE*, 04:24-28.
- Slatkin M (1985) Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 53-65
- Slatkin M & Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43: 1349-1368
- Smitinand T (1995) Overview of the status of biodiversity in tropical and temperate forests. In: Boyle TJB & Boontawee B (Eds.) *Measuring and monitoring biodiversity in tropical and temperate forests*. Proceedings of a IUFRO Symposium, Chiang Mai, Thailand: 1-4
- Sokal RR & Rohlf FJ (1969) *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H Blume Ediciones, Madrid, España.
- Soltis DE, Soltis PS & Milligan BG (1992) Intraspecific Chloroplast DNA Variation: Systematic and Phylogenetic Implications. In Soltis PS, Soltis DE & Doyle JJ (Eds.) *Molecular systematics of plants*. Chapman & Hall, New York: 117-150
- Stern K & Roche L (1974) Genetics of forest ecosystems. In Jacobs J, Lange OL, Olson JS, Wieser W. (Eds.) *Ecological Studies*, 6.: 1-330
- Swenson U, Hill RS & McLoughlin S (2000) Ancestral area analysis of *Nothofagus* (Nothofagaceae) and its congruence with the fossil record. *Australian Systematic Botany*, 13: 469-478
- Szmidt AE & Wang XR (2000) Genetic markers in forest genetics-the tunnel remains dark. In Mátyás C (Ed.) *Forest genetics and sustainability*, 63. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 31-48
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G & Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109
- Thiébaud B, Lumaret R & Vernet Ph (1982) The Bud Enzymes of Beech (*Fagus sylvatica* L.) Genetic Distinction and Analysis of Polymorphism in Several French Populations. *Silvae Genetica*, 31: 51-60
- Tomaru N, Mitsutsuji T, Takahashi M, Tsumura Y, Uchida K & Ohba K (1997) Genetic diversity in *Fagus crenata* (Japanese beech): influence of the distributional shift during the late-Quaternary. *Heredity*, 78: 241-251
- Tripathi RS & Khan ML (1990) Effects of seed weight and microsite characteristics on germination and seedling fitness in two species of *Quercus* in a subtropical wet hill forest. *Oikos*, 57:289-296

- Tsumura Y, Suyama Y & Yoshimura K (2000) Chloroplast DNA inversion polymorphism in populations of *Abies* and *Tsuga*. *Mol.Biol.Evol.*, 17: 1302-1312
- Tsumura Y, Taguchi H, Suyama Y & Ohba K (1994) Geographical cline of chloroplast DNA variation in *Abies mariesii*. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 922-926
- Turok J (1993) Levels of genetic variation in 20 beech (*Fagus sylvatica* L.) populatons from western Germany. In HJ Muhs & G von Wuehlisch (Eds.) *The scientific basis for the evaluation of forest genetic resources of beech*. Proceedings of an EC Workshop, Ahrensburg. Working document of the EC, DG VI, Brussels: 181-195
- Van Steenis CGGJ (1953) Results of the Archbold Expeditions - Papuan *Nothofagus*. *Journal of the Arnold Arboretum*, XXXIV: 301-373
- Veblen TT, Donoso C, Kitzberger T & Rebertus AJ (1996) Ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* Forests. In TT Veblen, Hill RS & J Read (Eds.) *The ecology and biogeography of Nothofagus forest*. Yale University, New Haven & London: 293-353
- Veblen TT, Kitzberger T, Burns BR & Rebertus AJ (1995) Perturbaciones y dinámica de regeneración en bosques andinos del sur de Chile y Argentina. En Armesto JJ, C Villagran & M Kalin Arroyo (Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 169-198
- Veblen TT, Schlegel FM & Oltremari JV (1983) Temperate broad-leaved evergreen forests of South America. In JD Ovington (ed.) *Temperate Broad-Leaved Forests*. Elsevier, Amsterdam: 5-31
- Veit H & Garleff K (1995) Evolución del paisaje cuaternario y los suelos en Chile central-sur. En Armesto JJ, C Villagran & M Kalin Arroyo (Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 29-50
- Verga A (1995) Genetische Untersuchungen an *Prosopis chilensis* und *P.flexuosa* (Mimosaceae) im trockenen Chaco Argentinien. PhD Thesis, Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen, Göttingen Research Notes in Forest Genetics, 19: 1-96
- Verheggen FJ & Farmer REJr (1983) Genetic and Environmental Variance in Seed and Cone Characteristics of Black Spruce in a Northwestern Ontario Seed Orchard. *The Forestry Chronicle*, 59:191-193.
- Villagran C (1991) Historia de los bosques templados del sur de Chile durante el Tardiglacial y Postglacial. *Revista Chilena de Historia Natural*, 64: 447-460
- Villagran C, Moreno P & Villa R (1995) Antecedentes palinológicos acerca de la historia cuaternaria de los bosques chilenos. En Armesto JJ, C Villagran & M Kalin Arroyo (Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 51-70
- Villani F, Pigliucci M, Benedettelli S & Cherubini M (1991) Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Heredity*, 66: 131-136

- Vuilleumier BS (1971) Pleistocene changes in the fauna and flora of South América. *Science*, 173: 771-780
- Wardle J (1984) *The New Zealand beeches*. New Zealand Forest Service, New Zealand: 447 pp
- Werner J (1987) Determinación de períodos óptimos de estratificación para semillas de diferentes procedencias de Raulí. Tesis, Fac. de Cs. Forestales, U. Austral de Chile.
- Wright JW (1976) *Introduction to forest genetics*. Academic Press, New York: 463 pp
- Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations. Vol. 4 Variability within and among natural populations*. The University of Chicago Press, Chicago: 580 pp
- Yeh F & Boyle T (1997) POPGENE Microsoft Window-based Software for Population Genetics Analysis. Version 1.2
- Yeh FC (2000) Population genetics. In A Young, D Boshier & T Boyle (Eds.) *Forest Conservation Genetics*. CABI Publishing, Oxon, UK: 21-38
- Zanetto A, Roussel G & Kremer A (1994) Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus rubur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Forest Genetics*, 1: 111-123
- Zanetto A & Kremer A (1995) Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. I. Monolocus patterns of variation. *Heredity*, 75: 506-517
- Zanetto A, Kremer A, Müller-Starck G & Hattemer HH (1996) Inheritance of isozymes in Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.). *The Journal of Heredity*, 87: 364-370
- Ziegenhagen B, Guillaumat P & Scholz F (1993) A Procedure for Mini-Preparations of Genomic DNA from Needles of Silver Fir (*Abies alba* Mill.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 11: 117-121
- Ziegenhagen B, Kormutak A, Schauerte M & Scholz F (1995) Restriction site polymorphism in chloroplast DNA of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Forest Genetics*, 2: 99-107

## Apéndice I

### Tablas y figuras complementarias al Capítulo I

Tabla 1: Clasificación infragenérica de *Nothofagus* de acuerdo a Hill & Read (1991). En cada subgénero se indica el tipo de polen y entre paréntesis en cada especie la distribución geográfica (SA: Sudamérica; NZ: Nueva Zelanda; A: Australia; NC: Nueva Caledonia; NG: Nueva Guinea)

Subgénero <i>Nothofagus</i> <i>fusca</i> tipo 1	Subgénero <i>Fuscospora</i> <i>fusca</i> tipo 2	Subgénero <i>Lophozonia</i> <sup>1</sup> <i>menziessi</i>	Subgénero <i>Brassospora</i> <i>brassi</i>
Sección <i>Nothofagus</i>			
<i>N. antarctica</i> (SA)	<i>N. alessandri</i> (SA)	<i>N. nervosa</i> (= <i>N. alpina</i> ) (SA)	<i>N. aequilateralis</i> (NC)
<i>N. betuloides</i> (SA)	<i>N. fusca</i> (NZ)	<i>N. cunninghamii</i> (A)	<i>N. balansae</i> (NC)
<i>N. dombeyi</i> (SA)	<i>N. gunnii</i> (A)	<i>N. glauca</i> (SA)	<i>N. baumanniae</i> (NC)
<i>N. nitida</i> (SA)	<i>N. solandri</i> (NZ)	<i>N. menziesii</i> (NZ)	<i>N. brassii</i> (NG)
	<i>N. truncata</i> (NZ)	<i>N. moorei</i> (A)	<i>N. carrii</i> (NG)
		<i>N. obliqua</i> (SA)	<i>N. codonandra</i> (NC)
Sección <i>Pumiliae</i>			
<i>N. pumilio</i> (SA)			<i>N. crenata</i> (NG)
			<i>N. discoidea</i> (NC)
			<i>N. flaviramea</i> (NG)
			<i>N. grandis</i> (NG)
			<i>N. nuda</i> (NG)
			<i>N. perryi</i> (NG)
			<i>N. pseudoresinosa</i> (NG)
			<i>N. pullei</i> (NG)
			<i>N. resinosa</i> (NG)
			<i>N. rubra</i> (NG)
			<i>N. starkenborghii</i> (NG)
			<i>N. stylosa</i> (NG)
			<i>N. womersleyi</i> (NG)

<sup>1</sup> En el trabajo de Hill & Read (1991) se proponía el nombre *Menziesospora*, pero posteriormente se cambió por *Lophozonia* (Hill & Jordan, 1993).

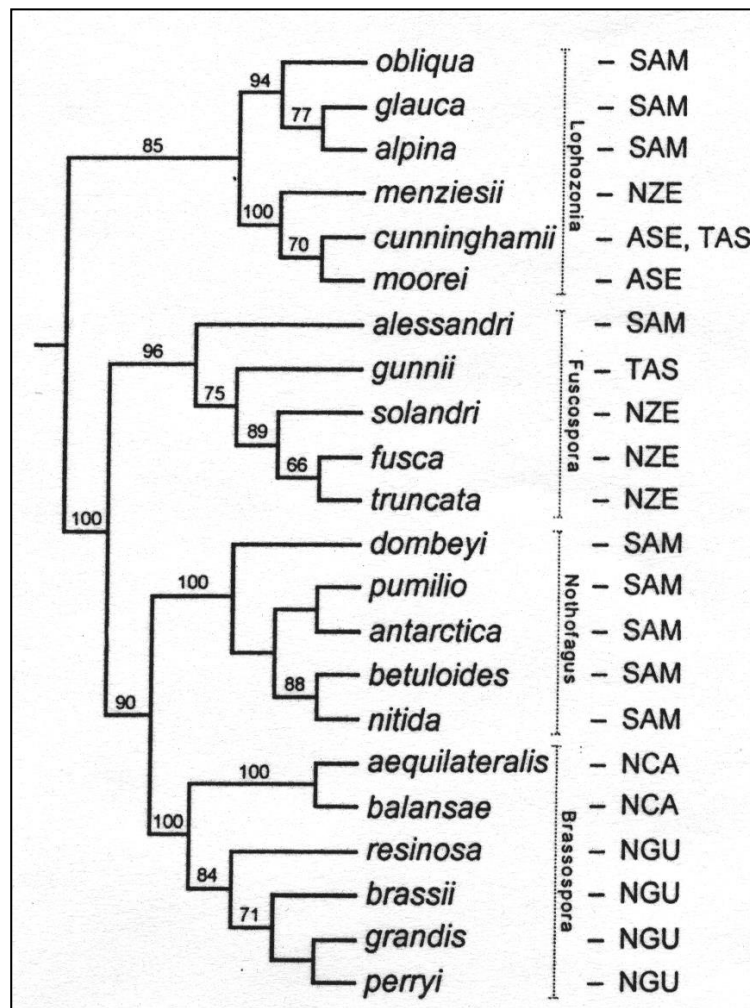


Figura 1: Filogenia de *Nothofagus* según Manos (1997), estimada en base a la combinación de datos morfológicos, de secuencias ITS nucleares y de secuencias del gen *rbcL* de cloroplasto. Los subgéneros y las áreas de endemismos se indican a la izquierda (ASE: SudEste de Australia; NCA: Nueva Caledonia; NGU: Nueva Guinea; NZE: Nueva Zelanda; SAM: Sudamérica; TAS: Tasmania). Los números sobre cada barra son los valores de bootstrap superiores a 50 %.  
(Tomado de Swenson et al., 2000).



## Apéndice IB

### Resultados de los test ANOVA correspondientes al Capítulo II

Tabla 1: Análisis de la Variancia. Variable: Producción de semillas

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr > F
Población	27	4450355.754	164827.991	1.35	0.1642
Año	3	6532791.229	2177597.076	17.83	<.0001
Error	63	7693145.27	122113.42		
Total	93	18495835.71			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 2: Análisis de la Variancia. Variable: Proporción de semillas dañadas por insectos

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr > F
Población	27	44982.28983	1666.01073	81.04	<.0001
Año	3	24772.12997	8257.37666	401.64	<.0001
Interacción	41	19692.22548	480.29818	23.36	<.0001
Error	144	2960.51540	20.55913		
Total	215	90632.49298			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 3: Análisis de la Variancia. Variable: Peso de semillas

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr > F
Block	3	0.2329307	0.0776436	0.43	0.7316
Población	27	271.3296980	10.0492481	55.68	<.0001
Año	3	146.7980322	48.9326774	271.11	<.0001
Interacción	41	131.8201363	3.2151253	17.81	<.0001
Error	211	38.0829503	0.1804879		
Total	285	579.7828146			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 4: Análisis de la Variancia. Variable: Producción de semillas, poblaciones cosechadas los cuatro años.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr > F
Población	11	1415149.917	128649.992	1.34	0.2451
Año	3	4184529.417	1394843.139	14.57	<.0001
Error	33	3158138.583	95701.169		
Total	47	8757817.917			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 5: Análisis de la Variancia. Variable: Proporción de semillas dañadas por insectos, poblaciones cosechadas los cuatro años.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr > F
Población	5	9339.299028	1867.859806	96.62	<.0001
Año	3	6782.813750	2260.937917	116.95	<.0001
Interacción	15	5930.010417	395.334028	20.45	<.0001
Error	48	927.98000	19.33292		
Total	71	22980.10319			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 6: Análisis de la Variancia. Variable: Peso de semillas, poblaciones cosechadas los cuatro años.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr >
Block	3	0.1571388	0.0523796	0.32	0.8143
Población	5	42.7243399	8.5448680	51.43	<.0001
Año	3	110.6784019	36.8928006	222.04	<.0001
Interacción	15	45.0597334	3.0039822	18.08	<.0001
Error	69	11.4646500	0.1661543		
Total	95	210.0842640			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 7: Análisis de la Variancia. Variable: Producción de semillas, análisis entre cuencas.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr >
Cuenca	4	974924.924	243731.231	1.93	0.1139
Año	3	7100992.210	2366997.403	18.72	<.0001
Error	79	9986952.00	126417.11		
Total	86	18163607.66			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 8: Análisis de la Variancia. Variable: Proporción de semillas dañadas por insectos, análisis entre cuencas.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr >
Cuenca	4	2143.07024	535.76756	2.19	0.0712
Año	3	27848.64231	9282.88077	38.02	<.0001
Interacción	10	8695.50447	869.55045	3.56	0.0002
Error	189	46140.49686	244.12961		
Total	206	79700.65184			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 9: Análisis de la Variancia. Variable: Peso de semillas, análisis entre cuencas.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr >
Block	3	0.3286570	0.1095523	0.11	
0.9529					
Cuenca	4	29.6793675	7.4198419	7.61	<.0001
Año	3	142.5799452	47.5266484	48.71	<.0001
Interacción	10	29.1608184	2.9160818	2.99	0.0014
Error	253	246.8310315	0.9756167		
Total	273	474.5716572			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 10: Análisis de la Variancia. Variable: Producción de semillas, análisis entre grupos de poblaciones con distintos haplotipos.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr >
Haplotipo	1	3957544.6	3957544.6	0.56	
0.4573					
Año	3	302909798.9	100969933.0	14.26	<.0001
Error	66	467217707.0	7079056.2		
Total	70	770255127.9			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 11: Análisis de la Variancia. Variable: Proporción de semillas dañadas por insectos, análisis entre grupos de poblaciones con distintos haplotipos.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr > F
Haplotipo	1	51.79694	51.79694	0.18	0.6733
Año	3	16363.76330	5454.58777	18.79	<.0001
Interacción	3	1413.61782	471.20594	1.62	0.1863
Error	151	43830.38883	290.26748		
Total	158	65881.73042			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

Tabla 12: Análisis de la Variancia. Variable: Peso de semillas, análisis entre grupos de poblaciones con distintos haplotipos.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Pr > F
Block	3	0.5843112	0.1947704	0.15	0.9309
Haplotipo	1	14.1998220	14.1998220	10.79	0.0012
Año	3	137.6238381	45.8746127	34.85	<.0001
Interacción	3	4.6649889	1.5549963	1.18	0.3180
Error	197	259.2860066	1.3161726		
Total	207	425.4425622			

g.l.: grados de libertad; SC: Suma de Cuadrados; CM: Cuadrado Medio.

## Apéndice II

### Recetas de buffers y sistemas de revelado empleados en la electroforesis isoenzimática

#### Preparación de geles de almidón:

Sistema de buffer	Porcentaje de gel	Número de fetas	Vol.Buffer de gel (ml)	Almidón (gr)	Sacarosa (gr)
Tris	10,8	3	300	32,4	6
Poulik	10,8	3	300	32,4	6

Nota: todas las fetas son de 2 mm excepto GOT (Poulik) que es de 3 mm.

- 1- Calentar en el microondas 2/3 del buffer (200 ml) en un vaso tapado durante 2 min 30 seg a máxima potencia (900 watts). Tiene que hervir.
- 2- Al mismo tiempo agregar el tercio restante del buffer al almidón y la sacarosa en el kitasato y agitar bien.
- 3- Agregar el buffer caliente al kitasato y agitar.
- 4- Calentar nuevamente durante 2 min 30 seg a máxima potencia, con ambas bocas del kitasato tapadas. Agitar una vez en medio de la cocción.
- 5- Hacer vacío hasta extraer todas las burbujas.
- 6- Verter y dejar enfriar al menos 20 min.

#### Recetas de los buffers

**Tris:** Buffer de electrodo: Tris 0.13 M- Ac. Cítrico 0.04 M pH 7

Buffer de gel: buffer de electrodo: agua destilada 1:2,5

**Poulik (1959):** Buffer de electrodo: Ac. Bórico 0.3 M- NaOH 0.06 M pH 8.2

Buffer de gel: Tris 0.07 M- Ac. Cítrico 0.008 M pH 8.7

#### Buffer de extracción (Cheliak y Pitel, 1984, B. Vegetativo I)

Producto	Cantidad
Tris/HCl 0,2 M pH 8	100 ml
PVP (8 %)	8,000 g
Sacarosa (0,3 M)	10,270 g
EDTA (0,5 mM)	0,019 g
DTT (1 mM)	0,015 g
Ac Ascórbico (1 mM)	0,018 g
Albúmina (0,1 %)	0,100 g
NAD (0,4 mM)	0,027 g
NADP (0,3 mM)	0,023 g
Piridoxal-5-P (0,2 mM)	0,005 g

**Soluciones de revelado****Todas disueltas en agua destilada**

<b>MTT</b>	<b>5 mg/ml</b>
NAD	5 mg/ml
NADP	5 mg/ml
Cl <sub>2</sub> Mg (5 %)	42,68 g / 400 ml
PMS	200 mg / 200 ml

**Buffers de revelado**

Buffer	pH	Enzima	Productos	Cantidad
Tris/HCl 0,2 M	8	IDH, ADH, PGI, LAP	Tris HCl (1 N)  Vol, Final 3 l	29,1 g 150 ml Tit, con HCl
Tris/HCl 0,2 M	9,5	MDH	Idem pH 8	Idem Tris Tit con HCl
GOT	8	GOT	Tris/HCl 0,2 M pH 8 L-Aspártico Cetoglutámico	1 l  6,13 g 0,90 g Disolver y titular con NaOH 1 N

### Revelado de los distintos sistemas

#### Gel Tris

Sistema	Buffer	Sustrato	Coenzimas y colorantes	Espesor de gel	Condiciones
MDH	Tris/HCl pH 9,5 60 ml	Ac, Málico 90 mg	PMS: 2 ml NBT: 20 mg NAD: 4 ml Cl <sub>2</sub> Mg (5 %) 4 ml	2 mm Feta superior	37 °C oscuridad 2 hs
IDH	Tris/HCl pH 8 60 ml	Ac isocítrico ***d 100 mg	PMS: 2 ml MTT: 3 ml NADP: 4 ml Cl <sub>2</sub> Mg (5 %) 4 ml	2 mm Feta inter-media	37 °C oscuridad 1 a 2 hs
ADH	Tris/HCl pH 8 60 ml	Etanol 95 % *** 12 ml	PMS: 6 ml NAD: 4 ml NBT: 20 mg	2 mm Feta inferior	37 °C oscuridad 2 hs
LAP	Tris/HCl pH 8 30 ml  Maleico 0,2 M 30 ml Llevar a pH 5,3 antes de usar con NaOH 1 N	L-leucine β naftilamida 50 mg	Fast Blak k 50 mg  Cl <sub>2</sub> Mg (5 %) 1 ml	2 mm Feta superior	Prebuffer: 0,5 M ac bórico,  Revelado a 37 °C oscuridad 2 hs
PGI	Tris/HCl pH 8 60 ml	D-Fructosa-6-P * 30 mg Glucosa-6-P-deshidrogenas 20 u	PMS: 2 ml MTT: 3 ml NADP: 4 ml Cl <sub>2</sub> Mg (5 %) 2 ml	2 mm Feta inter-media	37 °C oscuridad 1 hs
GOT	GOT 75 ml		Fast blue BB 95 mg Piridoxal-5-P 6 mg	3 mm Feta superior	37 °C oscuridad 1 hs

## Apéndice III

### Tablas y figuras complementarias al Capítulo IV

Tabla 1: Nivel de detección de la muestra y tipo de perfil genético.

Pob	<i>Mdh-B</i>			<i>Mdh-C</i>			<i>Idh</i>			<i>Adh</i>			<i>Got-A</i>			<i>Got-B</i>			<i>Got-C</i>			<i>Pgi</i>		
	<i>n</i>	$\alpha$	Perfil	<i>n</i>	$\alpha$	Perfil	<i>n</i>	$\alpha$	Perfil	<i>n</i>	$\alpha$	Perfil	<i>n</i>	$\alpha$	Perfil	<i>n</i>	$\alpha$	Perfil	<i>n</i>	$\alpha$	Perfil	<i>n</i>	$\alpha$	Perfil
1	286	2,4	Pma	286	2,4	M	284	2,4	Pm	216	3,0	M	264	2,5	Pma	286	2,4	Pm	278	2,4	Pm	264	2,5	Pm
4	228	2,9	Pmae	234	2,8	Pm	228	2,9	Pm	224	2,9	M	202	3,2	Pma	234	2,8	Pm	234	2,8	Pm	266	2,5	M
5	212	3,0	Pmae	118	3,0	M	200	3,2	Pma	200	3,2	M	228	2,9	Pma	228	2,9	Pm	224	2,9	Pm	200	3,2	M
6	234	2,8	Pmae	236	2,8	M	202	3,2	Pm	232	2,8	M	236	2,8	Pma	234	2,8	Pm	234	2,8	Pm	300	2,3	M
8	216	3,0	Pma	232	2,8	Pm	200	3,2	Pm	210	3,1	M	228	2,9	Pma	200	3,2	Pm	202	3,2	Pm	278	2,4	Pm
10	206	3,1	Pmae	228	2,9	Pm	228	2,9	Pm	230	2,8	Pm	220	2,9	Pma	220	2,9	Pm	220	2,9	Pm	230	2,8	Pm
11	234	2,8	Pmae	238	2,8	Pm	234	2,8	Pm	238	2,8	Pm	204	3,1	Pmae	206	3,1	Pm	206	3,1	Pm	234	2,8	Pm
12	236	2,8	Pmae	238	2,8	M	238	2,8	Pm	238	2,8	M	200	3,2	Pmae	206	3,1	Pm	206	3,1	Pm	234	2,8	M
14	222	2,9	Pmae	224	2,9	Pm	220	2,9	Pm	220	2,9	Pm	228	2,9	Pma	224	2,9	Pm	222	2,9	Pm	236	2,8	Pm
16	226	2,9	Pma	230	2,8	Pm	198	3,2	Pm	228	2,9	M	228	2,9	Pmae	226	2,9	Pm	226	2,9	Pm	200	3,2	M
17	200	3,2	Pmae	208	3,1	M	232	2,8	Pm	232	2,8	Pm	222	2,9	Pm	222	2,9	Pm	220	2,9	Pm	236	2,8	M
18	192	3,3	Pma	252	2,6	M	222	2,9	Pm	210	3,1	M	218	3,0	Pma	232	2,8	Pm	234	2,8	Pm	252	2,6	M
19	218	3,0	Pmae	258	2,6	Pm	240	2,8	Pma	250	2,7	Pm	212	3,0	Pma	214	3,0	Pm	216	3,0	Pm	238	2,8	Pm
21	258	2,6	Pmae	262	2,6	M	218	3,0	Pm	226	2,9	M	230	2,8	Pma	216	3,0	Pm	228	2,9	Pm	260	2,6	Pm
23	280	2,4	Pmae	292	2,3	M	288	2,4	Pm	290	2,3	M	196	3,3	Pma	202	3,2	Pm	202	3,2	Pm	260	2,6	M
24	264	2,5	Pmae	276	2,4	Pm	238	2,8	Pm	320	2,2	M	248	2,7	Pma	244	2,7	Pm	246	2,7	Pm	200	3,2	M
26	220	2,9	Pmae	242	2,7	Pm	236	2,8	Pm	212	3,0	M	226	2,9	Pma	220	2,9	Pm	222	2,9	Pm	242	2,7	M
27	258	2,6	Pmae	270	2,5	Pm	248	2,7	Pma	270	2,5	M	202	3,2	Pma	200	3,2	Pm	200	3,2	Pm	268	2,5	Pm
28	200	3,2	Pmae	216	3,0	M	210	3,1	Pma	216	3,0	M	214	3,0	Pma	210	3,1	Pm	210	3,1	Pm	278	2,4	M
30	206	3,1	Pmae	210	3,1	M	208	3,1	Pm	210	3,1	M	202	3,2	Pma	206	3,1	Pm	206	3,1	Pm	220	2,9	Pm
Ne	228	2,9	Pmae	230	2,8	Pm	230	2,8	Pm	214	3,0	Pm	212	3,0	Pma	192	3,3	Pm	206	3,1	Pm	222	2,9	Pm
Ma	196	3,3	Pmae	200	3,2	Pm	208	3,1	Pm	208	3,1	Pm	202	3,2	Pm	202	3,2	Pm	202	3,2	Pm	196	3,3	Pm
Na	202	3,2	Pma	202	3,2	Pm	202	3,2	Pm	202	3,2	Pm	200	3,2	Pma	202	3,2	Pm	202	3,2	Pm	200	3,2	Pm

Nivel de detección de la muestra ( $\alpha$ ) según el tamaño de la muestra de alélos (*n*) y tipo de perfil genético según Lewontin (1985) para cada locus en 20 poblaciones de Argentina y 3 de Chile: Ne: Neltume, Ma: Mallalcahuello, Na: Nahuelbuta. M: Monomorfismo, Pm: Polimorfismo menor, Pma: Polimorfismo mayor, Pmae: Polimorfismo mayor extendido.

Tabla 2: Frecuencias alélicas en las 20 poblaciones de Argentina y las tres de Chile.

Pob.	Locus															
	<i>Mdh-B</i>						<i>Mdh-C</i>			<i>Idh</i>			<i>Adh</i>			
	<i>n</i>	1	2	3	6	7	<i>n</i>	1	2	7	<i>n</i>	1	2	<i>n</i>	1	2
1	286	0,000	0,413	0,587	0,000	0,000	286	1,000	0,000	0,000	284	0,944	0,056	216	0,000	1,000
4	228	0,013	0,447	0,539	0,000	0,000	234	0,996	0,004	0,000	228	0,969	0,031	224	0,000	1,000
5	212	0,033	0,420	0,547	0,000	0,000	118	1,000	0,000	0,000	200	0,715	0,285	200	0,000	1,000
6	234	0,017	0,303	0,679	0,000	0,000	236	1,000	0,000	0,000	202	0,941	0,059	232	0,000	1,000
8	216	0,000	0,435	0,565	0,000	0,000	232	0,991	0,009	0,000	200	0,975	0,025	210	0,000	1,000
10	206	0,010	0,335	0,655	0,000	0,000	228	0,965	0,004	0,031	228	0,961	0,039	230	0,026	0,974
11	234	0,030	0,325	0,645	0,000	0,000	238	0,983	0,000	0,017	234	0,915	0,085	238	0,021	0,979
12	236	0,021	0,326	0,653	0,000	0,000	238	1,000	0,000	0,000	238	0,853	0,147	238	0,000	1,000
14	222	0,005	0,491	0,505	0,000	0,000	224	0,996	0,000	0,004	220	0,977	0,023	220	0,005	0,995
16	226	0,000	0,513	0,487	0,000	0,000	230	0,970	0,030	0,000	198	0,939	0,061	228	0,000	1,000
17	200	0,050	0,365	0,585	0,000	0,000	208	1,000	0,000	0,000	232	0,987	0,013	232	0,022	0,978
18	192	0,000	0,557	0,443	0,000	0,000	252	1,000	0,000	0,000	222	0,914	0,086	210	0,000	1,000
19	218	0,037	0,647	0,280	0,023	0,014	258	0,992	0,000	0,008	240	0,754	0,246	250	0,004	0,996
21	258	0,012	0,388	0,601	0,000	0,000	262	1,000	0,000	0,000	218	0,931	0,069	226	0,000	1,000
23	280	0,004	0,236	0,761	0,000	0,000	292	1,000	0,000	0,000	288	0,944	0,056	290	0,000	1,000
24	264	0,004	0,436	0,553	0,004	0,004	276	0,989	0,011	0,000	238	0,866	0,134	320	0,000	1,000
26	220	0,009	0,600	0,391	0,000	0,000	242	0,971	0,029	0,000	236	0,907	0,093	212	0,000	1,000
27	258	0,043	0,450	0,508	0,000	0,000	270	0,993	0,004	0,004	248	0,766	0,234	270	0,000	1,000
28	200	0,030	0,445	0,525	0,000	0,000	216	1,000	0,000	0,000	210	0,781	0,219	216	0,000	1,000
30	206	0,112	0,617	0,272	0,000	0,000	210	1,000	0,000	0,000	208	0,832	0,168	210	0,000	1,000
Ne	228	0,009	0,303	0,689	0,000	0,000	230	0,978	0,022	0,000	230	0,970	0,030	214	0,005	0,995
Ma	196	0,005	0,531	0,464	0,000	0,000	200	0,995	0,000	0,005	208	0,928	0,072	208	0,010	0,990
Na	202	0,000	0,668	0,332	0,000	0,000	202	0,990	0,000	0,010	202	0,926	0,074	202	0,010	0,990

Pob.	Locus																			
	<i>Got-A</i>						<i>Got-B</i>						<i>Got-C</i>				<i>Pgi</i>			
	<i>n</i>	1	2	3	6	<i>n</i>	1	2	3	4	5	6	<i>n</i>	1	2	3	4	<i>n</i>	1	2
1	264	0,610	0,390	0,000	0,000	286	0,000	0,056	0,000	0,944	0,000	0,000	278	0,058	0,914	<b>0,029</b>	0,000	264	0,996	0,004
4	202	0,772	0,228	0,000	0,000	234	0,000	0,004	0,000	0,996	0,000	0,000	234	0,004	0,996	0,000	0,000	266	1,000	0,000
5	228	0,338	0,662	0,000	0,000	228	0,000	0,031	0,000	0,969	0,000	0,000	224	0,022	0,978	0,000	0,000	200	1,000	0,000
6	236	0,568	0,432	0,000	0,000	234	0,000	0,051	0,000	0,949	0,000	0,000	234	0,051	0,949	0,000	0,000	300	1,000	0,000
8	228	0,728	0,272	0,000	0,000	200	0,000	0,040	0,000	0,960	0,000	0,000	202	0,040	0,960	0,000	0,000	278	0,993	0,007
10	220	0,632	0,359	0,000	0,009	220	0,000	0,055	0,000	0,945	0,000	0,000	220	0,055	0,945	0,000	0,000	230	0,970	0,030
11	204	0,750	0,240	0,000	0,010	206	0,000	0,024	0,000	0,976	0,000	0,000	206	0,024	0,976	0,000	0,000	234	0,970	0,030
12	200	0,685	0,315	0,000	0,000	206	0,000	0,092	0,000	0,908	0,000	0,000	206	0,092	0,908	0,000	0,000	234	1,000	0,000
14	228	0,658	0,338	0,000	0,004	224	0,004	0,183	0,004	0,705	0,000	<b>0,103</b>	222	0,194	0,698	0,000	<b>0,108</b>	236	0,996	0,004
16	228	0,605	0,395	0,000	0,000	226	0,000	0,088	0,000	0,912	0,000	0,000	226	0,093	0,907	0,000	0,000	200	1,000	0,000
17	222	0,847	0,153	0,000	0,000	222	0,000	0,050	0,000	0,950	0,000	0,000	220	0,045	0,955	0,000	0,000	236	1,000	0,000
18	218	0,693	0,307	0,000	0,000	232	0,009	0,034	0,000	0,957	0,000	0,000	234	0,030	0,970	0,000	0,000	252	1,000	0,000
19	212	0,774	0,226	0,000	0,000	214	0,000	0,098	0,000	0,902	0,000	0,000	216	0,097	0,903	0,000	0,000	238	0,996	0,004
21	230	0,643	0,357	0,000	0,000	216	0,000	0,120	0,000	0,880	0,000	0,000	228	0,114	0,886	0,000	0,000	260	0,996	0,004
23	196	0,617	0,383	0,000	0,000	202	0,000	0,069	0,000	0,931	0,000	0,000	202	0,069	0,931	0,000	0,000	260	1,000	0,000
24	248	0,577	0,423	0,000	0,000	244	0,000	0,045	0,000	0,955	0,000	0,000	246	0,041	0,959	0,000	0,000	200	1,000	0,000
26	226	0,770	0,230	0,000	0,000	220	0,005	0,027	0,005	0,959	<b>0,005</b>	0,000	222	0,027	0,973	0,000	0,000	242	1,000	0,000
27	202	0,564	0,436	0,000	0,000	200	0,000	0,025	0,000	0,975	0,000	0,000	200	0,025	0,975	0,000	0,000	268	0,993	0,007
28	214	0,640	0,360	0,000	0,000	210	0,000	0,029	0,000	0,971	0,000	0,000	210	0,033	0,967	0,000	0,000	278	1,000	0,000
30	202	0,545	0,455	0,000	0,000	206	0,000	0,078	0,000	0,922	0,000	0,000	206	0,078	0,922	0,000	0,000	220	0,995	0,005
Ne	212	0,665	0,311	<b>0,024</b>	0,000	192	0,000	0,037	0,000	0,963	0,000	0,000	206	0,034	0,966	0,000	0,000	222	0,995	0,005
Ma	202	0,847	0,153	0,000	0,000	202	0,000	0,035	0,000	0,965	0,000	0,000	202	0,025	0,975	0,000	0,000	196	0,990	0,010
Na	200	0,535	0,465	0,000	0,000	202	0,000	0,020	0,000	0,980	0,000	0,000	202	0,020	0,980	0,000	0,000	200	0,960	0,040

Los números en negrita indican alelos únicos. *n*: tamaño de la muestra de alelos. Ne: Neltume, Ma: Mallalcahuelo, Na Nahuelbuta



Tabla 3: Número absoluto de genotipos en las 20 poblaciones de Argentina y las tres de Chile.

Población	<i>Mdh-B</i>								<i>Mdh-C</i>				<i>Idh</i>			<i>Adh</i>					
	12	13	22	23	33	66	67	<i>n</i>	11	12	17	77	<i>n</i>	11	12	22	<i>n</i>	11	12	22	<i>n</i>
1	0	0	24	70	49	0	0	143	143	0	0	0	143	127	14	1	142	0	0	108	108
4	2	1	17	66	28	0	0	114	116	1	0	0	117	107	7	0	114	0	0	112	112
5	1	6	18	52	29	0	0	106	109	0	0	0	109	49	45	6	100	0	0	100	100
6	0	4	14	43	56	0	0	117	118	0	0	0	118	90	10	1	101	0	0	116	116
8	0	0	27	40	41	0	0	108	114	2	0	0	116	95	5	0	100	0	0	105	105
10	1	1	11	46	44	0	0	103	108	1	3	2	114	106	7	1	114	1	4	110	115
11	0	7	14	48	48	0	0	117	115	0	4	0	119	99	16	2	117	1	3	115	119
12	0	5	22	33	58	0	0	118	119	0	0	0	119	90	23	6	119	0	0	119	119
14	0	1	33	43	34	0	0	111	111	0	1	0	112	105	5	0	110	0	1	109	110
16	0	0	33	50	30	0	0	113	108	7	0	0	115	87	12	0	99	0	0	114	114
17	0	10	12	49	29	0	0	100	104	0	0	0	104	113	3	0	116	0	5	111	116
18	0	0	33	41	22	0	0	96	126	0	0	0	126	93	17	1	111	0	0	105	105
19	5	3	45	46	6	1	3	109	128	0	0	1	129	68	45	7	120	0	1	124	125
21	0	3	32	36	58	0	0	129	131	0	0	0	131	94	15	0	109	0	0	113	113
23	0	1	14	38	87	0	0	140	146	0	0	0	146	128	16	0	144	0	0	145	145
24	1	0	23	68	39	0	1	132	135	3	0	0	138	89	28	2	119	0	0	160	160
26	0	2	41	50	17	0	0	110	114	7	0	0	121	101	12	5	118	0	0	106	106
27	2	9	33	48	37	0	0	129	133	1	1	0	135	74	42	8	124	0	0	135	135
28	0	6	27	35	32	0	0	100	108	0	0	0	108	67	30	8	105	0	0	108	108
30	23	0	37	30	13	0	0	103	105	0	0	0	105	72	29	3	104	0	0	105	105
Ne	0	2	5	59	48	0	0	114	110	5	0	0	115	108	7	0	115	0	1	106	107
Ma	0	1	31	42	24	0	0	98	99	0	1	0	100	90	13	1	104	0	2	102	104
Na	0	0	47	41	13	0	0	101	99	0	2	0	101	86	15	0	101	0	2	99	101

Ne: Neltume, Ma: Mallalcahuelo, Na Nahuelbuta. *n*: tamaño de la muestra.

Tabla 3: continuación

Pob	Got-A								Got-B								Got-C						Pgi				
	11	12	22	13	23	26	66	<i>n</i>	14	22	24	44	35	36	46	<i>n</i>	11	12	22	23	14	24	<i>n</i>	11	12	22	<i>n</i>
1	52	57	23	0	0	0	0	132	0	1	14	128	0	0	0	143	1	14	116	8	0	0	139	131	1	0	132
4	69	18	14	0	0	0	0	101	0	0	1	116	0	0	0	117	0	1	116	0	0	0	117	133	0	0	133
5	9	59	46	0	0	0	0	114	0	0	7	107	0	0	0	114	0	5	107	0	0	0	112	100	0	0	100
6	46	42	30	0	0	0	0	118	0	0	12	105	0	0	0	117	0	12	105	0	0	0	117	150	0	0	150
8	60	46	8	0	0	0	0	114	0	0	8	92	0	0	0	100	0	8	93	0	0	0	101	137	2	0	139
10	44	51	14	0	0	0	1	110	0	0	12	98	0	0	0	110	0	12	98	0	0	0	110	109	5	1	115
11	58	37	6	0	0	0	1	102	0	0	5	98	0	0	0	103	0	5	98	0	0	0	103	112	3	2	117
12	50	37	13	0	0	0	0	100	0	0	19	84	0	0	0	103	0	19	84	0	0	0	103	117	0	0	117
14	48	54	11	0	0	1	0	114	1	7	27	54	0	1	22	112	8	25	54	0	2	22	111	117	1	0	118
16	40	58	16	0	0	0	0	114	0	2	16	95	0	0	0	113	2	17	94	0	0	0	113	100	0	0	100
17	80	28	3	0	0	0	0	111	0	0	11	100	0	0	0	111	0	10	100	0	0	0	110	118	0	0	118
18	58	35	16	0	0	0	0	109	2	0	8	106	0	0	0	116	0	7	110	0	0	0	117	126	0	0	126
19	63	38	5	0	0	0	0	106	0	0	21	86	0	0	0	107	0	21	87	0	0	0	108	118	1	0	119
21	51	46	18	0	0	0	0	115	0	1	24	83	0	0	0	108	1	24	89	0	0	0	114	129	1	0	130
23	44	33	21	0	0	0	0	98	0	0	14	87	0	0	0	101	0	14	87	0	0	0	101	130	0	0	130
24	42	59	23	0	0	0	0	124	0	0	11	111	0	0	0	122	0	10	113	0	0	0	123	100	0	0	100
26	69	36	8	0	0	0	0	113	1	1	4	103	1	0	0	110	1	4	106	0	0	0	111	121	0	0	121
27	37	40	24	0	0	0	0	101	0	0	5	95	0	0	0	100	0	5	95	0	0	0	100	132	2	0	134
28	49	39	19	0	0	0	0	107	0	0	6	99	0	0	0	105	0	7	98	0	0	0	105	139	0	0	139
30	36	38	27	0	0	0	0	101	0	1	14	88	0	0	0	103	1	14	88	0	0	0	103	109	1	0	110
Ne	48	42	11	3	2	0	0	106	0	1	5	90	0	0	0	96	1	5	97	0	0	0	103	110	1	0	111
Ma	71	29	1	0	0	0	0	101	0	0	7	94	0	0	0	101	0	5	96	0	0	0	101	96	2	0	98
Na	32	43	25	0	0	0	0	100	0	0	4	97	0	0	0	101	0	4	97	0	0	0	101	92	8	0	100

Tabla 4: Distancias genéticas de Gregorius (1974) para el pool de loci analizados. Ne = Neltume, Ma = Mallalcahuello, Na = Nahuelbuta.

1	4	5	6	8	10	11	12	14	16	17	18	19	21	23	24	26	27	28	30	Ne	Ma	Na
1	0,047	0,079	0,025	0,031	0,031	0,053	0,041	0,083	0,026	0,050	0,042	0,094	0,024	0,029	0,027	0,064	0,051	0,042	0,068	0,039	0,060	0,063
4		0,096	0,059	0,020	0,057	0,038	0,063	0,096	0,058	0,036	0,039	0,085	0,058	0,067	0,051	0,038	0,062	0,049	0,099	0,043	0,034	0,074
5			0,080	0,091	0,101	0,099	0,090	0,152	0,093	0,112	0,089	0,113	0,095	0,101	0,058	0,106	0,043	0,051	0,088	0,099	0,108	0,091
6				0,046	0,028	0,047	0,039	0,103	0,045	0,056	0,055	0,113	0,038	0,021	0,031	0,076	0,052	0,053	0,075	0,028	0,073	0,067
8					0,040	0,037	0,049	0,083	0,046	0,032	0,032	0,085	0,043	0,052	0,036	0,042	0,058	0,044	0,088	0,029	0,038	0,071
10						0,034	0,042	0,096	0,049	0,050	0,058	0,111	0,039	0,033	0,047	0,075	0,069	0,057	0,093	0,027	0,070	0,074
11							0,044	0,116	0,073	0,040	0,049	0,094	0,056	0,056	0,057	0,050	0,067	0,057	0,105	0,035	0,046	0,077
12								0,093	0,049	0,059	0,053	0,073	0,029	0,039	0,043	0,071	0,063	0,046	0,072	0,040	0,074	0,096
14									0,071	0,106	0,088	0,121	0,067	0,101	0,098	0,108	0,114	0,102	0,118	0,097	0,103	0,120
16										0,072	0,038	0,077	0,032	0,046	0,037	0,053	0,055	0,051	0,056	0,057	0,056	0,058
17											0,059	0,094	0,058	0,064	0,064	0,060	0,084	0,068	0,107	0,046	0,036	0,099
18												0,069	0,051	0,063	0,040	0,022	0,053	0,040	0,062	0,048	0,029	0,047
19													0,085	0,113	0,089	0,056	0,076	0,069	0,054	0,110	0,073	0,085
21														0,037	0,044	0,072	0,067	0,051	0,076	0,045	0,068	0,081
23															0,049	0,084	0,073	0,062	0,087	0,033	0,081	0,087
24																0,057	0,027	0,027	0,055	0,049	0,061	0,055
26																	0,068	0,057	0,069	0,063	0,029	0,054
27																		0,017	0,055	0,069	0,069	0,058
28																			0,062	0,055	0,060	0,069
30																				0,101	0,088	0,048
Ne																					0,062	0,082
Ma																						0,063
Na																						

Tabla 5: Matriz de probabilidades para las distancias genéticas de Gregorius (1974).

1	4	5	6	8	10	11	12	14	16	17	18	19	21	23	24	26	27	28	30	Ne	Ma	Na
1	1,000	1,000	0,820	0,960	0,940	1,000	1,000	1,000	0,810	1,000	1,000	1,000	0,780	0,980	0,880	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
4		1,000	1,000	0,760	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,990	1,000
5			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,990	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
6				1,000	0,790	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,760	0,940	1,000	1,000	1,000	1,000	0,860	1,000	1,000
8					0,990	1,000	1,000	1,000	1,000	0,970	0,960	1,000	1,000	1,000	0,990	1,000	1,000	0,990	1,000	0,940	1,000	1,000
10						0,970	0,980	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,990	0,980	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,760	1,000	1,000
11							0,990	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,940	1,000	1,000
12								1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,880	0,990	0,990	1,000	1,000	1,000	1,000	0,980	1,000	1,000
14									1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
16										1,000	1,000	1,000	0,940	1,000	0,980	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
17											1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
18												1,000	1,000	1,000	1,000	0,740	1,000	0,990	1,000	1,000	0,920	1,000
19													1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
21														0,980	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
23															1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,980	1,000	1,000
24																1,000	0,760	0,900	1,000	1,000	1,000	1,000
26																	1,000	1,000	1,000	1,000	0,880	1,000
27																		0,330	1,000	1,000	1,000	1,000
28																			1,000	1,000	1,000	1,000
30																				1,000	1,000	1,000
Ne																					1,000	1,000
Ma																						1,000
Na																						

$P > 0.950$  corresponde a diferencias significativas entre las distancias. Ne = Neltume, Ma = Mallalcahuello, Na = Nahuelbuta.



Tabla 6: Homogeneidad en las frecuencias alélicas y genotípicas entre poblaciones de cada cuenca y de a pares de poblaciones.

Cuenca	<i>Mdh-B</i>		<i>Mdh-C</i>		<i>Idh</i>		<i>Adh</i>		<i>Got-A</i>		<i>Got-B</i>		<i>Got-C</i>		<i>Pgi</i>	
	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G
<b>Hermoso</b>																
4*5	ns	ns	ns	ns	*	*	M	M	*	*	*	*	ns	ns	M	M
<b>Lácar</b>																
<b>6 pob.</b>	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	ns	*	*	*	*	*	ns
8-10	*	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
8-11	*	*	ns	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8-12	*	*	ns	ns	*	*	M	M	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns
8-14	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns
8-16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	M	M	*	*	*	ns	*	ns	ns	ns
10-11	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	Ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
10-12	ns	*	*	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*
10-14	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	ns
10-16	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
11-12	ns	ns	*	*	*	ns	*	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	ns
11-14	*	*	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	ns
11-16	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	ns
12-14	*	*	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns
12-16	*	*	*	*	*	*	M	M	ns	ns	ns	ns	ns	ns	M	M
14-16	ns	ns	*	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns
<b>Lolog</b>																
<b>3 pob.</b>	*	*	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	ns
17-18	*	*	M	M	*	*	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	M	M
17-19	*	*	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	ns	ns
18-19	*	*	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	ns	ns
<b>Huechulafafquen</b>																
<b>5 pob</b>	*	*	*	*	*	*	M	M	*	*	*	*	*	*	ns	ns
6-21	ns	ns	M	M	ns	ns	M	M	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns
6-23	ns	ns	M	M	ns	ns	M	M	ns	ns	ns	ns	ns	ns	M	M
6-24	*	*	ns	ns	*	*	M	M	ns	ns	ns	ns	ns	ns	M	M
6-26	*	*	*	*	ns	ns	M	M	*	*	ns	ns	ns	Ns	M	M
21-23	*	*	M	M	ns	ns	M	M	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
21-24	ns	*	ns	ns	*	ns	M	M	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns
21-26	*	*	*	*	ns	ns	M	M	*	*	*	*	*	*	ns	ns
23-24	*	*	ns	ns	*	*	M	M	ns	ns	ns	ns	ns	ns	M	M
23-26	*	*	*	*	ns	*	M	M	*	*	ns	*	*	*	M	M
24-26	*	*	ns	ns	ns	*	M	M	*	*	ns	ns	ns	Ns	M	M
<b>Tromen</b>																
<b>3 pob</b>	*	*	ns	ns	ns	ns	M	M	ns	Ns	*	ns	*	ns	ns	ns
27-28	ns	ns	ns	ns	ns	ns	M	M	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
27-30	*	*	ns	ns	ns	ns	M	M	ns	Ns	*	ns	*	ns	ns	ns
28-30	*	*	M	M	ns	ns	M	M	*	Ns	*	ns	*	ns	ns	ns

A: alelos, G: genotipos. \*: significativo al nivel de 0,05; ns: no significativo; M: locus monomórfico.

Tabla 7: Frecuencias alélicas en nueve poblaciones analizadas dos años.

Locus	Alelo	Población																	
		5		11		12		14		16		17		18		19		26	
		1994	1997	1994	1996	1996	1997	1994	1996	1996	1997	1995	1996	1995	1996	1995	1996	1996	1997
1		0,068	0,033	0,000	0,030	0,021	0,035	0,016	0,005	0,000	0,000	0,050	0,025	0,000	0,010	0,037	0,053	0,066	0,009
2		0,242	0,420	0,289	0,325	0,326	0,396	0,548	0,491	0,412	0,513	0,365	0,333	0,557	0,330	0,647	0,453	0,485	0,600
3		0,689	0,547	0,711	0,645	0,653	0,569	0,436	0,505	0,588	0,487	0,585	0,608	0,443	0,660	0,280	0,493	0,449	0,391
6		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000
7		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000
8		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
n		132	212	197	234	236	202	250	222	194	226	200	204	192	206	218	150	198	220
			*		*		ns		ns		*		ns		*		*		*
1		1,000	1,000	0,983	0,966	1,000	0,995	1,000	0,996	1,000	0,970	1,000	0,985	1,000	0,990	0,992	1,000	0,914	0,971
2		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,086	0,029
7		0,000	0,000	0,017	0,034	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,010	0,008	0,000	0,000	0,000
n		132	218	236	208	234	202	256	224	198	230	208	206	252	208	258	160	198	242
	M						ns		ns		*		ns		ns		ns		*
1		0,886	0,715	0,915	0,960	0,853	0,975	0,737	0,977	0,887	0,939	0,987	0,816	0,914	0,886	0,754	0,906	0,929	0,907
2		0,114	0,285	0,085	0,040	0,147	0,025	0,263	0,023	0,113	0,061	0,013	0,184	0,086	0,114	0,246	0,094	0,071	0,093
n		132	200	234	174	234	204	232	220	204	198	232	206	222	220	240	160	168	236
			*		ns		*		*		ns		*		ns		*		ns
1		0,000	0,000	0,021	0,035	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,022	0,083	0,000	0,150	0,004	0,000	0,000	0,000
2		1,000	1,000	0,979	0,965	1,000	1,000	1,000	0,995	1,000	1,000	0,978	0,917	1,000	0,850	0,996	1,000	1,000	1,000
n		132	200	234	202	234	200	234	220	204	228	232	204	210	220	250	148	192	212
	M				ns		M		ns		M		*		*		ns		M
1		0,931	0,338	0,750	0,668	0,685	0,674	0,539	0,658	0,578	0,605	0,847	0,643	0,693	0,486	0,774	0,663	0,714	0,770
2		0,069	0,662	0,240	0,332	0,315	0,326	0,461	0,338	0,422	0,395	0,153	0,357	0,307	0,514	0,226	0,331	0,286	0,230
3		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
6		0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
n		130	228	204	208	200	236	230	228	204	228	222	210	218	222	212	178	196	226
			*		*		ns		*		ns		*		*		*		ns
1		0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005
2		0,262	0,031	0,024	0,028	0,092	0,123	0,096	0,183	0,314	0,088	0,050	0,252	0,034	0,238	0,098	0,021	0,005	0,027
3		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
4		0,738	0,969	0,976	0,967	0,908	0,873	0,890	0,705	0,686	0,912	0,950	0,748	0,957	0,762	0,902	0,979	0,990	0,959
5		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
6		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,009	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
n		126	228	206	212	206	236	218	224	204	226	222	210	232	206	212	140	198	220
			*		ns		ns		*		*		*		*		*		ns
1		0,285	0,022	0,024	0,030	0,092	0,123	0,096	0,194	0,314	0,093	0,045	0,227	0,030	0,221	0,097	0,021	0,005	0,027
2		0,715	0,978	0,976	0,970	0,908	0,873	0,899	0,698	0,686	0,907	0,955	0,773	0,970	0,779	0,903	0,979	0,995	0,973
3		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,005	0,108	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
n		116	224	206	198	206	236	218	222	204	226	220	220	234	222	216	140	198	222
			*		ns		ns		*		*		*		*		*		ns
1		1,000	1,000	0,970	0,968	1,000	0,996	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,990	0,996	1,000	1,000	1,000
2		0,000	0,000	0,030	0,032	0,000	0,004	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,004	0,000	0,000	0,000
n		132	200	234	250	234	240	278	236	198	200	236	200	252	202	234	182	198	242
	M				ns		ns		ns		M		M		ns		ns		M

n = tamaño de la muestra de alelos, \*: significativo al nivel 0.05 entre las frecuencias de los dos años, ns = no significativo. M : locus monomórfico

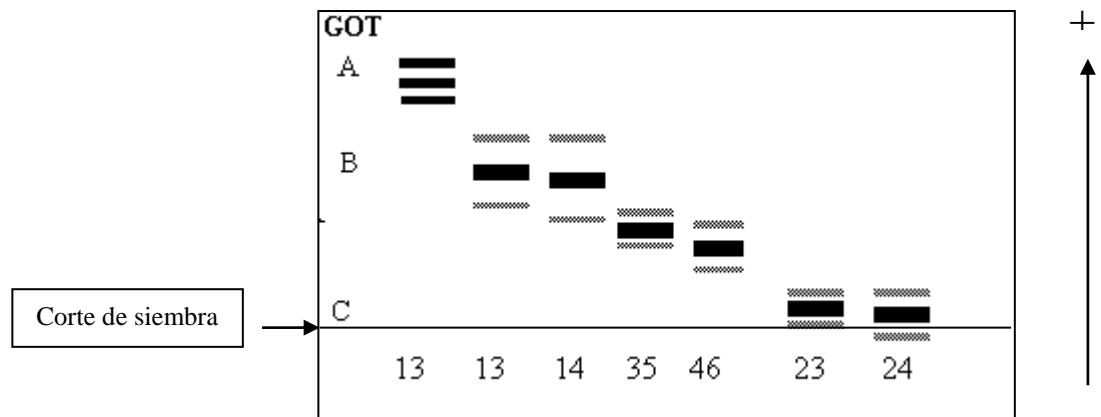


Figura 1: Nuevos alelos del sistema GOT encontrados en algunas poblaciones.  
Los alelos *Got-C-3* y *Got-C-4* migraron hacia el cátodo.

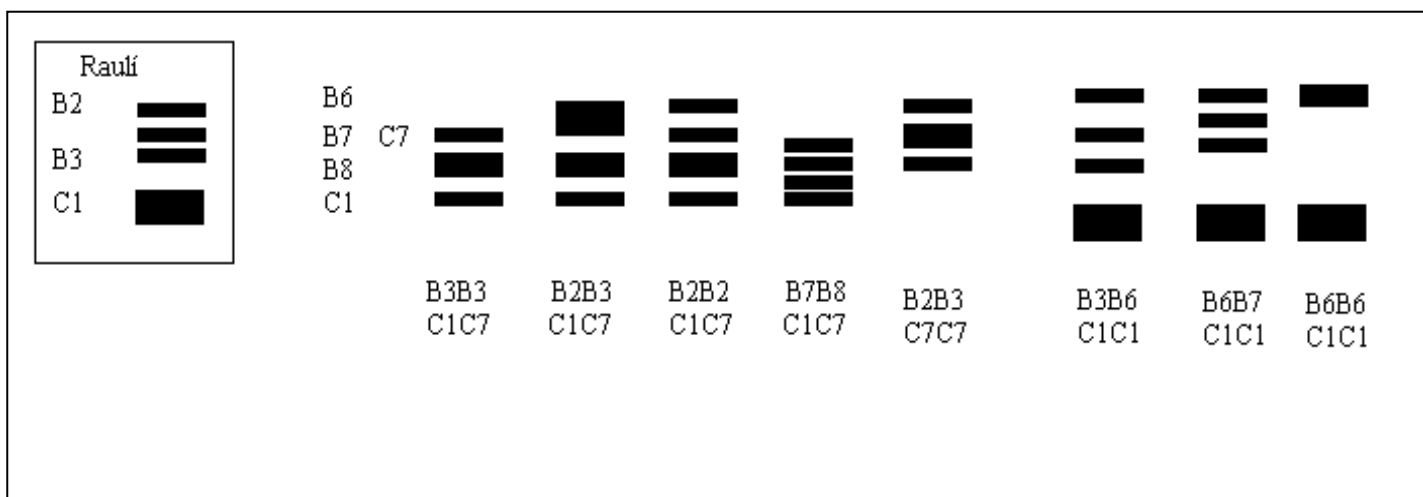
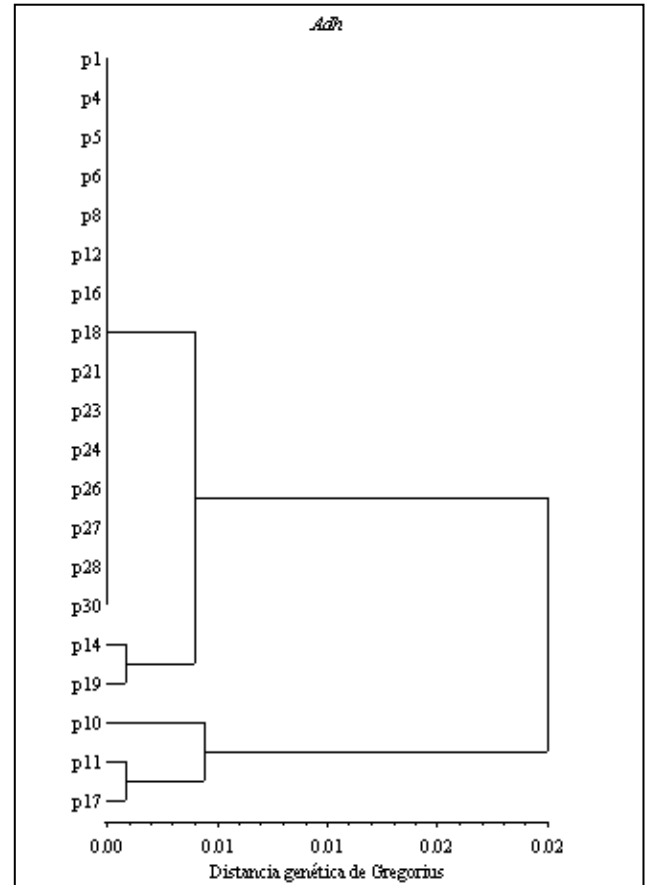
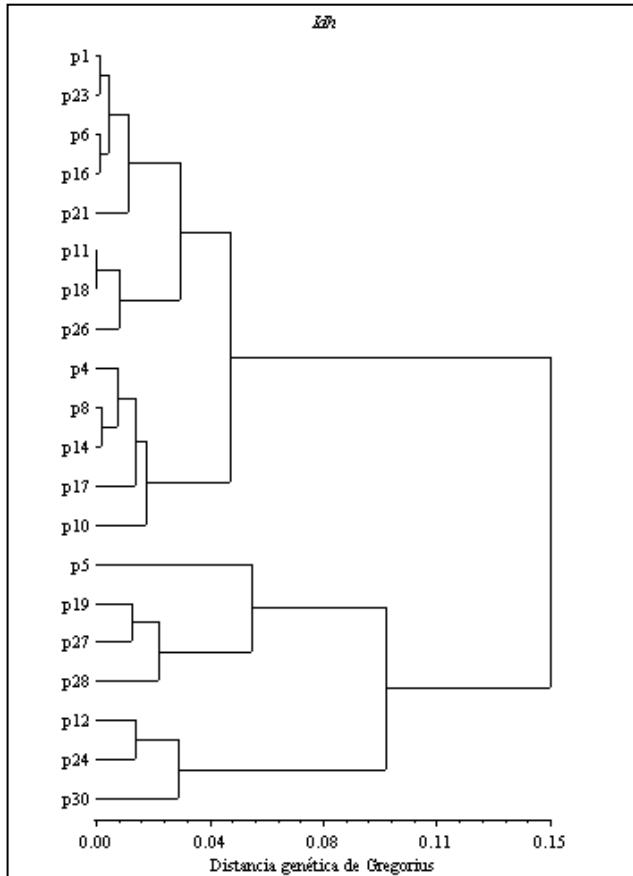
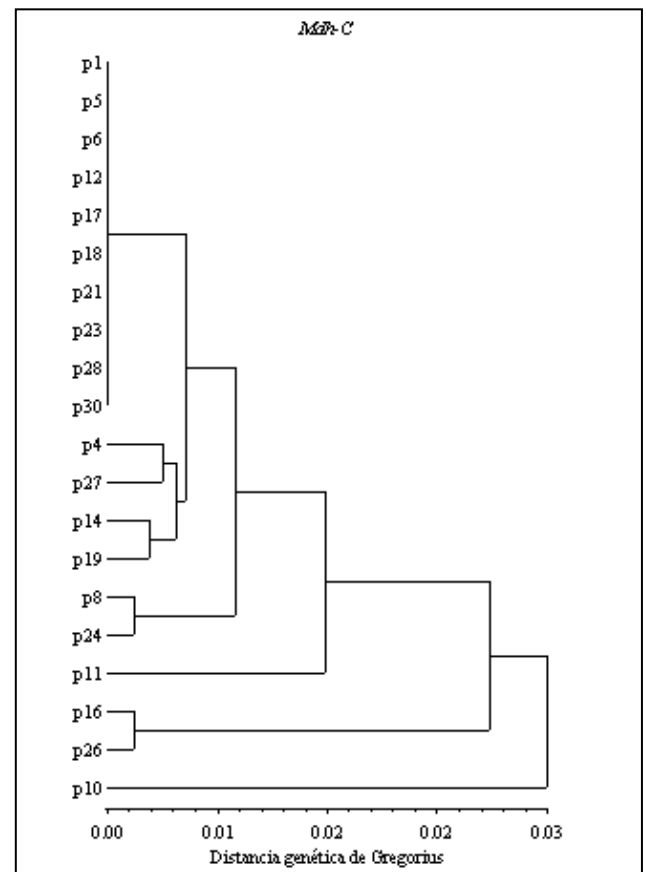
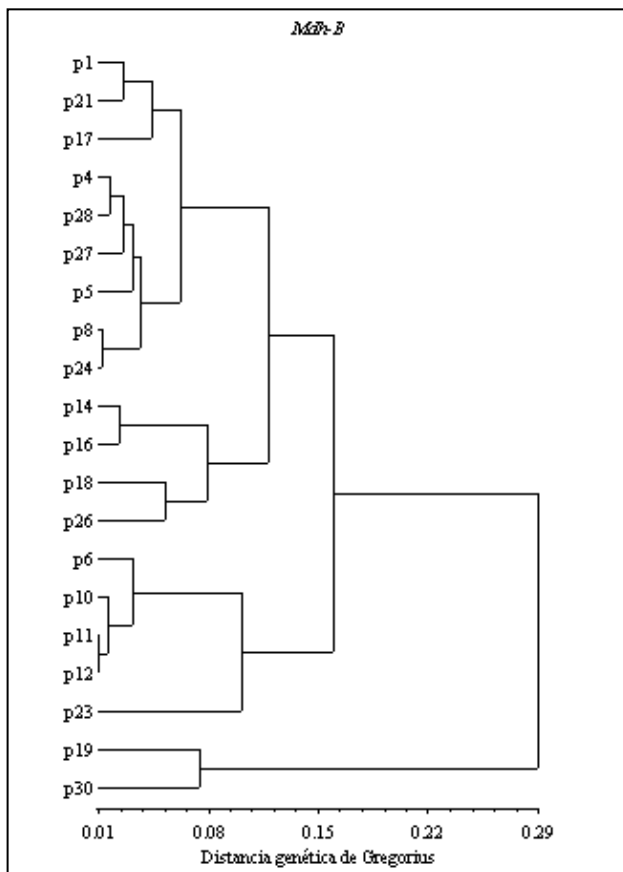


Figura 2: Esquema de los zimogramas encontrados para la enzima Mdh en semillas probablemente híbridas e interpretación de los mismos.





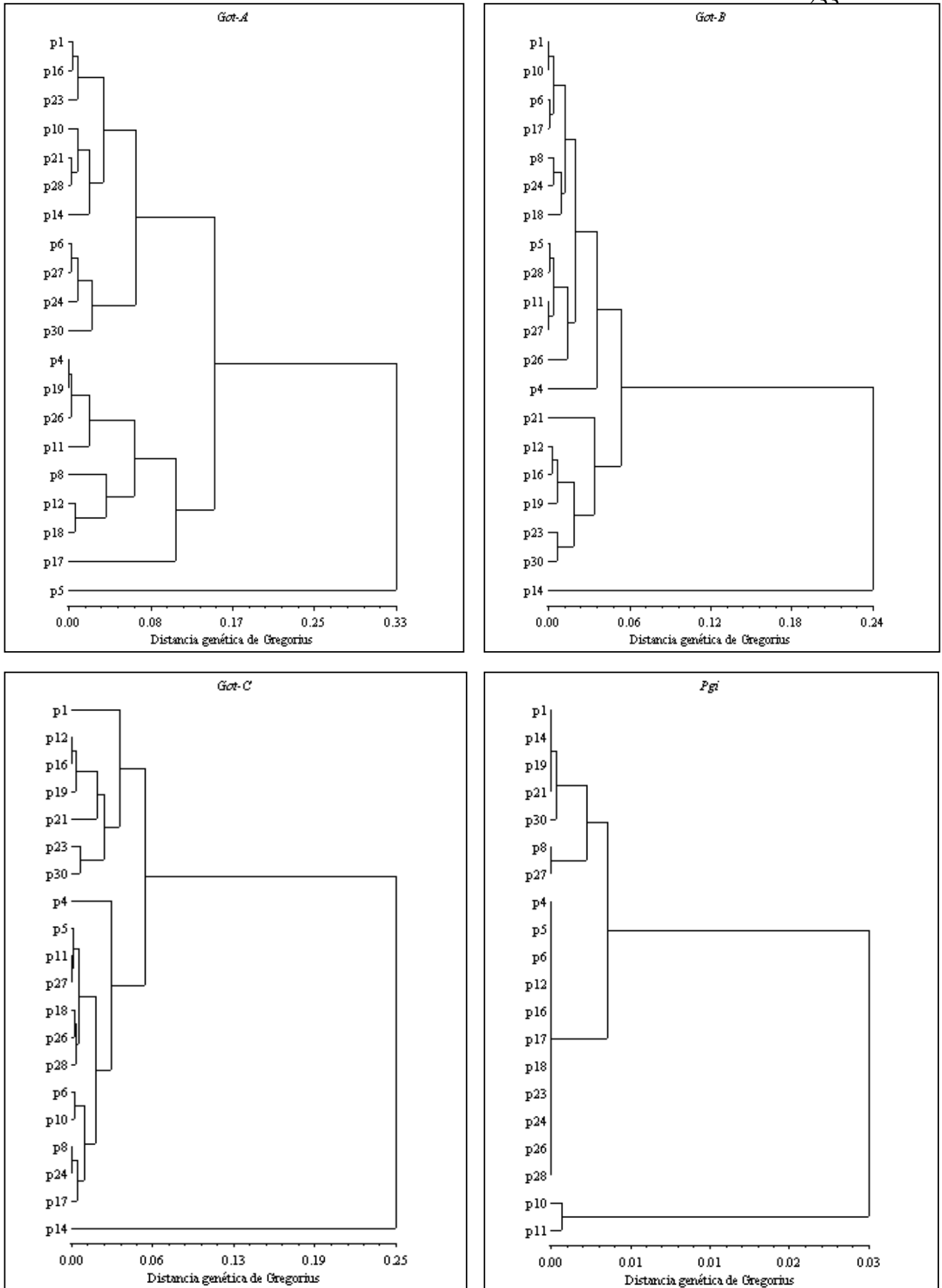


Figura 3: Dendrogramas obtenidos según el método UPGMA con las distancias genéticas (alélicas) de Gregorius para cada locus.

## Apéndice IV

### Protocolos y recetas empleados para el análisis de ADN de cloroplasto

#### Protocolo de extracción de ADN en microtubo (**utilizado en hojas y yemas**)

(Adaptado de Doyle & Doyle, 1990 (Dumolin et al., 1995))

Material:

**Yemas:** remover las escamas (2 o 3 yemas dependiendo el tamaño)

**Hojas:** 2-3 cm<sup>2</sup> de hojas preferentemente frescas, cortadas en pequeños trozos.

Colocar el material en microtubos de 1,5 o 2 ml y congelar con nitrógeno líquido.

- 1) Agregar 0,1 % de 2-mercaptoetanol y 1 % de PVP 40000 soluble a la cantidad necesaria de buffer de extracción (1 ml por muestra).
- 2) Calentar el buffer de extracción a 55 ° C
- 3) Para homogeneizar el tejido hay dos alternativas:
  - Si hay cantidad suficiente (por ejemplo con hojas) se puede obtener un polvo con nitrógeno líquido utilizando mortero.
  - Si el material es escaso agregar 250 µl de buffer de extracción y homogeneizar con varilla en homogeneizador eléctrico. Se puede agregar arena estéril.
- 4) Según el método utilizado en el paso anterior agregar 1 ml o 750 µl de buffer de extracción y mezclar bien.
- 5) Incubar en baño con agitación durante 1 h a 55 °C.
- 6) Sacar los tubos del baño y dejarlos 10 min para que se enfríen.
- 7) Agregar 400 µl de diclorometano y mezclar suavemente hasta obtener una emulsión.
- 8) Centrifugar 10 min a 13000 rpm (4° C). Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo cuidando de no pipetear la interfase. Si el sobrenadante no es claro repetir este paso.
- 9) Agregar 400 µl (2/3 del volumen) de isopropanol y mezclar suavemente. Si el pellet de ADN no aparece, colocar los tubos a -20° C durante 30 min.
- 10) Centrifugar 10 min a 13000 rpm (4° C). Remover el sobrenadante y dejar secar los tubos 15 min sobre papel de filtro.
- 11) Agregar 1 ml de etanol 76 %, mezclar y centrifugar 10 min a 13000 rpm (4° C). Remover el sobrenadante cuidadosamente y secar los tubos durante 30 min a 1 h sobre papel de filtro.
- 12) Agregar 40 µl de buffer 1x TE con RNAsa (2 µl/ml solución stock: 10 mg/ml). Incubar 30 min a 37 °C.
- 13) Estimar la cantidad de ADN en gel de agarosa al 0,8 %.

### Protocolo de extracción de ADN total utilizado para embriones

(Ziegenhagen et al., 1993)

Material:

**Semillas:** cortar y extraer el embrión. Colocarlo en un microtubo de 1,5 ml y congelar con nitrógeno líquido.

- 1) Agregar 1 ml de buffer de extracción y homogeneizar en mortero eléctrico.
- 2) Incubar 20 min a 65° C, mezclando dos o tres veces.
- 3) Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
- 4) Recolectar el sobrenadante y agregar 1/3 vol de acetato de potasio 5 M (pH 5,2). Mezclar suavemente e incubar durante 30 min a 0° C.
- 5) Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min a 4° C.
- 6) Recolectar el sobrenadante y agregar 0,6 vol de isopropanol. Mezclar e incubar durante 30 min a -20° C.
- 7) Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min a 4° C y eliminar el sobrenadante. Dejar secar el precipitado de ADN durante 10 min.
- 8) Resuspender el precipitado de ADN en 200 µl de buffer TE 1x durante 30 min a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C.
- 9) Agregar 2 µl de RNAsa e incubar a 37° C entre 30 min y 1 h.
- 10) Agregar 200 µl de fenol, mezclar bien y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
- 11) Recolectar el sobrenadante, agregar 100 µl de fenol y 100 µl de cloroformo, mezclar bien y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente.
- 12) Recolectar el sobrenadante, agregar 200 µl de cloroformo, mezclar bien y centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente
- 13) Recolectar el sobrenadante, ajustar a 300 mM de acetato de sodio (pH 5,2) y agregar 2,5 vol. de etanol al 96 %.
- 14) Incubar durante 1 h a -80° C o toda la noche a -20° C.
- 15) Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min a 4° C y eliminar el sobrenadante. Dejar secar el precipitado de ADN durante 10 min.
- 16) Resuspender el precipitado de ADN en buffer TE 1x.
- 17) Estimar la cantidad de ADN en gel de agarosa al 0,8 %.

Tabla 1: Resultados de extracción de ADN en distintos tejidos con distintos protocolos

Protocolo	Tejido	Resultado
DNeasy plant kit (Qiagen)	Semillas	+
	Yemas	+
Dumolin et al (1995)	Semillas	-
	Yemas	+
	Cotiledones	+
	Hojas	+
Ziegenhagen et al (1993)	Semillas	+
	Yemas	+



Table 2: Primers, temperaturas de annealing y enzimas de restricción usadas en ADN de cloroplasto de *Nothofagus nervosa*. Los primers señalados con \* corresponden a los que amplificaron un fragmento definido.

Par de primers	Abreviación	Temperatura de annealing (°C)	Enzima de restricción
<i>trnD-trnT</i> *	DT	50	<i>HaeIII</i> <i>TaqI</i>
<i>psaA-trnS</i> *	AS	57	<i>HinfI</i>
<i>trnF-trnVr</i> *	FV	57.5	<i>TaqI</i>
<i>trnT-trnF</i> *	TF	57	<i>TaqI</i> <i>HinfI</i>
<i>trnC-trnD</i> *	CD	58	<i>TaqI</i> <i>HinfI</i>
<i>trnM-rbcL</i> *	ML	58	<i>TaqI</i> <i>HinfI</i>
<i>trnH-trnK</i> *	HK	62	<i>TaqI</i> <i>HaeIII</i>
<i>rpoC1-trnC<sub>r</sub></i> *	rpoCC	47.5	<i>TaqI</i> <i>HinfI</i>
<i>trnK<sub>1</sub>-trnK<sub>2</sub></i> *	K <sub>1</sub> K <sub>2</sub>	52.5	<i>TaqI</i> <i>HinfI</i>
<i>trnV-rbcL<sub>r</sub></i> *	VL	57.5	<i>TaqI</i> <i>HinfI</i>
<i>trnQ-trnR<sub>r</sub></i>	QR	56.5	<i>TaqI</i> <i>HinfI</i>
<i>trnK<sub>2</sub>-trnQ<sub>r</sub></i>	K <sub>2</sub> Q	47.5 52 57	<i>TaqI</i> - <i>TaqI</i>
<i>trnS-trnT</i>	ST	57 54	<i>TaqI</i> <i>TaqI</i>
<i>trnS-trnfM</i>	SfM	62 57	<i>TaqI</i> -
<i>trnT-psbCr</i>	TC	52.5 50	- <i>TaqI</i>
<i>trnfM-psaAr</i>	fMA	47.5 50	<i>TaqI</i> <i>TaqI</i>

### Protocolo de digestión con enzimas de restricción.

Mezcla de digestión para una muestra

Buffer de la enzima	2 µl
Enzima (10 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada	12,5 µl
<b>Producto de PCR</b>	<b>5 µl</b>

La reacción se detiene agregando 2 µl de stop buffer, centrifugando unos segundos y guardando a -20° C hasta la migración electroforética.

### Preparación Gel Poliacrilamida (8 %)

Para 1 gel = 50 ml (20 x 20 cm)

10 x TBE	5 ml
Acrilamida/bisacrilamida	10 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada	35 ml

Mezclar bien y antes de cargar el gel agregar

APS (10%)	250 µl
Temed	50 µl

**Fast starter** (gel concentrado en la base de las placas)

APS	0,2 g
-----	-------

**Temed** 70 µl

H <sub>2</sub> O	930 µl
------------------	--------

En cada gel poner 50 µl de Fast Starter más 1000 µl de la solución con TBE, Acrilamida y H<sub>2</sub>O. Este gel es muy concentrado y gelifica muy rápido. Impide que se pierda gel por la base de la cuba.

### Recetas de los buffers

**Buffer de extracción de ADN** (1 l) para el protocolo de extracción de ADN en microtubo (Adaptado de Doyle & Doyle, 1990 (Dumolin et al., 1995))

ATMAB (Sigma M7635)(Alkyltrimethylammonium bromide)	20 g
EDTA 0,5 M pH=8	40 ml
Tris HCl 1 M pH=8	100 ml
NaCl 5 M	280 ml
H <sub>2</sub> O destilada	completar a 1 l

Las soluciones de NaCl, EDTA y Tris HCl deben autoclavarse antes de preparar el buffer.

Para disolver el ATMAB colocar en baño a 55 °C.

Autoclavar también el buffer de extracción una vez preparado.

**Buffer de extracción de ADN** para el protocolo de extracción de ADN total utilizado para embriones (Ziegenhagen et al., 1993)

Acetato de sodio	100 mM
EDTA pH 8	50 mM
NaCl	500 mM
PVP soluble (10.000)	2 %
Ajustar a pH 5,5 y agregar SDS a 1,4 %.	

**Buffer TE 10 x**

100 mM Tris	12,11 g
10 mM EDTA	3,72 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	1 l
RNAasa 20 µg/ml	

***Buffer TBE 10 x***

(Para 1 l)

Tris (Sigma T1503)	108 g
Ac. Bórico (B6768)	55 g
EDTA pH=8 (0,5 M)	40 ml

PH final = 8,3

Nota: el EDTA es muy difícil de disolver, una alternativa es agregarlo directamente en polvo.

Una vez preparado el buffer **autoclavar**.

**Stop buffer 10 x**

Azul de Bromofenol	0,42 %
Xylencyanol	0,42 %
Glicerina	50 %
H <sub>2</sub> O destilada	

## Apéndice V



## Tabla complementaria al Capítulo VI

Tabla 1: Distancias genéticas de Gregorius con todos los años analizados.

	1	4	5	6	8	10	11	12	14	16	17	18	19	21	23	24	26	27	28	30	Ne	Ma	Na	
1	0,000																							
4	0,047	0,000																						
5	0,049	0,090	0,000																					
6	0,025	0,059	0,047	0,000																				
8	0,031	0,020	0,076	0,046	0,000																			
10	0,031	0,057	0,066	0,028	0,040	0,000																		
11	0,048	0,046	0,080	0,036	0,036	0,025	0,000																	
12	0,034	0,057	0,035	0,041	0,043	0,042	0,046	0,000																
14	0,065	0,096	0,059	0,081	0,086	0,090	0,104	0,061	0,000															
16	0,050	0,081	0,059	0,065	0,070	0,075	0,090	0,049	0,034	0,000														
17	0,059	0,065	0,057	0,067	0,056	0,061	0,056	0,028	0,070	0,057	0,000													
18	0,040	0,075	0,045	0,055	0,061	0,059	0,073	0,038	0,047	0,035	0,040	0,000												
19	0,064	0,064	0,068	0,080	0,054	0,079	0,075	0,060	0,068	0,085	0,069	0,076	0,000											
21	0,024	0,058	0,036	0,038	0,043	0,039	0,051	0,013	0,054	0,041	0,035	0,030	0,068	0,000										
23	0,029	0,067	0,059	0,021	0,052	0,033	0,045	0,041	0,084	0,070	0,067	0,060	0,081	0,037	0,000									
24	0,027	0,051	0,043	0,031	0,036	0,047	0,057	0,047	0,058	0,051	0,070	0,040	0,056	0,044	0,049	0,000								
26	0,062	0,036	0,095	0,073	0,040	0,072	0,055	0,064	0,085	0,083	0,071	0,083	0,042	0,070	0,082	0,057	0,000							
27	0,051	0,062	0,039	0,052	0,058	0,069	0,070	0,068	0,071	0,073	0,091	0,062	0,056	0,067	0,073	0,027	0,063	0,000						
28	0,042	0,049	0,043	0,053	0,044	0,057	0,058	0,053	0,068	0,070	0,076	0,060	0,045	0,051	0,062	0,027	0,054	0,017	0,000					
30	0,068	0,099	0,058	0,075	0,088	0,093	0,107	0,078	0,066	0,081	0,101	0,072	0,043	0,076	0,087	0,055	0,076	0,055	0,062	0,000				
Ne	0,039	0,043	0,074	0,028	0,029	0,027	0,024	0,042	0,099	0,082	0,065	0,073	0,078	0,045	0,033	0,049	0,060	0,069	0,055	0,101	0,000			
Ma	0,060	0,034	0,101	0,073	0,038	0,070	0,054	0,068	0,087	0,088	0,073	0,081	0,053	0,068	0,081	0,061	0,033	0,069	0,060	0,088	0,062	0,000		
Na	0,063	0,074	0,090	0,067	0,071	0,074	0,076	0,089	0,088	0,086	0,110	0,079	0,068	0,081	0,087	0,055	0,057	0,058	0,069	0,048	0,082	0,063	0,000	

Se incluyen 20 poblaciones de Argentina y tres de Chile Ne: Neltume, Ma: Mallalcahuello, Na: Nahuelbuta.

