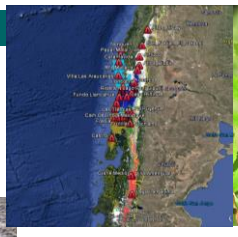
Ministerio de Agricultura
Gobierno de Chile
conaf.gob.cl
Universidad de Concepción
Fondo de Investigación del Bosque Nativo

068/2012
Certificación genética del origen de materiales reproductivos de Coigüe mediante herramientas moleculares y modelos ecológicos







068/2012
Certificación genética del origen de materiales reproductivos de Coigüe mediante herramientas moleculares y nichos ecologicos

financiado por

Fondo de Investigación del Bosque Nativo

Investigador Responsable
Rodrigo Hasbún Z[1], Dr.

Co-investigador (es)
Eduardo Ruiz P[2], Dr.
Darcy Ríos L[1], Dr
Glenda Fuentes A.[2], Dr.(C)
Diego Alarcón A.[2], Dr.(C)

Institución Patrocinante
Universidad de Concepción

Octubre, 2014
Concepción, Chile

[1] Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepcion.

2 Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

AGRADECIMIENTOS

El equipo de investigación desea agradecer a el Fondo de Investigación del Bosque Nativo de CONAF por los recursos financieros facilitados para la ejecución de este estudio.

Se agradece las facilidades dadas para el muestreo por Luis Sandoval CONAF (VIII Región), Pablo Donoso de UNIVERSIDAD AUSTRAL, Bárbara Langdon de BIOFOREST S.A., Elda Brandt, Boris Fica y Patricio Viluñil de FORESTAL BOSQUES ARAUCO S.A.

Adicionalmente, se agradece el acceso otorgado por CONAF a las unidades de SNASPE visitadas durante el proyecto y el apoyo brindado en terreno por Hugo Alvarez (FORESTAL VALDIVIA S.A.), Abelardo Veldebenito (FUNDO LLANCAHUE), Juan Iraira (RESERVA NACIONAL NONGUÉN). En especial se agradece el muestreo realizado en la Región de Aysen por José Perez (CONAF).

Se agradece el apoyo brindado durante el trabajo en terreno de familiares, amigos y colegas; en especial a Angela Sierra (UNIVERSIDAD DE CONCEPCION), Fernando Carrasco (UNIVERSIDAD DE CONCEPCION) y Anita Cisternas (UNIVERSIDAD DE CONCEPCION).

Finalmente un especial reconocimiento a todos aquellos que contribuyeron para que esta propuesta llegara a buen término y a partir de ella se proyecten muchas preguntas, ideas y desafios por resolver. Se reconoce el trabajo esforzado y dedicado de las asistentes de investigación Daniela Fernandez, Giannina Espinoza y Paulina Rivas, quienes lograron vencer los optáculos que fueron apareciendo durante el desarrollo de la investigación en el Laboratorio de Epigenética Vegetal de la Facultad de Ciencias Forestales (UNIVERSIDAD DE CONCEPCION). Sin duda que el aporte de los estudiantes fue fundamental y en este sentido se reconoce los aportes de Joseline Valdes, Jorge Gonzalez y Javiera Vargas, todos memoristas asociados al proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos i
Tabla de Contenido 2
Índice de Tablas 3
Índice de Gráficos 3
Índice de Figuras 3
Resumen 4
1. Introducción 5
2. Marco teórico 7
3. Hipótesis 25
4. Objetivos 25
5. Metodología 26
6. Resultados 32
DIEGO ..... **¡Error! Marcador no definido.**
Bibliografía 44
Anexos 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Producción de plantas nativas por tamaño de vivero y principales especies año 2011.
Tabla 2.2. Listado con resultados de la consulta para coigüe en la base de datos del CIACEF.
Tabla 2.3. Tipos de materiales de base y categorías admitidos por el sistema de comercialización del material forestal de reproducción.

Tabla 2.4. Características de los materiales de base correspondientes a las distintas categorías de los materiales de reproducción.

Tabla 2.5. Algunos criterios de clasificación de diferentes tipos de marcadores moleculares utilizados hasta la fecha en estudios de genética evolutiva y de poblaciones en especies del género Nothofagus (modificado y adaptado de: Gallo et al. 2006).

Tabla 5.1. Lista de subpoblaciones de *N. dombeyi* muestreadas, se muestra el estrato al cual pertenecen (ver Tabla 1), y el número de individuos seleccionados para análisis por GBS, cada subpoblación poseía N=24.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 2.1. Número de publicaciones en porcentaje, según tipo de marcador molecular, entre los años 1992-2014 sin considerar estudios en progreso.
Grafico 2.2. Número de estudios por especies del genero Nothofagus (nativas y exóticas), en relación a uso de marcadores moleculares (más detalle en la tabla 2.5).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Representación esquemática de la cadena productiva de plantas forestales indicando los momentos más adecuados para control visual o diagnóstico molecular.
Figura 2.2. Esquema general de la técnica Genotyping by sequencing.

RESUMEN

Este proyecto busca sentar las bases para garantizar el suministro de semillas de Coigüe con calidad genética basándose en los avances producidos en el área de la genética, el mejoramiento genético forestal y el modelamiento ecológico. Específicamente se utilizarán marcadores AFLPs y SNP's de para la catalogación del material genético presente en Chile. Se espera realizar una clasificación precisa de las áreas de crecimiento de Coigüe mediante herramientas moleculares y modelos ecológicos. El uso de modelamiento de nichos permitirá conocer la situación actual y las proyecciones a mediano-largo plazo (dentro del siglo). La integración de ambos resultados constituye un esquema de estudio innovador planteado en este proyecto, que permitirá localizar áreas productoras de semilla con capacidad de abastecer extensas regiones de procedencia. La identificación de estas áreas estará apoyada en la información del modelamiento, las cuales serán seleccionadas por proyecciones de bajas tasas de cambios en el largo plazo. Adicionalmente, y como resulto secundario se identificarán zonas que requieren esfuerzos futuros de conservación y/o restauración, y zonas de vulnerabilidad por cambio climático, información que será de uso público. Para cumplir el objetivo principal del proyecto, enfocado a la certificación de origen, se espera generar herramientas simples y económicas basadas en PCR, que podrán ser usadas en un laboratorio básico de diagnóstico molecular. Se generará un banco de ADN de los materiales de base presente en estas áreas productoras de semilla y diseñarán herramientas moleculares que permitan diagnosticar el origen del material de propagación. El modelo experimental que se espera desarrollar para Coigüe podrá ser aplicado a cualquier otra especie relevante en el futuro y por cualquier grupo de investigación que reúna las condiciones mínimas para aplicar el esquema de estudio. Por otra parte, los estudios genéticos moleculares realizados con muchas especies forestales de todo el mundo en conjunto con simulaciones mediante modelamiento de nichos, están contribuyendo a un mejor conocimiento de los modelos de variación, los cuales van en apoyo del desarrollo de mejores sistemas de manejo y posibilitan el seguimiento de las variaciones en el distribución de las especies en el tiempo y en el espacio, contribuyendo a desarrollar planes de manejo, conservación y restauración de recursos.

1. Introducción

Las tasas marginales de plantación de especies forestales nativas, explicadas principalmente por la deficiente oferta de semillas y plantas de calidad genética óptima para los objetivos de forestación y reforestación, es uno de los puntos fundamentales que justifican este proyecto. Los resultados esperados están en directa relación con la Línea de Investigación 8 del año 2012 (Generar e implementar propuestas para mejorar la disponibilidad y calidad genética de semillas forestales de árboles nativos, con énfasis en el establecimiento de fuentes semilleras). Importantes pasos han sido dados por el Instituto Nacional Forestal (INFOR) y el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) mediante proyectos ya terminados y en curso enfocados en la elaboración de una normativa que regule y coordine entre sí los procesos de abastecimiento de semillas, producción de plantas y áreas de plantación en función del origen de las semillas. Sin embargo, aspectos genéticos y ecológicos no han sido suficientemente abordados, y sobretodo en especies como el coigüe, que presenta un gran potencial productivo pero que carece de programas de mejoramiento genético avanzado.

El establecimiento de fuentes semilleras requiere de la identificación de una zona o grupo de zonas sujetas a condiciones ecológicas suficientemente uniformes en las que se encuentran árboles o rodales que presentan características fenotípicas o genéticas semejantes. Estos individuos forman parte de las fuentes semilleras identificadas o regiones de procedencia, y aportan los materiales base de propagación para generar plantas de la más alta calidad genética para esas zonas, junto con constituir el material base para nuevos ciclos de mejoramiento. El resultado de la correcta determinación de las regiones de procedencia se ve a largo plazo y todos los errores incluidos en las estimaciones ecológicas, fenotípicas y genéticas se pueden traducir en pérdidas de biodiversidad y dificultades para alcanzar los potenciales productivos. Las características fenotípicas resultan de fácil observación, pero están muy influenciadas por el ambiente y su control genético es normalmente desconocido. Sin embargo, las variables ecológicas y genéticas pueden ser estimadas con alta precisión mediante el uso de modernas herramientas. Estas apoyan la adopción de mejores medidas de conservación y aumentan las tasas de ganancia en menor tiempo. En este proyecto se utilizarán metodologías de modelamiento de nicho que darán cuenta de la distribución actual y futura proyecta a 100 años del coigüe, con lo que se logrará una definición efectiva de las zonas con potencial productivo para la especie, junto con la detección de zonas que requerirán esfuerzos de conservación o recuperación en el corto plazo. Ambos aspectos están directamente relacionados con los objetivos de la Ley N° 20.283, los cuales son "la protección, la recuperación y el mejoramiento de los bosques nativos, con el fin de asegurar la sustentabilidad forestal y la política ambiental".

Otro aspecto del proyecto que va en aporte directo a la línea de investigación, es la ejecución de estudios de diversidad genética para definir cuales son las fuentes semilleras más adecuadas para cada zona, lo que debería aumentar la oferta de semillas de procedencias conocidas.

En el corto a mediado plazo existirán en Chile normativas específicas sobre la calidad genética de las semillas forestales, al igual que ocurre actualmente Europa. Considerando que el objetivo final del proyecto es generar herramientas que permitan certificar las regiones de procedencia de los materiales reproductivos, no solo se favorecerá la disponibilidad semillas sino que también se podrán certificar su procedencia y calidad genética en función de los planes de mejoramiento genético, satisfaciendo completamente el objetivo de la línea de investigación.

Con respecto a la conservación, es importante señalar que los programas realizados a la fecha se han basado en el estableciendo de áreas protegidas, reservas y parques nacionales, sin prestar suficiente atención a la distribución de las especies y su variación genética tanto a nivel intraespecífica como interpoblacional. Ambos aspectos representa la materia prima para asegurar el mantenimiento de la capacidad adaptativa/evolutiva y el potencial de producción para satisfacer las necesidades actuales y futuras.

2. Marco teórico

2.1. Antecedentes históricos.

La conservación, utilización y manejo de especies arbóreas nativa tiene una serie de beneficios ambientales, sociales y económicos. Su protección y uso sustentable favorece la conservación de los recursos genéticos para las futuras generaciones, junto al cuidado de los recursos hídricos y de suelo, contribuye notablemente a la atenuación del clima local, reduce el impacto de emisiones de gases invernadero y ayuda a la conservación de los hábitats naturales y de la diversidad biológica. Desde el punto de vista social tiene una serie de funciones recreativas y de valoración del paisaje. Adicionalmente, la posibilidad de generar una variada gama de productos madereros y no madereros a partir de especies forestales nativas como *Nothofagus nervosa* (raulí), *Nothofagus oblicua* (roble), *Nothofagus dombeyi* (coigüe) y *Quillaja saponaria* (quillay) entre otras, ha incentivado notablemente su uso en las últimas décadas, convirtiéndolas en alternativas reales de diversificación forestal.

El Instituto Forestal de Chile (INFOR) en su misión de apoyar a las instituciones públicas y agentes económicos privados del sector forestal, a través de la generación de información y tecnologías para una eficiente asignación y uso sostenible de los recursos forestales, ha establecido desde 1962 múltiples ensayos desde la I Región (R. de Tarapacá) a la XII Región (R. de Magallanes), con más de 300 especies tanto exóticas como nativas. A partir del año 1997, INFOR inicia el programa de mejoramiento genético de especies nativas, con *Nothofagus pumilio* (lenga), *N. alpina* (raulí), *N. dombeyi*, *N. oblicua*, *Laurelia sempervirens* (laurel) y *Eucryphia cordifolia* (ulmo), a través del cual hoy se están habilitando fuentes productoras de semillas genéticamente mejoradas. En 2008 se promulga la Ley de Recuperación del Bosque Nativo y Fomento Forestal, que busca fundamentalmente proteger, recuperar y mejorar las especies nativas del país, asegurando su sustentabilidad forestal, mediante planes de manejo y preservación. Se crea un Fondo de Conservación, Recuperación y Manejo Sustentable del Bosque Nativo que es administrado por el Ministerio de Agricultura. A través de él se otorgan bonificaciones para solventar, en parte, el costo de las actividades que favorezcan la regeneración, recuperación o protección de formaciones xerofíticas (adaptadas a la aridez) de alto valor ecológico o de bosques nativos de preservación.

Antes de la entrada del nuevo milenio, Donoso et al. (1999) señalaron que dado el potencial de crecimiento y calidad, las especies más plantadas en el centro sur de Chile son raulí y coigüe. En menor medida se utilizaba ulmo y roble para fines madereros, y en zonas de recuperación de bosques laurel, olivillo y lingue. En últimos 20-25 años se han plantado varias especies del género Nothofagus con una mayor tecnología silvícola, perfeccionando en primer lugar el primer eslabón de la cadena productiva que es la calidad de planta a utilizar, produciéndolas en viveros con altos estándares de producción. A partir del año 2000 se registran las primeras experiencias con establecimiento intensivo de plantaciones (manejo físico del suelo, fertilización y control de maleza),

en dichas situaciones se han registrado crecimientos notables tanto en coihue como en Raulí, los cuales bordean en promedio 2 cm anuales en diámetro y 1,5 m en altura (Soto y Ríos, 2009). A pesar de estos bueno resultados, la demanda y con ello la producción de plantas forestales nativas sigue siendo marginal (2%) en relación a especies exóticas de rápido crecimiento como *Pinus radiata* (pino radiata), *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens* (95%). Dentro de las especies nativas, algunas presentan una mayor demanda de plantas (Tabla 2.1). Tal es el caso del quillay, raulí y roble, especies que en conjunto hoy representan más del 70% de las plantas producidas (INFOR 2011), cambiado notablemente su importancia en cuanto a producción de plantas en relación al año 2002 cuando aun no aparecían entre las 3 especies más comercializadas (Castillo y Moreno 2002).

Tabla 2.1. Producción de plantas nativas por tamaño de vivero y principales especies año 2011.

Tamaño del vivero	**N° de viveros**	**Quillay**	**Raulí**	**Roble**	**Coigüe**	**Otras Nativas**	**Total**
Micro	16	9.400	22.600	14.150	8.600	59.189	113.939
Pequeño	23	32.200	332.700	14.205	23.700	89.150	491.955
Mediano	38	539.250	309.500	489.000	81.700	412.610	1.832.060
Grande	10	252.000	100.000	89.600	113.200	98.603	653.403
Total	87	832.850	764.800	606.955	227.200	659.552	3.091.357
% de participación		27	25	20	7	21	100

Fuente: INFOR, 2011

Según los antecedentes que se presentan a continuación, esta tendencia no sería casual, sino que puede estar directamente relacionada con la implementación de programas de mejoramiento avanzados. La totalidad de los esfuerzos de mejoramiento genético para especies forestales del bosque nativo de chileno hasta el año 2000 aparecen claramente detallados en Castillo y Moreno (2002), donde se puede notar que roble, raulí y quillay recibieron gran atención. Adicionalmente para las dos primeras especies, en el año 2000 se inicia un ambicioso e innovador proyecto financiado por Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (FONTAGRO) en el que participó el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), INFOR, Corporación Nacional Forestal (CONAF), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuarias (INTA) de Argentina entre otras instituciones. El objetivo general fue evaluar la variabilidad genética de roble y raulí en Chile y Argentina mediante el uso de marcadores moleculares (RAPDs, cpADN) e isoenzimáticos para la fijación de criterios de conservación, mejoramiento genético, reforestación, manejo y aprovechamiento. El análisis conjunto de ambos tipos de marcadores permitió la identificación de áreas prioritarias para la conservación (según criterios genéticos) a partir de lo cual surgieron pedidos oficiales a las autoridades competentes en cada caso para; i) la re-categorización en el caso de áreas de jurisdicción de Parques Nacionales o ii) la declaración como área de reserva en el caso de bosques de propiedad privada. También se identificaron zonas de transferencia de semilla para el futuro manejo silvícola de la región.

En el caso del quillay la alta demanda de plantas puede estar explicada por su amplia distribución geográfica, multiplicidad de productos obtenidos a partir de sus extractos y un programa de mejoramiento genético dirigido por la Universidad Mayor a partir de 2004. El cual se basó en el desarrollo industrial de extractos de quillay y selección genotípica. Para cumplir el segundo objetivo, se realizó una evaluación de la diferenciación genecológica del quillay en Chile, muestreando individuos a lo largo de toda la distribución de la especie, entre la IV y la IX Región. Esta evaluación permitió preseleccionar un grupo de individuos en función de su rendimiento industrial, los que fueron clonados y usados en ensayos de terreno. Paralelamente, en conjunto con el INIA se hizo un estudio de la diversidad genética que presenta esta colección representativa del germoplasma de quillay, utilizando la técnica de análisis genético denominada "Amplified Fragment Length Polymorphism" (AFLP). Estos estudios permitieron describir el desempeño de los genotipos preseleccionados, sentar bases respecto a la incidencia genética y ambiental en la producción de los extractos del quillay, y además, seleccionar individuos para la implementación de un huerto semillero clonal.

Diferente ha sido la situación de coigüe, especie para la cual no se encuentran en las bases de datos nacionales iniciativas como las llevadas a cabo para raulí, roble y quillay. Se señala esto luego de conversaciones con expertos de la Universidad de Concepción, INFOR y CONAF, información ratificada luego de realizar una búsqueda en el Centro de Información de Experiencias de Adaptación y Crecimiento de Especies Forestales en Chile (CIACEF; www.infor.cl/ciacef/). El CIACEF es una base de datos orientada a poner en conocimiento y uso público la información de 48 años de investigación sobre especies forestales en Chile con fines productivos y de experimentación científica. La información entregada para coigüe se resume en la Tabla 2.2. Se detectan cuatro ensayos relacionados con mejoramiento genético. Estos ensayos son parte de un proyecto FONDEF destinado a generar fuentes de semilla genéticamente mejorada (huertos semilleros clonales y áreas productoras de semillas). No obstante, coigüe no ha logrado ponerse al nivel del Raulí, Roble o Quillay en cuanto a la producción y demanda de plantas.

Tabla 2.2. Listado con resultados de la consulta para coigüe en la base de datos del CIACEF.

Código	**Región**	**Clasificación ensayo**	**Año**
606	10	Silvicultura y Manejo de Bosques Plantados	1960
607	10	Silvicultura y Manejo de Bosques Plantados	1965
608	10	Silvicultura y Manejo de Bosques Plantados	1970
609	10	Silvicultura y Manejo de Bosques Plantados	1978
279	9	Silvicultura y Manejo de Bosques Plantados	1987
281	14	Silvicultura y Manejo de Bosques Plantados	1987
536	8	Producción de Plantas	1988
87	14	Mejoramiento Genético	2001
85	14	Mejoramiento Genético	2002
84	14	Mejoramiento Genético	2002
83	14	Mejoramiento Genético	2002
888	11	Agroforestería	2008
940	14	Silvicultura y Manejo de Bosques Naturales	2009
939	14	Silvicultura y Manejo de Bosques Naturales	2009

2.2. Identificación del problema.

La menor producción de plantas de coigüe podría estar explicada por un significativo déficit en la oferta de semillas de calidad que garanticen el traspaso del potencial productivo de la especie a los futuros proyectos de forestación o reforestación. En este sentido, el mercado de las semillas forestales en Chile (y en gran medida de las plantas), se caracteriza por un alto nivel de informalidad, compuesto por muchos proveedores pequeños que entregan productos de origen desconocido y muchas veces inadecuado para el lugar de plantación. Es posible que la falta de programas de mejoramiento avanzados en coigüe unido a la necesidad urgente de normativas que permitan certificar la calidad genética de las semillas forestales en general, estén afectando de manera particular a esta especie.

2.3. El caso del coigüe; alternativa de desarrollo forestal sustentable.

La capacidad de las especies latifoliadas para producción de madera, favorecer actividades asociadas a la conservación de suelos y agua, mejoramiento de hábitat para la vida silvestre y en general para el desarrollo sostenible del sector forestal productivo justifica su creciente uso en Chile (CONAF 2005, 2006; INFOR, 2011) como en otras zonas templadas (Barret y Jacobs 2006). Entre las latifoliadas nativas de Chile; roble, raulí y coigüe están entre las más valoradas. Luego de un gran trabajo de recopilación de información, Donoso y Soto (2010) resumen los resultados al menos 30 años investigación en plantaciones con especies nativas en centro-sur de Chile. Se consideran distintos esquemas de establecimiento, condiciones ambientales y de manejo cultural. Sobre la base de dicha información se puede concluir que en general, en sitios más mésicos (depresión intermedia y en ambas precordilleras hasta los 300 m.s.n.m.), coigüe se desarrolla muy bien en diferentes ambientes, a diferencia de raulí que requiere de condiciones específicas de luz, agua, nutrientes y interacciones con otras especies arbóreas y arbustivas. Dentro de estas experiencias, se pueden recopilar muy pocas plantaciones sometidas a una oportuna y adecuada silvicultura intermedia que demuestren el verdadero potencial de crecimiento y calidad de los productos maderables a extraer. Usando control de la vegetación competidora y fertilización inicial en el establecimiento de plantaciones de raulí y coigüe permiten aventurar modelos silvícolas teóricos muy auspiciosos (2 cm en diámetro y 1,5 m en altura en sus primeros 5 años de desarrollo), pudiendo ser comparables con *Pinus radiata* en un índice de sitio 28 (IS: altura a una edad clave de 20 años), lo que disminuiría las rotaciones de 40-50 años del coigüe a 25-35 años, dependiendo de la calidad de sitio. Respecto a la bonificación forestal, se afirma que la tabla de costo para plantaciones nativas de la Ley 28.283 de Fomento y Recuperación del Bosque Nativo, es insuficiente para pagar los costos de una plantación con alta tecnología silvícola a campo abierto. Sin embargo, cuando este punto mejore se van a demandar plantas de la mejor calidad genética para obtener los más altos rendimientos, ya que el negocio forestal es de largo plazo y concentra los mayores costos al inicio. El uso de plantas de calidad deficiente o generadas a partir de

semillas de un origen inadecuado para el sitio de plantación tiene un impacto negativo en la rentabilidad de un proyecto de forestación o reforestación. Seguramente la marginalidad en las tasas de plantación de especies como el coigüe se ven acentuadas por la ausencia de una oferta de semillas de calidad, lo que finalmente se traduce en pocos incentivos para su utilización, dado que resulta poco probable alcanzar el potencial productivo.

En un libro publicado por Castillo y Moreno (2002) se anexo un listado de las fuentes semilleras que tanto CONAF como otras instituciones han logrado indentificar y establecer. En el caso de coigüe se presentan 6 alternativas de las cuales solo tres son áreas productoras de semillas (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Fuentes semilleras para coigüe (*Nothofagus dombeyi*).

Código fuente	Región	Comuna	Lugar	Edad (años)
No-do/VIII-1	VIII	Santa Bárbara	Ñireco	90
No-do/APS Malalcahuello	IX	Curacautín	Malalcahuello	50
No-do/APS RN Malleco	IX	Collipulli	RN Malleco	60
No-do/APS Huilo-Huilo	XIV	Panguipulli	Neltume-Puerto Fuy	50 a 70
No-do/XIV-1	XIV	Puerto Mont	Lago Chapo	Bosque adulto
No-do/XIV-2	XIV	Puerto Montt	Sargazo	Bosque adulto

2.4. Normativa de comercialización de material forestal de reproducción.

La "calidad de la planta" involucra atributos morfológicos, fisiológicos y genéticos que determinan la supervivencia, adaptabilidad, crecimiento y productividad de un cultivo. Con excepción de algunos caracteres morfológicos, tales atributos no son perceptibles a simple vista, situación que genera una falla de transparencia de mercado y provoca incertidumbre en los compradores respecto al desempeño que exhibirán las plantas una vez establecida la plantación. Por consiguiente, la única garantía que le queda al usuario, en cuanto a la identidad que aparece en el documento de compra, es esperar que haya funcionado correctamente todo el flujo de controles establecidos en la cosecha de los frutos, el procesado y transformación en semillas, en el almacenamiento y comercialización y finalmente en la producción de planta. El mercado nacional de semillas nativas forestales se caracteriza por ser informal y por la comercialización de materiales de origen desconocido (INFOR 2011), lo que finalmente afecta la productividad y adaptabilidad de las especies. Dada la importancia de los materiales forestales de reproducción (frutos, semillas, plantas y partes de plantas utilizados en el

proceso de regeneración natural o artificial) se han establecido normas nacionales e internacionales que regulan el proceso de comercialización, desde los tipos de materiales de base de los que se pueden obtener, a las características que deben reunir estos materiales. De esta forma se busca disminuir la incertidumbre y otorgar cierta garantía a los compradores respecto de la calidad del producto que adquieren. Estos mecanismos de certificación son comunes en diversos países. En Europa hay dos sistemas de comercialización; i) para los estados miembros de la Unión Europea (UE) existe una directiva sobre comercialización de materiales forestal de reproducción (Sistema UE) de aplicación obligatoria para todos ellos: ii) con carácter abierto a todos los países la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) tienen un sistema de comercialización que los estados miembros que lo deseen pueden aplicar voluntariamente. Según estas normas el material de base está constituido por las poblaciones, plantaciones y clones de los que se obtiene el material forestal de reproducción. Los diferentes tipos de materiales de base que están admitidos para las especies reguladas por estas normas son: fuentes semilleras, rodales, huertos semilleros, progenitores de familia, clones y mezcla de clones. Se establecen cuatro categorías de material forestal de reproducción: identificada, seleccionada, cualificada y controlada, que pueden proceder de distintos tipos de materiales de base (Tabla 2.4) y los cuales son equivalentes a las categorías establecidas por la normativa chilena (ver detalles más adelante en el texto).

Tabla 2.4. Tipos de materiales de base y categorías admitidos por el sistema de comercialización del material forestal de reproducción.

Material de Base	**Categoría de los materiales forestales de reproducción**			
	Identificada	**Seleccionada**	**Cualificada**	**Controlada**
Fuente semillera	X			
Rodal	X	X		X
Huerto semillero			X	X
Progenitores de familias			X	X
Clon			X	X
Mezcla de clones			X	X

Adaptado de Alía et al. (2005).

De acuerdo a su categoría y al material de base del que proceden, los materiales de reproducción presentan características diferentes en cuanto a origen, componentes, tipo de selección y evaluación (Tabla 2.4), que están caracterizados por: i) la variación y diferenciación genética del material de base; ii) el tipo e intensidad de selección aplicado; iii) el esquema de cruzamiento utilizado para obtener los materiales de base; iv) el método de propagación y esquema de cruzamiento utilizado para obtener los materiales de reproducción; v) el tipo de ensayos necesarios para evaluarlos; vi) la ganancia genética obtenida.

En Chile existe una autoridad nacional responsable de la certificación de semillas (SAG), una ley (DL N° 1.764) y reglamentos complementarios que permiten su implementación en semillas de cultivo agrícolas y frutales, pero se carece de reglamentación específica para especies forestales. Hasta el año 2006 no existieron estándares oficiales de calidad para plantas de especies forestales. Ese año el Instituto Nacional de Normalización (INN) junto al INFOR, el SAG y otros participantes, crean la Norma Chilena Oficial 2957 que regula el proceso de certificación de la producción y comercialización de materiales de propagación de uso forestal para las especies *P. radiata, E. globulus, E. nitens, Pseudotsuga menziesii* y *N. dombeyi* (INN 2006). Con esta norma, la idea de certificación aparece por primera vez en el mercado de plantas forestales, integrándose como el primer eslabón en la cadena de custodia (trazabilidad). Esta norma, de carácter voluntario, se fundamenta en la necesidad de estándares de calidad para plantas forestales, estableciendo los requisitos morfológicos y fisiológicos mínimos que debe cumplir cada especie para obtener la certificación. Sin embargo, aun se carece de pautas básicas de ordenamiento genético territorial lo que podría estar ocasionando pérdidas económicas por uso de materiales que no están adaptados y pérdidas de diversidad genética en procedencias locales, debido a contaminación producida por individuos de otras procedencias. Conscientes de esta situación, el INFOR como beneficiario, y el SAG como mandante y oferente, ejecutan actualmente un proyecto INNOVACHILE, con el objetivo de "Desarrollar una Propuesta de Reglamento de Semillas y Plantas Forestales", para reducir la incertidumbre que al momento de la compra enfrentan los forestadores respecto a la idoneidad y desempeño futuro de estos materiales. Para tal efecto se propone desarrollar normativas técnicas que permitan regular las áreas de producción y utilización de semillas (mapa de regiones de procedencia y establecer estándares de calidad para las plantas), y articularlas en un Reglamento de Certificación de Semillas y Plantas Forestales, el cual se generará mediante un proceso amplio de consulta a expertos y a los actores relevantes involucrados en esta materia.

2.5. Regiones de procedencia.

En el caso de especies forestales, se trata de buscar las semillas que contengan las variantes genéticas (o alelos) relacionadas con caracteres de crecimiento, producción y adaptación, más idóneas para una determinada ubicación geográfica. Para ello se seleccionan grandes unidades territoriales para la comercialización de materiales de reproducción según su procedencia, obteniéndose las semillas de rodales, huertos o de árboles padres selectos. Las fuentes semilleras están constituidas por árboles situados dentro de una zona de recolección de frutos y semillas, con una superficie tal que contenga uno o más grupos de árboles bien distribuidos y en número y densidad suficiente para asegurar una adecuada polinización cruzada. La utilización de una fuente de semilla inadecuada puede producir la pérdida parcial o total de la reforestación, pero el peor daño que se puede producir es que la masa instalada logre llegar a la edad de reproducción y su polen entre en

competencia con masas naturales de la zona (Zobel y Talbert, 1984; Mesén et al., 1996).

Para las especies a las que se aplica un sistema de certificación de materiales de reproducción, se definen unidades de comercialización en los materiales identificados y seleccionados (Tabla 2.4 y 2.5), que corresponden a divisiones de su distribución geográfica. A cada unidad básica resultante de la división en regiones se la denomina región de procedencia. La región de procedencia se define para una especie como la zona o el grupo de zonas sujetas a condiciones ecológicas suficientemente uniformes en las que se encuentran fuentes semilleras o huertos que presentan características fenotípicas o genéticas semejantes, teniendo en cuenta límites de altitud, cuando proceda (Zobel y Talbert, 1984). La región de procedencia determina los límites geográficos máximos dentro de los cuales se puede mezclar la semilla recolectada de fuentes semilleras. Según la normativa internacional de la OCDE (2007) si no se han establecido regiones de procedencia, por no tener fuentes semilleras o huertos identificados que justifiquen la producción de materiales de reproducción, no se puede comercializar material de reproducción de las categorías identificado o seleccionado a partir de materiales de base. Solo podrían aprobarse materiales de base para la producción de materiales de reproducción de las categorías cualificada y controlada (Tabla 2.4 y 2.5) lo cual demanda más tiempo, ensayos y recursos para su aprobación.

Tabla 2.5 Características de los materiales de base correspondientes a las distintas categorías de los materiales de reproducción Adaptado de Alía et al. (2005)

Factores materiales de base	Categoría de los materiales forestales de reproducción			
	Identificada	Seleccionada	Cualificada	Controlada
Origen	Una región deprocedencia	Una región procedencia	No aplicable	No aplicable
Constitución del material de base	Conjunto de arboles o población	Población	Individuos o clones	Población o individuos
Tipo de selección	Sin selección	Selección a nivel población	Selección individual	Selección a nivel población/ind
Evaluación	Ninguna	Fenotípica	Fenotípica	Genética
Ensayo	No	No	No necesarios /experimental	Obligatorio
Ganancia genética	Ninguna	Baja	Media	Alta

Para la delimitación de regiones de procedencia dos son los métodos más utilizados: i) aglomerativo y ii) divisivo (CTGREF, 1976; Lindgren y Ying, 2000; Kleinschmit et al., 2004; Geburek y Konrad, 2008). El método aglomerativo se basa en la unión en una misma región de procedencia de las zonas (o fuentes semilleras o rodales) de una especie que presentan características ecológicas, fenotípicas o genéticas similares. Las zonas homogéneas de cada especie se determinan tras analizar los patrones de

variación fenotípicos y genéticos, así como los factores que más influyen en la diferenciación de las poblaciones: aislamiento geográfico, características ecológicas, etc. Con respecto al método divisivo, se realiza una división territorial en zonas con características ecológicas similares, que se supone darán lugar a fuentes semilleras o rodales con características fenotípicas o genéticas similares. La división se suele realizar a partir de las regiones biogeoclimáticas. Muchas veces el interés diferencial por las especies, así como el distinto grado de conocimiento y de los factores que ocasionan su variación genética, obliga a que se usen los dos métodos. Los criterios para establecer esas uniones o divisiones territoriales son, por un lado la similitud ecológica, y por otro la similitud en las características fenotípicas o genéticas de las masas forestales que habitan en ellas. La aplicación práctica difiere entre los distintos países, pues las regiones establecidas dependen de la información disponible sobre las especies o el territorio. En general se utilizan distintos criterios, tales como ecológicos (clima, geología, suelo), geográficos, de distribución de las especies, económico-silvícolas y relacionados con límites administrativos. La información disponible sobre la variación genética de las especies se utiliza en pocos casos, ya que esta información suele ser incompleta y referida a pocas poblaciones. En el mejor de los casos los datos procedentes de los ensayos de procedencias-progenies y de marcadores moleculares pueden ser utilizados para precisar los límites entre las regiones (Alía et al., 2005).

2.6. Control de los materiales forestales de reproducción.

El sistema de control consta de dos componentes fundamentales; 1) una serie de normas y 2) una organización administrativa. Esta última, en base a las normas monitorea los procesos de producción y comercialización, asegurando que la identidad (origen) y la calidad genética (categoría) asignada a un determinado material forestal de reproducción no sea alterado en ninguna fase del proceso, y garantiza que su calidad exterior cumple con valores dentro de rangos establecidos. Su establecimiento se basa en la necesidad de protección del usuario de materiales forestales ante la práctica imposibilidad de reconocer de manera objetiva e inmediata la identidad y de evaluar la calidad genética del material de reproducción. La correcta aplicación de la normativa necesita el apoyo de herramientas y procedimientos específicos para el control de su cumplimiento. En este sentido, las técnicas de marcadores moleculares se perfilan como instrumentos adecuados de diagnóstico, ya que permiten a productores como a controladores, un apropiado seguimiento en los procesos de producción, comercialización y utilización de algunos tipos de material forestal de reproducción (Figura 2.1). Con un sistema de control bien establecido basado en marcadores moleculares se puede conseguir la trazabilidad completa desde el material base, pasando por la fase de semilla, planta, materia prima sin procesar (productos madereros y no madereros) hasta el producto final (Finkeldey et al., 2010).

Actualmente se dispone de un amplio número de marcadores moleculares, herramientas que están en constante aumento y

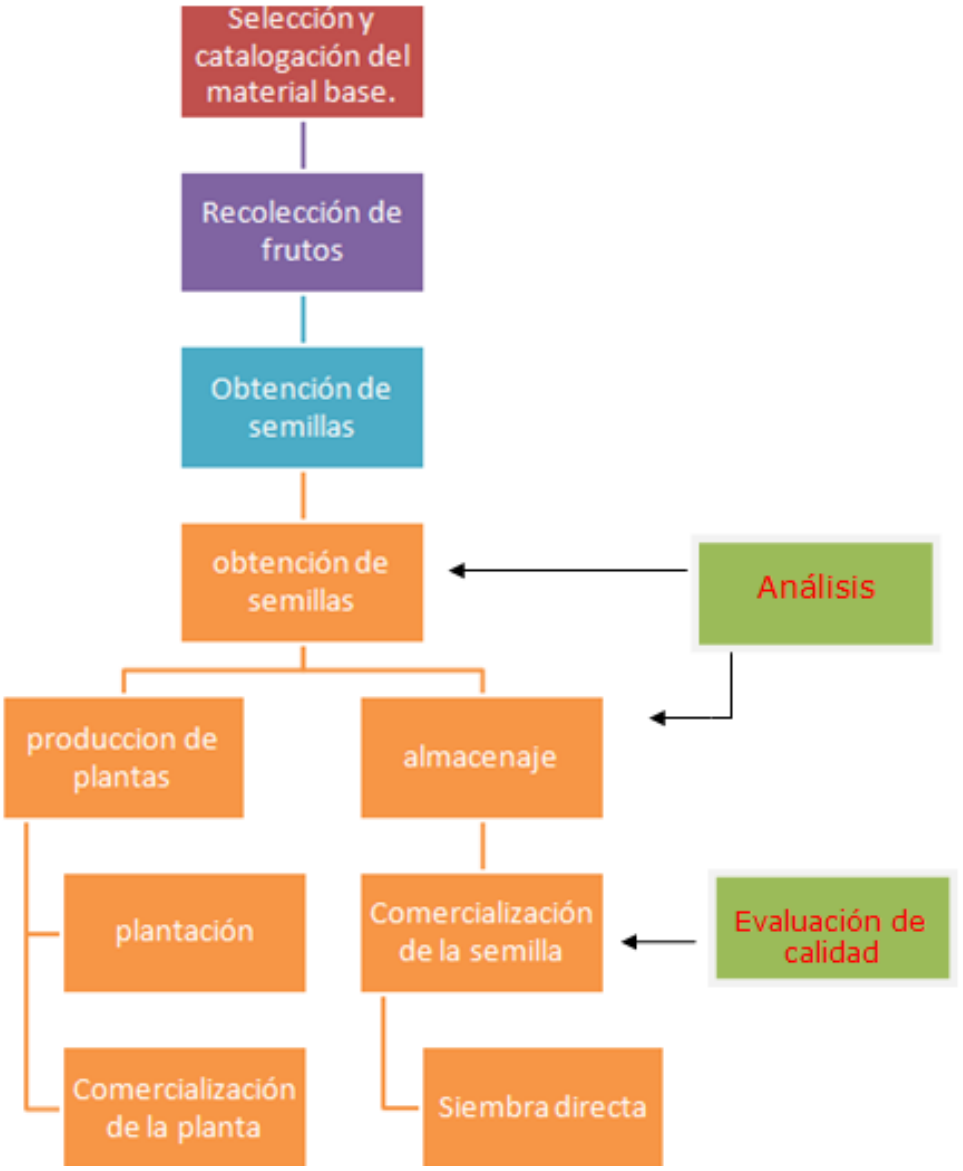
perfeccionamiento. Dichas herramientas tienen diversas potencialidades para el diagnóstico, de modo que puede afirmarse que existe un marcador para cada objetivo, como por ejemplo; i) caracterización rápida de los niveles de diversidad genética de las poblaciones (e.g. isoenzimas, RAPD), ii) identificación y verificación de la autenticidad del material forestal de reproducción (e.g. barcodes, SSR, SCAR), iii) estimación simple de otros parámetros genéticos relacionados con su calidad como la heredabilidad (e.g. SSR, AFLP, SNPs).

El uso de marcadores moleculares en el proceso de control de los materiales de base y de reproducción está bien demostrado y documentado (Alía et al. 2005, Deguilloux et al. 2003, Deguilloux et al. 2004, Finkeldey et al. 2010), al igual que su uso en el género *Nothofagus* (Mattioni et al. 2002, Azpilicueta et al. 2004, Premoli y Kitzberger 2005, Gallo et al. 2006, Marchelli et al. 2008, Mathiasen y Premoli. 2010). A nivel práctico, los marcadores moleculares tienen diversas aplicaciones en el campo de la conservación y el mejoramiento genético (Glaubitz y Moran 2000):

- Medida de la diversidad genética y la diferenciación
- Estimación de las tasas de flujo genético o migración
- Caracterización del sistema de reproducción
- Análisis de paternidad y parentesco
- Determinación de la eficiencia de los huertos semilleros
- Identificación de clones y material forestal de reproducción
- Estudios de filogenia y taxonomía
- Mapas de ligamiento genético, análisis de genes que controlen rasgos cuantitativos (QTLs), selección asistida por marcadores.

En este punto es necesario resaltar que así como los marcadores moleculares tienen sus ventajas, también tienen desventajas que pueden limitar su aplicabilidad. Las diferencias entre poblaciones de una misma especie que ocupan distintas regiones se pueden atribuir, en parte, a procesos de modificación fenotípica como respuesta a las distintas condiciones climáticas y edáficas locales. Sin embargo, existen importantes diferencias que tienen una base genética y han sido objeto de selección natural o artificial a lo largo de un determinado número de generaciones. Estas diferencias genéticas son la base sobre la que se establece la delimitación de las regiones de procedencia de las principales especies forestales, como unidad básica de comercialización en los materiales de reproducción. Se distinguen dos tipos de variación; la diversidad neutral, es decir, aquellos rasgos no determinados por fuerzas selectivas, y la variación adaptativa, constituida por los caracteres con valor adaptativo. La primera se estima principalmente mediante marcadores moleculares, existiendo diversas técnicas para estudiar tanto proteínas como el ADN. El método clásico de estudio de la variación adaptativa son los ensayos de procedencia/progenies, en los que se analiza el grado de variabilidad y el porcentaje de ésta que corresponde a una variación genética (Jiménez y Collada 2000). La base de estos estudios es ensayar distintos genotipos en un mismo ambiente con el fin

Figura 2.1. Representación esquemática de la cadena productiva de plantas forestales indicando los momentos más adecuados para control visual o diagnóstico molecular.



de minimizar la variabilidad ambiental (Donoso y Gallo 2004). Sin embargo, la presencia de alelos únicos o que muestran diferencias significativas en su frecuencia para distintos grupos (detectados mediante marcadores moleculares), puede ser un método efectivo de estudiar y utilizar la variación adaptativa. Estos marcadores también se conocer como loci outliers y mediante el uso de las herramientas biotecnólogicas actuales es posible identificarlos con relativa facilidad, confianza, rapidez y bajo costo.

2.7. Variación intraespecífica en coigüe.

En el caso concreto de coigüe por su amplia distribución geográfica (en Chile crece entre las provincias de Colchagua y Capitán Prat en ambas cordilleras y el sur de Argentina), con poblaciones grandes y continuas debería esperarse una elevada variación genética poblacional y un elevado flujo génico interpoblacional que reduce la divergencia interpoblacional, tal como ya fue demostrado mediante estudio de isoenzimas (Donoso et al. 2004, Donoso et al. 2006). La mayoría de la variación genética se encontró dentro de las poblaciones, mientras que el porcentaje entre distintas poblaciones resultó ser muy bajo. Del total de loci, el 70% resultó monomórfico en al menos una población. La heterocigosis observada (Ho) varió entre 0,063-0.104 y la heterocigosis esperada (He) entre 0,059-0,130 (Premoli 1996). No obstante, se debe tener en cuenta que la variación electroforética detectable en isoenzimas es una pequeña fracción de la diversidad genética real una especie. Por otra parte, dichas herramientas moleculares complican la búsqueda de alelos únicos que tengan el potencial de ser utilizados en programas de mejoramiento y tiene baja capacidad de multiplexación (análisis de varios marcadores en una misma reacción). Entre estos marcadores se encuentran los SSRs, AFLP, y los SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Merchelli et al. (2008) y Soliani et al. (2010) desarrollaron SSRs para raulí y lenga, respectivamente. Estos marcadores demuestran ser altamente polimórficos y a la vez transferibles a otras especies de *Nothofagus* como el coigüe, detectándose heterocigocidades entre 0,604-0.834 y 0,118-0,867. Los AFLP ya fueron probados en *N. alpina* mostrando tasas de polimorfismo > 50% y heterocigocidades > 0.7 (Hasbún et al. 2012). Por su parte los SNP son muy polimórficos pero a la fecha no han sido utilizados en el género *Nothofagus* han comenzado a ser asequibles gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación y genotipificación que han reducido notable su costo de uso mediante nuevas tecnologías como "Genotyping by Sequencing" (GBS) (Elshire et al. 2011).

En el sur de Asía las distintas especies milenarias de *Shorea* (muy apreciadas por su madera) se han visto favorecidas con la aplicación de los marcadores AFLP, los cuales han ayudado a identificar especies, procedencias y genotipos locales y no locales, determinar zonas en las que se está perdiendo diversidad y facilitar la introducción de nueva diversidad para los programas de conservación integrada y de mejoramiento genético (Cao et al. 2006, Nuroniah 2009, Finkeldey et al. 2010). Esta herramienta puede servir también para mejorar el manejo de la variación genética intraespecífica (Brown y Kresovich 1996, Karp 2000). Por otra parte los SNPs son ampliamente utilizados en especies agrícolas y frutales para clasificación de germoplasmas. Las frecuencias alélicas en diferentes colecciones de germoplasma son estimadas y utilizadas para identificar marcadores SNP con alelos únicos o alelos perdidos en colecciones de germoplasma específicos. Los alelos únicos por colección indican los alelos existentes sólo en un banco de germoplasma, pero no en los demás. Los alelos perdidos indican los alelos ausentes por completo en una colección de germoplasma, mientras que están presentes en todos las otras (Lu et al. 2009). Este tipo de

marcadores comienzan a ser una opción real de utilización en especies forestales mediante GBS, tecnología que ya fue probada en eucalipto (Faria el al., 2011).

2.8. Marcadores moleculares en el género Nothofagus.

En relación a los bosques chilenos y el manejo de nuevas tecnologías aún existe mucho por investigar por ejemplo el género Nothofagus (*N. alessandrii, N. alpina, N. antártica, N. betuloides, N.dombelyi, N. glauca, N. nítida, N. oblicua , N. pumillo*) especies que crecen al Sur de Chile y Argentina todavía se desconoce mucho en lo respecta el área de genética y herramientas moleculares, aunque los estudios comenzaron hace alrededor de 20 años solo se tiene referencia de datos de aproximadamente 10 años atrás, los cuales no logran entregar toda la información necesaria para ir solucionando problemas latente, careciendo de un genoma secuenciado las especies chilenas de este género resultan muy difícil solucionar los actuales problemas de selección, conservación y mejoramiento genético.

Los primeros trabajos con marcadores moleculares en especies del genero *Nothofagus* corresponden a estudios de taxonomía y clasificación filogenética (Haase 1992) estudios que fueron cerciorados en el año 2006 mediante la publicación de Gallo *et al*. (2006). Una exhaustiva revisión bibliográfica en diferentes bases de datos arrojó que principalmente se han utilizado marcadores isoenzimatico, los cuales ya representan solo una porción menor de la diversidad genética, es decir son pocos informativos (Grafico 2.1; 2,2, Tabla 2.6). Otros estudios realizados corresponden a caracterización de poblaciones (FONTAGRO 2003, Gallo et al. 2006) pero estos solamente abocados mayoritariamente a especies *N. oblicua y N. alpina* (Gallo et al.2006, Azpilicueta et al.2009). En argentina un proyecto puesto en marcha "Estudio de genes candidatos para estrés abiótico en especies forestales nativas patagónicas", proyecto a cargo del Área Estratégica Biología Molecular, Bioinformática y Genética de Avanzada y del Programa Nacional Forestal del INTA, investigadores del Instituto de Recursos Biológicos, Instituto de Biotecnología y la EEA Bariloche, tuvo por objetivo desarrollar y analizar el genoma funcional de hoja de *N. nervosa*, un recurso genético forestal nativo patagónico de gran interés para la región por su valor económico y ecológico (INTA. 2013). En el proyecto se descubrió un número considerable de SSR los cuales fueron registrados. Para confirmar la validez de estos marcadores se seleccionó un subgrupo de 73 SSR los cuales mediante pruebas funcionales fueron amplificados con éxito en seis muestras de ADN de plántulas, siendo 14 muy polimórficos. Por último, también se ha analizado la variación con marcadores en ADN de cloroplasto, que por sus características (tasa de evolución altamente conservada y herencia uniparental (materna) y clonal) permiten estudiar la historia evolutiva de las especies Además, en este caso se estudiaron 15 poblaciones de Chile. Con estos marcadores se observaron diferencias entre las Cordilleras de la Costa y de los Andes y, en esta última, dos grandes grupos de poblaciones separadas en sentido norte-sur.

Grafico 2.1. Número de publicaciones en porcentaje, según tipo de marcador molecular, entre los años 1992-2014 sin considerar estudios en progreso.

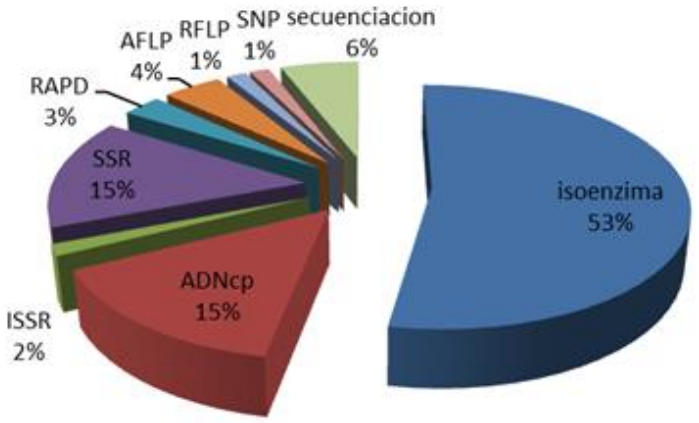


Grafico 2.2 Número de estudios por especies del genero Nothofagus (nativas y exóticas), en relación a uso de marcadores moleculares (más detalle en la tabla 2.5).

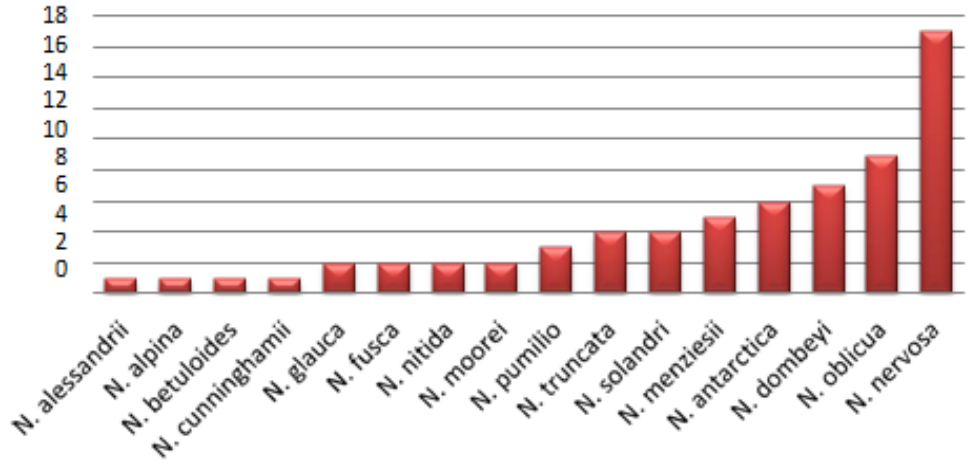


Tabla 2.6. Algunos criterios de clasificación de diferentes tipos de marcadores moleculares utilizados hasta la fecha en estudios de genética evolutiva y de poblaciones en especies del género Nothofagus (modificado y adaptado de: Gallo et al. 2006).

Tipo de marcador	Tipo de ADN	Temas abordados	Referencias
Isoenzimas	cl, g	Distribución espacial y geográfica, variación de isoenzimas, conservación e interpretación evolutiva, estructura genética y heterocigosidad, determinación marcadores, diversidad y diferenciación genéticas, hibridación, filogenia, flujo génico, conservación	Haase. 1992, 1993ab y 1994; Gallo. 1995; Gallo et al. 1997,2000ab, 2003; Premoli. 1996, 1997, 1998 , 2003, 2005; Azpilicueta y Gallo. 2001, 2002,2009; Marchelli y Gallo. 2000ab, 2001, 2004a; Pineda.2000ab; Martinez et al. 2001; Crego y Gallo. 2002ab; Carrasco y Eaton. 2002; Marchelli. 2002; Steconni et al. 2002 y 2004; FONTAGRO. 2003; Donoso et al. 2004; Pastorino et al. 2008, 2009; Martín et al. 2010, Carrasco et al. 2011, Acosta M. et al 2012
PCR-RFLP cpADN	cl	Distribución de la variación genética en poblaciones, Caracterización genética, Diferenciación, determinación de refugios, caminos migratorios.	Premoli. 1997; FONTAGRO. 2003; Manos. 1997; Marchelli et al. 1998; Marchelli y Gallo 2000b, 2004b y 2006; Thomsen. 2002; Azpilicueta et al. 2005 y 2009; Pastorino et al. 2008.
ISSR	g	Desarrollo, diversidad y diferenciación.	Mattioni et al. 2002
SSR	cl, g	Genética poblacional y mejoramiento, Conservación e interpretación evolutiva, Trascriptomica y búsqueda de marcadores moleculares	Azpilicueta y Gallo. 2001; Jones. 2004; Schultz. 2008; Torales. 2012; Marchelli y Gallo 2000b; Azpilicueta et al. 2004; Marchelli et al. 2007; Soliani et al. 2010; Azpilicueta et al. 2013;Vergara et al.2014
RAPD	g	Desarrollo, diversidad y diferenciación.	Mattioni et al. 2002, FONTAGRO. 2003
AFLP	-	Conservación e interpretación evolutiva	Schultz. 2008; Stockler. 2001; Till-Bottraud et al. 2012.
RFLP	-	Filogenia	Manos et al 1993
SNP	-	Ecología molecular	Bechet et al. 2009
Secuenciación	g	Filogenia	Martín y Dowd 1993; Manos 1997; Manos y Steele 1997; Setoguchi et al. 1997.

g: ADN genómico total; cl: ADN cloroplastidial

2.9. Nuevas herramientas moleculares basadas en enzimas de restricción y secuenciación de alto rendimiento.

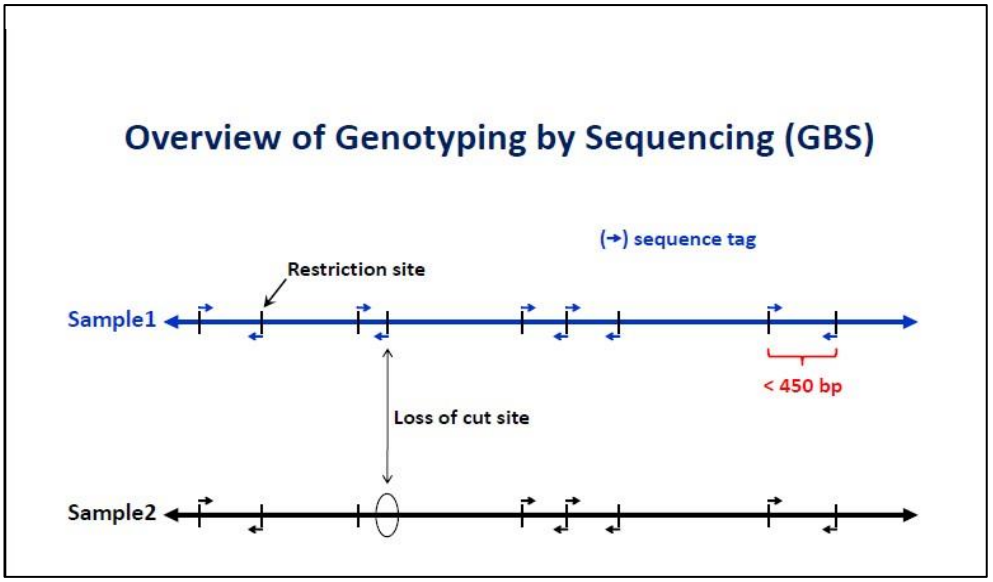
El descubrimiento de las enzimas de restricción permitieron el desarrollo de los primeros marcadores moleculares (RFLP) y han ido contribuyendo de manera continua a gran parte de las nuevas herramientas que van surgiendo (ej. AFLP, SNP). Las enzimas de restricción son fundamentales para la genotificación de alto rendimiento basada en secuenciación de nueva generación (NGS; Next Generation Sequencing). Hoy en día estas dos técnicas han ido evolucionado al punto que su fusión dio origen a la técnica de genotipificación por secuenciación (GBS; Genotyping by Sequencing), donde los polimorfismos en lugar de estar basados en la longitud de los fragmentos, se buscan en variantes estructurales o SNP (Elshire et al. 2011). La diversidad de enzimas de restricción disponibles (que varían en la longitud, sitios de reconocimiento, y también en su sensibilidad a metilación) permite optimizar el método a cualquier especie. Su flexibilidad permite a los investigadores personalizar enfoques de investigación y descubrimiento de marcadores en proyectos individuales (Davey 2011).

La genotipificación por GBS es un sistema sencillo, robusto y eficiente para la construcción de librerías, basándose en la digestión del ADN para una reducción representativa del genoma y la determinación de la secuencia de los fragmentos basado en técnicas de secuenciación masiva en sistema tales como Illumina, 454, Ion torrent, etc. el enfoque de esta es técnica es genotipificación por secuenciación y es adecuada para todo tipo de genomas, incluso aquellos grandes y complejos, ya que es capaz de generar una versión reducida de este, mediante el uso de enzimas de restricción. En particular se usan enzimas de restricción altamente sensibles a la metilación, lo que permite que grandes bloques de ADN altamente metilados (normalmente asociados a zonas repetitivas) queden fuera del análisis. De esta forma se cubren zonas genómicas codificantes y no codificantes que comúnmente quedan fuera con otras plataformas (ej. RNA-seq). Si a esto le agregamos la utilización de un eficiente sistema de multiplexación basado en el uso de "etiquetas" o barcodes que permite analizar en paralelo cientos de muestras, convierte a GBS en una técnica de alto rendimiento (Craig et al. 2008). La técnica fue desarrolla con el objetivo de crear un protocolo barato y solido de secuenciación múltiple (Elshire et al. 2011). Sin duda ha sido una de las plataformas más convenientes que han surgido en relación a la genotipificación y descubrimiento de SNP, ya que permite ambos procesos de una forma eficiente y a un bajo costo. Es una tecnología nueva que está siendo ocupada para diversos objetivos como un nuevo enfoque de genotipificado en especies que no tengan un genoma de referencia, o en especies polipoloides como el trigo. También se usa para la construcción de mapas genéticos de alta densidad, caracterizar germoplasmas y desarrollar modelos de selección genómica para programas de mejoramiento.

Esta técnica como se mencionaba anteriormente genera grandes cantidades de marcadores SNP (Elshire et al. 2011, Lu et al. 2013,

Nimmakayala et al. 2014), basados en los sitios de reconocimiento de las enzimas, los cuales al variar una base esto se pierden contribuyéndonos un polimorfismo (Figura 2.2).

Figura 2.2. Esquema general de la técnica Genotyping by Sequencing.



Los marcadores obtenidos se pueden usar para análisis genéticos incluyendo; estudios de población, caracterización de germoplasmas y mapeo de algunos caracteres en diversos organismos etc. Y aplicaciones futuras ya que permitirá a los cultivadores y mejoradores genéticos la selección de germoplasmas elite de especies de interés, sin realizar estudios moleculares previos o bien para hacer planes de conservación sin tener estudios genéticos previos.

Dentro de las ventajas de esta técnica cabe mencionar las siguientes:

- ☐ Reducción en la manipulación de la muestra
- ☐ Pocos pasos en PCR y purificación
- ☐ Tamaño de ADN pequeño (fraccionado)
- ☐ Eficiente sistema de multiplexación.
- ☐ Búsqueda de SNP y su genotipificación de forma simultánea.

Esta técnica depende y requiere de ADN de excelente calidad y alta pureza (libre de ARN). Actualmente se utiliza solamente 100 ng, aunque se están probando disminuir a 50 ng, pero en estricto rigor se necesita 1µL de muestra. Regularmente los laboratorios que prestan servicio piden al menos 1 ug de ADN por muestra, porque necesitan ADN extra para la robótica, repeticiones ocasionales y porque los usarios suelen sobrestimar la concentración de su ADN.

2.10. Cambio climático en Chile y particularidades de la zona centro-sur.

No se puede dejar de considerar que el clima constituye uno de los principales factores que dirigen los patrones de distribución espacial y productividad de las plantas. Las variables componentes del clima, se relacionan con los rangos geográficos y ecológicos de distribución de las plantas, de acuerdo a las restricciones fisiológicas que éstas presentan y determinan la supervivencia y productividad de sus poblaciones en un determinado lugar (Woodward 1987, Lomolino et al. 2006). Existe amplia evidencia acerca de la naturaleza dinámica del clima (Petit et al. 1999, Hinojosa 2005), la cual impulsa a las especies a ir adaptándose a las condiciones cambiantes (Woodward 1987, Villagrán & Hinojosa 1997). Pese a esto, la tasa de cambios del clima durante las últimas décadas, ha sido muy superior al ritmo de los siglos anteriores (Gitay et al. 2002, IPCC 2007). Una variable clave como la temperatura media global, ha presentado un aumento de cerca de 1°C durante el último siglo (IPCC 2007).

Si la tasa de cambios en el clima excede el ritmo de respuesta fisiológica de las especies, en especial la capacidad de las poblaciones de migrar o adaptarse, se puede esperar un profundo impacto adverso en la distribución de las especies, estructuras de comunidades y procesos ecosistémicos asociados (Ackerly et al. 2010).Las modificaciones que el cambio climático ocasiona en la distribución de las plantas y disminución de sus tamaños poblacionales, se asocian al hecho que los hábitats de muchas especies se desplazarán hacia los polos o hacia mayores altitudes desde sus localidades actuales (Walther et al. 2002, Lawler et al. 2006, Lenoir et al. 2008, Ackerly et al. 2010).

La tendencia de cambio climático para Chile centro-sur observa una merma de entre un 20-25% de precipitación anual registrada en las últimas décadas, y se prevé que continúe en el futuro (CONAMA 1999, CONAMA 2008, Searle & Rovira 2008). A ello debe sumarse el que una disminución significativa en el monto de las precipitaciones, generalmente va asociada a una mayor variabilidad en la periodicidad de las mismas (Woodward 1987). Por otra parte, la tendencia global de aumento en temperatura media anual también sería aplicable a las regiones centrales y sureñas de Chile, lo que conjuntamente podrá reducir aún más el régimen hídrico en las cuencas y por ende su disponibilidad para los ecosistemas y su productividad en estas regiones (CONAMA 2008, Searle & Rovira 2008).

3. Hipótesis

El uso herramientas de genotipificación molecular y el modelamiento de nichos ecológicos permiten definir regiones de procedencia de *Nothofagus dombeyi* en Chile y permiten sentar la bases para la certificación molecular a nivel de ADN del origen geográfico de materiales reproductivos.

4. Objetivos

4.7. Objetivo general.

Aplicar marcadores moleculares informativos y modelos ecológicos con fines de mejoramiento genético productivo, control de origen geográfico y conservación de poblaciones vulnerables a cambio climático

4.8. Objetivos específicos

OE1. Definir zonas de crecimiento de coigüe con potencial productivo y zonas con alta probabilidad de extinción local durante el siglo en curso, mediante modelamiento de nichos ecológicos.

.

OE2. Evaluar la diversidad genética de coigüe a lo largo de toda su distribución en Chile mediante marcadores moleculares altamente informativos (AFLPs y SNPs).

OE3. Identificar áreas productoras de semillas asociado la información genética y los modelos ecológicos.

OE4. Desarrollar marcadores moleculares simples para confirmar el origen geográfico de semillas de coigüe.

5. Metodología.

OE1. Definir zonas de crecimiento de coigüe con potencial productivo y con alta probabilidad de extinción local durante el siglo en curso, mediante modelamiento de nichos ecológicos.

5.1.1. Estudiar la distribución geográfica y ecológica actual del coigüe.

Las poblaciones existentes de coigüe incluyeron como fuente las localidades registradas en Herbarios oficiales tales como CONC, cartografía del bosque nativo a partir de CONAF-CONAMA-BIRF (1999) y actualizaciones, y otras investigaciones específicas que cubran la distribución de la especie de manera precisa. A partir de estas localidades, se evaluó el nicho ecológico según su definición clásica de Hutchinson (1957) para el coigüe, detallando su amplitud ecológica en cuanto a variables edafoclimáticas y topográficas, considerando tipos de suelo (SERNAGEOMIN 2004), altitud e índices climáticos derivados de medias mensuales modeladas para las temperaturas extremas y para la precipitación (Hijmans et al. 2005), disponibles para la distribución de la especie en el territorio.

5.1.2. Modelamiento de nichos.

A partir de la información del punto anterior, tanto para localidades del coigüe, como su información ecológicamente relevante siguiendo a Anderson et al. (2003) y Guisan et al. (2006), se realizaron modelos de nicho ecológico para la especie, relacionando información espacial explícita de las distribuciones geográficas de la especie y las variables ambientales mediante conjuntos de protocolos estadísticos comparados (RF, MAXENT, ANN, CTA, GAM, GBM, GLM, MARS, FDA y SRE), escogiendo aquellos de mejor ajuste absoluto (best model) y ponderando ensambles de modelos de mejor ajuste (ensemble forecasting) mediante el uso de software BIOMOD (Thuiller 2003) y MAXENT (Phillips et al. 2006). Este proceso arrojó una cartografía proyectada para todo el territorio nacional a escala espacial de tamaño mínimo cercano a 1 km2, tanto para un escenario de clima contemporáneo como también para escenarios futuros de cambio climático a lo largo del siglo en curso, permitiendo localizar aquellas poblaciones con riesgo de desaparecer por cambio climático y aquellas que permanecerán ante dichos escenarios (Guisan & Zimmermann 2000).

5.1.3. Identificar regiones de procedencias y poblaciones vulnerables según parámetros biogeoclimáticos.

Tomando los datos de los pasos anteriores, se definieron zonas locales y macrozonas a partir de las poblaciones naturales de la especie, asociadas a las zonas geográficas proyectadas en su nicho ecológico modelado. Esta delimitación se realizó por medio de métodos aglomerativos (*cluster*) espaciales para el territorio, de acuerdo a las variables edafoclimáticas a considerar y usando sistemas de información geográfica y *package raster* de R (R Development Core Team 2012; Hijmans & van Etten 2012). De

esta forma se puede zonificar en unidades relativamente homogéneas en términos ecológicos, que servirán de marco para la definición de las regiones de procedencias de la especie coigüe.

Por otro lado, se identificaron zonas geográficas cuya proyección comparada de sus modelos de nicho, para los escenarios de clima actual y futuro pueden implicar una pérdida futura de hábitat, mediante las herramientas del software BIOMOD (Thuiller 2003). Eventuales localidades que queden bajo esta categoría tendrán prioridad para conservación de su acervo genético en programas de rescate de germoplasma.

OE2. Evaluar la diversidad genética de coigüe a lo largo de toda su distribución en Chile mediante marcadores moleculares altamente informativos (AFLPs y SNPs).

5.2.1. Determinar reproducibilidad de marcadores AFLPs y SNPs para coigüe.

En el caso de los AFLPs ya se encuentra desarrollado un protocolo que funciona bien para raulí (Hasbún et al., 2012), sin embargo, se probará su aplicabilidad en coigüe para distintos tipos de materiales vegetales. El ADN genómico fue extraído con kit para purificación de ADN genómico. Para el análisis de los AFLPs se usaron partidores con marcaje fluorescente, análisis de fragmentos en secuenciador capilar y el uso del programa Gene Mapper. Se probaron 78 combinaciones selectivas de las cuales se seleccionaron las más polimórficas y reproducibles según metodología de Herrera y Bazaga (2010).

La SNPs fueron detectados y genotipificados en un solo paso mediante la tecnología de Genotipificación por Secuenciación (Genotyping-by-Sequencing) descrita en detalle por Elshire et al. (2011) o en http://www.maizegenetics.net/Table/Genotyping-by-Sequencing/. Las mismas muestras de ADN usadas para AFLPs fueron utilizadas para esta actividad. La construcción de librerías genómicas reducidas por enzimas de restricción sensibles a metilación y su posterior secuenciación con tecnología de nueva generación se realizó en Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, Madison, WI, Estados Unidos (EE.UU). La secuenciación se utilizó la plataforma Genome Analyzer II (Illumina, San Diego). El análisis bioinformático se realizó usando la pipeline Universal Network Enabled Analysis Kit (UNEAK), la cual es una extensión del programa Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage (TASSEL) usando la configuración predeteminada. Esta pipeline (UNEAK) fue diseñada para especies que no tengan genoma de referencia, como es el caso de *N. dombeyi.* Las instrucciones y documentación para correr el programa están disponible de forma gratuita en el sitio web "Buckler Lab for Maize Genetics and Diversity" y los comandos de UNEAK sonejecutados vía línea de comandos. El programa TASSEL es de uso libre y se encuentra de forma gratuita en el mismo sitio.

5.2.2. Muestrear poblaciones de coigüe potencialmente representativas de su diversidad genética.

Dentro de las poblaciones vulnerables y regiones de procedencias determinadas en la actividad 1.3 se realizaron muestreos en puntos determinados. Cada uno de estos puntos de muestreos fue cubierto por 20 individuos adultos de al menos 40 cm de DAP y separados por 50-100 m. Cada uno de estos árboles fue geo-referenciado mediante GPS

5.2.3. Genotipificación con marcadores AFLPs y SNPs.

Las muestras colectadas en la actividad 2.2 fueron procesadas con el fin de extraer ADN y proceder a genotipificadas con marcadores AFLPs según las condiciones determinadas en la actividad 2.1. Los muestreos fueron realizados de acuerdo a la disponibilidad de material vegetal y a las posibilidades de conservación del mismo durante las campañas de colecta. Es así como se muestrearon hojas en aquellos caso en que ramas de la copa se encontraban cercanas al suelo. En caso contrario se tomaron muestras de corteza más madera para extraer el ADN a partir de tejidos meristemásticos contenidos en ella (ej. felógeno y cambium). Por otra parte, algunas muestras fueron conservadas en frío (hielera eléctrica) hasta llevarlas hasta el laboratorio o en sílica para asegurar su secado rápido. De manera preliminar para el análisis con AFLP se tomaron solo 6 localidades y así poder estimar la variabilidad genética asociada a la especie. Además, este análisis exploratorio tiene por objetivo ver si existe estructuración poblacional que permita encontrar alelos únicos de los distintos estratos.

Para la genotipificación de los SNPs a partir de las subpoblaciones pertenecientes a distintos estratos detectados se seleccionaron entre 3 y 6 muestras (Tabla 5.1), excepto en Termas de Tolhuaca y Villa las araucarias, donde se seleccionó 9 y 7 individuos respectivamente. Esto en base a que se cree que se encontraban fuera de los límites del último máximo glacial durante el Holoceno en Chile, siendo posibles refugios glaciares donde se espera una mayor diversidad genética.

5.2.4. Caracterizar la diversidad intraespecífica y estructura poblacional de la especie.

Se realizó un análisis de agrupamiento para detectar subpoblaciones genéticamente homogéneas en el programa Structure 2.3.3. Previmente se utilizó el programa Arlequin y/o Bayescan para detectar los posibles loci outliers.

Para estimar la diversidad genética se calculó el índice de diversidad de Shannon (I), la heterocigosidad media (He) de Nei (1973), riqueza alélica (Número de alelos, Na; Número de alelos efectivos, Ne; número de alelos menos comunes) y el porcentaje de loci polimórficos AFLP (%P) a nivel de especie y a nivel poblacional con el programa GenAlEx versión 6.5 (Peakall & Smouse 2006; Peakall & Smouse 2012).

Tabla 5.1. Lista de localidades de *N. dombeyi* muestreadas donde se muestra el estrato al cual pertenecen (ver Tabla 1), y el número de individuos seleccionados para análisis de SNP por GBS.

.

Estrato	Subpoblación	N° de individuos seleccionados
1	Altos Lircay	6
1	Antuco	5
2	Ralco	6
2	Termas Tolhuaca*	9
3	Coihayque 1**	5
3	Coihayque 2**	5
3	Coihayque 3**	5
3	Coihayque 4**	5
4	Nonguén	6
4	Villa Las Araucarias	7
4	Caramavida	5
5	Mariquina	5
5	Lago Riñihue	3
5	Fundo LLancao	3
5	Lago Neltume	3
5	Parque Nacional Villarica	5
5	Loncoche Interior	3
5	Cunco***	3
6	Las Trancas	5
6	Maicolpué****	5
7	Parque Nacional Puyehue	3
7	Lago Rupanco	5

* Ex Reserva Nacional Malleco, ** Las subpoblaciones del estrato 3, son pertenecientes a poblaciones costeras de la Region de Los Lagos estas son propiedad de CONAF, *** muestras tomadas en Mellipuerco, **** muestras tomadas entre el camino de Osorno a Maicolpué por la ruta U-40.

Las diferencias entre pares de zonas se estimaron a través del índice de fijación F_{ST} (entre pares de poblaciones de haplotipos estacionarios de tamaño N) y la distancia de Nei (Nei y Li 1979), este último índice permite calcular el número promedio de pares de diferencias dentro y entre zonas, obteniendo los valores-p para cada índice en el programa Arlequin 3.5 program (Excoffier & Lischer 2010).

Del total de SNPs detectados mediante UNEAK se seleccionaron aquellos más confiables aplicando extrictos filtros en el programa Tassel generándose dos grupos de datos. Sin embargo, gran parte de la base de datos con marcadores SNPs detectados no serán directamente utilizados en el proyecto, sino que pretenden ser la base para iniciar estudios de genética funcional y estructural con relación a características funcionales de importancia ecológica y/o productiva en la especie (ej. resistencia al

frío, sequía, calidad de madera, resistencia a enfermedades, etc.). También será un importante recurso a mediano plazo cuando se inicie un proyecto de secuenciación del genoma del género Nothofagus. Todos los datos generados son de acceso público y pueden ser solicitados informándonos sobre el uso que recibirán junto con asegurar la correcta citación de los autores de los mismo. Para acceder a los datos se puede ingresar a la página web del proyecto: http://www.udec.cl/~origen_coigue.

OE3. Identificar áreas productoras de semillas asociando la información genética y los modelos ecológicos.

5.3.1. Refinar la delimitación de las regiones de procedencia y identificación de poblaciones vulnerables integrando los datos genéticos.

Esta actividad se realizará utilizando agrupamientos basados en características ecológicas y genéticas definiendo unidades territoriales homogéneas con potenciales para formar zonas de procedencia o que requieren esfuerzos futuros de conservación/restauración, y zonas de vulnerabilidad por cambio climático, de acuerdo a lo mencionado en los objetivos anteriores.

Para determinar las zonas mayor diversidad genética, los índices de diversidad genética (FST, Distancia de Nei, He, Shannon) serán visualizados como un "landscape" genético, en un Sistema de Información Geográfica (DIVA-GIS v5, libre en la red en http://www.diva-gis.org), siguiendo los protocolos propuestos por Miller (2005) y Vandergast et al. (2008).

5.3.2. Identificar potenciales áreas productoras de semillas para las distintas regiones de procedencia.

Dentro de cada región de procedencia se identificó una o más áreas productoras de semilla usando los criterios señalados por Keiding y Barner (1990) y siguiendo las recomendaciones de la normativa de la OCDE (2007). Se utilizaron parámetros demográficos (ej. composición y estructura poblacional) y genéticos (ej. tamaño efectivo poblacional > 30-50 para evitar problemas de endogamia, uniformidad genética intra-zona y diferenciación con otras zonas), entre otros parámetros que serán discutidos por el equipo del proyecto.

OE4. Desarrollar marcadores moleculares simples para confirmar el origen geográfico de semillas de coigüe.

5.4.1. Identificar alelos únicos para cada región de procedencia.

Los estadígrafos estimados en la actividad 3.1 serán también calculados por cada locus, junto con las frecuencias alélicas, varianza y la desviación estándar por locus y las frecuencias alélicas por población. Con estas frecuencias alélicas podrán distinguir los alelos que se encuentra en alta frecuencia y alelos de baja frecuencia, considerando estos últimos como

"raros" a nivel de toda la población. Se seleccionarán los "alelos raros candidatos" que además sean exclusivos de cada región de procedencia.

5.4.2. Generar marcadores simples tipo SCAR (basados en PCR) por detectar los alelos únicos.

La conversión de marcadores AFLPs y SNP raros desde perfiles de tipificación multilocus a marcadores mediante PCR de loci simples, técnicamente conocidos como marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), los transforman en herramientas potencialmente útiles para diagnóstico molecular. A partir de las secuencias se desarrollarán marcadores SCAR mediante el diseño de partidores específicos. El objetivo es desarrollar al menos 3 SCAR por cada región de precedencia para diseñar una prueba de PCR multiplex específica por cada una de ellas.

5.4.3. Probar los marcadores simples en la determinación de la región de procedencia.

Se seleccionaron al menos 5 regiones de procedencias desde las cuales se obtendrán semillas o material vegetal (hojas, madera y/o corteza) para aplicar las pruebas de PCR en la determinación de la región procedencia. Por ejemplo para una muestra compuesta por un lote de semillas de origen anónimo se realizó una extracción de ADN genómico y se aplicarán tantas pruebas de PCR, en reacciones paralelas, como regiones de procedencia con alelos únicos se logre identificar. En base a estos análisis se probó la efectividad de la herramienta de certificación desarrollada, considerando también el efecto del método de extracción de ADN, pureza de la muestra, efecto de genotipos contaminantes de las muestras (e.g. semillas de otra procedencia) entre otras pruebas de validación. Además las pruebas de PCR serán probadas en tres laboratorios distintos.

6. Resultados.

Los resultados finales del proyecto se encuentran disponibles de manera indefinida en el sitio web http://www.udec.cl/~origen_coigue, donde serán constantemente actualizados y mejorados según corresponda.

OE1. Definir zonas de crecimiento de coigüe con potencial productivo y con alta probabilidad de extinción local durante el siglo en curso, mediante modelamiento de nichos ecológicos.

6.1. Zonas de crecimiento de coigüe.

6.1.1. Estudio de la distribución geográfica y ecológica actual del coigüe.
A partir de la recopilación de toda la información georeferenciada disponible sobre la localización de las poblaciones existentes de coigüe en base al herbario de la Universidad de Concepción (CONC) y sumado a los puntos generados de centroides de polígonos de la cartografía del bosque nativo con presencia corroborada de coigüe (Ver mapa de puntos en Fig. 1 de Anexo 1), totalizando más de 30.000 localidades o rodales, se generó un mapa de distribución potencial para la especie en base a la evaluación del nicho ecológico según los métodos de modelamiento considerados. Las variables que resultaron de utilidad correspondieron a ocho variables bioclimáticas, cuatro de ellas referidas a temperatura (promedio del rango de temperaturas, estacionalidad de la temperaturas, máxima temperatura del mes más cálido del año y mínima temperatura del mes más frío del año), y cuatro referidas a precipitación (precipitación total anual, índice de estacionalidad de la precipitación, precipitación del trimestre más cálido, precipitación del trimestre más frío), las cuales consideraron la distribución completa de la especie en Chile.

6.1.2. Modelamiento de nicho ecológico de coigüe.
La información desarrollada en el punto anterior permitió mediante métodos de modelamiento de nicho comparar opciones de modelos aplicables a la especie. Para ello se empleó el software BIOMOD y MAXENT. El mejor resultado de los protocolos estadísticos comparados (ANN, CTA, FDA, GAM, GBM, GLM, MARS, MAXENT, RF y SRE) resultó ser RF (Random Forest) que arrojó el mejor valor de AUC (parámetro de comparación de resultados), es decir un mejor modelo de valor predictivo y corresponde al usado para la proyección geográfica que por ende refleja mejor el hábitat bioclimático para la especie *N. dombeyi*. La cartografía de dicho modelo de hábitat se encuentra disponible en el sitio web del proyecto http://www.udec.cl/~origen_coigue.

6.1.3. Identificar regiones de procedencias y poblaciones vulnerables según parámetros biogeoclimáticos.
La definición de regiones de procedencia se realizó siguiendo la metodología planteada en el proyecto lo que generó los resultados de se muestran en las Fig. 2 a 5 del Anexo 1. A partir de cada una de las celdas del modelo de hábitat (de resolución cercana a 1 m2), se procedió a realizar un análisis de cluster y arrojó el dendrograma que se ilustra en la

figura compuesta, el cual permitió agrupar zonas con variables bioclimáticas más afines, constituyéndose en estratos bioclimáticos para la especie. A través del análisis denominado Decorana-Calinski se interpretó la utilidad de usar un número óptimo de 7 estratos. Esta estratificación se presenta en la figura 6 del Anexo 1. En dicho mapa, se muestra la proyección de los estratos bioclimáticos para la especie con potencial para su interpretación como regiones de procedencias ecológicas de la especie: 1) distribución septentrional andina, 2) área andina de Alto Biobío y Araucanía andina, 3) región de Los Lagos costa, 4) Patagonia en región de Aysén, 5) Nahuelbuta y costa de Biobío, 6) Araucanía y Los Ríos, 7) Región de Los Lagos Andes. La cartografía correspondiente a estos estratos se encuentra disponible en el sitio web http://www.udec.cl/~origen_coigue.

Considerando estos estratos e incluyendo la variabilidad de origen edáfico permitió focalizar el muestreo de material genético de *N. dombeyi* para así incluir el gradiente climático total de esta especie con potencial productivo de la cual se podrá certificar la procedencia de su material reproductivo.

A partir del mejor modelo de hábitat se procedió a proyectarlo con la información disponible para el escenario futuro de tipo conservador CSIRO B2A 2050 para la segunda mitad del siglo. Esta proyección permitió obtener la zonificación de zonas de mayor vulnerabilidad por cambio climático, que se muestran en mapa de la figura 6 del Anexo 1. Éste corresponde al mapa de la distribución del hábitat de coihue según su vulnerabilidad al cambio climático, identificando tres estratos de influencia: un estrato de mayor vulnerabilidad producto de eventual contracción de poblaciones y pérdida de hábitat, apreciándose que gran parte de la zona septentrional andina y costera marginal es la más vulnerable a cambio climático. Un segundo estrato correspondiente a la zona de mejor desarrollo de *N. dombeyi* que se mantendrá como tal pese a los efectos del esperado cambio climático, mientras que un tercer estrato menos, con zonas de eventual expansión relativa de las poblaciones en sectores de mayor altitud y en áreas como la provincia de Palena, en las cuales el modelo prevé mejoras en el hábitat para la especie. La cartografía de aquellas zonas del modelo que de acuerdo a la vulnerabilidad ante cambio climático se encuentra disponible en el sitio web http://www.udec.cl/~origen_coigue.

OE2. Evaluar la diversidad genética de coigüe a lo largo de toda su distribución en Chile mediante marcadores moleculares altamente informativos (AFLPs y SNPs).

6.2.1. Determinar reproducibilidad de marcadores AFLPs y SNPs para coigüe.

La extracción de ADN de tejidos diferentes dependiendo de cada población de muestreo ha sido uno de los desafíos más importantes para el desarrollo del proyecto. Esto porque nos encontramos que no es posible disponer del mismo tipo de material vegetal para realizar el muestreo en todas las poblaciones. Ciertos árboles poseen copa baja y

por lo tanto se puede acceder a sus hojas, pero en algunas poblaciones esta situación no se da, producto de una gran densidad de individuos que genera copas por sobre los 10 m de altura. En estos casos se debe realizar el muestreo a partir de los tejidos que están a mano como por ejemplo la madera y la corteza. Ambos materiales son fáciles de recolectar pero al estar compuestos principalmente de células muertas el rendimiento de ADN es sumamente bajo y degradado. Sin embargo la presencia de tejidos meristemáticos asociados a la generación de ambos materiales (cambium en el caso de la madera y felógeno en relación a la corteza), representa una alternativa para lograr la extracción de ADN en concentración y calidad adecuada para ser utilizada posteriormente (ver Anexo 2 y Anexo 3).

El protocolo de AFLP previamente utilizado para *Nothofagus alpina* fue aplicado sin mayores inconvenientes para N. dombeyi (ver Anexo 4). Se realizó un estudio preliminar de la reproducibilidad de los AFLP considerando individuos y materiales vegetales de origen del ADN genómico distintos. No se observa sesgo de los perfiles genéticos partiendo de ADN extraído de distintos orígenes (ápices cualinares, hojas expandidas o felógeno). Uno de los principales aportes del proyecto ha sido demostrar que a partir de ADN obtenido a partir de felógeno o cambium es posible obtener un perfil genético confiable de un individuo de coigüe cuando no es posible acceder a sus hojas.

En relación a los marcadores SNPs se logró su obtención mediente prestación de servicio por parte de la Universidad de Wisconsin-Madison-USA (GCW;Genome Center of Wisconsin). Esta institución posee una basta experiencia en este tipo de proyecto y a la fecha cumplió con la optimización del protocolo de Genotyping-by-Sequencing(GBS) para coigüe junto con la genotipificación de 96 individuos quedando pendientes otros 96 hasta que se envíen nuevas muestras de ADN (Anexo 5).

6.2.2. Muestrear poblaciones de coigüe potencialmente representativas de su diversidad genética.

En base a los resultados del OE1 se determinaron 7 estratos o nichos ecológicos del coigüe a lo largo de su distribución actual en Chile y se definió un número representativo de poblaciones a muestrear en función de su superficie (Anexo 6). Se identificaron en total 30 poblaciones que fueron efectivamente muestreadas entre los meses de enero y mayo de 2013. Como ya fue señalado en el punto 2.1 se tomaron muestras de hojas o corteza (para posterior obtención de felógeno) dependiendo de las características de cada población.

6.2.3. Genotipificación con marcadores AFLPs y SNPs.

En cada caso (AFLP y SNP) se genotipificaron 96 muestras que son representativas de la variabilidad de la especie. En el caso de los AFLP se usaron 2 combinaciones selectivas (Eco+ACA/Mse+CAT y

Eco+AGG/Mse+AGC) que en total permitieron estudiar los polimorfismos asociados a 107 loci que corresponden a fragmentos de 50 a 600 pb.

Con respecto a los SNPs utilizando la técnica GBS y posterior análisis mediante la pipeline UNEAK se utilizaron un total de 130.670.072 (172.171.356 en total) secuencias que cumplieron los estándares mínimos de calidad, es decir, más del 75% de las secuencias fueron utilizadas. La cantidad final de SNP detectados utilizando los parámetros por defecto de la pipeline UNEAK fueron 66.042, sin embargo, luego de aplicar diversos filtros se generó una matriz con 3674 SNPs que cumplieron con los requisitos básicos para posteriores análisis de diversidad genética. De los 96 individuos inicialmente utilizados, solo 67 cumplieron con tener un número mínimo de al menos 125.000 secuencias para análisis posteriores (aproximadamente el 70%). El 30% de la muestras que no sirvieron se pueden explicar principalmente por calidades deficientes de ADN que hace que el protocolo de GBS no funcione como debería. De acuerdo a la opinión de expertos en el tema estos resultados son los esperados cuando se aplica GBS por primera vez en un especie.

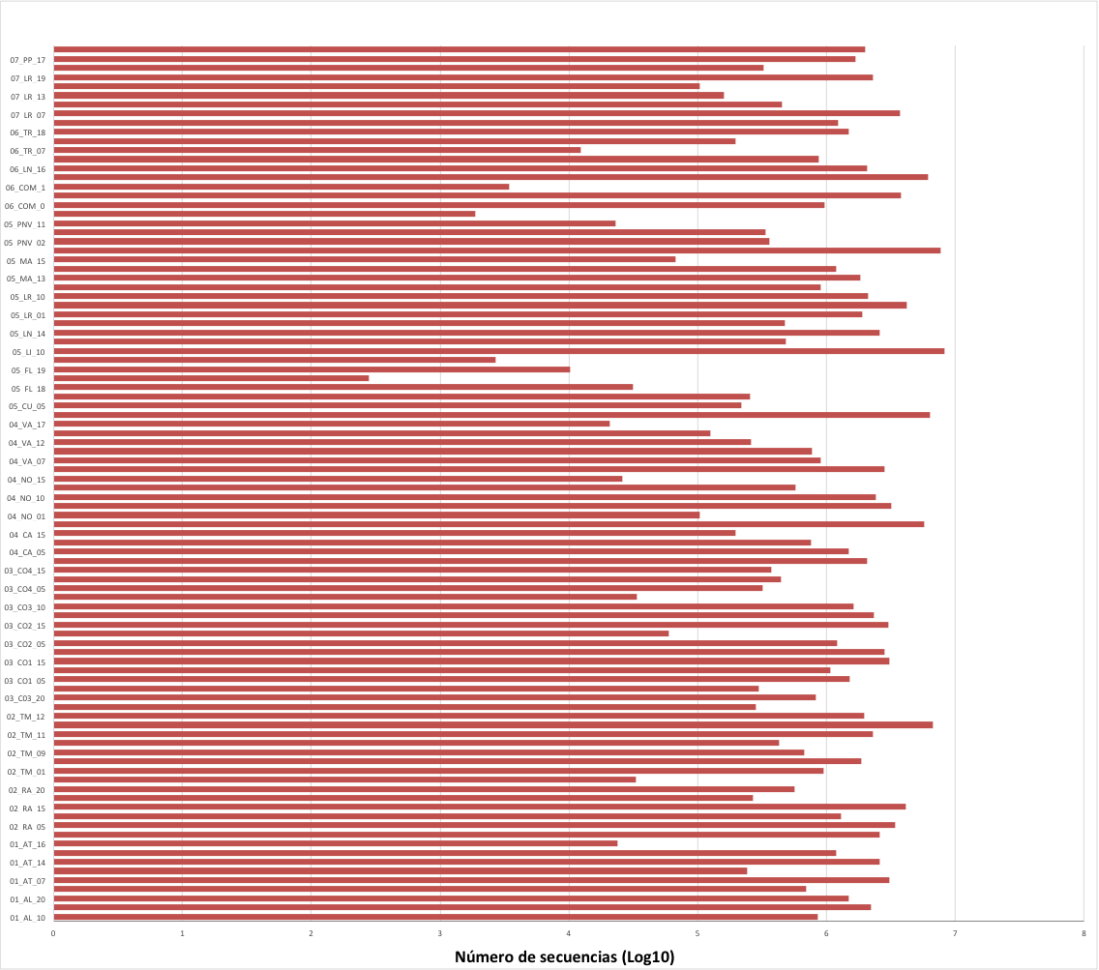


Figura 6.1. Número de secuencias por genotipo generadas por medio de GBS y utilizadas con la pipeline UNEAK para el descubrimiento de SNP.

6.2.4. Caracterizar la diversidad intraespecífica y estructura poblacional de la especie.

6.2.4.1. Diversidad genética en un grupo de localidades evaluada con AFLP.

Se analizaron un total de 117 marcadores AFLP obtenidos a partir de las combinaciones selectivas EcoRI+ACA/MseI+CAT (62) EcoRI+AGG/MseI+AGC (55) los cuales son todos polimórficos, lo cual es un primer indicio de una alta diversidad genética intraespecífica. En la tabla 6.1 se puede observar que la variabilidad genética de la especie en las localidades evaluadas es alta, con valores de He entre 0,242 para Fresia y 0,313 para Villas las Araucarias (Tabla 6.1). Cabe destacar que localidades con un mayor nivel de conservación del ecosistema presentan índices de diversidad genética intraespecífica, como Las Trancas (Chillan), Termas de Tolhuaca o Villas Las Araucarias. Por otra parte, no se detectaron alelos únicos de localidades específicas, lo que estaría reflejando bajos niveles de diferenciación genética poblacional o entre localidades. Esto podría ser explicado por el amplio rango de distribución de *N. dombeyi* y la gran heterogeneidad del medio ambiente en que se despliega, lo que sugiere variabilidad genecológica en esta especie (Donoso et al., 2004). Solo se detectan algunos ALC(50), que se trata de alelos presentes en localidades específicas en todos los individuos y que poseen una reducida frecuencia en el resto de las localidades (menor al 50%). Estos podrían estar reflejando procesos recientes de selección o simplemente la perdida de alelos por efectos estocásticos como la deriva génica. Este resultado es de vital importancia para definir si mediante los marcadores AFLP será posible encontrar marcadores únicos de una procedencia específica, para el posterior desarrollo de herramientas de selección.

Tabla 6.1. Indices de diversidad genética intraespecífica para las localidades de presencia de coigüe estimadas en base a AFLP.

Localidades	He	Na	Ne	%P	ALC(50)
Fresia	0,242	1,735	1,413	78	2
Cochamó	0,230	1,602	1,389	70	1
Las Trancas	0,263	1,752	1,438	81	4
Coyhaique	0,260	1,735	1,441	79	5
T. Tolhuaca	0,300	1,735	1,525	86	2
V. las Araucarias	0,313	1,858	1,538	93	5

He; heterocigocidad esperada, ALC(50); numero de alelos localmente comunes, Na; Número de alelos efectivos, Ne; número de alelos menos comunes, %P; porcentaje de loci polimórficos.

El análisis de diversidad poblacional realizado con todos los individuos empleando el programa Structure, indicó que el número de subpoblaciones que mejor explicaría el patrón genético presente en las localidades evaluadas fue K=2 con una probabilidad posterior igual a 0,9 (Figura 6.2).

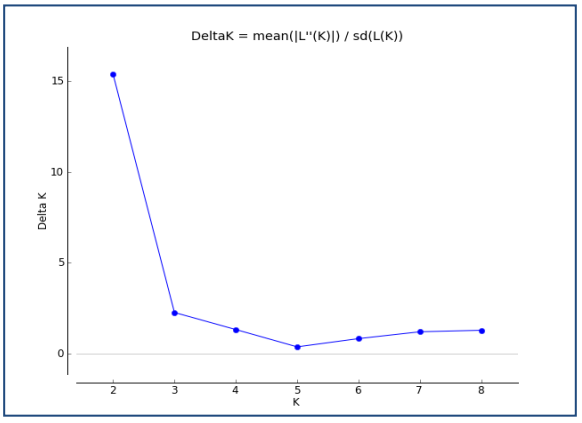


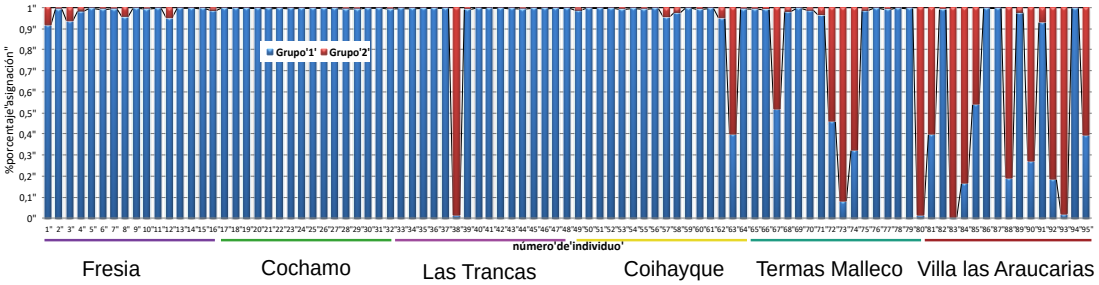
Figura 6.2. Análisis de probabilidad posterior de K (número de subpoblaciones) en todos los individuos de coigüe analizados con los marcadores AFLP.

Este resultado está respaldado por un porcentaje de asignación de los individuos a la primera subpoblación (azul) sobre el 90% de pertenecía en la mayoría de los individuos contenidos en él. La segunda subpoblación presente en las localidades de Villas las Araucarias y Termas de Tolhuaca esta presente en muy pocos individuos con un porcentaje de asignación mayor al 90%, mostrando más bien una condición híbrida (Tabla 6.2, Figura 6.3). Además, en una misma localidad se observa presencia de individuos puros de la subpoblación 1 con puros de la subpoblación 2 e híbridos, lo cual dificulta lograr el objetivo general del proyecto.

Tabla 6.2. Porcentaje de asignación de cada localidad a los grupos genéticos determinados mediante los datos de AFLP en coigue.

Localidad	Subpoblación 1 (%)	Subpoblación 2 (%)	Individuos
Fresia	97,6	2,4	16
Cochamó	99,5	0,5	16
Las Trancas	93,4	6,6	16
Coyhaique	94,8	5,2	16
T. Tolhuaca	76,4	23,6	16
V. las Araucarias	52,9	47,1	15

Figura 6.3. Análisis de estimaciones de Q en seis localidades de presencia de coigüe en Chile. Cada individuo es representado por una barra de colores divididos en K=2, según las subpoblaciones encontradas. El color azul representa una colección única de alelos y el rojo otra diferente.



1:Fresia (E6); 2:Cochamo (E7); 3:Las Trancas (E6); 4:Coihayque (E3); 5:Termas de Malleco (E2); 6:Villa Las Araucarias (E4).

6.2.4.2. Diversidad genética del rango completo de distribución del coigüe con marcadores SNP.

En el caso de los SNP los cuales cubrieron localidad representativas de toda la distribución de la especie en Chile, estos confirman la gran diversidad genética presente en la especie (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Valores promedios y sus desviaciones estándar (SE) para distintos índices de diversidad genética en función de las localidades de colecta de coigue determinada mediante los marcadores SNPs. *Na*; Número de alelos efectivos, *Ne*; número de alelos menos comunes, *I*; índice de diversidad de Shannon, *Ho*; Heterosigocidad Observada, *UHe*; Heterosigocidad Esperada no sesgada, *F*; índice de Fijación, *%P*; porcentaje de Loci.

Localidad		N	Na	Ne	I	Ho	uHe	F	%P
1	**Media**	2,992	1,886	1,732	0,561	0,606	0,472	-0,506	88,62
	SE	0,004	0,014	0,015	0,010	0,016	0,009	0,024	
2	**Media**	2,984	1,882	1,724	0,557	0,572	0,468	-0,439	88,22
	SE	0,006	0,014	0,015	0,010	0,016	0,009	0,025	
3	**Media**	3,984	1,954	1,791	0,602	0,626	0,483	-0,448	95,41
	SE	0,006	0,009	0,013	0,007	0,015	0,006	0,024	
4	**Media**	7,635	2,000	1,817	0,628	0,556	0,471	-0,245	100
	SE	0,026	0,000	0,010	0,004	0,011	0,004	0,020	
5	**Media**	2,830	1,840	1,656	0,518	0,464	0,440	-0,275	84,03
	SE	0,017	0,016	0,016	0,011	0,016	0,010	0,028	
6	**Media**	3,960	1,892	1,670	0,536	0,515	0,424	-0,344	89,22
	SE	0,009	0,014	0,015	0,009	0,016	0,008	0,025	
7	**Media**	3,435	1,838	1,620	0,502	0,315	0,408	0,075	83,83
	SE	0,031	0,016	0,016	0,011	0,014	0,009	0,029	
8	**Media**	4,295	1,980	1,800	0,618	0,541	0,491	-0,234	98,00
	SE	0,029	0,006	0,010	0,005	0,013	0,005	0,024	
9	**Media**	4,309	1,976	1,760	0,600	0,481	0,473	-0,134	97,60
	SE	0,026	0,007	0,011	0,006	0,014	0,006	0,026	
10	**Media**	3,200	1,906	1,686	0,551	0,407	0,456	-0,076	90,62

	SE	0,031	0,013	0,014	0,009	0,014	0,008	0,027	
11	**Media**	3,557	1,946	1,747	0,586	0,498	0,476	-0,207	94,61
	SE	0,024	0,010	0,013	0,007	0,014	0,007	0,026	
12	**Media**	2,920	1,950	1,747	0,588	0,565	0,494	-0,357	95,01
	SE	0,012	0,010	0,012	0,007	0,015	0,007	0,026	
13	**Media**	2,832	1,908	1,740	0,573	0,542	0,489	-0,337	90,82
	SE	0,017	0,013	0,014	0,009	0,015	0,008	0,027	
14	**Media**	2,611	1,944	1,696	0,569	0,518	0,495	-0,317	94,41
	SE	0,024	0,010	0,012	0,007	0,012	0,008	0,020	
15	**Media**	4,669	1,988	1,812	0,625	0,544	0,491	-0,221	98,80
	SE	0,022	0,005	0,010	0,005	0,013	0,004	0,025	
16	**Media**	2,992	1,952	1,777	0,598	0,632	0,502	-0,476	95,21
	SE	0,004	0,010	0,013	0,007	0,015	0,007	0,024	
17	**Media**	5,034	1,982	1,772	0,607	0,503	0,470	-0,181	98,20
	SE	0,036	0,006	0,011	0,006	0,011	0,005	0,021	
Total	**Media**	3,779	1,931	1,738	0,578	0,523	0,471	-0,278	93,10
	SE	0,014	0,003	0,003	0,002	0,004	0,002	0,006	1,22

Altos de Lircay (1); Antuco (2); Ralco (3); Tolhuaca (4); Coihayque Alto (5); Coihayque (6); Aisen Lago Paloma (7); Nonguen (8); Villa Las Araucarias (9); Caramavida (10); Mariquina (11); Fundo Llancahue (12); Riñihue (13); Neltume (14); Villarrica (15); Loncoche (16); Las Trancas-Valdivia (17).

Los resultados del análisis de estructura poblacional muestran la existencia de 3 subpoblaciones (Figura 6.4) que se distribuyen de manera diferencial en los distintos estratos (Figura 6.5).

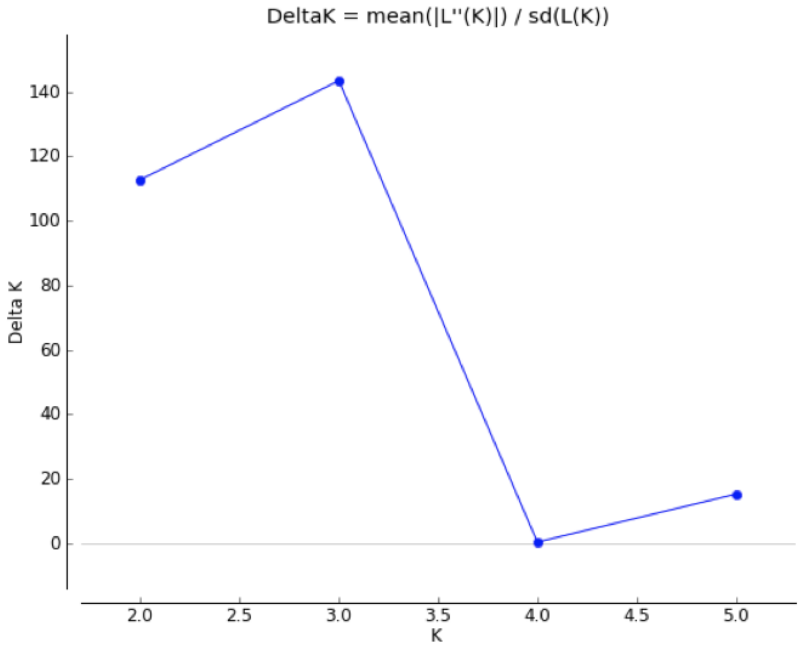


Figura 6.4. Análisis de probabilidad posterior de K (número de subpoblaciones) en todas las localidades con presencia de coigüe analizadas con los marcadores SNP.

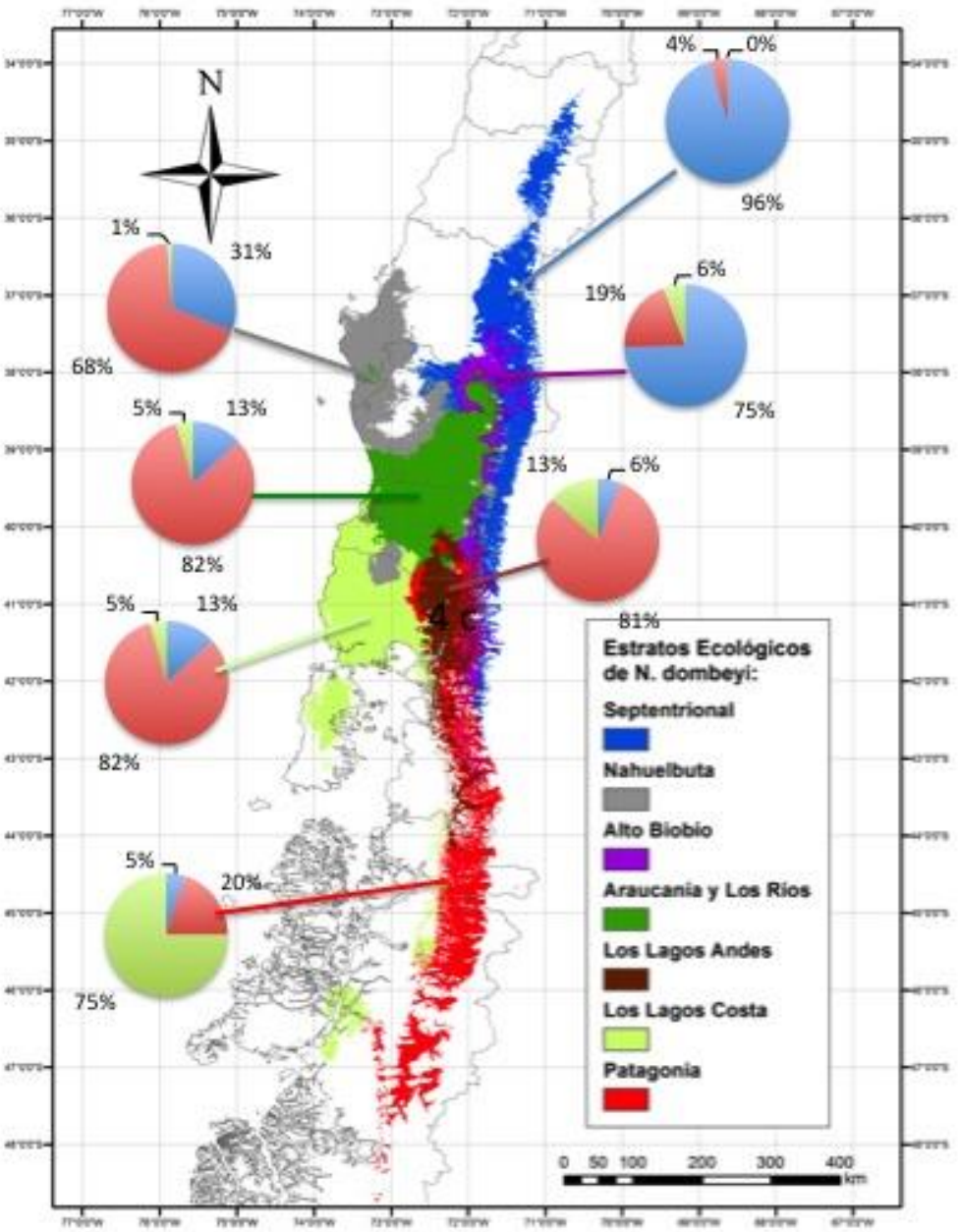


Figura 6.5. Representación gráfica de Q cestimado con los marcadores SNP en cada estrato de coigüe definido por modelamiento de nicho ecológico. Cada subpoblación es representada por un color y el gráfico de torta refleja el procentaje de pertenencia de los indivduos analizados a cada una de las tres subpoblaciones detectadas mediante Structure.

Tabla 6.4. Caracterización de la variabilidad intrapoblacional a nivel de las suboblaciones de coigüe detectadas.

Subpoblación	Fst	He
Azul	0.1376	0.3260
Roja	0.0152	0.3570
Verde	0.3056	0.2928

OE3. Identificar áreas productoras de semillas asociando la información genética y los modelos ecológicos.

6.3.1. Refinar la delimitación de las regiones de procedencia y identificación de poblaciones vulnerables integrando los datos genéticos.

De acuerdo a nuestro modelamiento de nichos ecológicos el número mínimo de procedencias debería ser siete representadas por los siete estratos identificados (ver Anexo 1). No obstante al integrar dicha información con el resultados del análisis genético el cual reveló la presencia de al menos 3 subpoblaciones, podemos señalar que existe dos procedencias puras:

1) Procedencia norte representada por los estratos 1 y 2 donde podemos encontrar localidades como Altos de Lircay, Antuco, Ralco y Termas de Tolhuaca.
2) Procedencia sur representada por el estrato 3 donde encontramos las localidades de Coihayque y Aysen.

Es posible describir una tercera procedencia que se caracteriza por contener todas las localidades de estrato 5 donde encontramos zonas que abarcan puntos ubicados en la Cordillera de la Costa (Mariquina, Llancahue), depresión intermedia (Loncoche interior, Riñihue) y Cordillera de los Andes (Villarica, Neltume). Este estrato presenta una elevada diversidad genética e individuos que poseen ancestros pertenecientes de distintas subpoblaciones.

6.3.2. Identificar potenciales áreas productoras de semillas para las distintas regiones de procedencia.

Actualmente las áreas productoras se semilla se concentran en una zona restringida de la distribución total del coigüe en Chile. Ya hemos demostrado que existen diversos estratos y que la vez estos contiene genotipos distintos los cuales son el resultados de un proceso de selección natural. Las actuales áreas productoras de semillas pueden proveer de material de propagación en aquella zonas que predomina la subpoblación roja, sin embargo, no serían adecuadas por zonas donde predomina la subpoblación azul o verde. Por lo tanto se propone la creación de una nueva área productora de semillas en la zona norte de la distribución y otra en la zona sur austral. Estas áreas prodcutoras de semillas podrían proveer de materiales de propagación para fines productivos pero también con fines de restauración.

OE4. Desarrollar marcadores moleculares simples para confirmar el origen geográfico de semillas de coigüe.

6.4.1. Identificar alelos únicos para cada región de procedencia.
En el análisis exploratorio realizado con marcadores AFLP se han encontrado 4 loci outlier con un valor-p< a 0.001 (Tabla 6.5), sin embargo, las frecuencia en que se encuentran no permiten utilizarlos con finas de certificación (Tabla 6.6).

Tabla 6.5. Loci outlier detectados con los marcadores AFLPs en coigue.

Locus	Obs. Het. BP	Obs FST	FST P-value
6	0.281599	0.364545	0.0029819
46	0.169789	-0.0552344	0.0128958
84	0.482578	-0.0658597	0.00709513
89	0.485986	0.00162981	0.00883788

Tabla 6.6. Frecuencia por localidad de los loci outlier en una zona reducida de la distribución de coigue en Chile.

Localidad /Alelo	Locus 6	Locus 46	Locus 84	Locus 89
Fresia	0,375	0,938	0,562	0,688
Cochamó	0,875	0,958	0,688	0,812
Las Trancas	1	0,875	0,562	0,500
Coyhaique	0,938	0,938	0,562	0,562
Termas de Tolhuaca	0,875	0,875	0,625	0,500
Villa Las Araucarias	1	0,933	0,600	0,533

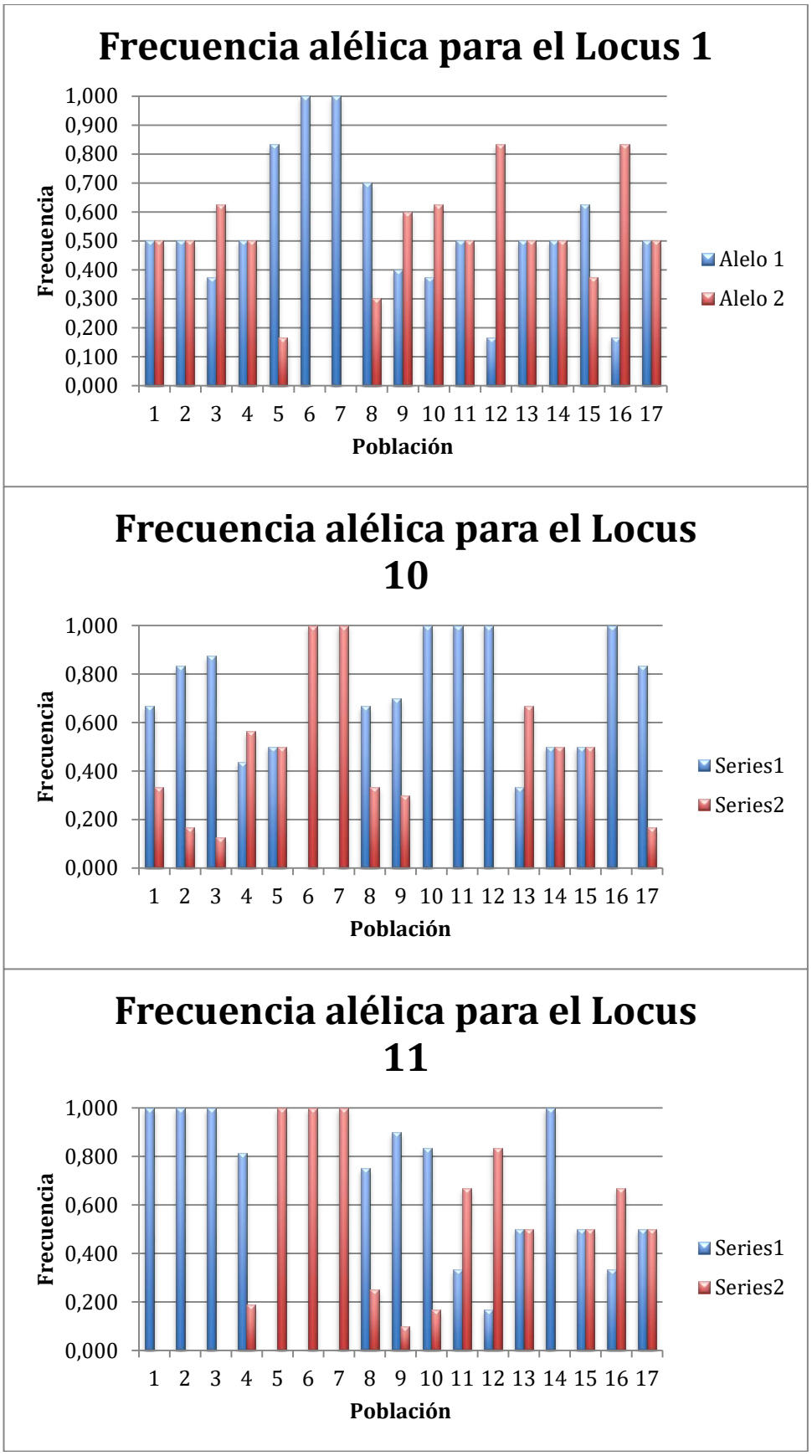
A diferencia de los marcadores AFLP, con los marcadores SNPs fuimos capaces de detectar un número mayor de loci outliers, dependiendo del método de análisis utilizado (16 en el caso de Arlequin; Tabla 6.7 y 61 usando Bayescan; Figura 6.6). Además las frecuencias en la que estos se encuentran en las distintas localidades permite tomarlos directamente como herramientas de certificación basada en la ausencia de determinados alelos en ciertas localidades. Para poder determinarlos se propone el uso de la técnica de genotipificación de SNP llamada HRM la cual es simple, rápida y barata. Dado que uno de los resultados de la pipeline UNEAK es la secuencia adyacente que contiene el SNP, esto permite diseñar partidores y aplicar sin mayores complicaciones la genotipificación de SNPs. Esta paso no pudo ser incluido en este proyecto por cuestiones de tiempo y recursos

Tabla 6.7. Loci outlier detectados con los marcadores SNPs usando Arlequin y un valor p < 0,01 considerando toda la distribución de coigue en Chile.

Locus	Obs, Het, BP	Obs FST	FST P-value
12	0,5933	0,3106	0,0007
31	0,6618	0,0005	0,0027
32	0,6937	-0,0885	0,0094
54	0,6904	-0,0999	0,0056
55	0,5647	0,2731	0,0036
77	0,7148	-0,1055	0,0030
80	0,6896	-0,1031	0,0050
132	0,6930	-0,0973	0,0060
143	0,7053	0,0009	0,0054
156	0,6834	0,2470	0,0034
160	0,7056	0,2457	0,0020
168	0,1491	-0,1499	0,0005
188	0,0000	0,0000	-1,0000
228	0,6396	0,0016	0,0086
240	0,6871	-0,0905	0,0091
247	0,6820	-0,1485	0,0006

Tabla 6.8. Frecuencia de locus outlier para las 17 poblaciones de coigue analisadas.

Locus	L1		L2		L3		L4		L5		L6		L7		L8		L9		L10		L11		L12		L13		L14		L15		L16
Allele	**1**	**4**	**1**	**3**	**3**	**4**	**3**	**4**	**3**	**4**	**1**	**4**	**2**	**4**	**1**	**2**	**1**	**3**	**1**	**4**	**1**	**4**	**1**	**3**	**2**	**3**	**3**	**4**	**1**	**4**	**2**
P1	0,50	0,50	0,50	0,50	0,17	0,83	0,83	0,17	0,50	0,50	0,33	0,67	0,67	0,33	0,50	0,50	0,33	0,67	0,67	0,33	1,00	0,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,67	0,33	0,50	0,50	0,50
P2	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,83	0,17	0,50	0,50	0,50	0,50	0,83	0,17	0,83	0,17	0,33	0,67	0,83	0,17	1,00	0,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,33
P3	0,38	0,63	0,63	0,38	0,25	0,75	0,75	0,25	0,50	0,50	0,38	0,63	0,75	0,25	0,63	0,38	0,25	0,75	0,88	0,13	1,00	0,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,75	0,25	0,50
P4	0,50	0,50	0,50	0,50	0,31	0,69	0,69	0,31	0,44	0,56	0,38	0,63	0,63	0,38	0,38	0,63	0,38	0,63	0,44	0,56	0,81	0,19	0,56	0,44	0,50	0,50	0,44	0,56	0,63	0,38	0,71
P5	0,83	0,17	0,50	0,50	0,33	0,67	0,50	0,50	0,17	0,83	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,75	0,25	0,50	0,50	0,00	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	1,00	0,00	0,33
P6	1,00	0,00	0,25	0,75	0,38	0,63	0,75	0,25	0,00	1,00	0,50	0,50	0,75	0,25	0,25	0,75	0,75	0,25	0,00	1,00	0,00	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,63	0,38	0,75	0,25	0,88
P7	1,00	0,00	0,33	0,67	0,25	0,75	0,67	0,33	0,13	0,88	0,83	0,17	0,67	0,33	0,25	0,75	0,25	0,75	0,00	1,00	0,00	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,75	0,25	0,67	0,33	0,50
P8	0,70	0,30	0,30	0,70	0,40	0,60	0,63	0,38	0,10	0,90	0,40	0,60	0,60	0,40	0,40	0,60	0,50	0,50	0,67	0,33	0,75	0,25	0,50	0,50	0,50	0,50	0,60	0,40	0,50	0,50	0,38
P9	0,40	0,60	0,25	0,75	0,63	0,38	0,50	0,50	0,38	0,63	0,38	0,63	0,60	0,40	0,25	0,75	0,50	0,50	0,70	0,30	0,90	0,10	0,60	0,40	0,50	0,50	0,38	0,63	0,50	0,50	0,50
P10	0,38	0,63	0,17	0,83	0,50	0,50	0,50	0,50	0,17	0,83	0,67	0,33	0,17	0,83	0,25	0,75	0,17	0,83	1,00	0,00	0,83	0,17	0,63	0,38	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
P11	0,50	0,50	0,00	1,00	0,33	0,67	0,63	0,38	0,63	0,38	0,63	0,38	0,63	0,38	0,38	0,63	0,17	0,83	1,00	0,00	0,33	0,67	0,63	0,38	0,50	0,50	0,33	0,67	0,75	0,25	0,67
P12	0,17	0,83	0,50	0,50	0,17	0,83	0,83	0,17	0,50	0,50	0,83	0,17	0,83	0,17	0,67	0,33	0,33	0,67	1,00	0,00	0,17	0,83	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
P13	0,50	0,50	0,00	1,00	0,50	0,50	1,00	0,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,25	0,75	0,50	0,50	0,33	0,67	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,67	0,33	0,83
P14	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,17	0,83	0,17	0,83	0,25	0,75	0,75	0,25	0,33	0,67	0,50	0,50	0,50	0,50	1,00	0,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,75	0,25	0,50	0,50	0,50
P15	0,63	0,38	0,40	0,60	0,40	0,60	0,63	0,38	0,38	0,63	0,70	0,30	0,80	0,20	0,38	0,63	0,38	0,63	0,50	0,50	0,50	0,50	0,60	0,40	0,50	0,50	0,40	0,60	0,60	0,40	0,75
P16	0,17	0,83	0,17	0,83	0,67	0,33	0,67	0,33	0,50	0,50	0,67	0,33	0,33	0,67	0,33	0,67	0,50	0,50	1,00	0,00	0,33	0,67	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,83
P17	0,50	0,50	0,42	0,58	0,20	0,80	0,75	0,25	0,13	0,88	0,90	0,10	0,50	0,50	0,50	0,50	0,42	0,58	0,83	0,17	0,50	0,50	0,58	0,42	0,50	0,50	0,60	0,40	0,88	0,13	0,70


Frecuencia alélica para el Locus 1
1,000
0,900
0,800
0,700
0,600
0,500
0,400
0,300
0,200
0,100
0,000
Frecuencia
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Población
Alelo 1
Alelo 2
Frecuencia alélica para el Locus 10
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
Frecuencia
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Población
Series1
Series2
Frecuencia alélica para el Locus 11
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
Frecuencia
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Población
Series1
Series2

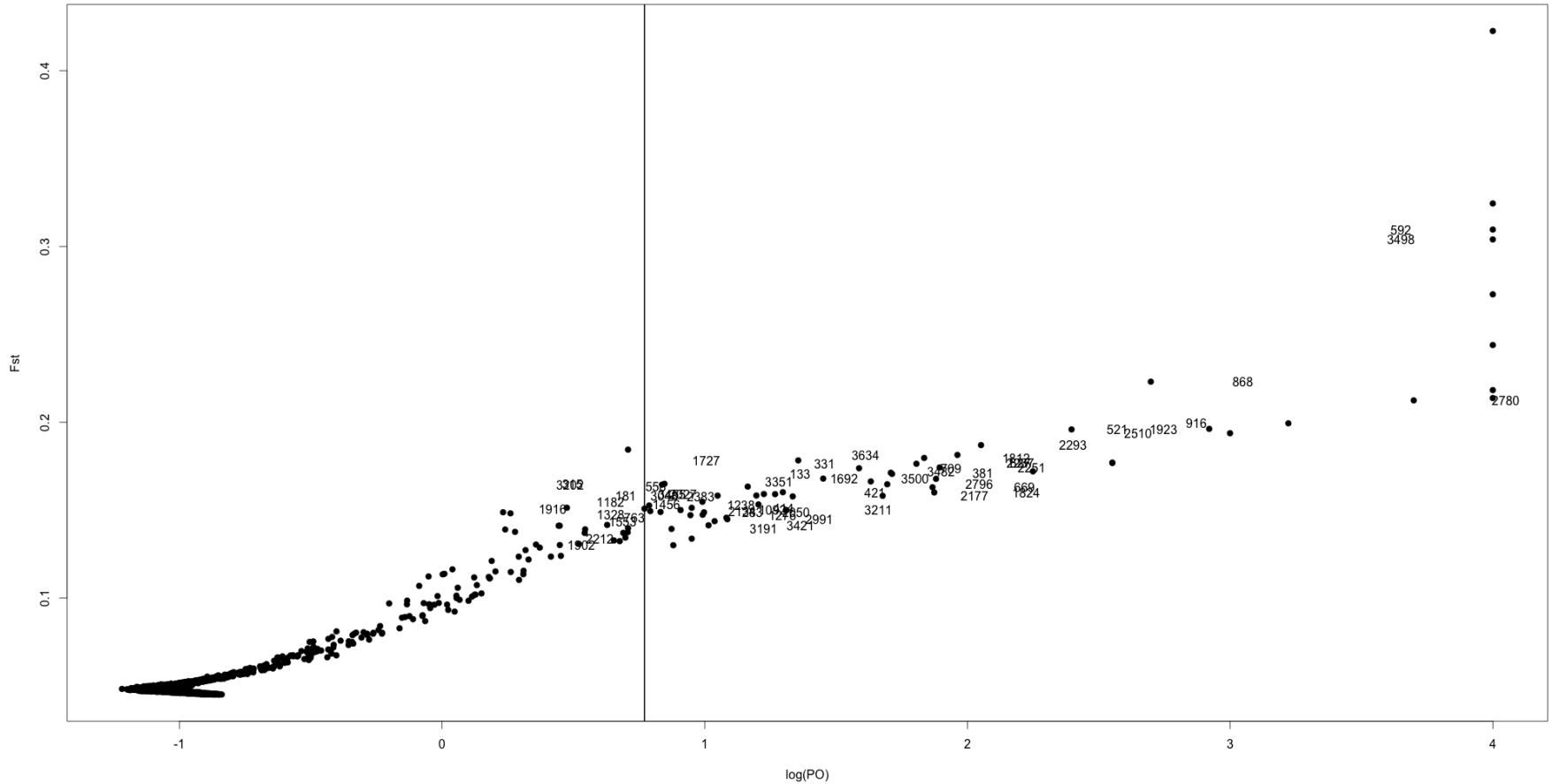


Figura 6.6. Detección de loci outliers mediante el programa Bayescan con un FRD = 0,05. La línea vertical indica la posición del límite a partir del cual los loci se consideran significativamente bajo selección.

BIBLIOGRAFÍA

Ackerly D, Loarie S, Cornwell W, Weiss S, Hamilton H, Branciforte R, Kraft N. 2010. The geography of climate change: implications for conservation biogeography. Diversity and Distributions 16(3):476-487.

Acosta M., Mathiasen P., Premoli A. 2002. Predominant regeneration strategy results in species-specific genetic patterns in sympatric *Nothofagus s.s*. congeners (Nothofagaceae). Australian Journal of Botany 60:319–327.

Alía R., Alba N, Agúndez D, Iglesias S. 2005. Manual para la comercialización y producción de semillas y plantas forestales. Materiales de base y de reproducción. Serie Forestal. DGB. Madrid. 384 pp.

Azpilicueta M., Marchelli P., Gallo L. 2009. The effects of Quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. Tree Genetics & Genomes 5:561–571.

Azpilicueta M., Gallo L. 2001. Análisis de la variación genética en *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. a través de marcadores génicos isoenzimáticos. In XXX Congreso Argentino de Genética, Mar del Plata, Argentina. Actas. p. 147.

Azpilicueta M., Gallo, L., 2002. Variación genética aloenzimatica como herramienta de diagnóstico para la conservación e interpretación evolutiva de los bosques de *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. en Argentina. In Actas XXXI Congreso Argentino de Genética, La Plata. Actas. p. 135.

Azpilicueta M., Caron H., Bodénès B., Gallo L. 2004. SSR markers for analysing South American *Nothofagus* species. Silvae Genetica 53: 240-243.

Azpilicueta M., Marchelli P., Gallo L. 2005. Common ice-age refugia in two southern beeches (*Nothofagus spp*.). In XXII IUFRO Congress "Forest in the balance: linking tradition and technology", Brisbane, Australia. p 68.

Azpilicueta M., Gallo L., Van zonneveld M., Thom E., Moreno, C. Marchelli P. 2013. Management of Nothofagus genetic resource: Definition of genetic zones based on a combination of nuclear and chloroplast marker data. Forest Ecology and Management 302:414-424.

Barret CW, JF Jacobs. 2006. Quality assessment of temperate zone deciduous hardwood seedlings. New Forests 31:417-433.

Bechet A., Varios. 2009. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2009–30 November.

Brown S, Kresovich S. 1996. Molecular characterization for plant genetic resources conservation. En: A.H. Paterson (Ed.) Genomic mapping in plants. R.G. Landes Austin, TX, USA. pp. 85–93.

Carrasco B., Eaton L. 2002. Natural history and genetic structure of Raulí (*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil.). Forest Genetics 9:275-284.

Carrasco B., Eaton L., Letelier L., Díaz C., García-Gonzáles R. 2011. Heterogeneous genetic structure in a natural population of Raulí (*Nothofagus nervosa*). Ciencia e Investigación Agraria. 38:441-452.

Cao C-P, Finkeldey R, Siregar I, Siregar U, Gailing O. 2006. Genetic diversity within and among populations of Shorea leprosula Miq. and S. parvifolia Dyer (Dipterocarpaceae) in Indonesia detected by AFLPs. Tree Genet Genomes 2:225–239.

Castillo J, Moreno G. 2002. Semillas forestales del bosque nativo chileno. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 223 pp.

CONAF. 2005. Viveros forestales, temporada 2004-2005. Chile Forestal 314. 24 p.

CONAF. 2006. Viveros forestales, temporada 2006. Chile Forestal 322. 28 p.

CONAMA. 1999. Primera Comunicación Nacional bajo la Convención Marco de las naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Comisión Nacional del Medio Ambiente. Santiago, Chile. 153 pp.

CONAMA. 2008. Plan de Acción Nacional de Cambio Climático 2008-2012. Comisión Nacional del Medio Ambiente. Santiago, Chile. 86 pp.

Craig D., Pearson J., Szelinger S., Sekar A., Margot R., Corneveaux J., Pawlowski T., Laub T., Nunn G., Stephan D., Homer N., Huentelman M. 2008. Identification of genetic variants using barcoded multiplexed sequencing. Natural methods .5(10): 887–893.

Crego, M., Gallo L. 2002a. Local dynamic of interspecific hybridization between two southern beeches (Nothofagus spp.). In DYGEN Conference. "Dynamics and conservation of genetic diversity in forest ecosystems". Strasbourg, France. Abstracts. p. 108.

Crego M., Gallo L., 2002b. Variación temporal en la hibridación natural entre Nothofagus nervosa, Raulí y Nothofagus obliqua, Roble Pellín. In XXXI Congreso Argentino de Genética. La Plata. Actas. p.136.

CTGREF. 1976. Semences Forestieres. Les regions de provenance d'epicea commun. CTGREF Nogent/Vernison. Not. Tech. Num 30.

Davey J., Hohenlohe P., Etter P., Boone J., Catchen J., Mark L., 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. Nature Reviews Genetics 12:499-510.

Deguilloux MF, Pemonge MH, Bertel L, Kremer A, Petit RJ. 2003. Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. Molecular Ecology 12:1629-1636.

Deguilloux MF, Pemonge MH, Petit RJ. 2004. DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. Annals of Forest Science 61: 97-104.

Donoso C, A Premoli, PJ Donoso. 2004. Variación genética en *Nothofagus* siempreverdes (Coihues). En: Donoso C, Premoli A, Gallo L, Ipinza R (Eds.) Variación intraespecífica en las especies arbóreas nativas de los bosques templados de Chile y Argentina. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. pp. 189-211.

Donoso C, Gallo L. 2004. Aspectos conceptuales y metodológicos. En: Donoso C (Ed.) Variación intraespecífica en las especies arbóreas nativas de los bosques templados de Chile y Argentina. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. pp. 189-211.

Donoso P, Soto D. 2010. Plantaciones con especies nativas en el centro-sur de Chile: experiencias, desafíos y oportunidades. Revista Bosque Nativo 47:10-17.

Donoso PJ, C Donoso, B Escobar, C Navarro, L Gallo. 2006. Nothofagus dombeyi. En: Donoso C (Ed.) Especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Marisa Cúneo Ediciones, Valdivia, Chile. pp. 423-432.

Donoso PJ, González ME, Escobar B, Basso I, Otero L. 1999. Viverización y plantaciones de Raulí, Roble y Coihue. En: C. Donoso y A. Lara (Eds.) Silvicultura de los Bosques Nativos de Chile. ED. Universitaria, Santiago, Chile. pp. 177-244.

Donoso C., Gallo L., Donoso P., Azpilicueta M. 2004. Variación en *Nothofagus obliqua* (Mirb.). Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Santiago de Chile, Chile, Editorial Universitaria. p. 79-113.

Elshire R., Glaubitz J., Poland J., Kawamoto K., Buckler E., Mitchell S. .2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. PLoS ONE 6(5): e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379.

Faria D,Tanno P, Reis A, Martins A, Ferreira M, Grattapaglia D. 2011. Genotyping-by-Sequencing (GbS) the Highly Heterozygous Genome of Eucalyptus Provides Large Numbers of High Quality Genome-Wide SNPs. PAG XX, San Diego, CA, USA. http://pag.confex.com/pag/xx/webprogram/Paper4239.html.

Finkeldey R, Leinemann L, Gailing O. 2010. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. Appl Microbiol Biotechnol 85: 1251-1258.

FONTAGRO. 2003. Caracterización genética de poblaciones de *Nothofagus obliqua* (mir.et Oest) y *Nothofagus alpina* (Poepp.et Endl.) Oest (=Nervosa (Phil) Dim. Et mil) mediante marcadores moleculares e isoenzimatico", Chile- Argentina.

Gallo L. 1995. Supuestos híbridos interespecíficos en progenies de Raulí. Resumen. *In Congreso Argentino de Genética. 26. Reunión Anual de la Sociedad Genética de Chile. 28. Jornada Argentino-Chilena de Genética. 1. 1995 10 22-26, 22-26 de octubre*, 1995. San Carlos de Bariloche.

Gallo L., Marchelli P., Breitembücher A. 1997. Morphologycal and allozymic evidence of natural hybridization between two southern beeches (Nothofagus spp.) and its relation to heterozygosity and height growth. Forest Genetics 4: 13-21.

Gallo LA, Marchelli P, P Crego. 2000b. Variación genética en poblaciones y progenies de Raulí en Argentina. III. Dinámica de hibridación interespecífica entre Raulí y Roble Pellín. *In* R Ipinza, B Gutiérrez y V Emhart eds. Domesticación y Mejora Genética de raulí y roble. Valdivia, Chile. Exsion. p. 181-196.

Gallo L., Marchelli P., Crego P., Oudloerlo L., Izquierdo F., Breilembücher A., González M., Chauchard L., Maresea L., Cuerpo de Guardaparques de los Parques Nacionales Lanin & Nahuel Huapi., Mel U. 2000b. Revista Domesticación y mejora genética en Rauli y

Roble. Editorial Maval Ltda. ISBN: 956 288-691-3 Registro de Propiedad Intelectual N° 115.794 Agosto 2000. Páginas 157-180.
Gallo L., Marchelli P., González Peñalba M., Chauchard L., & Vellido S. 2003. Genética de poblaciones en la definición de áreas protegidas. In *Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe*.
Gallo LA, P Marchelli, MM Azpilicueta, P Crego. 2006. El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. Bosque 27:3-15.
Geburek T, Konrad H. 2008. Why the conservation of forest genetic resources has not worked. Conservation Biology 22:267-274.
Gitay H, Suárez A, Watson R, Dokken D. 2002. Climate change and biodiversity. IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. 86 pp.
Glaubitz J, Moran G. 2000. Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. En: Young A, Boshier D, Boyle T (Eds.). Forest conservation genetics: principles and practice. CSIRO-CABI, pp. 39-59.
Haase, P. 1992. Isozyme variability and biogeography of Nothofagus truncata (Fagaceaea). New Zealand Journal of Botany 30: 315-328.
Haase, P. 1993a. Isozyme studies of New Zealand Nothofagus species (southern beech) using leaf extracts. Silvae Genetica 42: 46-51.
Haase, P. 1993b. Genetic variation, gene flow, and the "founder effect" in pioneer populations of *Nothofagus menziesii* (Fagaceae), South Island, New Zealand. Journal of Biogeography 20: 79-85.
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.
Hasbún R, Iturra C, Moraga P, Wachtendorff P, Quiroga P, Valenzuela S. 2012. An efficient and reproducible protocol for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection. Tree Genetics and Genomes 8(4):925-931.
Hinojosa L. 2005. Cambios climáticos y vegetacionales inferidos a partir de paleofloras cenozoicas del sur de Sudamérica. Revista geológica de Chile 32(1):95-115.
INFOR. 2011. Situación actual del sistema de abastecimiento de semillas y producción de plantas nativas en viveros de la zona centro-sur del país. Informe preliminar proyecto 028/2010 "Fundamentos para una normativa sobre origen de semillas y calidad deplantas forestales nativas". 1er Concurso del Fondo de Investigación del Bosque Nativo.
INN, 2006. Norma Chilena Oficial. NCh 2957. Of2006. Material de propagación de uso forestal. 1ra ed. Instituto Nacional de Normalización, Santiago.
INTA 2012. Artículo de divulgación - por Acuña C,. Azpilicueta M,. Fernandez P,. Gallo L,. Gonzalez S,. Hopp H,. Marchelli P,. Rivarola M,. Pomponio M,. Paniego N,. Torales S. [en linea]. Publicado originalmente: 14 de agosto de 2012., [fecha de consulta 13 de abril de 2013]. Disponible en: http://inta.gob.ar/proyectos/aebio-242421.

IPCC. 2007. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 976pp.

IPGRI, FRIM, Kuala Lumpur, Malasia.

Jiménez P, Collada C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, Fuera de Serie (Chile) 2: 237-248.

Jones R., Vaillancourt R., Jordan G. 2004. Microsatellites for use in *Nothofagus cunninghamii* (Nothofagaceae) and related species. Molecular Ecology 4:1-14.

Karp, A. 2000. The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity? SAT 21 Meeting,

Kleinschmit, J, Kownatzki D, Gregorius H. 2004. Adaptational characteristics of autochthonous populations - consequences for provenance delineation. Forest Ecology and Mangement 197:213-224.

Lawler J, White D, Neilson, Blaustein A, Andrew R. 2006. Predicting climate-induced range shifts: model differences and model reliability. Global Change Biology 12(8):1568-1584.

Lenoir J, Gégout J, Marquet P,de Ruffray P, Brisse H. 2008. A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. Science 320(5884):1768-1771.

Lindgren, D, Ying, C. 2000. A model integrating seed source adaptation and seed use. New Forests 20:87-104.

Lomolino M, Riddle B, Brown. 2006. Biogeography. Third Edition. Sinauer. 845 pp.

Lu Y, Yan J, Guimaraes CT, Taba S, Hao Z, Gao S, Chen S, Li J, Zhang S, Vivek BS, Magorokosho C, Mugo S, Makumbi D, Parentoni SN, Shah T, Rong T, Crouch JH, Xu Y. 2009. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms. Theor Appl Genet 120:93–115.

Lu F., Lipka A., Glaubitz J., Elshire R, Cherney J., et al. 2013. Switchgrass Genomic Diversity, Ploidy, an.d Evolution: Novel Insights from a Network-Based SNP Discovery Protocol. PLoS Genet 9(1): e1003215. doi:10.1371/journal.pgen.1003215.

Manos P., Nixon K., Doyle. J. 1993. Cladistic analysis of restriction site variation within the chloroplast DNA Inverted repeat region of selected Hamamelididae. Australian Systematic Botany 18: 551-562.

Manos P., 1997. Systematics of Nothofagus (Nothofagaceae) based on rDNA spacer sequences (ITS): taxonomic congruence with morphology and plastid sequences. American Journal of Botany 84:1137.

Manos, P.S., Steele. K, 1997. Phylogenetic analyses of "higher" Hamamelididae based on plastid sequence data. American Journal of Botany 84: 1407-1419.

Marchelli P., Gallo L., Scholz F., Ziegenhage B. 1998. Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech Nothofagus nervosa (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. Theoretical and Applied Genetics 97: 642—646.

Marchelli P., Gallo L. 2000a. Genetic analysis of isozyme variants in open pollinated families of Southern beech Nothofagus nervosa (Phil.) Dim. et Mil. Silvae Genetica 49: 90-98.

Marchelli P., Gallo L. 2000b. Variación aloenzimatica, de ADN de cloroplasto y de ADN nuclear en poblaciones y progenies de Raulí en argentina. Revista Domesticación y mejora genética en Raulí y Roble. Editorial Maval Limitada. ISBN: 956 288-691·3 Registro de Propiedad Inlelectual N°115.794 Agosto 2000. p 157-180.

Marchelli, P., Gallo, L. 2001. Genetic diversity and differentiation in a southern beech subjected to introgressive hybridisation. Heredity 87: 284-293.

Marchelli, P. 2002. Variabilidad genética en Raulí (Nothofagus nervosa (Phil.) Dim et Mil.), su relación con procesos evolutivos y la importancia en la conservación y utilización de sus recursos genéticos. Tesis Doctoral, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue. 222 p.

Marchelli, P., Gallo, L. 2004. Conservación y utilización de la variación genética en poblaciones argentinas de Raulí (Nothofagus nervosa (Phil.) Dim. et Mil.). IUFRO International Symposium, Valdivia, Chile. Publicación en CD. 17 p.

Marchelli, P., Gallo, L. 2004b. The combined role of glaciation and hybridization in shaping the distribution of genetic variation in a Patagonian southern beec. Journal of Biogeography Volume 3: 451–460.

Marchelli P., Gallo L. 2006. Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. Conservation Genetics 7:591-60.

Marchelli, P., Caron, H., Azpilicueta, M and Gallo, L. 2007. A New Set of Highly Polymorphic Nuclear Microsatellite Markers for Nothofagus nervosa and Related South American Specie.

Mathiasen P, AC Premoli. 2010. Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. Molecular Ecology 19:371-385.

Martin P., Dowd J. 1993. Using sequences of rbcL to study phylogeny and biogeography of Nothofagus species. Australian Systematic Botany 6: 441-447.

Martín M., Muñoz S., Muñoz F., Uribe M., Molina J., Herrera M., Martína L., Álvarez J. 2010. Primeros resultados en el desarrollo de un marcador genético basado en las proteínas de reserva en dos especies del género Nothofagus. Bosque 31: 252-257.

Martinez G., Zappacosta D., Arena M., Curvetto N. 2001. Changes in isoperoxidase patterns during the in vitro rooting of Nothofagus antarctic. Plant Physiology 27: 43–53.

Mattioni C., Casasoli M., González M., Ipinza R., Villani F. 2002. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean Nothofagus species. Genetic 104: 1064-1070.

Mesén F, Guevara AL, Jiménez ML. 1996. Guía técnica para la producción de semilla forestal certificada y autorizada. Serie Técnica, Manual Técnico No. 20. CATIE-Oficina Nacional de Semillas-MINAE. Turrialba, Costa Rica. 34 pp

Nimmakayala P., Levi A., Abburi L., Lakshmi V., Abburi L., Tomason Y., Saminathan T., Gopinath V., Malkaram S., Reddy R., Wehner T., Mitchell S., Reddy U. 2014. Single nucleotide polymorphisms generated by genotyping by sequencing to characterize genome-wide diversity, linkage disequilibrium, and selective sweeps in cultivated watermelon. BMC Genomics 15:767.

Nuroniah HS. 2009. Diagnostic markers for the identification of the tree species Shorea leprosula Miq. And S. parvifolia Dyer and the geographic origin of S. leprosula Miq. [Dissertation]. Goettingen University, Goettingen. Alemania.

OCDE. 2007. OECD Scheme for the Certification of Forest Reproductive Material moving in International Trade. OCDE, Paris. 26 pp.

Pastorino M., Marchelli P., Milleron M., Gallo L. 2008. Inheritance of isozyme variants in Nothofagus antarctica (G.forster) Oersted. Journal of Basic and Applied Genetics 19: 27-33.

Pastorino M., Marchelli P., Milleron M., Soliani C., Gallo L. 2009. The effect of different glaciation patterns over the current genetic structure of the southern beech *Nothofagus antárctica*. Genética 136:79-88.

Petit J, Raynaud D, Basile I, Chappellaz J, Davisk M, Ritz C, Delmotte M, Legrand M, Lorius C, Pe L, Saltzmank E. 1999. Climate and atmospheric history of the past 420000 years from the Vostok ice core , Antarctica. Nature 399:429-435.

Pineda, G.2000a. Variabilidad aloenzimatica de *N. alpina* en chile. Revista Domesticación y mejora genética en Rauli y Roble. Editorial Maval Limitada. ISBN:956 288-691·3 Registro de Propiedad Inlelectual N" 115.794 Agosto 2000. Páginas 95-120.

Pineda, G. 2000b. Variabilidad isoenzimatica del huerto semillero clonal de N. alpina. Editorial Maval Limitada. ISBN: 956 288-691·3 Registro de Propiedad Inlelectual N" 115.794 Agosto 2000. Páginas 297 -306.

Premoli, A. 1996. Allozyme polymorphisms, ourcrossing rates, and hybridization of South American Nothofagus. Genética 97: 55-64.

Premoli, A. 1997. Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American Nothofagus. Journal of Biogeography 24:883–892.

Premoli A. 1998. The use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas of more widespread species. In Proceedings of an International Workshop on Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management (International Foundation for Science, ed.). Santa Catarina, Brazil, Universidade Federal de Santa Catarina. p. 157-171.

Premoli, A. 2003. Isozyme Polymorphisms Provide Evidence of Clinal Variation With Elevation in *Nothofagus pumillo*. Journal of Heredity 94:218–226.

Premoli, A and Kitzberger, T. 2005. Regeneration mode affects spatial genetic structure of *Nothofagus dombeyi* forests. Molecular Ecology 14:2319–2329.

Schultz L. 2008. Conservation Genetics of a Gondwana relict rainforest tree, *Nothofagus moorei* (F. Muell) Krasser. Tesis Doctoral. Universidad de la Tecnología de Queensland. Australia.

Searle R, Rovira R. 2008. Cambio climático y efectos en la Biodiversidad: el caso chileno. En: CONAMA. 2008. Biodiversidad de Chile. Patrimonio y Desafíos, pp 502-505.

Setoguchi, H., Ono, J., Doi, Y., Koyama, H., Tsuda, M. 1997. Molecular phylogeny of Nothofagus (Nothofagacea) based on the atpB-rbcL intergenic spacer of the chloroplast DNA. Journal of Plant Research 110: 469-484.

Soliani C., Sebastiani F., Marchelli P., Gallo L., Vendramin G. 2010. Development of novel genomic microsatellite markers in the southern beech *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasse. Molecular Ecology Resources 10:404-408.

Soto DP, Ríos AI. 2009. Seis años de respuesta de una plantación intensiva de Raulí y Coihue en la Precordillera de la Costa. Revista Bosque Nativo 44: 7-11.

Stecconi M., Marchelli P., Puntieri J., Gallo L. 2002. Hybridisation between Nothofagus antarctica (deciduous) and N. dombeyi (evergreen) (Nothofagaceae) in natural communities. In Southern Connection Bulletin 21: 8-9.

Steconni M., Marchelli P., Puntieri J., Picca P., Gallo L. 2004. Natural hybridisation between a deciduous (Nothofagus antarctica, Nothofagaceae) and an evergeen (N. dombeyi) forest tree species as evidenced by morphological and isoenzymatic traits. Annals of Botany 94:775-786.

Stöckler K. 2001. Origins and Evolution of the New Zealand Forest flora a molecular phylogenetic approach. Tesis Doctoral. Universidad de Massey. New Zealand.

Torales S., Rivarola M., Pomponio M., Fernandez P., Acuña C., Marchelli P., Gonzalez S., Azpilicueta M., Hopp H., Gallo L., Paniego N., Marcucci S. 2012. Trascriptome survey of Patagonian southern beech Nothofagus nervosa (=N. alpina): assembly, annotation and molecular markers discovery. BMC Genomics 13: 291.

Thomsen T. 2002. Biogeography of Nothofagus subgenus Fuscospora in the South Island of New Zealand inferred from chloroplast DNA. Tesis Doctoral. Universidad de Canterbury. Nueva Zelanda.

Villagrán C, Hinojosa L. 1997. Historia de los bosques del sur de Sudamérica, II: Análisis fitogeográfico. Revista Chilena de Historia Natural 70: 241-267.

Vergara R., Gitzendanner M., Soltis D., Soltis P. Population genetic structure, genetic diversity, and natural history of the South American species of Nothofagus subgenus Lophozonia

(Nothofagaceae) inferred from nuclear microsatellite data. John Wiley & Sons Ltd.
Walther G, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee T, Fromentin J, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F. 2002. Ecological responses to recent climate change. Nature 416:389-395.
Woodward F. 1987. Climate & Plant Distribution. Cambridge Studies in Ecology. Cambridge University Press. UK. 174 p.
Zobel B, Talbert J. 1984. Applied Forest Tree Improvement. John Wiley and Sons, IAC. USA.

ANEXOS

FICHA TÉCNICA COIGÜE

Identificación de la especie.

Nombre científico: *Nothofagus dombeyi*
Nombre común: Coigüe
Nombre Mapudungun: *Koywe*



Figura 1 hojas de *Nothofagus dombeyi* (Coigüe)

Descripción: Es una árbol frondoso, de corteza gris y con ramas aplanadas horizontalmente que le da un aspecto característico. Sus hojas son perennes y coriáceas, tienen un peciolo muy corto y la forma es de rombo redondeado, con el borde aserrado (Figura 1). Las flores son pocos visibles, ya que no miden más de 5mm y son de color verde.

Distribución y Hábitat: el Coigüe crece desde Colchagua hasta Aisén (VI a XI región), también en Argentina, en las cercanías de la cordillera de los Andes, en las provincias de Neuquén, Rio Negro y al noroeste de Chubut. Habita desde el nivel del mar hasta el límite altitudinal arbóreo ocupando distintos sitios. Forma bosques puros o es componente dominante de otras asociaciones forestales.

Componentes en bosques de Coigüe: Roble-Rauli-Coigüe, Coigüe-Rauli-Tepa. Roble- Hualo,Lenga , Siempre verde Coigüe de Magallanes, Ciprés de la cordillera-Araucaria- Alerce.

Tipo de reproducción: es un árbol monoico (i.e posee flores masculinas y féminas en el mismo árbol), y tiene una reproducción sexual, la polinización es por viento, es decir, plantas anemofilias.

Duración del ciclo de vida: indeterminado.

Requerimientos ambientales para el cultivo:

- Zona Climática: climas fríos y lluviosos, característico del centro sur chileno

- Tipo de suelo: suelos húmedos, bien irrigados de las depreciones en las montañas como ocurre en la parte norte de su distribución (Donoso, 1999), mientras que al sur se observa un cambio en el biotropo, como en Chiloé, donde *N. dombeyi* está limitado a suelos morrémicos mejor drenados (Weinberger 1973)
- Precipitaciones: este se da bien en zonas lluviosas que comprenden los 2500-3500 mm anuales (Veblen, et al. 1996).
- Temperatura: amplio rango de resistencia al frio en invierno -8,5° C en hojas y -10° C en yemas a 500m en los 41 ° S, y 10° C en hojas y 13,5°C en las yemas a los 41°S (Alberdi, et al. 1985)

Mercado y productos manufacturados: una vez la madera seca posee muy buenas características para elaboración, siendo fácil de trabajar. Debido a esto se encuentra frecuentemente en diferentes tipos de construcción, en estructuras de casas, puentes rurales, andamios, diferentes tipos de pisos, establos, silos, escaleras, embarcaciones, revestimiento interiores y exteriores, muebles comunes y exclusivo también en artesanía, y grandes cantidades como chapa (Hall M, Witte Jorg. 2004)