

VCH-FC
MA5-
C313
c.L

PATRONES DE VARIABILIDAD ALOENZIMATICA EN
RAULI (*Nothofagus alpina* Poepp.et Endl.(Oerst)): EFECTO DE
SU SISTEMA REPRODUCTIVO, DISTRIBUCION
GEOGRAFICA Y ULTIMA GLACIACION

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

Basilio Carrasco Gálvez

1998

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la comisión de postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magister presentada por el candidato:

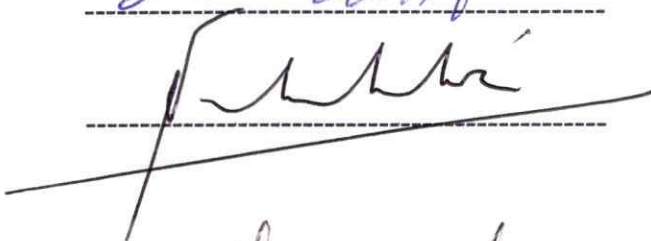
Basilio Alejandro Carrasco Gálvez

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 12 de Mayo de 1998.

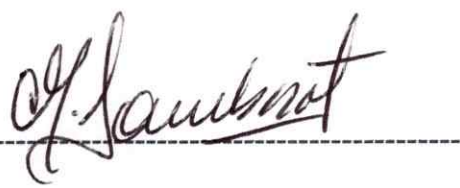
Director de Tesis:
Dr. Lafayette Eaton



Co-Director de Tesis:
Dr. Nelson Díaz



Comisión Informante de Tesis:
Prof. Madeleine Lambrot



Dra. Liliana Cardemil



Dr. Ramiro Bustamante



Dedico esta Tesis a :

**A mi amado hijo Felipe, de quien espero perdone
las locuras de su padre.**

INDICE DE MATERIAS

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTAS DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	10
2.1.Descripción y Ubicación Geográfica de las Poblaciones Muestreadas	10
2.2.Preparación de las Muestras	12
2.3.Extracción de las Enzimas	12
2.4.Electroforesis en geles de Almidón	13
2.4.1.Preparación de los Geles	13
2.4.2.Carga de los geles	14
2.4.3.Corrída de la Electroforesis	15
2.4.4.Tinción de las enzimas	16
2.4.5.Interpretación de la información electroforética	17
2.5.Análisis Estadísticos	17

2.5.1. Equilibrio Hardy-Weinberg	17
2.5.2. Estimación de los Niveles de Variabilidad Genética	18
2.5.2.1. Número medio de alelos por locus	18
2.5.2.1. Número medio de alelos por locus	18
2.5.2.2. Porcentaje de loci polimórficos	18
2.5.2.3. Heterocigosidad	18
2.5.2.3.1. Heterocigosidad media observada	18
2.5.2.3.2. Heterocigosidad media esperada	19
2.5.3. Distribución de la Variabilidad genética	19
2.5.3.1. Diversidad Génica de Nei	19
2.5.3.2. Estadígrafos F de Wright	20
2.5.3.3. Significancia de los estadígrafos F	22
2.5.4. Diferenciación entre poblaciones	22
2.5.4.1. Prueba de Bondad de Ajuste (G)	22
2.5.4.2. Distancia Genética de Nei	23
2.5.4.3. Estadígrafo F_{st} de Wright	23
2.5.4.4. Estadígrafo G_{st} de Nei	23
2.5.5. Relaciones entre poblaciones	24
2.5.5.1. Análisis de Cluster Jerárquico	24
2.5.5.2. Análisis de Cluster No Jerárquico	24
2.5.6. Niveles de Flujo Génico	24
2.5.7. Relaciones entre parámetros genéticos y distancias geográfica	25

3. RESULTADOS	26
3.1. Identificación y Caracterización de las Variantes Enzimáticas.	26
3.2. Análisis de las Variantes Alélicas	28
3.3. Desviaciones de la distribución Hardy-Weinberg	29
3.4. Niveles de Variabilidad Genética Aloenzimática	31
3.5. Distribución de la Variabilidad Genética Aloenzimática	34
3.6. Deficiencia de Heterocigotos	35
3.7. Diferenciación Interpoblacional	36
3.7.1. Relaciones entre poblaciones	38
3.7.2. Correlaciones entre parámetros genéticos y geográficos	39
3.8. Niveles de Flujo Génico	41
4. DISCUSION	52
4.1. Niveles de variabilidad genética aloenzimática en el Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst)).	52
4.1.1. Variabilidad genética a nivel poblacional	52
4.1.2. Variabilidad genética a nivel de especie	55
4.1.3. Deficiencia de heterocigotos	59
4.2. Distribución de la variabilidad genética en el Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))	61
4.2.1. Variabilidad genética intrapoblacional	62
4.2.2. Variabilidad genética interpoblacional	63
4.3. Factores Evolutivos que afectan la estructura genética de las poblaciones	

naturales de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).	66
4.3.1. Procesos evolutivos que afectan los niveles de variabilidad genética.	66
4.3.2. Procesos evolutivos que afectan la distribución de la variabilidad genética.	69
4.3.2.1. Influencia de la deriva genética y flujo génico	70
4.3.2.2. Influencia de la selección y la migración	74
4.3.3. Estructura genética e historia de vida	76
4.3.3.1. Distancia genéticas y rutas de migración	79
5. CONCLUSIONES	81
6. BIBLIOGRAFIA	83
ANEXOS	

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer afectuosamente al Dr. Lafayette Eaton por su constante apoyo. Más que un profesor fue un amigo que siempre estuvo dispuesto, con suma paciencia, a ayudarme en la asimilación y profundización de mis conocimientos. Al respecto, siempre me estimuló y enseñó a pensar en soluciones alternativas a los problemas que enfrentaba, y a expandir mi mente más allá de sus límites.

Con especial aprecio quiero también agradecer la ayuda y amistad de Dionisia Sepúlveda quién durante la realización de mi tesis me enseñó con mucha paciencia el funcionamiento del Laboratorio de Microevolución. Además, su incansable capacidad para buscar, aprender y aplicar nuevos conocimientos (de diferentes disciplinas) me permitieron comprender que el célebre dicho "Querer es Poder" es esencial en cualquier aspectos de la vida de una persona.

Agradezco con mucho cariño a la Prof. Madeleine Lamborot, ella fue un persona muy importante en mi formación. Pero sin duda, lo más relevante fue su sincera amistad y confianza depositada sobre mi. Ella confió en mi sin siquiera conocerme y me permitió trabajar en su laboratorio sin ninguna condición previa, lo cual no es muy común hoy en día. Además, su ayuda ha sido fundamental para proseguir mis estudios de postgrado en el extranjero.

También quiero agradecer a Dra. Patricia Iturra, Dra. Margarita Carú, Dr. Claudio Martínez Dr. Victor Cifuentes, Dr. Nelson Díaz quienes a parte de haber sido mis profesores en algún momento se convirtieron en mis amigos.

Debo hacer una especial mención al Dr. Guido Pincheira pues, fue la primera persona que me apoyó para entrar al Programa de Magister. Además, las amenas conversaciones que a menudo sostuvo con las personas que nos encontrábamos en su laboratorio fueron enriquecedoras, a pesar de que muchas veces no estaba de acuerdo con sus apreciaciones.

Por las innumerables molestias que les he causado y por los interminables favores que les he solicitado, quiero agradecer a mis amigos German Hermsilla, Rubén León, Patricio Retamales, Mauricio Vásquez, Enrique Pereira, Blanca Urzúa, Oscar Chandía, Rafael, Sandra y Lorena.

Agradezco infinitamente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por la posibilidad de realizar mi postgrado y por su apoyo económico durante los años que estuve en sus aulas. Sin los beneficios de rebaja de aranceles y ayuda económica, no habría podido cursar mis estudios.

Finalmente agradezco de corazón a toda mi familia por su eterna paciencia.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ubicación geográfica de 18 poblaciones naturales de Raulí <i>(Nothofagus alpina Poepp et Endl (Oerst))</i> muestreadas en este estudio.	11
Figura 2: Dendrograma construido en base a distancia genética no sesgada de Nei (1978) para 10 loci en 18 poblaciones naturales de Raulí <i>(Nothofagus alpina (Poepp. et Endl (Oerst))</i>).	43
Figura 3: Alelos identificados para la enzima Shikimato Deshidrogenasa: a= SKDH-2 ; b= SKDH-3 ; c= SKDH-4.	44
Figura 4: Alelos identificados para la enzima Deshidrogenasa Málica : a= MDH ₂ -1; b= MDH ₂ -2 ; c= MDH ₂ -3 ; d= MDH ₂ -4.	45
Figura 5: Alelos identificados para la enzima Fosfoglucoisomerasa : a= PGI ₂ -2 ; b= PGI ₂ -3; c=PGI ₂ -4.	46
Figura 6: Alelos identificados para la enzima Aspartato Aminotransferasa : a= AAT ₂ -1; b=AAT ₂ -2 ; c= AAT ₂ -3.	47

Figura 7: Alelos identificados para la enzimas Peroxidasa :

a = PX_4 -2; b= PX_4 -3 ; c= PX_4 -4; d= PX_3 -1; e= PX_3 -2; f= PX_2 -1;

g= PX_2 -2;h= PX_2 -3; i = PX_2 -4.

48

Figura 8: Alelos identificados para la enzima Alanina Aminopeptidasa :

a= AAp -2; b= AAP - 3.

49

Figura 9: Alelos identificados para la enzima Menadione Reductasa:

a= MNR_1 -2; b= MNR_1 -3; c= MNR_1 -4; d= MNR_1 -6.

50

Figura 10: Alelos identificados para la enzima Fosfatasa Acida :

a= ACP_2 -1; b= ACP_2 -2 ; c= ACP_2 -3.

51

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Ubicación geográfica de 18 poblaciones naturales de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> Poepp. et Endl. (Oerst.)) muestreadas en este estudio.	10
Tabla 2: Composición del Buffer de Extracción (200ml de solución, pH=8,0) utilizado para la extracción de enzimas en Raulí.	12
Tabla 3: Composición de geles (cantidad de almidón y tipo de buffer) según sistema enzimático ensayado.	14
Tabla 4: Condiciones de las fuentes de poder ensayado durante el transcurso de la electroforesis para cada sistema enzimático.	16
Tabla 5: Caracterización de los 10 loci enzimáticos estudiados en 18 poblaciones naturales de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).	27
Tabla 6: Número de Alelos raros (frecuencia menor a 10%), Alelos privativos, Alelos en frecuencia intermedia y Alelos frecuentes revelados para 10 loci	

enzimático en 18 poblaciones de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).	29
Tabla 7: Prueba exacta de Hardy-Weinberg para 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones naturales de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).	30
Tabla 8: Niveles de Variabilidad Genética Aloenzimática en 18 Poblaciones Naturales de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).	33
Tabla 9: Diversidad génica y genotípica para 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones naturales de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))) (Según los métodos de Nei (1973) y Weir y Cockerham (1984) respectivamente).	34
Tabla 10: Prueba de Bondad de Ajuste (G) para las frecuencias alélicas de 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).	36
Tabla 11: Correlaciones significativas entre parámetros geográficos (latitud, longitud, altitud) y las frecuencias alélicas de 9 aloenzimas en 18 poblaciones naturales de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).	40

<p>Tabla 12: Niveles de flujo génico ($Nm=(1/Fst \text{ ó } Gst -1)/4$) para 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones naturales de Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).</p>	42
<p>Tabla 13: Índices de variabilidad aloenzimática a nivel poblacional para especies que presentan atributos como: Perennes, Leñosas, Amplia Distribución Geográfica, Alogamia y Anemocoria.</p>	53
<p>Tabla 14: Niveles promedio de variabilidad genética aloenzimática para géneros de la familia de las Fagaceas y para <i>N. alpina</i>.</p>	56
<p>Tabla 15: Niveles de variabilidad genética aloenzimática para especies vegetales clasificadas según atributos como: Estatus taxonómico, forma de vida, distribución geográfica, dispersión de polen y dispersión de semillas.</p>	58
<p>Tabla 16: Distribución de variabilidad genética aloenzimática en especies de los géneros <i>Nothofagus</i>, <i>Fagus</i>, <i>Castanea</i> y <i>Quercus</i>, incluyendo al Raulí (<i>Nothofagus alpina</i> (Poepp. et Endl (Oerst))).</p>	64

Tabla 17: Flujo génico ($Nm = (1/F_{st} - 1)/4$) en especies con alogamia y anemocoría.

65

RESUMEN

En 18 poblaciones de Raulí muestreadas a lo largo de su distribución geográfica natural, se estudiaron los patrones de variabilidad genética para 8 sistemas enzimáticos mediante electroforesis en geles de almidón. Se analizaron 10 loci putativos, identificándose un total de 43 alelos, los que en su mayoría se encontraron en frecuencias inferiores al 10%.

Los resultados verificaron la presencia de una elevada variabilidad aloenzimática ($P=92.8\%$; $A=3.04$; $H_e=28.2\%$), siendo muy superior a la estimada para otras Fagaceas ($P=56.8\%$; $A=2.03$; $H_e=19.5\%$) y al promedio estimado para especies vegetales ($P=50.5\%$; $A=1.96$; $H_e=14.9\%$). Al particionar la variación existente, se apreció que aproximadamente un 95% se distribuyó dentro de las poblaciones y una menor proporción se encontró entre poblaciones (5%). Además se pudo observar la presencia de elevados niveles de consanguinidad a nivel intrapoblacional ($F_{is}=0.186$).

En este estudio se pudo confirmar que la distribución geográfica, forma de vida y el sistema de reproductivo son los atributos biológicos que mejor predicen la cantidad y distribución de la variabilidad genética. Sin embargo, como ellos no explican la totalidad de los patrones aloenzimáticos, la estructura genética de las poblaciones naturales de Raulí sería el resultado de los efectos combinados de sus atributos biológicos y procesos evolutivos como la deriva genética, flujo génico, selección y procesos catastróficos (último ciclo glacial).

Al parecer, la última glaciación no cambió drásticamente los patrones de variabilidad genética en el Raulí como se ha reportado para otras especies vegetales sin embargo, ésta habría jugado un importante papel en la diferenciación poblacional. En tal sentido, la moderada diferenciación observada ($F_{st}=5.11\%$, $G_{st}=6.4\%$) se asociaría en parte, a los procesos de contracción y expansión de la vegetación durante y después la glaciación, en la cual, Las Trancas y El Colegual representarían relictos que quedaron mientras las demás poblaciones avanzaban hacia el norte (17000-18000 años antes del presente). Posteriormente, diferentes rutas migratorias postglaciación (15000-3000 años antes del presente) habrían causado la divergencia genética de las otras poblaciones.

SUMMARY

In 18 populations of Raulí sampled throughout its natural geographic distribution, the patterns of genetic variability were studied for 8 enzyme systems using starch gel electrophoresis. Ten putative loci were analyzed, identifying a total of 43 alleles, the majority of which were found in frequencies less than 10%.

The results verified the presence of a very high level of alloenzymatic variability ($P = 92.8\%$; $A = 3.04$; $He = 28.2\%$), quite superior to that estimated for other Fagaceae ($P = 56.8\%$; $A = 2.03$; $He = 19.5\%$) and to the general mean estimated for plant species ($P = 50.5\%$; $A = 1.96$; $He = 14.9\%$). Partitioning the genetic variation revealed about 95% within populations and only 5% between populations. The presence of high levels of consanguinity within populations ($F_{is} = 0.186$) was also observed.

This study confirmed that the geographic distribution, life form and reproductive system are the biological attributes which best predict the magnitude and distribution of the genetic variability. However, since they do not explain the alloenzymatic patterns completely, the genetic structure of natural populations of Raulí must be the result of the combined effects of its biological attributes and evolutionary processes such as genetic drift, gene flow, selection and catastrophic processes (the last glacial cycle).

The last glacial cycle did not change drastically the patterns of genetic variability in Raulí as has been reported for other plant species, however, it played an important role in population differentiation. In this vein, the moderate differentiation observed ($F_{st} = 5.1\%$, $G_{st} = 6.4\%$) is in part associated with the processes of contraction and expansion

of the vegetation during and after the glaciation. Thus the populations in Las Trancas and El Colegual appear to be relicts which remained while the rest of the populations advanced northward (17,000 - 18000 years before present), while the divergence of the rest of the populations would have been produced as an effect of different postglaciation migratory routes (15,000 - 3,000 years before present).

1.INTRODUCCION

El género *Nothofagus* es muy importante dentro de la flora del cono sur de América pues, se distribuye ampliamente entre los 33° y 55° S y sus especies dominan los bosques templados de Chile y Argentina. Existen 9 especies (*N. oblicua*, *N. glauca*, *N. alpina*, *N. alessandri*, *N. pumilo*, *N. antarctica*, *N.dombeyi*, *N.betuloides*, *N. nitida*), un híbrido (*N. leoni* = *N. oblicua* x *N. glauca*) y una variedad (*N. Oblicua* var. *Macrocarpa*), todos los cuales forman bosques con una inusual biodiversidad y relaciones ecológicas complejas (Donoso, 1995).

Dentro de las especies señaladas se encuentra *N. alpina*, árbol de hoja caduca, monoico, alógamo, anemófilo, con anemocoría y que puede alcanzar su madurez entre los 20 a 40 años. Presenta una amplia distribución geográfica, abarcando 640 Km. desde la VII a la X Región tanto por la Cordillera de los Andes como, por la Cordillera de la Costa (Donoso, 1995; Riveros et al,1995; Ormazábal y Benoit,1987). Las investigaciones realizadas para el Raulí y para muchas de las especies que se desarrollan en los bosques templados, han sido fundamentalmente de tipo ecológico, existiendo una carencia absoluta de estudios genético poblacionales en las cuales se analizen los patrones de variabilidad y las implicancias evolutivas de marcadores genéticos (ej. Isoenzimas). Por suerte la literatura que cubre esta área en plantas es extensa, entregando antecedentes muy valiosos que permitirían en cierta medida predecir y comprender la estructura genética de las poblaciones naturales de Raulí.

Es así como, en la actualidad los numerosos estudios genéticos realizados en plantas y animales han permitido determinar que las especies vegetales (gimnospermas y angiospermas) en conjunto presentan mayor variabilidad genética aloenzimática que los animales ($He=10.0\%$) y organismos invertebrados ($He=5.4\%$) (Nevo et al, 1984 citado por Hamrick y Godt, 1990.). En promedio las plantas presentarían 50% de loci polimórficos (P), 2.0 alelos por locus (A) y 15% de heterocigosidad (He). Menor variación ocurriría a nivel poblacional con 34% de loci polimórficos (P), 1.53 alelos por locus (A) y 11% de heterocigosidad (He) (Hamrick y Godt, 1990).

En las especies vegetales, los estudios sobre patrones de variabilidad genética aloenzimática se han focalizado principalmente en especies gimnospermas, sin embargo en el último tiempo ha aumentado significativamente este tipo de investigaciones en angiospermas. La familia Fagaceae es un importante grupo taxonómico dentro de las angiospermas la cual, ha sido sometida a intensas investigaciones de tipo genético-evolutivo, especialmente las especies pertenecientes a los géneros *Quercus* y *Fagus*. Los resultados muestran que las Fagaceas presentan niveles de variabilidad genética superiores a los valores obtenidos para las plantas en conjunto. En promedio mostrarían 2,3 alelos por locus (A), 71% de loci polimórficos (P) y 24% de diversidad genética (He). (Belletti y Lateri, 1995; Comps et al, 1990; Comps et al, 1991; Könnert, 1995; Leonardi y Menozzi, 1995 ; Löcheit y Franke, 1995; Houston y Houston, 1994; Huang et al, 1994; Villani et al, 1991; Müller et al, 1993; Manos y Fairbrother, 1987; Guttman y Weigt, 1989; Schnabel y Hamrick, 1990; Yacine y Lumaret, 1989; Kleinschmit et al, 1995; Hasse, 1992; 1993;).

Tal variación genética se caracterizaría por la presencia de 1 a 2 alelos aloenzimáticos más frecuentes y una predominante cantidad de alelos raros con frecuencias menores al 10%, situación que es frecuentemente observada en especies vegetales arbóreas (Conkle, 1992).

La información electroforética también ha sido utilizada para medir la distribución de la variabilidad genética en las poblaciones naturales (Nei, 1973, 1977; Wright, 1965), verificándose que en las especies arbóreas, la mayor parte de la diversidad genética se encuentra distribuida a nivel intrapoblacional (78-95%) y una menor proporción se distribuye entre poblaciones (5%-22%). Las Fagaceas presentan patrones similares, con aproximadamente 81.5%-100% de diversidad genética dentro de sus poblaciones y del orden de 0.0%-18.5% entre poblaciones (Hamrick y Godt, 1990; Belletti y Lateri, 1995; Comps et al, 1990; Comps et al, 1991; Könnert, 1995; Leonardi y Menozzi, 1995; Löchelt y Franke, 1995; Takahashi et al, 1994; Houston y Houston, 1994; Huang et al, 1994; Villani et al, 1991; Müller et al, (1993); Manos y Fairbrother, 1987; Guttman y Weigt, 1989; Schnabel y Hamrick, 1990; Yacine y Lumaret, 1989; Kleinschmit et al, 1995).

En una extensa recopilación de antecedentes bibliográficos realizada por Hamrick et al (1979; 1991), Hamrick (1982) y Hamrick y Godt, (1990), sostienen que los niveles y distribución de la diversidad genética en especies vegetales estarían estrechamente relacionados a sus características biológicas. Ellos estudiaron 8 categorías de atributos biológicos (estatus taxonómico, forma de vida, distribución geográfica, distribución climática, estado sucesional, modo de reproducción, sistema de apareamiento y tipos de dispersión de semillas), concluyendo que, las especies leñosas perennes, alógamas, anemófilas, anemócoras y con amplia distribución geográfica tendrían la capacidad de mantener elevados niveles de

variabilidad genética aloenzimática y poblaciones genéticamente homogéneas, comparado con especies que muestran otras combinaciones de atributos. Dichas características, les habrían permitido mantener poblaciones grandes y continuas durante la mayor parte de su historia vida. En estas condiciones se habría facilitado el flujo génico evitándose así, que la deriva genética disminuyera los niveles de variabilidad aloenzimática y llevara a una importante diferenciación poblacional. Por lo tanto, en base a tales antecedentes se plantea la siguiente hipótesis 1:

Se esperaría que las poblaciones de Raulí presenten una alta variabilidad genética intrapoblacional (Alto número de alelos por locus, elevado polimorfismo y heterocigosidad) y poblaciones genéticamente homogéneas.

Si bien los atributos biológicos del Raulí permitirían predecir sus patrones de variabilidad aloenzimática esta debe ser tomada con precaución ya que, frecuentemente se cita en la literatura especies que no se ajustan a estas predicciones. Al respecto, uno de los factores que habitualmente se indica como un proceso importante en la estructuración de la diversidad genética de las poblaciones naturales, es el efecto de la última glaciación. En las Fagaceas se sabe que varias especies de los géneros *Quercus*, *Castanea* y *Fagus* en Norte América y Europa fueron fuertemente afectadas por la glaciación obligando a sus poblaciones a mantenerse en refugios aislados en sectores más templados, induciendo a una importante diferenciación entre poblaciones (Comps et al, 1990; Comps et al, 1991; Villani et al, 1991)

Un caso extremo de los efectos de la última glaciación lo representan las especies del género *Nothofagus* de Nueva Zelandia. En ese período la intensa fragmentación, reducción de

los tamaños poblacionales y aislamiento de sus poblaciones habría alterado significativamente los patrones de variabilidad genética. A pesar de que los atributos biológicos de los *Nothofagus* de Nueva Zelandia predecirían una elevada variabilidad genética y poblaciones homogéneas la situación es absolutamente inversas, pues ellas presentan los niveles más bajos de diversidad genética determinados en la familia de las Fagaceas y algunas de sus especies muestran una elevada diferenciación interpoblacional (Hasse, 1992;1993).

En Chile los antecedentes existentes sobre la flora indican, que en el período interglacial hace 41.000 a 50.000 años antes del presente (AP) el clima era similar al de hoy y había una abundante flora de *Nothofagus* desde la Región de los Lagos hasta los 34° S (Auer, 1960; Stuiver et al, 1975; Heusser, 1983). A medida que se alcanzaba el último máximo glacial aumentaron las precipitaciones y bajaron las temperaturas permitiendo que la flora higrófila se expandiera hasta los 33°S (Villagrán, 1991). Una vez alcanzado el último máximo glacial entre los 28.000 a 14.000 AP gran parte de Chile se cubrió con hielo produciéndose una intensa deforestación y obligando a las especies a refugiarse en los sectores no glaciados de la Cordillera de la Costa, Depresión Intermedia y Faldeos Cordilleranos (Villagrán et al, 1991; 1996).

En este período el bosque caducifolio representado por las especies *Nothofagus oblicua* y *Nothofagus alpina* se habrían refugiado en la Cordillera de Nahuelbuta (37°S-38°S), Depresión Intermedia y Faldeos Cordilleranos (Villagrán, 1991). Según Heusser (1983) la taxa *N. oblicua/N. alpina* estaba presente a los 34°30'S y se encontraba representada por trazas en la Región de los Lagos (X Región) (Villagrán, 1991). Durante el Tardiglacial (15.000AP) el aumento de las temperaturas y las precipitaciones permitieron el inicio de del proceso de

recolonización. Entre los 12.500-11.000 AP la taxa *N. oblicua/N. alpina* estaba presente en trazas en la Depresión Intermedia a los 39°S (Heusser, 1984).

Terminada la glaciación y durante gran parte del Holoceno (9.500-3.000 AP) se produjo una fuerte desecación en la Cordillera de la Costa, Depresión Intermedia y Faldeos Cordilleranos, obligando a la taxa *N. oblicua/N. alpina* a expandirse por el sector andino hasta la Región de los Lagos y Argentina (Villagrán, 1991). En este mismo período la menguada representación de *N. oblicua/N. alpina* presente a los 39°S se habría expandido fuertemente hacia el Sureste hasta 41-42°S (Villagrán, 1980). Finalmente en los últimos 3.000AP la taxa *N. oblicua/N. alpina* se habría contraído por la Depresión Intermedia y Cordillera de los Andes hasta alcanzar su distribución actual.

A pesar de los intentos por reconstruir la historia de la vegetación durante la última glaciación es difícil saber su real efecto sobre las poblaciones de Raulí (*N. alpina*) debido fundamentalmente a 2 razones:

- 1.-El polen de *N. oblicua* y *N. alpina* es muy similar lo cual imposibilita saber la dinámica de cada especie por separado.
- 2.-Los estudios palinológicos no cubren toda el área representada por los bosques templados

Por lo tanto, si el Raulí se mantuvo como una gran población se esperaría encontrar patrones de variabilidad aloenzimática similares a los indicados en la hipótesis 1. Mientras que si ellas fueron intensamente afectadas, se esperaría una situación absolutamente distinta por lo tanto, se plantea la siguiente hipótesis alternativa:

Si durante la última glaciación hubo una severa disminución de sus tamaños poblacionales y las poblaciones se mantuvieron fragmentadas y aisladas se esperaría una baja variabilidad genética y una importante diferenciación interpoblacional, en contraposición a lo esperado, si se consideran solamente los atributos biológicos de la especie.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, en este trabajo se estudiaron los patrones de variabilidad aloenzimática para 18 poblaciones naturales de Raulí, planteándose para ello los siguientes objetivos:

1)Objetivo General: Cuantificar la magnitud y distribución de la variabilidad genética y analizar los procesos microevolutivos que habrían afectado la organización de su estructura genética.

2)Objetivos específicos:

a) Niveles de Variabilidad Genética:

Caracterizar genéticamente 18 poblaciones naturales de Raulí a través del estudio de aloenzimas determinando:

- Número de alelos por locus (A)
- Porcentaje de alelos polimórficos (P)
- Heterocigosidad observada (H_o)
- Heterocigosidad esperada (H_e)

b) Distribución de la Variabilidad Genética Aloenzimática y Relaciones entre poblaciones.

-Cuantificar y analizar la distribución de la variabilidad genética a través de los métodos de diferenciación alélica de Nei (1973,1977), diferenciación genotípica de Wright (1965) según Weir y Cockerham (1984) y distancia genética de Nei (1978)

-Determinar las relaciones existentes entre las poblaciones de Raulí mediante los métodos de análisis de cluster jerárquico (Sneath y Sokal, 1973) y análisis de cluster no jerárquico (Sokal y Rolf, 1973 y Lamborot y Eaton 1992).

c) Relación entre Parámetros Genéticos y Geográficos

-Correlacionar parámetros genéticos (número de alelos por locus, polimorfismo, heterocigosidad observada y esperada, frecuencias alélicas y distancia genéticas) con parámetros geográficos (latitud, longitud, altitud y distancias geográficas).

d) Niveles de Flujo Génico

-Determinar el flujo génico en forma indirecta, mediante la estimación del número de migrantes por generación (Nm) a partir del estadígrafo F_{st} de Wright según Weir y Cockerham (1984) y G_{st} de Nei (1973,1977).

Importancia de este estudio

El presente estudio sería el primero de su clase realizado para especies arbóreas nativas chilena, cuyos resultados permitirían obtener información valiosa sobre, los niveles y distribución de la variabilidad genética aloenzimática de las poblaciones naturales de Raulí y sobre los procesos evolutivos que pueden haber influenciado la organización de su estructura genética en el espacio y en el tiempo.

Además, la información obtenida podría ser utilizada en el diseño de programas de conservación de la especie, ya que, permitirían distinguir poblaciones prioritarias para la conservación y a su vez, entregaría una línea base para realizar monitoreos de los cambios de la diversidad genética en el tiempo. Por otro lado, tales antecedentes podrían ser valiosos para programas de mejoramiento genético, debido a que permitirían tener una aproximación inicial de los niveles de diversidad genética con que se cuenta, facilitando posteriormente, el monitoreo de los efectos del proceso de selección.

2.MATERIALES Y METODOS

2.1.Descripción y Ubicación Geográfica de las Poblaciones Muestreadas: Durante los meses de primavera-verano de los años 1995 y 1996 se muestrearon 18 poblaciones de Raulí a lo largo de su distribución natural, tanto por la Cordillera de la Costa como, por la Cordillera de los Andes. La ubicación geográfica de las 18 poblaciones de Raulí estudiadas se indica en la Tabla 1 y Figura 1. Características más detalladas de cada población se pueden ver en los anexos 1 al 4.

Tabla 1. Ubicación geográfica de 18 poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl. (Oerst.)) muestreadas en este estudio.

POBLACION	AREA	REGION	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD m.s.n.m.
1Curico	C. A.	VII	35°07'	71°58'	800
2Aguas Frias	C. A.	VII	35°21'	71°04'	650
3Radal-7Tasas	C. A.	VII	35°25'	71°03'	800
4Sn. Fabian A	C. A.	VIII	36°39'	71°23'	750
5Sn. Fabian B	C. A.	VIII	36°30'	71°38'	450
6Recinto	C. A.	VIII	36°49'	71°41'	750
7Monte León	C. A.	VIII	37°01'	71°44'	850
8Nahuelbuta	C. C.	VIII	37°40'	73°13'	950
9Chacay-Nahuel	C. C.	VIII	37°48'	73°08'	725
10Vega Blanca	C. C.	IX	37°50'	72°54'	860
11Malleco B	C. A.	IX	38°14'	71°57'	850
12Malleco A	C. A.	IX	38°13'	71°50'	1000
13Selva Oscura	C. A.	IX	38°19'	72°05'	550
14Curacautin	C. A.	IX	38°27'	71°44'	750
15Malalcahuello	C. A.	IX	38°28'	71°31'	1050
16Melipeuco	C. A.	IX	38°51'	71°28'	750
17Las Trancas	C. C.	X	40°17'	73°16'	150
18El Colegual	C. C.	X	40°42'	73°29'	223

C.A.= Cordillera de los Andes; C.C.= Cordillera de la Costa.

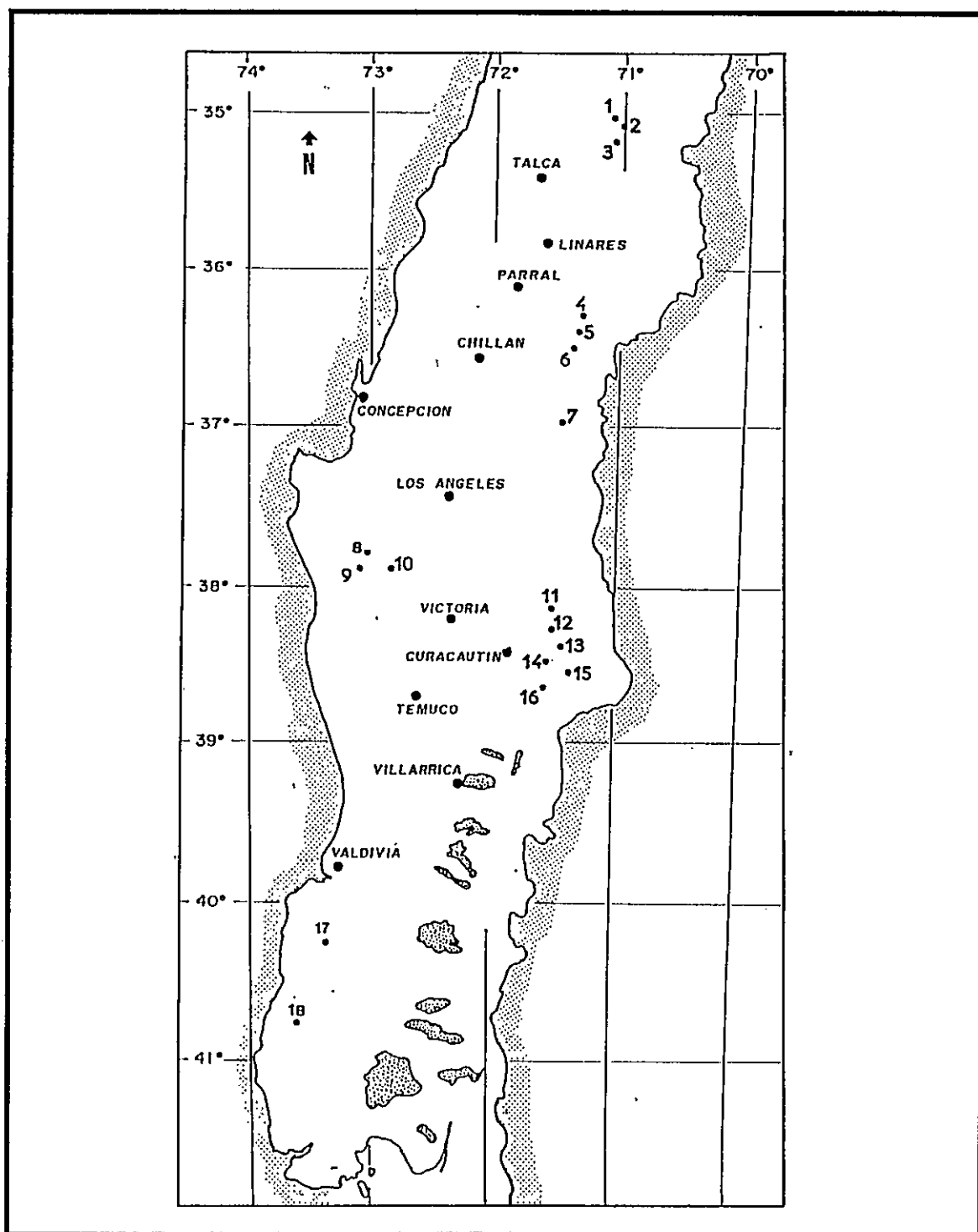


Figura 1 Ubicación geográfica de 18 poblaciones naturales de Rauli (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)) muestreadas en este estudio.

2.2.Preparación de las Muestras: En cada una de las 18 poblaciones se seleccionaron aleatoriamente 50 individuos, separados hasta 40m entre ellos. De cada árbol muestreado se extrajo una ramilla de aproximadamente 30 cm. de largo, asegurándose que tuviera yemas y hojas tiernas.

Las muestras recolectadas fueron envueltas en papel absorbente húmedo y mantenidas en frío durante su transporte al laboratorio, donde se intrudujieron al refrigerador hasta el momento de comenzar el proceso de extracción de las enzimas.

Tabla 2. Composición del Buffer de Extracción (200ml de solución, pH=8,0) utilizado para la extracción de enzimas en Raulí.

Nombre comercial	Fabricante	Ingrediente activo (%)	Peso Molecular	Cantidad para 200ml de solución
Trizma Base	SIGMA	Tri(Hidroximetil) aminometano (99,9%)	121.1	1.3gr
Acido Cítrico	NACIONAL	Ac. cítrico anhidro	192.1	0.3gr
Cisteína HCl	SIGMA	l-Cisteína hidrocloreto anhidro (98%)	157.6	0.2gr
Acido Ascórbico	SIGMA	l-Ac. ascórbico	198.1	0.2gr
Polietilenglicol	SIGMA	Polietilenglicol	15000-20000	1.0gr
Polivinilpirrolidona (PVP soluble)	SIGMA	Polivinilpirrolidona	360000	2.6gr
Mercaptoetanol	SIGMA	2Mercaptoetanol (>98%)	78.13	2 gotas

2.3.Extracción de las Enzimas: Antes de comenzar la extracción de las enzimas se preparó el buffer de extracción pH 8,0 cuya composición se detalla en la tabla 2. Durante la preparación de dicho buffer todos los compuestos fueron disueltos en 200ml de agua destilada y la solución resultante fue mantenida en el congelador a -20°C hasta el momento de su uso.

Para extraer las enzimas de los tejidos vegetales se procedió a macerar en un mortero, hojas, yemas foliares y corteza de cada una de las muestras, empleando arena inerte y buffer de extracción. El producto del proceso de macerado se centrifugó a 1000 rpm, guardándose el sobrenadante en tubos Eppendorf a -80C hasta su utilización en la electroforesis.

2.4. Electroforesis en geles de Almidón: La metodología de electroforesis en geles de almidón se realizó de acuerdo a los siguientes pasos consecutivos: Preparación de geles, Carga de las muestras, Corrida de la electroforesis y Tinción de las enzimas.

2.4.1. Preparación de los Geles: La composición de los geles fue obtenida de Conkle et al, (1982) y el procedimiento de preparación siguió la metodología estandarizada por el Dr. Lafayette Eaton (comunicación personal).

Se prepararon 3 geles diferentes cuya composición se describe en la Tabla 3. Cada uno de ellos permitió estudiar diferentes grupos enzimáticos seleccionados en análisis previos en base a su mejor resolución de tinción. Detalles de la formulación de los buffer de gel se pueden ver en los anexos 5,6,7.

El sistema de gel A se utilizó para las enzimas Glutamato Oxaloacetato Transaminasa (GOT) ó Alanina AminoTransferasa (AAT EC2.6.1.1) , Acido Fosfatasa (ACP EC3.1.3.2), Alanina Aminopeptidasa (AAP EC3.4.11.1), Fosfoglucosa Isomerasa (PGI EC5.3.1.9); el Sistema de gel D para las enzimas Shikimato Deshidrogenasa (SKDH EC1.1.1.25), Menadione Reductasa (MNR EC1.6.99.2), Malato Deshidrogenasa (MDH EC1.1.1.37) y el Sistema de gel H para Peroxidasa (PER EC1.11.1.6).

Para preparar cada gel, en un matr az Kitasato se agregó almidón y su respectivo buffer (Tabla 3), luego se calentó sobre la llama de un mechero hasta que la solución espes  y cambió de color (cristalino). Posteriormente, con una bomba de vacío se extrajieron las burbujas retenidas en la solución y se vertió en forma homogénea sobre moldes previamente preparados. Después que los geles se enfriaron a temperatura ambiente fueron guardarlos en el refrigerador a 4 C hasta su utilización.

Tabla 3 Composición de geles (cantidad de almidón y tipo de buffer) según sistema enzimático ensayado.

Sistema Enzimático	Número de Enzimas	Almidón (12%)	Tipo de Buffer
A	4	40.8gr.	340ml (10% buffer cámara A pH=8,3 y completar con buffer gel A).
D	3	36.0gr	300ml (5% buffer gel D, pH=6,1 completar con Agua destilada).
H	4	40.8gr	370ml (buffer gel D).

2.4.2.Carga de los geles: Se cortó un trozo de aproximadamente 6-7cm en uno de sus extremos de cada gel y se separ  del trozo de gel mayor. Sobre el extremo del gel mayor se procedió a cargar las muestras.

Se descongelaron 36 muestras las que se mantuvieron en hielo para evitar su descomposición. Una vez descongeladas cada muestra se embebi  en un trozo de papel filtro, los cuales fueron depositados en el extremo del gel mayor (origen), procedimiento que se realizó simultáneamente para los 3 geles. Es importante señalar que para distinguir alelos de diferente movilidad, siempre se cargaron grupos de individuos pertenecientes a diferentes poblaciones.

Junto a las muestras se agregó un papelillo embebido en indicador (azul de bromofenol) para verificar el término de la electroforesis. Una vez finalizado el procedimiento de carga se unieron ambos trozo de gel .

2.4.3. Corrida de la Electroforesis: Los geles cargados se taparon con envoltorio plástico (Alusaplast) y se depositaron sobre las cámaras de corrida previamente llenas con sus respectivos buffer de cámara. Detalles de la formulación de los buffer de cámara se pueden ver en los anexos 5,6,7.

Los extremos de cada gel fueron cubiertos con pañales embebidos en buffer, para permitir el flujo de corriente hacia los geles . Posteriormente se fijaron todos los lados de los moldes y junto a las cámaras de corrida se introdujeron en el refrigerador para mantener la temperatura a 4°C.

Para evitar la desnaturalación de las enzimas durante la electroforesis, cada gel se cubrió con una bolsa de agua fría. Es importante señalar que cada cierto tiempo, se tuvo la precaución de cambiar las bolsas de agua fría , para así mantener los geles fríos.

Luego, se procedió a conectar cada cámara a su respectiva fuente de poder, mediante electrodos y se ajustó la intensidad de corriente según el sistema enzimático ensayado (Tabla 4). Posteriormente, se realizó una precorrida de aproximadamente 15-20 minutos para permitir que las enzimas salgan del papel filtro y se introduzcan en el gel. Una vez transcurrido este periodo de tiempo se procedió a retirar los papeles filtros. Finalmente, se corrieron los geles por un periodo de tiempo que dependió del movimiento del indicador sobre el gel, pero en general se consideraron aproximadamente 4 horas 45 minutos para el sistema enzimático A y 4 horas para los sistemas D y H.

Tabla 4. Condiciones de las fuentes de poder durante el transcurso de la electroforesis para cada sistema enzimático ensayado.

Sistema Enzimático	Amperes	Voltaje Aproximado
A	75mA	170V
D	50mA	200V
H	75mA	125V

2.4.4. Tinción de las enzimas: Terminada la electroforesis se desmontaron los geles y se procedió a cortar horizontalmente un número de capas correspondiente al número de sistemas enzimáticos a analizar por gel. Para el sistema de gel A se realizaron 4 cortes (enzimas AAP, AAT, ACP y PGI); 3 cortes para el sistema de gel D (enzimas MNR, MDH y SKDH) y 4 cortes para el sistema de gel H (enzimas PER, FLEST, CAT y LAP).

Es necesario aclarar, que durante todas las electroforesis realizadas, para el gel H se esperaba revelar 4 sistemas enzimáticos pero, finalmente sólo el sistema Peroxidasa se resolvió adecuadamente.

Cada corte se depositó sobre una cubeta de acrílico de 20cm de largo X 15 cm de ancho X 2 cm de alto y 3mm. de espesor, sobre los cuales se aplicaron las soluciones de tinción previamente preparadas según modificaciones a Conkle et al, (1982). Luego se tapó cada cubeta con envoltorio plástico (Europlast) y se incubaron según las recomendaciones especificadas para cada enzima. La formulación de los buffer de tinción y procedimientos de tinción modificados se describen detalladamente en los Anexos 8 al 11.

2.4.5. Interpretación de la información electroforética: Identificar adecuadamente el número de bandas, la intensidad, la herencia codominante y la estructura cuaternaria de las enzimas analizadas es fundamental para interpretar la información electroforética. De tal manera, las características de los patrones de bandeo revelados, unido a la información existente de ellos en la literatura, especialmente de su estructura cuaternarias (monomérica, dimérica y tetramérica), facilitaron la identificación de los fenotipos homocigotos y heterocigotos.

Durante el procedimiento de interpretación, se identificó a la isoenzima y/o aloenzima que migró más rápido anodalmente como la número 1, a la siguiente como la número 2 y así sucesivamente.

2.5. Análisis Estadísticos: Los cálculos y el análisis de los estadígrafos se realizaron mediante los programas BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989), GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1997), Statistica 4.5 y un programa computacional desarrollado por el Dr. Lafayette Eaton.

2.5.1. Equilibrio Hardy-Weinberg: Las desviaciones de las frecuencias genotípicas observadas en relación a las esperadas bajo condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg se midieron a través de la prueba exacta incorporadas en el programa GENEPOP 3.1 de Raymond y Rousset, (1997).

En necesario aclarar que los supuestos en que se basa la ley de Hardy-Weinberg establecen que una población ideal las frecuencias alélicas y genotípicas estarán en equilibrio estable si se cumplen los siguientes requisitos: No hay migración, las

generaciones son discretas, no hay mutación, no hay selección, el tamaño poblacional es infinito y hay panmixia. Obviamente ninguna población natural cumple todas las condiciones señaladas por lo cual esta ley no es realista, no obstante este análisis es un punto de partida para estudiar las desviaciones de las frecuencias genotípicas esperadas y sus probables causas.

2.5.2. Estimación de los Niveles de Variabilidad Genética: Para medir el nivel de variabilidad genética en las 18 poblaciones naturales de Raúlí se utilizaron los siguientes indicadores:

2.5.2.1. Número medio de alelos por locus (A): Se obtiene sumando los alelos por locus observados y se divide por el número de loci analizados.

2.5.2.2 Porcentaje de loci polimórficos (P): Se obtiene sumando los todos los loci polimórficos observados y se divide por el número total de loci analizados. Un locus fue considerado polimórfico cuando presentaba más de una variante alélica independiente de su frecuencia.

2.5.2.3. Heterocigosidad: La heterocigosidad es la medición de variabilidad genética más simple y ampliamente utilizada. Su importancia radica en que cada heterocigoto lleva diferentes alelos, representando la variación existente. Generalmente en los estudios poblacionales se calculan dos mediciones de heterocigosidad: la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e).

2.5.2.3.1. Heterocigosidad media observada (H_o): La heterocigosidad observada para una población se obtiene sumando el número de individuos heterocigotos observados

para cada locus y se divide por el número total de individuos y loci analizados en la población.

2.5.2.3.2. Heterocigosidad media esperada (H_e): Para una población se obtienen sumando el número de heterocigotos esperados para cada locus considerando equilibrio Hardy-Weinberg, y se divide por el número total de individuos y loci analizados en la población.

2.5.3. Distribución de la Variabilidad genética: Para cuantificar y analizar la distribución de la variabilidad genética se utilizaron 2 métodos : Diversidad Génica de Nei (1973) y los Estadísticos F de Wright (1965) según Weir y Cockerham (1984). Se utilizaron ambos métodos debido a 2 razones: a) entregan información complementaria a pesar de que todavía existe controversia sobre cual de los dos métodos es el mejor estimador de la distribución de la variabilidad genética y b) permite hacer comparaciones con estudios en los cuales se utiliza uno u otro método.

2.5.3.1. Diversidad Génica de Nei (1973): Este método permite determinar la distribución de la frecuencias alélicas en poblaciones subdivididas. La Diversidad Génica se puede particionar en 3 componentes : $H_t = H_s + D_{st}$

Donde, H_t es la diversidad genética total , H_s es la diversidad genética intrapoblacional y D_{st} es la diversidad genética interpoblacional. La diferenciación genética interpoblacional es frecuentemente medida como un valor relativo G_{st} :

$$G_{st} = D_{st} / H_t$$

Este método puede ser aplicado para cualquier número de loci si se reemplaza la diversidad génica para un locus por el promedio de la diversidad génica para todos los loci estudiados.

2.5.3.2. Estadígrafo F de Wright (1965) según Weir y Cockerham (1984): La estructura genotípica de una población a menudo es analizada mediante los estadígrafos F, los cuales permiten estimar la distribución de las frecuencias genotípicas y a diferencia del método de diversidad génica de Nei, permite estudiar los efectos de factores evolutivos como la deriva genética, consanguinidad flujo génico y selección en poblaciones subdivididas jerárquicamente. Wright en 1965 derivó la siguiente fórmula para analizar las frecuencias genotípicas de genes neutros:

$$1-F_{it} = (1-F_{is}) (1-F_{st})$$

donde F_{it} , F_{is} y F_{st} representan coeficientes de consanguinidad.

a) F_{it} = Correlación entre dos gametos que se unen para producir un individuo en relación a la población total, es decir, se define como el grado de consanguinidad de un individuo en relación a la población total.

b) F_{is} = Correlación entre dos gametos que se unen al azar en relación a la subpoblación. Mide el grado de consanguinidad de un individuo en relación a su subpoblación, por lo que habitualmente se le denomina Coeficiente de Consanguinidad. Los valores de este estadígrafo dan cuenta de variaciones en la heterocigosidad debido a apareamiento no aleatorio en la subpoblación y a posibles efectos selectivos.

Hay que distinguir dos aspectos en el estadígrafo F_{is} , su signo y su valor. Si el signo es negativo indica excesos de heterocigotos y si es positivo indica déficit de heterocigotos en relación a las proporciones esperadas según equilibrio Hardy-Wienberg, mientras que un valor $F_{is}=0$ indicaría panmixia y $F_{is} =1$ indicaría consanguinidad total.

c) F_{st} = Correlación entre 2 gametos tomados al azar de 2 subpoblaciones en relación a los gametos de la población total. Mide los cambios en la heterocigosidad debido a deriva genética y subdivisión poblacional. Generalmente se le denomina Índice de Fijación y habitualmente se utiliza para estimar la diferenciación interpoblacional y el nivel de flujo génico entre subpoblaciones.

Según Hartl (1987) y Cuguen et al (1988) sus valores siempre son positivos y pueden ser clasificados como:

$F_{st} = 0$ a 0.05 Escasa diferenciación entre poblaciones.

$F_{st} = 0.05-0.15$ Moderada diferenciación

$F_{st} = 0.15 >$ Gran diferenciación.

Para los fines de esta tesis se utilizó el método de Weir y Cockerham (1984) desarrollado para calcular los estadígrafos F de Wrigth. Tal método presenta menos sesgo pues considera el efecto del tamaño de la muestra y el número de poblaciones.

Los detalles de fórmulas y procedimientos empleados por este método se pueden ver en Weir y Cockerham (1984).

2.5.3.3. Significancia de los estadígrafos F: Para probar que los estadígrafos F son significativamente diferente de cero se usó la prueba de Bondad de Ajuste Chi Cuadrado (X^2) para cada locus:

a) Fis y Fit: Se usa el estadístico X^2 de Li y Horvitz (1953).

$$X^2 = F^2 N (k-1) ; \text{ gl} = k(k-1)/2$$

b) Fst= Se usa el estadístico X^2 de Workman y Niswander (1970)

$$X^2 = 2N Fst (k-1) ; \text{ gl} = (k-1) (s-1)$$

Donde N=Tamaño total de la muestra, k=Número de alelos, s= Número de subpoblaciones.

2.5.4. Diferenciación entre poblaciones: Para analizar la diferenciación interpoblacional se utilizaron 4 métodos:

2.5.4.1. Prueba de Bondad de Ajuste (G): La prueba de bondad de ajuste para los 10 loci enzimáticos estudiados en esta tesis, permitió verificar si las frecuencias génicas son significativamente heterogéneas.

2.5.4.2. Distancia Genética de Nei (1972,1978): La medición de Distancia Genética propuesta por Nei (1972,1978) es la más ampliamente utilizadas para determinar relaciones genéticas entre poblaciones. Este método toma en consideración los efectos del polimorfismo en las poblaciones midiendo las diferencias alélicas acumuladas por locus:

$$D = -\ln (G_{xy} / G_x G_y)$$

Donde, $G_x = (2n_x J_x - 1) / (2n_x - 1)$ es la identidad no sesgada promedio para todos los loci en la población X. $G_y = (2n_y J_y - 1) / (2n_y - 1)$ es la identidad no sesgada promedio sobre todos los loci en la población Y y $G_{xy} = J_{xy}$.

Por otro lado, $J_x = x_i^2$, $J_y = y_i^2$, $J_{xy} = x_i y_i$ son las probabilidades de identidad de 2 genes tomados aleatoriamente, donde x_i e y_i son las frecuencias alélicas del i^{avo} alelo en las poblaciones X e Y.

2.5.4.3. Estadígrafo F_{st} de Wright modificado por Weir y Cockerham (1984)

Como se indica en el punto 2.5.3.2. F_{st} permite estimar el grado de diferenciación genotípica interpoblacional, por lo tanto es un importante parámetro que mide la relación existente entre poblaciones.

2.5.4.4. Estadígrafo G_{st} de Nei (1973, 1977): Como se señala en el punto 2.5.3.1. G_{st} mide el nivel relativo de diferenciación alélica entre poblaciones.

2.5.5. Relaciones entre poblaciones: Para estudiar las relaciones entre poblaciones se utilizaron 2 métodos : Análisis Jerárquico de Cluster y Análisis de Cluster No Jerárquico.

2.5.5.1. Análisis de Cluster Jerárquico: El análisis de cluster jerárquico se realizó mediante el programa computacional BIOSYS 1.7 (Swofford y Selander, 1989). Este método utiliza el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) el cual a través de el promedio aritmético de las distancias genéticas no sesgadas (Nei, 1978) va formando sucesivos grupos hasta originar un dendrograma.

2.5.5.2. Análisis de Cluster No Jerárquico: Los dendrogramas UPGMA son un método jerárquico que no permite visualizar asociaciones entre poblaciones pertenecientes diferentes grupos, poblaciones híbridas. Por tal motivo, para identificar relaciones intermedias se realizó un análisis no jerárquico utilizando las distancia genéticas de Nei (1978) obtenidas del programa computacional Biosys-1.

El método en cuestión, compara sucesivamente la distancia genética de un par de poblaciones con las demás, permitiendo apreciar grupos poblacionales intermedios que con el dendrograma no son detectados. Los análisis de cluster no jerárquico fueron realizados mediante un programa computacional creado por el Dr. Lafayette Eaton a partir de las ideas de Sokal y Rolf (1973). Para mayor información ver Lamborot y Eaton (1992).

2.5.6. Niveles de Flujo Génico: Los análisis teóricos de flujo génico se basan en la estructura espacial de las poblaciones naturales, existiendo varios modelos para

estudiarlos, entre los cuales se encuentran los modelos de Islas de Wright, Continuo o Aislamiento por Distancia y Discontinuo o Paso en Paso. Tales modelos consideran además, varios métodos indirectos para estimar el flujo génico entre poblaciones, tales como: Alelos Privativos (Slatkin, 1985), Fst de Wright (1965), Fst según por Weir y Cockerham (1984), Gst de Nei (1973,1977), Máxima Verosimilitud (Barton et al, 1983 ; Wehrhahn y Powell, 1987 citados por Slatkin y Barton, 1989).

Para este estudio se utilizaron los métodos Fst según por Weir y Cockerham (1984) y Gst de Nei (1973,1977), debido a que Slatkin y Barton (1989) demostraron que proporcionan una razonable estimación del número de migrantes por generación (Nm) bajo una amplia variedad de estructuras poblacionales comparado con otras metodologías: $Nm_{Fst} = (1 / Fst - 1) / 4$ ó $Nm_{Gst} = (1 / Gst - 1) / 4$

Donde N es el tamaño poblacional, m la tasa de migración, Fst es el índice de fijación y Gst es el índice de diferenciación poblacional de Nei.

2.5.7. Relaciones entre parámetros genéticos y ubicación geográfica: Para verificar la existencia de patrones geográficos para los parámetros genéticos estudiados (número de alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada, frecuencias alélicas y distancias genéticas) se realizaron una serie de correlaciones no paramétricas de Spearman mediante el programa computacional Statistica 4.5.

3.RESULTADOS

3.1. Identificación y Caracterización de las Variantes Enzimáticas

Se estudiaron 8 sistemas enzimáticos en 18 poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst)), revelándose 16 presuntos loci. Todos ellos se consideraron como presuntos loci ya que, no se verificó su herencia.

En la Tabla 5 se detallan el número de isoenzimas, el número total de alelos identificados por locus, los alelos más frecuentes, fenotipos más frecuentes y la estructura cuaternaria para los 10 loci enzimáticos analizados en este estudio. En ella se puede apreciar que la identificación de 6 loci (AAT₁, ACP₁, MDH₁, MNR₂, PGI₁, PER₁) no fue suficientemente clara y muchas veces su resolución fue errática. Solamente 10 loci mostraron patrones de bandeo claros y confiables (AAP, AAT₂, ACP₂, MDH₂, MNR₁, PGI₂, PER₂, PER₃, PER₄, SKDH₁), identificándose un total de 43 alelos. Por tal motivo solamente estos últimos fueron utilizados en los posteriores análisis.

Los 10 loci anteriormente señalados mostraron un número total de alelos por locus que fluctuó entre 4 y 6. Los loci enzimáticos AAP, ACP₂, SKDH₁, ATT₂, PGI₂, PER₂, PER₃, PER₄ revelaron 4 alelos mientras que los loci MDH₂ y MNR₁ revelaron 5 y 6 alelos respectivamente.

La intensidad y característica de los patrones de bandeo obtenidos para los 10 loci enzimáticos, facilitaron la identificación indirecta de su estructura cuaternaria (Tabla 5), es así como se pudo apreciar 8 enzimas monoméricas (AAP, AAT, ACP, MDH, PER y SKDH), 1 enzima dimérica (PGI) y 1 enzima tetramérica (MNR). Además se facilitó el estudio de la herencia de tales marcadores genéticos, sugiriéndose que todas las variantes alélicas se heredarían en forma mendeliana-codominante. Mayores detalles sobre los patrones de bandeo para cada loci y las características de las enzimas estudiadas se pueden ver en las figuras 3-a la 10.

Tabla 5. Caracterización de los 10 loci enzimáticos estudiados en 18 poblaciones naturales de Rulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst)).

ENZIMAS	Número Isoenzimas	Número Total Alelos	Alelo Frecuente	Fenotipos Frecuentes	Estructura Cuaternaria
AAP:Alanina Aminopeptidasa	1	AAP= 4	AAP-2	AAP-1/ AAP-2 AAP-2/ AAP-3	Monomérica
AAT:Aspartato Aminotransferasa	2?	AAT ₁ =? AAT ₂ =4	AAT ₂ -3	AAT ₂ -2/ AAT ₂ -3	Monomérica
ACP:Fosfatasa Acida	2?	ACP ₁ =? ACP ₂ =4	ACP ₂ -3	ACP ₂ -1/ ACP ₂ -2	Monomérica
MDH:Deshidrogenasa málica	2?	MDH ₁ =? MDH ₂ =5	MDH ₂ -3	MDH ₂ -2/ MDH ₂ -3	Monomérica
MNR:Menadione Reductasa	2?	MNR ₁ =6 MNR ₂ =?	MNR ₁ -2	MNR ₁ -2/MNR ₁ -4	Tetramérica
PGI:Fosfogluco Isomerasa	2?	PGI ₁ =? PGI ₂ =4	PGI ₂ -3	PGI ₂ -1/PGI ₂ -3	Dimérica
PER:Peroxidasa	4?	PER ₁ =? PER ₂ =4 PER ₃ =4 PER ₄ =4	? PER ₂ -2 PER ₃ -2 PER ₄ -2	? PER ₂ -2/PER ₂ -3 PER ₃ -2/PER ₃ -3 PER ₄ -2/PER ₄ -3	Monomérica
SKDH:Shikimato deshidrogenasa	1	SKDH=4	SKDH-2	SKDH-2/SKDH-3	Monomérica

3.2. Análisis de las Variantes Alélicas

Para las 18 poblaciones de Raulí estudiadas se logró identificar un total de 43 alelos, los cuales fueron clasificados en raros, privativos, frecuencia intermedia y frecuentes de acuerdo a los criterios de Zanetto y Kremer, (1995) y Schnabel y Hamrick, (1990). Así se consideró a un alelo como frecuente cuando sus frecuencias se encontraban entre 0.20-0.99; alelo de frecuencia intermedia cuando sus frecuencias se encontraban entre 0.11-0.20; alelo raro cuando su frecuencia fue inferior al 10%; alelo privativo cuando estaba presente en una o unas pocas poblaciones independiente de su frecuencia. Es importante señalar que para las poblaciones de Raulí estudiadas, los alelos privativos se presentaron en frecuencias inferiores al 10%.

En la Tabla 6 se resumen esta clasificación para los 10 loci enzimáticos analizados, mientras que mayores detalles sobre número de alelos por locus observados y sus frecuencias alélicas se muestran en el Anexo 12.

En base a las anteriores definiciones se pudo verificar la presencia de 1 a 2 alelos más frecuentes (27.9% del total de alelos identificados) dependiendo del locus analizado. De los 10 loci estudiados, 8 mostraron 1 alelo más frecuente, mientras que los loci MNR₁ y MDH₂ presentaron 2 alelos frecuentes cada uno, esto obviamente obedecería al mayor número de alelos revelados por dichos loci (Tabla 5).

Solo el locus AAP mostró alelos con frecuencias intermedias para 13 de las 18 poblaciones analizadas correspondiendo a un 2.3% del total de alelos observados. Como se puede apreciar en la Tabla 6, existió una predominante cantidad de alelos en baja

frecuencia (<10%), correspondiendo al 69.8% de los alelos revelados, los cuales a su vez se subdividieron en 60,5% de alelos raros y 9,3% de alelos privativos. Es importante señalar que los alelos privativos también fueron considerados raros.

Tabla 6. Número de Alelos raros (frecuencia menor a 10%), Alelos privativos, Alelos en frecuencia intermedia y Alelos frecuentes revelados para 10 loci enzimático en 18 poblaciones de Rauli (*Nothofagus alpina* (Poep. et Endl (Oerst))

Locus	Baja frecuencia (Raro)	Privativo	Frecuencia intermedia	Alelos frecuentes
MNR ₁	2	2	0	2
MDH ₂	2	1	0	2
PER ₂	3	0	0	1
PER ₃	3	0	0	1
PER ₄	3	0	0	1
AAP	2	0	1	1
AAT ₂	3	0	0	1
SKDH	3	0	0	1
ACP ₂	2	1	0	1
PGI ₂	3	0	0	1
Total	26	4	1	12

De estos últimos se identificaron 4 alelos privativos en 6 poblaciones, el alelo MNR₁ -5 se encontró en Radal-7 Tasas, Malleco A, Selva Oscura., el alelo MNR₁ -6 se observó sólo en la población de Las Trancas y finalmente los alelos MDH₁ -5 y ACP₂ -4 estuvieron presente en Curacautín y Radal respectivamente.

3.3.Desviaciones de la distribución Hardy-Weinberg

Los resultados de la prueba exacta Hardy-Weinberg se resume en la Tabla 7. Los valores fueron obtenidos a partir del programa Genepop 3.1 de Raymond y Rousset (1995). Es importante señalar que la prueba de X^2 y Fis permite detectar desviaciones en

las frecuencias genotípicas observadas en relación a las frecuencias esperadas bajo los supuestos de equilibrio Hardy-Weinberg. Además Fis permite determinar la orientación de tales desviaciones, es así como valores positivos o negativos indicarían que ellos se encausan hacia una deficiencia o exceso de heterocigotos respectivamente.

Tabla 7. Prueba exacta de Hardy-Weinberg para 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst)).

Locus	Chi Cuadrado	Grados de Libertad	Probabilidad	Fis
MNR ₁	209.5	36	<0.00001 **	0.1766 **
MDH ₂	244.3	36	<0.0001 **	0.2740 **
PER ₂	157.9	32	<0.0001 **	0.3161 **
PER ₃	24.7	26	0.54 ns	0.1089 **
PER ₄	15.3	26	0.95 ns	0.0244 ns
AAP	85.5	36	<0.0001 **	0.1399 **
AAT ₂	100.5	36	<0.0001 **	0.1975 **
SKDH	46.2	32	0.049 *	0.1341 **
ACP ₂	62.7	24	<0.0001 **	0.2006 **
PGI ₂	51.1	36	0.049 *	0.0996 **
Todos loci y poblaciones	997.8	228	<0.0001 **	0.1856**

ns = no significativo; * = significativo (P<0.05); ** = altamente significativo (P<0.01)

Los resultados permitieron verificar que, al analizar en conjunto todos los loci y poblaciones, se observaron importantes desviaciones de lo esperado según Hardy-Weinberg en dirección hacia deficiencia de heterocigotos. Esto se reflejó, en valores de X^2 altamente significativo (P<0.0001) y un valor promedio de Fis positivo y significativamente diferente de cero (Fis=0.1856, P<0.01).

Sin embargo, al analizar detalladamente la Tabla 7 se puede ver que individualmente los loci presentaron variaciones en el grado de significancia para los valores de X^2 . Es así, como para 6 loci (MNR₁, MDH₂, PER₂, AAP, AAT₂, ACP₂) las diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas fueron altamente significativas ($P < 0.0001$), y para los loci SKDH y PGI-2 las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$).

Por otro lado, los loci PER₃ ($P > 0.05$) y PER₄ ($P > 0.05$) estadísticamente no mostraron diferencias significativas, pero se apreciaron discrepancias en sus valores Fis. Al analizar los valores Fis para ambos loci se pudo constatar que para el locus PER₄ (Tabla 7), Fis no difirió significativamente de cero (Fis=0.0244; $P > 0.01$), indicando que para este locus no existiría deficiencias de heterocigotos.

La situación del locus PER₃ fue distinta pues, el valor Fis fue significativamente diferente de cero (Fis=0.1089; $P < 0.01$) sugiriendo que existen desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg orientadas hacia la deficiencias de heterocigotos. Estas discrepancias se deberían a que los métodos que calculan Fis y su significancia serían más poderosos que el método de Chi cuadrado habitualmente utilizado para determinar desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg.

3.4. Niveles de Variabilidad Genética Aloenzimática

En la Tabla 8 se detallan los parámetros de variabilidad genética medidos: número de alelos/ locus, porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad observada y

esperada. Se puede apreciar que el Raulí presenta elevados niveles de variabilidad genética aloenzimática con un promedio 3.04 alelos por locus (A), 92.8% de alelos polimórficos (P), 22.9% de heterocigosidad observada (H_o) y 28.2% de heterocigosidad esperada (H_e). De la misma tabla se desprende que, las poblaciones de los extremos de la distribución geográfica de la especie, Curicó por la Cordillera de los Andes y El Colegual por la Cordillera de la Costa, fueron las que presentaron los valores mas bajos de polimorfismo (80%), heterocigosidad observada ($H_o=18.8\%$ y 14.4% respectivamente) y heterocigosidad esperada ($H_e=23.0\%$ - 22.2% respectivamente). Además, El Colegual fue la población que mostró el menor número de alelos por locus calculados para la especie ($A=2.5$).

La población de Nahuelbuta también presentó niveles bajos de variabilidad genética ($A=2.6$; $P=90\%$; $H_o=20.0\%$; $H_e=23.5\%$) pero estos resultado deber tomarse con precaución debido al bajo número de individuos analizados (20 individuos).

Como se puede apreciar en la Tabla 8 y Figura 1, las 4 poblaciones que representan la zona central de la distribución geográfica del Raulí por la Cordillera de los Andes (San Fabian B, San Fabian A, Recinto y Monte León), mostraron niveles intermedios de variabilidad genética. Las restantes 11 poblaciones mostraron valores superiores al promedio de la especie, para todos los parámetros medidos fluctuando entre $A=3.1$ - 3.5 , $P=100\%$, $H_o=20.3\%$ - 30.6% , y $H_e=27.5\%$ - 34.6% .

Para verificar si los parámetros que miden los niveles de variabilidad genética se relacionaban con el tamaño de la muestra, se realizó un análisis de correlación no paramétrico de Spearman. Los resultados indicaron que no existiría una correlación

aparente entre el número de individuos analizados por población con el número de alelos por locus, polimorfismo y heterocigosidad ($P > 0.05$).

Tabla 8. Niveles de Variabilidad Genética Aloenzimática en 18 Poblaciones Naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poep. et Endl (Oerst)).

Población	Ubicación	N	A	P (%)	Ho	He
1Curicó	Cordillera Andes	37.9	2.9	80.0	0.188 (0.044)	0.230 (0.060)
2Agua Fria	Cordillera Andes	38.1	3.2	100.0	0.244 (0.048)	0.335 (0.064)
3Radal-7Tasas	Cordillera Andes	37.2	3.4	100.0	0.291 (0.058)	0.317 (0.063)
4Nahuelbuta	Cordillera Costa	20.0	2.6	90.0	0.200 (0.073)	0.235 (0.060)
5Chacay-Nahuel	Cordillera Costa	37.4	3.1	100.0	0.254 (0.057)	0.292 (0.068)
6Vega Blanca	Cordillera Costa	42.7	3.5	100.0	0.306 (0.045)	0.346 (0.048)
7Sn.Fabian A	Cordillera Andes	32.4	2.8	80.0	0.199 (0.061)	0.275 (0.087)
8Sn.Fabian B	Cordillera Andes	37.0	2.9	90.0	0.244 (0.073)	0.269 (0.077)
9Recinto	Cordillera Andes	40.7	2.9	90.0	0.238 (0.059)	0.282 (0.075)
10Monte León	Cordillera Andes	37.4	2.6	80.0	0.193 (0.059)	0.256 (0.081)
11Malleco A	Cordillera Andes	38.4	3.0	90.0	0.213 (0.061)	0.250 (0.071)
12Malleco B	Cordillera Andes	45.4	3.2	100.0	0.237 (0.048)	0.282 (0.065)
13Selva Oscura	Cordillera Andes	31.5	3.1	100.0	0.235 (0.045)	0.284 (0.049)
14Curacautín	Cordillera Andes	39.5	3.4	100.0	0.203 (0.055)	0.287 (0.064)
15Malalcahuello	Cordillera Andes	38.9	3.5	100.0	0.258 (0.041)	0.337 (0.056)
16Melipeuco	Cordillera Andes	43.2	3.1	90.0	0.246 (0.056)	0.307 (0.064)
17Las Trancas	Cordillera Costa	38.2	3.1	100.0	0.234 (0.058)	0.275 (0.046)
18El Colegual	Cordillera Costa	39.7	2.5	80.0	0.144 (0.047)	0.222 (0.053)
Promedio		35.5	3.04	92.8	0.229 (0.055)	0.282 (0.064)

(Entre paréntesis Error Estándar); N=Tamaño medio de la muestra por locus; A=Número medio de alelos/locus; P=Porcentaje de loci polimórficos (Se consideró a un locus polimórfico cuando más de un alelo fue detectado); Ho=Heterocigosidad media observada; He=Heterocigosidad media esperada (Estimación insesgada de Nei, 1978).

3.5. Distribución de la Variabilidad Genética Aloenzimática

La distribución de la variabilidad genética aloenzimática en Raulí fue medida a través de 2 métodos: Diversidad génica de Nei (1973) y Estadígrafos F de Wright según Weir y Cockerham (1984). La Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos para ambos estadígrafos.

Tabla 9. Diversidad génica y genotípica para 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poep. et Endl (Oerst)) (Según los métodos de Nei (1973) y Weir y Cockerham (1984) respectivamente).

Locus	Fis	Fst (%)	Fit	1-Fst (%)	Ht	Hs (%)	Dst	Gst (%)
MNR ₁	0.1766**	4,77**	0.2159**	95.2	0.566	94.2	0.033	5.8
MDH ₂	0.2740**	4,60**	0.3075**	95.4	0.557	93.9	0.033	6.1
PER ₂	0.3161**	10,89**	0.3905**	89.11	0.287	88.9	0.032	11.1
PER ₃	0.1089**	2,73**	0.1332**	97.3	0.094	96.8	0.004	3.2
PER ₄	0.0244ns	4,60**	0.0692ns	93.1	0.142	93.7	0.008	6.3
AAP	0.1399**	6,83**	0.1986**	93.2	0.466	91.6	0.039	8.4
AAT ₂	0.1975**	2,37**	0.2165**	97.6	0.293	95.2	0.014	4.8
SKDH	0.1341**	4,61**	0.1741**	95.4	0.233	93.9	0.015	6.0
ACP ₂	0.2006**	3,73**	0.2304**	96.3	0.110	95.5	0.005	4.5
PGI ₂	0.0996**	1,45ns	0.1127**	98.6	0.222	97.3	0.005	2.7
Promedio	0.1856**	5,11**	0.2272**	94.9	0.297	93.6	0.019	6.4

ns = no significativo ($P < 0.05$), ** = Altamente significativo ($P < 0.01$). Detalles de los cálculos para los niveles de significancia de Fit, Fis y Fst se detallan en el anexo 13.

Ambos métodos son coincidentes en reportar que, en promedio el componente intrapoblacional (Hs y 1-Fst) fue superior al 90% y mayor que el componente inter poblacional (Gst y Fst) para los 10 loci enzimáticos analizados. Con el método de diversidad génica de Nei se obtuvo que el 93.6% de la variabilidad alélica se encuentra a nivel intrapoblacional (Hs), similar proporción fue determinada a través de los

estadígrafos F , indicando que el 94.9% ($1-F_{st}$) de la diversidad genotípica se encuentra distribuida dentro de las poblaciones. En la misma tabla se puede observar que sólo el locus PER_2 mostró valores de diversidad genética intrapoblacional menores al 90% para ambos métodos.

3.6. Deficiencia de Heterocigotos

Básicamente 2 líneas de evidencias permitieron verificar la presencia de una importante deficiencia de heterocigotos a nivel intrapoblacional. En primer lugar, en la Tabla 8 se puede observar que para todas las poblaciones analizadas la heterocigosidad observada fue menor que heterocigosidad esperada ($H_o=0.229$ y $H_e=0.282$).

En segundo lugar, los valores de F_{is} y F_{it} también mostraron un déficit generalizado de heterocigotos. En la Tabla 9 se presenta un resumen de los estadígrafos F , en ella se puede apreciar que el promedio para todos los loci el valor de F_{is} y F_{it} fueron, positivos y significativamente diferente de cero ($F_{is}=0.1856$; $P<0.01$; $F_{it}=-0.02272$; $P<0.01$) situación que permitió evidenciar el importante nivel de consanguinidad presentes en las poblaciones de Raúlí. Al analizar en detalle la Tabla 9, se puede apreciar que para 9 loci (MNR_1 , MDH_2 , PER_2 , PER_3 , AAP , AAT_2 , $SKDH$, ACP_2 y PGI_2) las probabilidades calculadas fueron mucho más bajas que el valor crítico ($P<0.01$) indicando que los valores de F_{is} son diferente de cero en forma altamente significativa, solamente el locus PER_4 mostró un valor de F_{is} estadísticamente no significativo ($F_{is}=-$

0.0244; $X^2 = 1.31$, $gl=6$; $P=0.97 > 0.05$). Los valores de Chi cuadrado, grados de libertad y probabilidad para Fis y Fit por locus se detallan en el anexo 13.

3.7. Diferenciación Interpoblacional

Los niveles de diferenciación interpoblacional se analizaron a través de 4 métodos: Prueba de Bondad de ajuste (G), Diferenciación Alélica (Gst de Nei), Diferenciación Genotípica (Fst de Wright según Weir y Cockerham, 1984) y Distancia Genética (Nei 1973, 1978). En la Tabla 10 se muestran los resultados de la prueba de bondad de ajuste para las frecuencias alélicas de 10 loci enzimáticos estudiados.

Tabla 10. Prueba de Bondad de Ajuste (G) para las frecuencias alélicas de 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones de Rauli (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst))).

Locus	Numero Alelos	Probabilidad	Error Estándar
MNR ₁	6	0.0017**	0.0017
MDH ₂	5	0.0007**	0.0007
PER ₂	4	<0.0001**	0.0000
PER ₃	4	<0.0001**	0.0000
PER ₄	4	<0.0001**	0.0000
AAP ₁	4	<0.0001**	0.0000
AAT ₂	4	<0.0001**	0.0000
SKDH ₁	4	<0.0001**	0.0000
ACP ₂	4	0.0006**	0.0006
PGI ₂	4	<0.0001**	0.0000
Total		<0.0001**	

** = altamente significativo ($P < 0.01$); $gl = 20$

Como se puede apreciar, los valores de G fueron altamente significativos ($P < 0.01$) para todos los loci analizados indicando que existe una importante

heterogeneidad en las frecuencias alélicas. Sin embargo, los estadígrafos de Nei y Wright revelaron niveles moderados de diferenciación interpoblacional (Tabla 9).

El estadígrafo G_{st} de Nei, indicó que un 6,4% de la diversidad alélica se distribuiría entre las 18 poblaciones estudiadas. Similares resultados fueron obtenidos con el estadígrafo F_{st} de Wright, donde el valor F_{st} multilocus indicó que un 5,11% ($P < 0.01$) de la variabilidad genotípica se distribuiría entre las poblaciones de Raulí.

Teóricamente se sostiene que valores de $F_{st} = 0$ indicarían que no existe diferenciación entre poblaciones, mientras que $F_{st} = 1,0$ indicarían diferenciación total. Al respecto, la prueba de significancia de Workman y Neiswander (1970), reveló que los valores de F_{st} para 9 loci (MNR_1 , MDH_2 , PER_2 , PER_3 , PER_4 , AAP , AAT_2 , $SKDH$ y ACP_2) fueron estadísticamente diferente de cero ($P < 0.01$), con lo cual ellos estarían reflejando el grado de diferenciación interpoblacional observada.

Como se desprende de la Tabla 9, en general los valores de F_{st} para los 10 loci estudiados fluctuaron entre 1.45% y 10.89%, mientras que con el método de Nei (1973) los resultados fueron levemente superiores, variando entre $G_{st} = 2.3\%$ a $G_{st} = 11.1\%$. Sin embargo, en términos generales ambos métodos fueron consistentes en sus resultados, pues los loci PER_2 ($G_{st} = 11.1\%$; $F_{st} = 10.89\%$; $P < 0.01$) y AAP ($G_{st} = 8.4\%$; $F_{st} = 6.83\%$, $P < 0.01$) presentaron los valores más altos y el locus PGI_2 mostró los valores más bajos ($F_{st} = 1.45\%$ y $G_{st} = 2.3\%$), incluso para éste último su valor de F_{st} no fue significativamente diferente de cero ($P > 0.01$).

Otro método utilizado para verificar el grados de diferenciación interpoblacional fue la distancia genética no sesgada de Nei (Nei, 1978). Los resultados permitieron

apreciar que la distancia genética promedio fue de 0.0215, fluctuando entre 0.001 (Curicó-Nahuelbuta) y 0.076 (Agua Fría- Las Trancas), lo que indicaría que las poblaciones de Raulí son similares entre sí, a excepción de las poblaciones de las Trancas y El Colegual. Al respecto, la teoría sostiene que valores de distancia genética cercanos a cero se observarían cuando las poblaciones presentan alelos y frecuencias alélicas comunes no obstante, la existencia de una significativa heterogenidad de las frecuencias alélicas y la presencia de una moderada diferenciación interpoblacional permiten sugerir que las poblaciones de Raulí presentarían muchos alelos comunes pero con importantes variaciones en sus frecuencias.

3.7.1. Relaciones entre poblaciones

Las relaciones entre poblaciones se estudiaron a través de 2 métodos: Análisis de Cluster Jerárquico de Sneath y Sokal (1973) y Análisis de Cluster No Jerárquico (Sokal y Rohlf, 1973, Lamborot y Eaton, 1992).

El Análisis de Cluster Jerárquico reflejado en el dendrograma UPGMA de la Figura 2, reveló la existencia de 3 grupos diferenciados y dos poblaciones diferentes de todas las demás. El primer grupo se formó con las poblaciones del extremo norte de la distribución del Raulí, ubicadas en la Cordillera de la Costa (Nahuelbuta, Chacay-Nahuel y Vega Blanca) y en la Cordillera de los Andes (Curicó, Radal y Agua Fría).

Un segundo grupo incluyó 7 poblaciones del sector de la Cordillera de los Andes la (San Fabian A, San Fabian B, Recinto, Malleco A, Malleco B, Curacautín, Monte León), mientras que el tercer grupo se formó con 3 poblaciones (Selva Oscura,

Malalcahuello y Melipeuco) ubicadas a lo largo del mismo cordón montañosos pero, más al sur que las poblaciones del segundo grupo. Las poblaciones de Las Trancas y El Colegual, que representan el extremo sur de la distribución natural del Raulí por la Cordillera de la Costa, mostraron ser diferentes entre ellas y de todas las demás.

En el dendrograma (Figura 2) se puede observar además, que la distancia genética promedio entre los grupos 1, 2 y 3 fue 0.025 y entre los grupos 2 y 3 fue de 0.023. Por otro lado, los grupos 1,2,3 y la población de Las Trancas tuvieron una distancia promedio de 0.031, mientras que para todas las poblaciones con respecto a El Colegual fue de 0.035.

Si bien, los dendrogramas UPGMA son un método jerárquico ampliamente utilizado en estudios poblacionales presenta algunas limitaciones, una de ellas es que no permite detectar poblaciones intermedias. Para detectar tales asociaciones y descartar que los 3 grupos y las 2 poblaciones visualizados en el dendrograma sean sólo el efecto de la metodología aplicada, las poblaciones se sometieron análisis de cluster no jerárquico (Sokal y Rolf, 1973, Lamborot y Eaton, 1992). Los resultados no mostraron asociaciones intermedias entre poblaciones, evidenciando que las relaciones observadas en el dendrograma no son solo producto del método empleado si no que, podrían ser el efecto de otros procesos, cuyas implicancias serán analizadas posteriormente.

3.7.2. Correlaciones entre parámetros genéticos y geográficos

Se realizaron correlaciones no paramétricas de Spearman entre la latitud, longitud, altitud y cada uno de los parámetro genéticos medidos (número de alelos por

locus, polimorfismo, heterocigosidad observada y esperada, frecuencias alélicas, flujo génico y distancias genéticas).

La latitud, longitud y altitud no se correlacionaron con ninguno de los parámetro que miden los niveles de variabilidad genética (número de alelos por locus, polimorfismo, heterocigosidad observada y esperada). Sin embargo, al correlacionar las frecuencias alélicas con los parámetros geográficos, 9 alelos de los 43 analizados mostraron una correlación significativa. En la Tabla 11 se muestran los resultados de los análisis de correlación y sus significancia para los 9 alelos, distinguiéndose que los alelos AAP-1, AAP-2 y PER₃-2 se correlacionaron significativamente con la altitud, pero los alelos AAP-1 y AAP-2 presentaron una relación opuesta entre ellos.

Tabla 11. Correlaciones significativas entre parámetros geográficos (latitud, longitud, altitud) y las frecuencias alélicas de 9 aloenzimas en 18 poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst.)).

Variabes	Número Poblaciones	R (Spearman)	Probabilidad
Altitud-AAP -1	18	0.633	0.005**
Altitud-AAP-2	18	-0.605	0.008**
Altitud-PER ₃ -2	18	0.556	0.017*
Latitud-MDH ₂ -2	18	-0.744	0.000**
Latitud-MDH ₂ -3	18	0.684	0.002**
Latitud-MNR ₁ -1	18	-0.575	0.013*
Latitud-MNR ₁ -3	18	-0.479	0.044*
Latitud-PER ₂ -3	18	-0.486	0.041*
Longitud-MDH ₂ -2	18	-0.585	0.011*
Longitud-PER ₂ -3	18	-0.499	0.039*
Longitud-AAP-3	18	0.559	0.016*

** Altamente significativo ($P < 0.01$); * Significativo ($P < 0.05$)

Por otro lado, los alelos MDH₂-2, PER₂ -3, AAP₁ -3 se correlacionaron significativamente con la longitud, siendo ésta negativa para los alelos MDH₂ -2 y PER₂

-3 y positiva para el alelo AAP-3. Finalmente 5 alelos se correlacionaron significativamente con la latitud, la cual fue negativa para los alelos MNR₁ -1, MNR₁ -3, MDH₂ -2 y PER₂ -3 y positiva para el alelo MDH₂-3.

Es importante señalar que las correlaciones opuestas entre los alelos AAP-1 /AAP-2, MDH₂ -2 / MDH₂ -3 con sus respectivos parámetros geográficos son obvias ya que, la suma de las frecuencias alélicas siempre debe ser 1.0 por lo cual, si la frecuencia de un de los alelos sube la del otro bajará. Sin embargo, para el locus MNR estos no se apreció puesto que, 2 de sus alelos presentaron las mismas tendencias:

Finalmente se realizó una correlación entre las distancias genéticas y geográficas. Los resultados fueron positivos y altamente significativos ($P < 0.0001$), indicando que las poblaciones genéticamente más distantes son aquellas que se encuentran geográficamente más separadas.

3.8. Niveles de Flujo Génico

En la Tabla 12 se resumen los valores de flujo génico calculados a partir de los estadígrafos F_{st} y G_{st} en base al modelo Islas (Wright, 1965). Los promedio de ambos métodos dieron valores similares ($Nm_{F_{st}} = 4.64$ y $Nm_{G_{st}} = 3.66$), indicando niveles moderados de intercambio genético entre poblaciones, sin embargo, existió una mayor fluctuación en los valores de $Nm_{F_{st}}$ por locus obtenidos a partir de F_{st} , comparados con los estimados mediante G_{st} .

Es así como los loci AAT₂ ($Nm_{Fst} = 10.30$) y PGI₂ ($Nm_{Fst} = 17.24$) presentaron los niveles más altos de flujo génico, mientras que los locus PER₂ y AAP mostraron los valores más bajos ($Nm_{Fst} = 2.05$ y $Nm_{Fst} = 3.4$ respectivamente). Por el contrario, los valores de G_{st} fueron más estables variando entre $Nm_{Gst} = 2.0$ a 5.7, sin considerar al locus PGI₂ cuyo valor fue mayor ($Nm_{Gst} = 10.61$).

Tabla 12. Niveles de flujo génico ($Nm = (1/Fst \text{ ó } Gst - 1)/4$) para 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poep. et Endl (Oerst.)).

Locus	Fst ¹	Nm ²	Gst ³	Nm ⁴
MNR ₁	0.0477**	4.99	0.058	4.06
MDH ₂	0.0460**	5.18	0.059	3.99
PER ₂	0.1089**	2.05	0.111	2.00
PER ₃	0.0273**	8.90	0.042	5.70
PER ₄	0.0460**	5.18	0.056	4.21
AAP	0.0683**	3.40	0.084	2.73
AAT ₂	0.0237**	10.30	0.048	4.96
SKDH	0.0461**	5.17	0.064	3.66
ACP ₂	0.0373**	6.45	0.045	5.30
PGI ₂	0.0145ns	17.24	0.023	10.61
Promedio	0.0511**	4.64	0.064	3.66

** = altamente significativo ($P < 0.01$); n.s. = No significativo.

1= Diferenciación genotípica de Wright (Weir y Cockerham, 1984)

2= Número de migrantes por generación a partir de Fst.

3= Diferenciación génica de Nei (Nei, 1973, 1977)

4= Número de migrantes por generación a partir de Gst.

A pesar de que las estimaciones de Nm_{Fst} por locus presentan mayores fluctuaciones, ésta se ajustarían mejor a la realidad pues, el método de Weir y Cockerham (Fst) incorpora en sus cálculos el tamaño poblacional y el número de poblaciones haciéndolo más exacto que G_{st}. Por tal motivo, la discusión de los niveles de intercambio genético entre poblaciones se restringirá solamente a los resultados obtenidos mediante Fst (Weir y Cockerham, 1984).

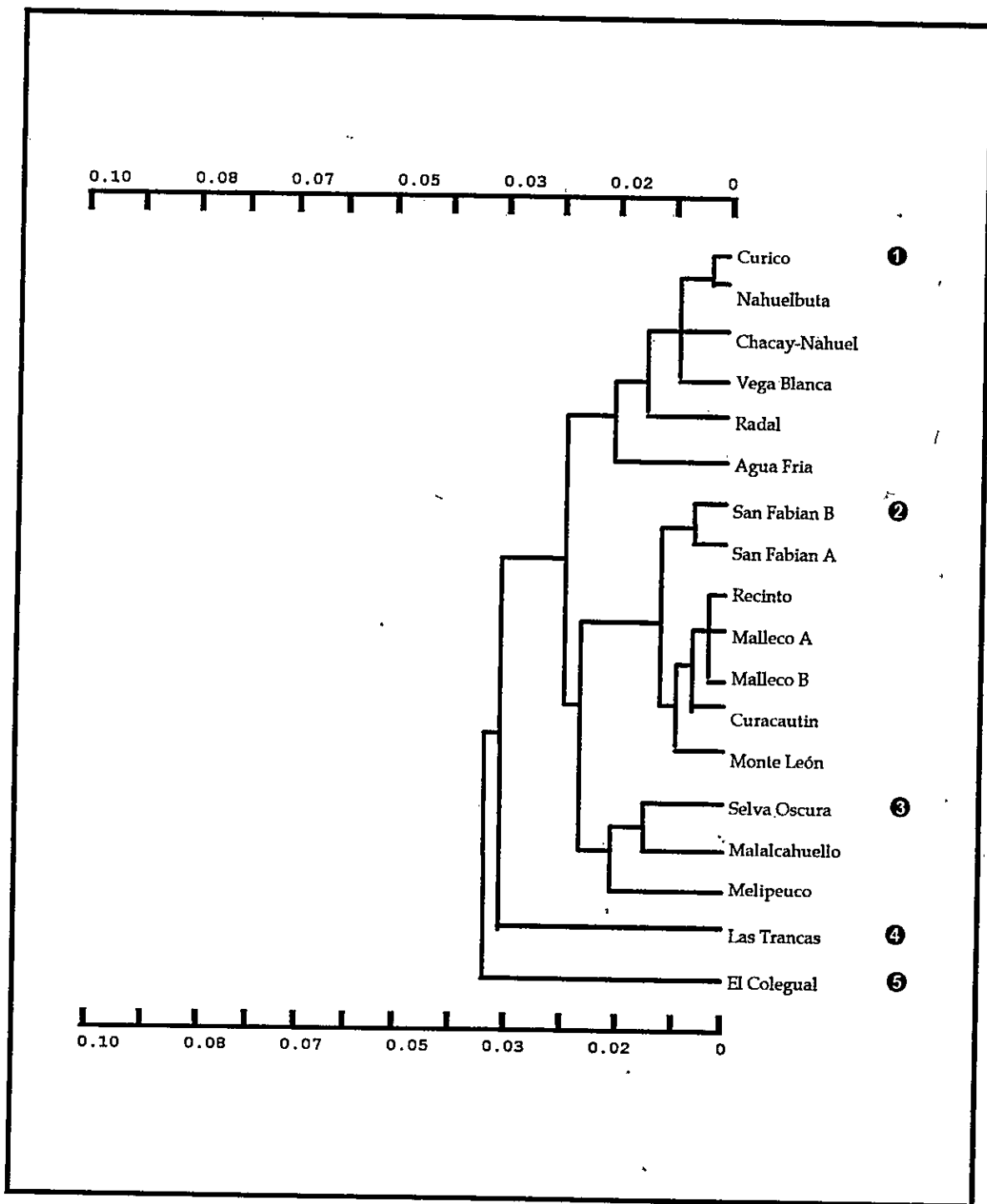


Figura 2. Dendrograma construido en base a distancia genética no sesgada de Nei (1978) para 10 loci en 18 poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poep. et Endl) (Oerst)).



Figura 3. Alelos identificados para la enzima Shikimato Deshidrogenasa: a= SKDH-2 ; b= SKDH-3 ; c= SKDH-4. Enzima monomérica ubicada en plastidios y citosol. Participa en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptofano (deshidrogenación de de 5-deshidrosikimato a shikimato). Se han descrito en plantas 1-2 loci. (Scandalios, 1974; Gottlieb, 1982; Weeden y Wendel, 1989).



Figura 4. Alelos identificados para la enzima Deshidrogenasa Mállica : a= MDH₂ -1; b= MDH₂ -2 ; c= MDH₂ -3 ; d= MDH₂ -4. Enzima monomérica o dimérica según la especie estudiada, se ubica en mitocondrias, microcuerpos y citosol. Participa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (citosol = Malato +NAD⁺ ⇌ Oxaloacetato+NADH ; mitocondrias= Malato +NAD⁺ ⇌ Oxaloacetato+NADH). Se han descrito en plantas 3 loci. (Scandalios, 1974; Gottlieb, 1982; Weeden y Wendel, 1989).

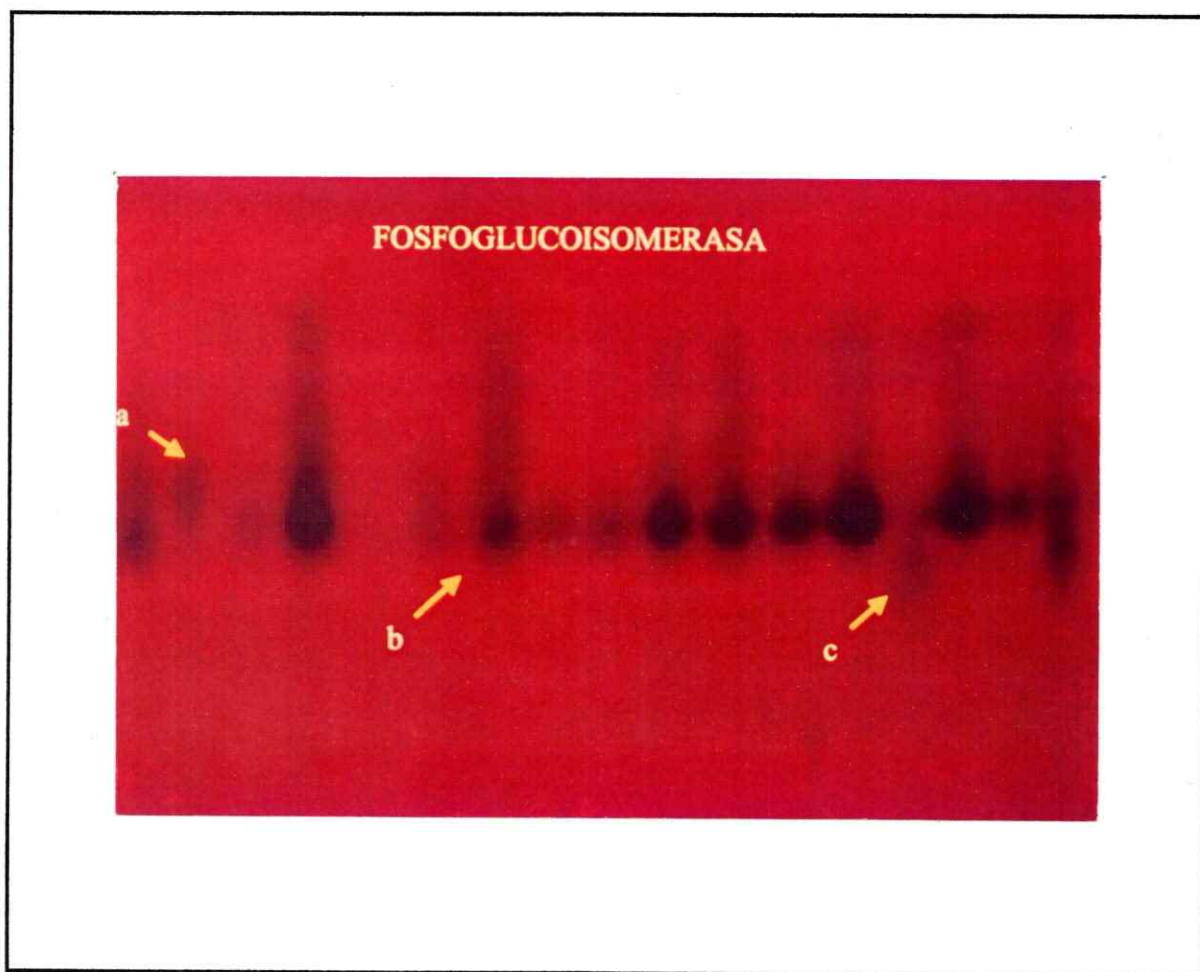


Figura 5. Alelos identificados para la enzima Fosfoglucoisomerasa : a= PGI₂ -2 ; b= PGI₂ -3; c=PGI₂ -4. Enzima dimérica ubicada plastidios y citosol. Participa en la Glicólisis (Glucosa-6P \leftrightarrow Fructosa-6P). Se han descrito en plantas 2 loci. (Scandalios, 1974; Gottlieb, 1982; Weeden y Wendel, 1989).

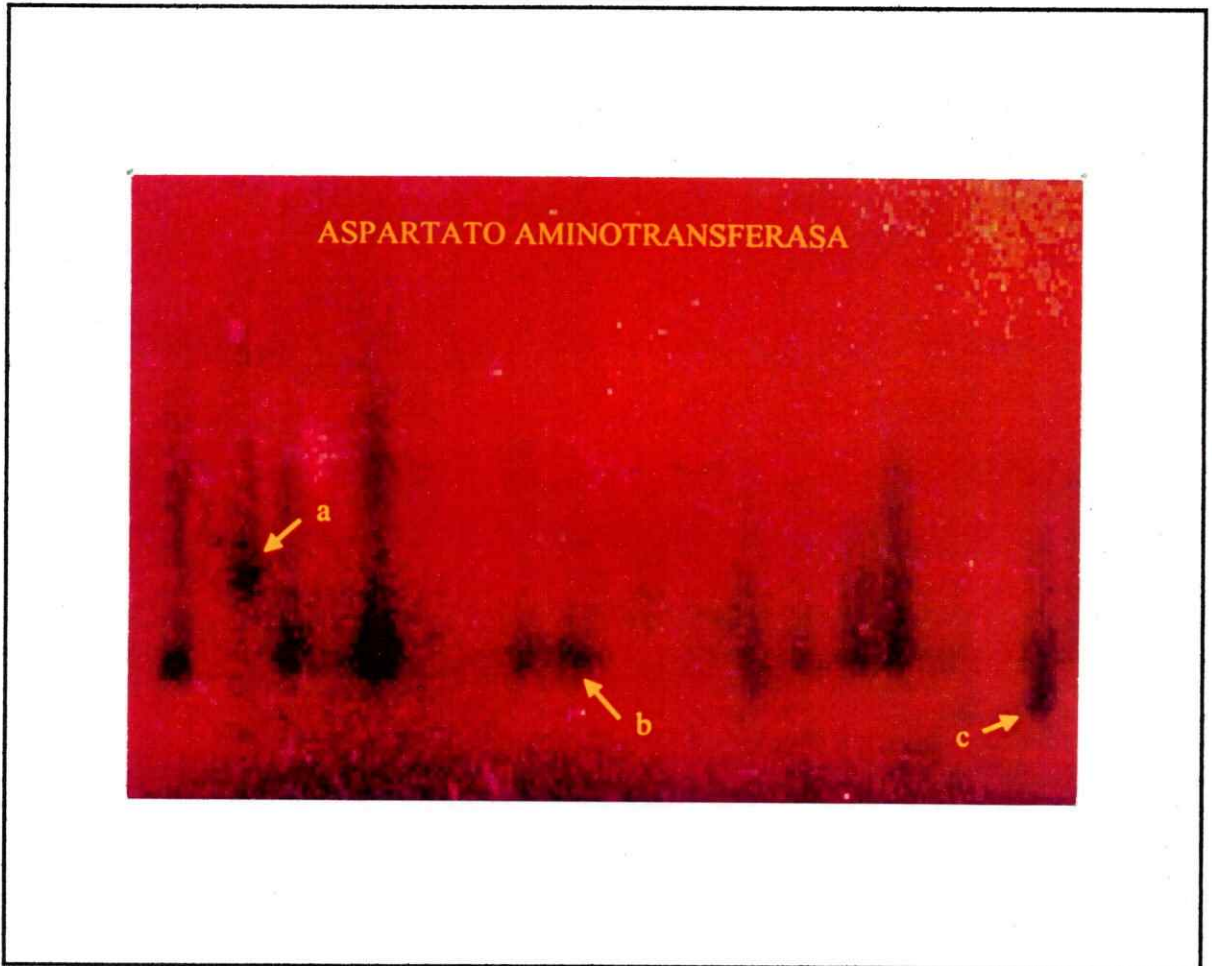


Figura 6. Alelos identificados para la enzima Aspartato Aminotransferasa : a= AAT₂ -1; b=AAT₂ -2 ; c= AAT₂ -3. Enzima dimérica, se ubica en plastidios, mitocondrias, microcuerpos y citosol. Participa en transaminación en el citoplasma (Oxaloacetato ↔ Aspartato) y en el metabolismo del glutamato en las mitocondrias (Glutamato ↔ α-Ketoglutarato). Se han descrito en plantas 3-4 loci. (Scandalios, 1974; Gottlieb, 1982; Weeden y Wendel, 1989).

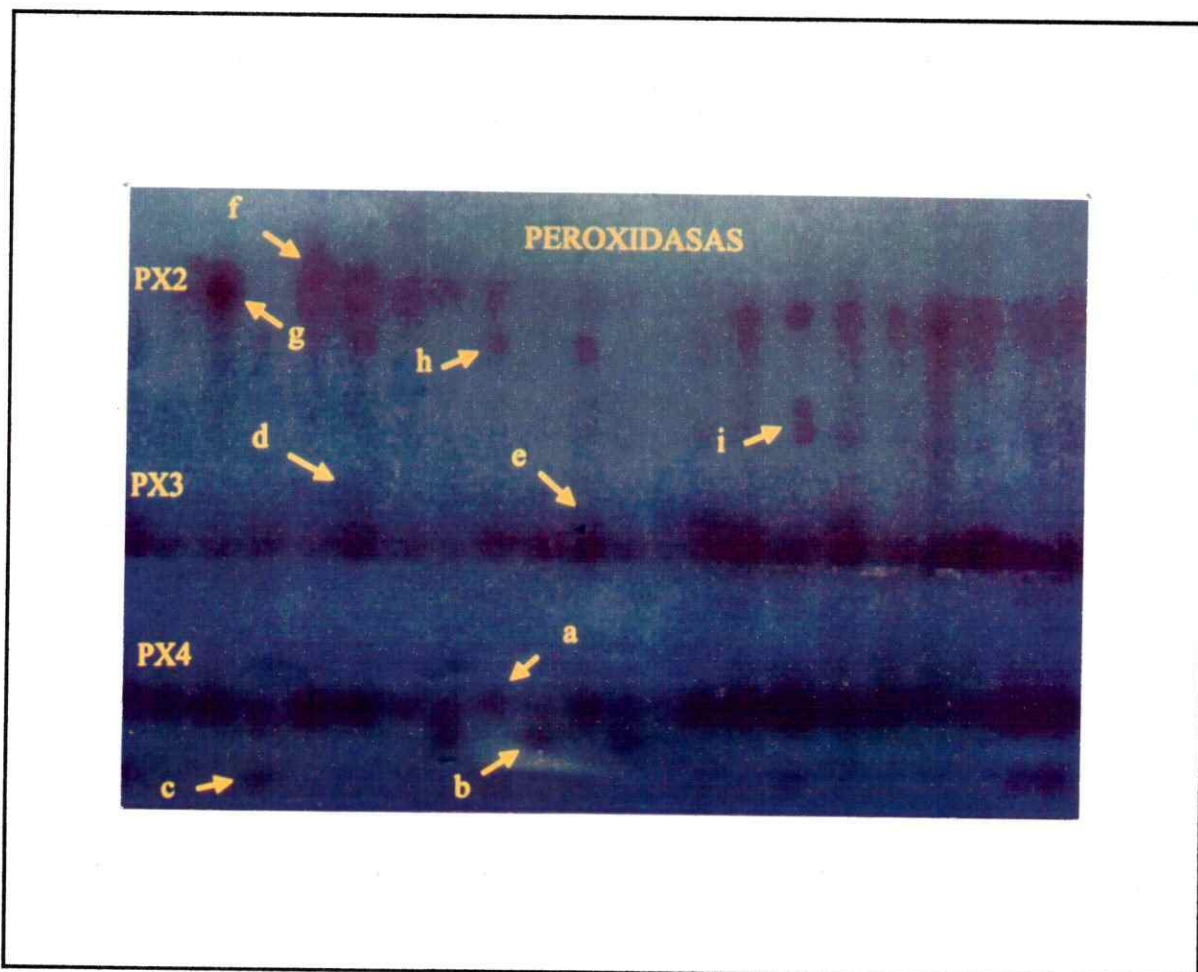


Figura 7. Alelos identificados para la enzimas Peroxidasa : a = PX_4 -2; b= PX_4 -3 ; c= PX_4 -4; d= PX_3 -1; e= PX_3 -2; f= PX_2 -1; g= PX_2 -2 ; h= PX_2 -3; i = PX_2 -4;. Enzima monomérica o dimérica según la especie estudiada, se ubica en plastidios, pared celular y citosol. Participa en una amplia variedad de reacciones utilizando peróxidos ($H_2 O_2$) para oxidar una gran variedad de dadores de H^+ . Se han descrito en plantas 2-13 loci. (Scandalios, 1974; Gottlieb, 1982; Weeden y Wendel, 1989).

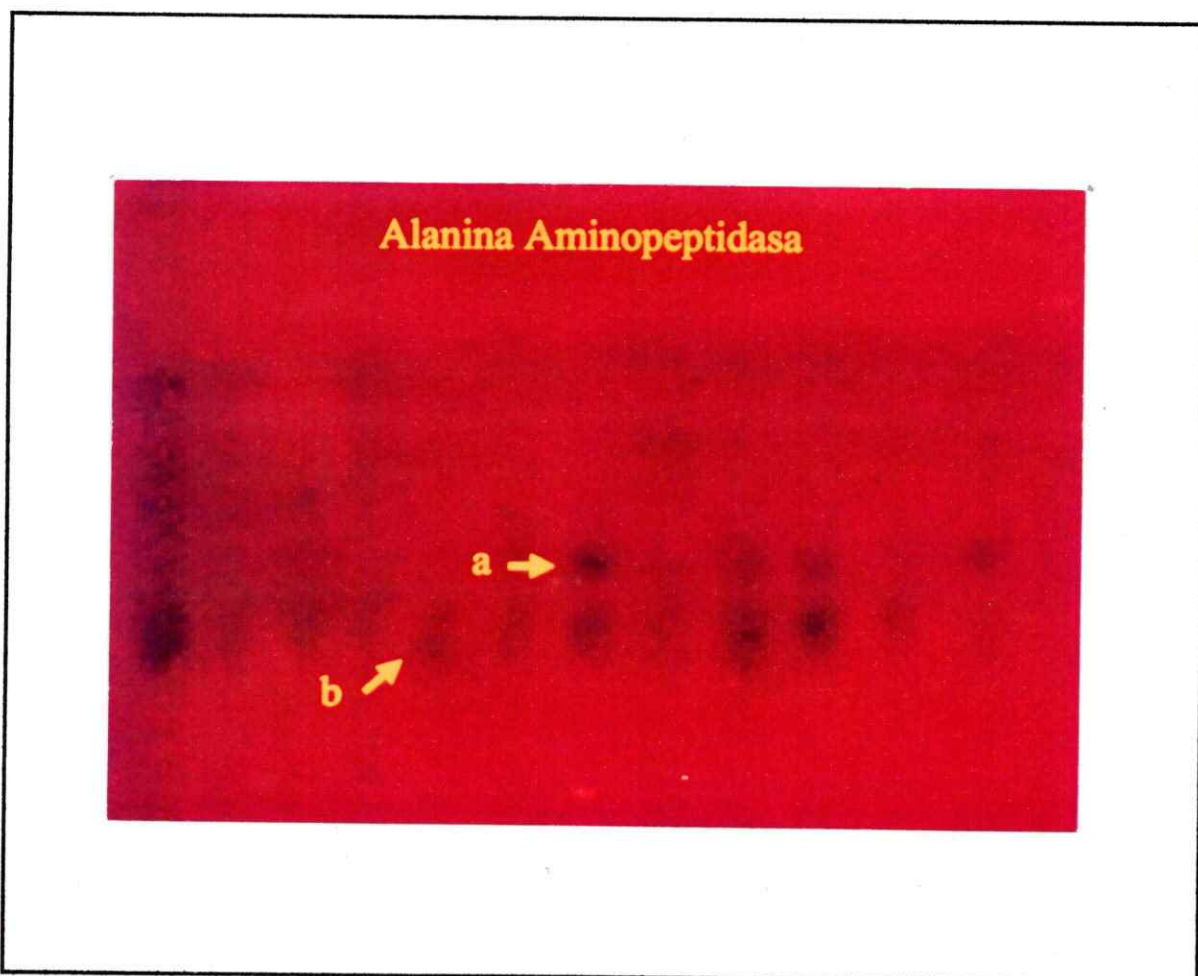


Figura 8. Alelos identificados para la enzima Alanina Aminopeptidasa : a= AAP -2; b=AAP- 3. Enzima monomérica, de amplia distribución a nivel celular. Participa en el catabolismo de proteínas a través de la hidrólisis de residuos alanina. No se tiene claridad si en plantas existen más de 1 locus que la codifique. (Scandalios, 1974; Gottlieb, 1982; Weeden y Wendel, 1989).

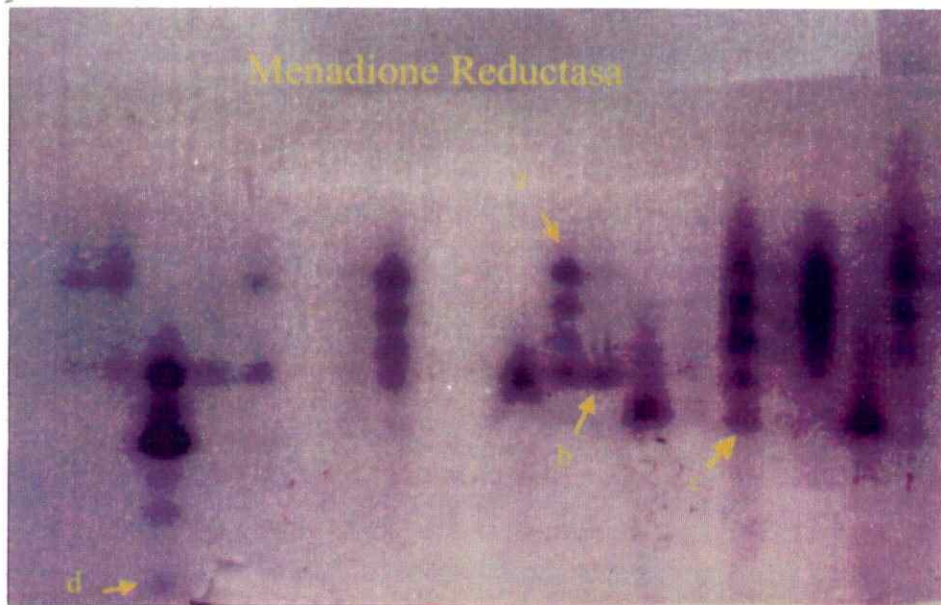


Figura 9. Alelos identificados para la enzima Menadione reductasa: a= $MNR_1 -2$; b= $MNR_1 -3$; c= $MNR_1 -4$; d= $MNR_1 -6$. Enzima tetramérica, no se sabe su distribución celular pero, se cree que se ubica en mitocondrias, microcuerpos y citosol. Participa en la respiración celular y fotosíntesis a través de la transferencia de H^+ desde desde nucleótidos de piridina a quinonas. Se han descrito en plantas 2 loci. (Scandalios, 1974; Gottlieb, 1982; Weeden y Wendel, 1989).

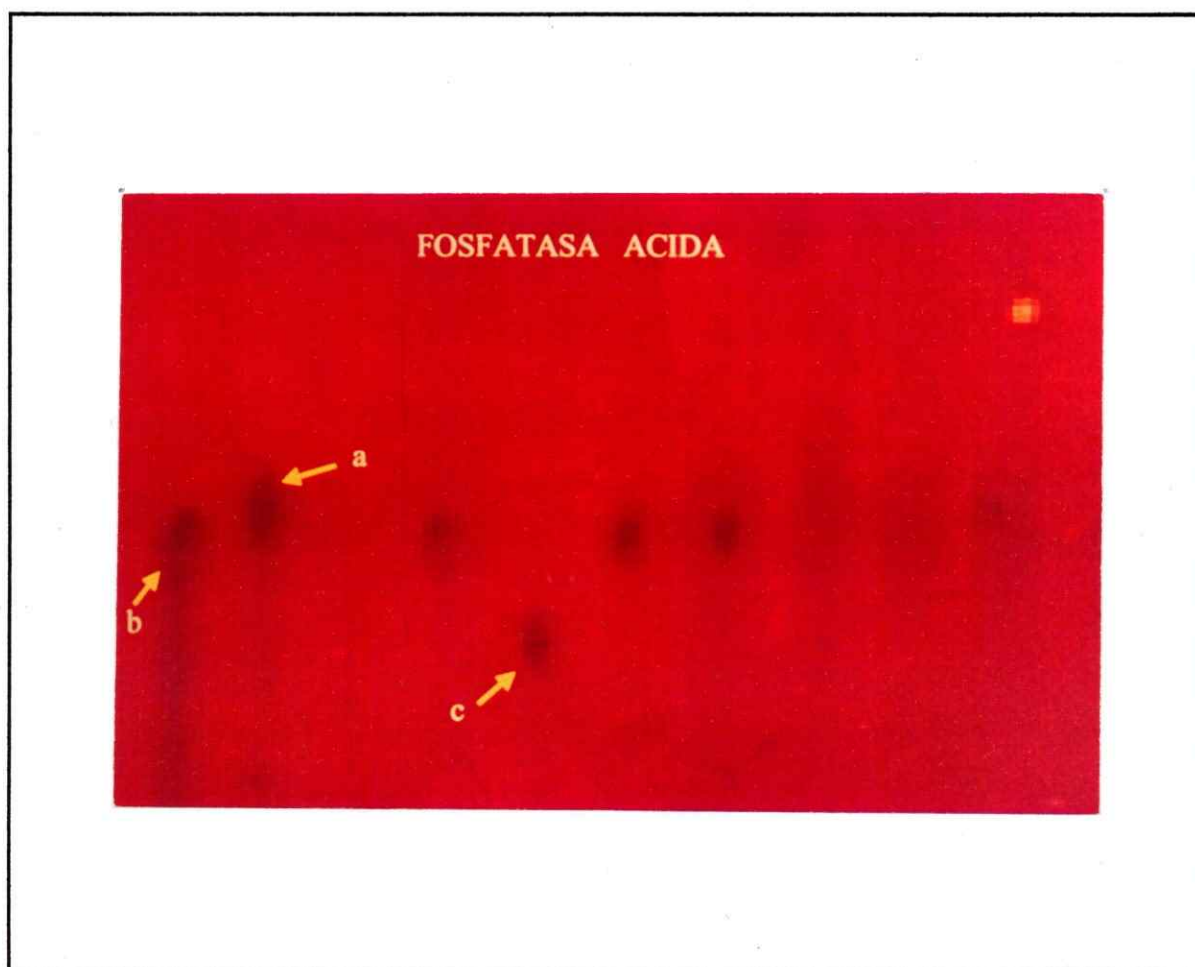


Figura 10. Alelos identificados para la enzima Fosfatasa ácida : a= ACP₂ -1; b=ACP₂ -2 ; c= ACP₂ -3. Enzima monomérica o dimérica según la especie estudiada, se distribuye ampliamente a nivel celular. Participa en el metabolismo del glicógeno. A través de la hidrólisis de enlaces ésteres de ácido fosfórico. Se han descrito en plantas loci. (Scandalios, 1974; Gottlieb, 1982; Weeden y Wendel, 1989).

4.DISCUSION

4.1. Niveles de variabilidad genética aloenzimática en el Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst))

4.1.1. Variabilidad genética a nivel poblacional

La cantidad de la variabilidad genética medida para las 18 poblaciones de Raulí estudiadas, fluctuó entre 2.5-3.5 alelos por locus (A), 80%-100% de loci polimórficos (P) y 22.2%-34.6% de heterocigosidad esperada. Tales valores son muy superior al promedio determinado para plantas a nivel poblacional (A= 1.53; P= 34.2% y He= 11.3%) (Hamrick y Godt, 1990). Al comparar los resultados obtenidos a nivel poblacional, con especies que presentan características biológicas similares a las del Raulí, se pudo apreciar que sus valores también fueron superiores (Tabla 13).

De las 18 poblaciones de Raulí estudiadas, Curicó y El Colegual mostraron los niveles más bajos de diversidad genética estimados para la especie (He = 23.0% y 22.2% respectivamente y P=80%). Esto quiere decir, que presentan muchos loci en los cuales la frecuencia del alelo más frecuente se encuentra cercana a 1.0, mientras que los demás se encontrarían en frecuencias menores al 10% (ver anexos 12).

La menor diversidad genética encontrada en ambas poblaciones puede ser explicada por su condición de poblaciones marginales, puesto que, la localidad de Curicó

representa el extremo norte por la Cordillera de los Andes, mientras que El Colegual correspondería al extremo sur por la Cordillera de la Costa.

Tabla 13. Índices de variabilidad aloenzimática a **nivel poblacional** para especies que presentan atributos como: Perennes, Leñosas, Amplia Distribución Geográfica, Alogamia y Anemocoria.

Característica	Nes	Np	L	A	P(%)	He(%)
Perenne Leñosa	115	9.3	17.0	1.79	50.0	14.9
Amplia Distribución	85	25.5	14.6	1.72	43.0	15.9
Alogamia	102	10.7	16.7	1.79	49.7	14.8
Anemocoria	105	8.7	16.6	1.70	42.9	12.3
Raulí	1	18	10.0	2.5-3.5	80-100	22.2-34.6

Nes=Número de especies estudiadas; Np= Número promedio de poblaciones estudiadas; L= Número de loci promedio; A= Número promedio de alelos por locus; P= Porcentaje de loci polimórficos; He=Heterocigosidad esperada (%).

Fuente: Hamrick y Godt, (1990).

La teoría clásica desarrollada a partir de observaciones en *Drosophila spp.*, predice bajos niveles de variabilidad genética en poblaciones marginales (Dobzhansky et al, 1963). Estas predicciones han mostrados ser ciertas para varias especies de la familia de las Fagaceas como: *Fagus sylvatica* (Leonardi y Menozzi, 1995; 1996), *Quercus petraea* (Zanetto y Kremer, 1995) y *Quercus ilex* (Michaud et al, 1995). Al respecto, dichos autores sugieren que la menor diversidad genética sería producto de fuertes presiones selectivas que ocurren en sectores con condiciones ambientales críticas.

Sin embargo, debido a que los loci enzimáticos son considerados selectivamente neutros, es difícil extender dichas sugerencias para las poblaciones de Raulí. En este contexto, los loci enzimáticos serían marcadores genéticos que reflejan el fenómeno, a menos que se demuestre que están asociados a características que influyen directamente sobre la adecuación biológica de la especie.

Otros factores que pueden haber reducido los niveles de variabilidad genética en las poblaciones de Curicó y El Colegual son, su aislamiento geográfico y sus pequeños tamaños poblacionales. En esas condiciones, las restricciones del flujo génico y la deriva genética podrían haber favorecido la disminución de la diversidad genética en ambas poblaciones.

Analizar y discutir resultados electroforéticos a nivel poblacional, como ya se ha visto, permite distinguir poblaciones especiales, pero además permite confirmar la importancia que tiene un diseño de muestreo adecuado, en términos de números de individuos y número de poblaciones.

Para las 18 poblaciones de Raulí estudiadas el tamaño promedio de las muestras por locus y por población fue aproximadamente 40 individuos con la excepción de la población de Nahuelbuta, donde sólo 20 individuos revelaron patrones electroforéticos. Según Brown y Briggs (1991), el número de individuos muestreados se relacionaría directamente con la diversidad genética, lo cual podría explicar la menor variabilidad genética encontrada en la población de Nahuelbuta.

Sin embargo, no se apreció correlación entre los índices de variabilidad genética (número de alelos por locus, polimorfismo y heterocigosidad) y el tamaño poblacional, indicando que al menos para este estudio, los tamaños muestrales no serían un factor limitante para capturar la mayor parte de la diversidad genética en las poblaciones de Raulí. Probablemente este resultado se deba a que el número de individuos que revelaron patrones electroforéticos fluctuaron entre 20 a 45.4, valores que se encuentran

dentro de los rangos señalados como óptimos (10-50 individuos) para detectar la mayoría de los alelos más frecuentes (Conkle, 1992 ; Falk , 1991).

El número de individuos analizados por población tomaría mayor importancia cuando se desea capturar alelos en baja frecuencia y especialmente en especies forestales como el Raulí, donde su variabilidad genética se basa fundamentalmente en la presencia de un gran número de alelos raros (frecuencias menores al 10%). Marshall y Brown (1975) citados por Holsinger y Gottlieb, (1991) señalan que para capturar el 95% de los alelos cuyas frecuencias son superiores al 5% se requeriría entre 50-100 individuos por población.

Por otro lado, el número de poblaciones muestreadas también puede influir en la cantidad de variabilidad detectada a nivel poblacional. Se considera que en especies alógamas y con distribución geográfica amplia, una muestra de menos de 5 poblaciones puede conducir a una subestimación de los niveles de variabilidad genética (Manos y Fairbrothers, 1987; Schnabel y Hamrick, 1990; Holsinger y Gottlieb, 1991). En este estudio se muestreó un número de poblaciones muy superior al mínimo recomendado en la literatura, lo que puede dar seguridad de que los datos obtenidos son una estimación que representa en gran medida la cantidad de variabilidad genética aloenzimática existente en el Raulí, tanto a nivel poblacional como, a nivel de especie.

4.1.2. Variabilidad genética a nivel de especie

A nivel de especie la cantidad de variabilidad genética aloenzimática en el Raulí mostró ser muy superior ($A=3.04$; $P=92.8\%$; $H_e=28.2\%$) al promedio determinado para

especies vegetales (A= 1.96; P=50.5%; He=14.9%). A su vez, fue superior a los valores promedios estimados para gimnospermas (A= 2.35; P=70.9%; He=17.3%) y angiospermas (A= 2.09; P=52.0%; He=15.9%) (Hamrick y Godt, 1990).

Las comparaciones con algunas de las especies Fagaceae, se muestran en la Tabla 14. Se pudo constatar que los niveles de variabilidad genética en el Raulí fueron superiores a los valores promedios reportados para algunas de las especies pertenecientes a los 4 géneros de la familia de las Fagaceae.

Tabla 14. Niveles promedio de variabilidad genética aloenzimática para 4 géneros de la familia de las Fagaceas y para *N. alpina*.

Genero	N	L	A	P(%)	He(%)
Quercus	33	15(3-26)	2.12(1.25-3.8)	62(21.9-90.0)	21.6 (5.5-39.8)
Castanea	4	18(16-19)	2.1(1.74-2.67)	72(62.2-84.2)	23.5(18.3-30.5)
Fagus	3	11(6-16)	2.6(2.12-2.9)	78(58.2-100)	28.2(16.8-39.5)
Nothofagus	5	21(15-22)	1.3(1.15-1.38)	15(4.5-19.7)	4.6(2.7-9.9)
<i>N. alpina</i>	1	10	3.04	92.8	28.2

N = Número de especies estudiadas; He=Heterocigosidad esperada; A = Número de alelos/locus; P= Porcentaje de loci polimórficos; L= Número de loci estudiados.

Fuente: Müller et al, (1993); Manos y Fairbrother (1987); Guttman y Weigt (1989); Schnabel y Hamrick (1990); Yacine y Lumaret (1989); Kleinschmit et al, (1995); Hasse (1992,1993); Belletti y Lanteri, (1995); Comps et al, (1990,1991); Könnert (1995); Leonardi y Menozzi (1995); Takahashi et al, (1994); Houston y Houston (1994); Huang et al, (1994); Villani et al, (1991, 1992).

De los resultados publicados, sólo 2 especies mostraron niveles de variabilidad genética similares a los obtenidos para Raulí. Müller-Starck et al, (1993) y Kleinschmidt et al, (1995) reportaron para *Quercus petraea* 3.1 alelos por locus (A), 90.0% de loci polimórfico (P) y 27.0-29.0% de heterocigosidad esperada (He). Por otro lado, Doubree y Kremer (1993) señalan para *Quercus rubra* 3.8 alelos por locus (A) y 27.1 % de heterocigosidad esperada (He).

Es importante considerar que, las comparaciones entre especies sólo deben tomarse como un antecedente ilustrativos debido a la diversidad de estrategias de muestreo utilizadas en los estudios publicados. En general los esquemas de muestro varían enormemente en relación al número y tipo de loci analizado, número de poblaciones y número de individuos por población, llevando en algunas ocasiones a resultados muy diferentes para una misma especie.

En la actualidad sólo la recopilación de 653 estudios realizada por Hamrick (1979, 1982) y Hamrick y Godt en 1990 que abarca alrededor de 700 especies vegetales han permitido hacer generalizaciones y predicciones de la cantidad de variabilidad genética que podría presentar una especie en particular y sobre de las características ecológicas y de su historia de vida que la pueden haber influenciado.

En la Tabla 15 se muestran los niveles promedios de variabilidad aloenzimática para especies vegetales con diferentes atributos biológicos. De ella se desprende que los niveles de variabilidad genética obtenidos para el Raulí son mayores que los promedios calculados para especies con características similares a él (plantas leñosas perennes $A=2.19$, $P=64.7\%$, $He=17.7\%$, especies con amplia distribución geográfica $A=2.29$, $P=58.9\%$, $He=20.2\%$; especies alógamas anemófilas, $A=2.40$, $P=66.1\%$, $He=16.2\%$, y especies con anemocoría, $A=2.10$, $P=55.4\%$, $He=14.4\%$).

Por lo tanto, los resultados obtenidos para el Raulí permitieron confirmar las predicciones generales hechas por Hamrick (1979, 1982) y Hamrick y Godt, (1990) basadas en los atributos biológicos de las especies vegetales. Estos autores sostienen que, especies como el Raulí, que son plantas leñosas perennes, alógamas, anemófilas y

Tabla 15. Niveles de variabilidad genética aloenzimática para especies vegetales clasificadas según atributos como: Estatus taxonómico, forma de vida, distribución geográfica, dispersión de polen y dispersión de semillas

Nivel	N	L	A	P	He
<u>Estatus taxonómico</u>					
Gimnospermas	55	16.1	2.35	70.9	0.173
Angiospermas	440	16.1	2.09	52.0	0.159
<u>Forma de vida</u>					
Herbáceas perennes	4	13.8	1.42	39.6	0.205
Leñosas perennes	110	17.0	2.19	64.7	0.177
<u>Distribución geográfica</u>					
Endémicas	81	17.8	1.80	40.0	0.096
Restringido	101	16.9	1.83	45.1	0.137
Regional	193	16.7	1.94	52.9	0.150
Amplia	105	14.6	2.29	58.9	0.202
<u>Dispersión del polen</u>					
Autogamia	123	16.2	1.69	41.8	0.124
Autogamia-Alogamia y zoofila	64	14.4	1.68	40.0	0.120
Alogamia/zoofila	172	17.7	1.99	50.1	0.167
Alogamia/Anemofila	105	16.7	2.40	66.1	0.162
Autogamia-Alogamia y anemofila	9	12.5	2.18	73.5	0.194
<u>Dispersión de semillas</u>					
Gravedad/Adherida a animal	15	18.6	2.42	69.3	0.166
Adherida a animal	55	16.5	2.96	68.8	0.204
Anemocoria	111	16.6	2.10	55.4	0.144
Gravedad	198	16.9	1.81	45.7	0.136
Endozoozofilia	67	13.2	1.69	45.7	0.176
Explosiva	27	18.6	1.48	30.4	0.092

N = Número de taxa; L=Número medio de loci estudiados; P=porcentaje de loci polimórficos

A =Número de alelos/locus; He=Heterocigosidad esperada

Fuente: Modificada de Hamrick y Godt (1990).

con amplia distribución geográfica, tenderían a mantener niveles altos de variabilidad intrapoblacional comparado con especies que muestren otra combinación de atributos, siendo el rango de distribución geográfica el mejor predictor de los niveles de

variabilidad aloenzimática. Al respecto, es frecuente observar en especies vegetales con rangos geográficos amplios mayor diversidad genética que aquellas que presentan rangos restringidos. Tales patrones se deberían a que las especies vegetales con amplia distribución geográfica pueden haber mantenido poblaciones grandes y continuas durante la mayor parte de su historia vida, lo cual las haría menos susceptibles a perder variabilidad aloenzimática por efecto de la deriva genética.

4.1.3 Deficiencia de heterocigotos

Las Tablas 8 y 9 presentadas en la sección resultados muestran que, las poblaciones de Raulí presentan una generalizada deficiencia de heterocigotos. Como se aprecia en la Tabla 8, en promedio la heterocigosidad observada ($H_o=22.9\%$) fue menor que la heterocigosidad esperada ($H_e=28.2\%$) en condiciones de equilibrio Hardy-Weimberg, indicando que las poblaciones estudiadas no se comportan como panmícticas y existiría importantes niveles de consanguinidad. Similares resultados se apreciaron al analizar los resultados del estadígrafo Fis (Tabla 9), donde 9 loci mostraron valores positivos y significativamente diferentes de cero.

La presencia de apreciables niveles de consanguinidad observados en el Raulí no es un caso aislado ya que, los estudios sobre genética de poblaciones vegetales frecuentemente reportan ciertos niveles de deficiencia de heterocigotos en plantas alógamas. Brown en 1979, ya había descrito que en las especies alógamas, mostraría un déficit general de heterocigotos si se comparaba con lo esperado en condiciones de panmixia. Al respecto, algunos autores sugieren que la existencia de este fenómeno

favorecería la formación de unidades de apareamiento semi-aisladas con adaptación local diferencial, la cual en combinación con el flujo génico limitado serían efectivos mecanismos para la mantención del polimorfismo genético y la adaptabilidad (Levin y Kerster, 1974 citado por Bacilieri et al, 1995; Gregorius et al, 1986).

Las especies de la familia Fagaceae a las cuales pertenece el Raulí, son plantas alógamas en las cuales el polen y las semillas son dispersadas por diversos mecanismos (viento, gravedad, animales). Tales características permitirían mantener poblaciones genéticamente homogéneas con elevados niveles de variabilidad genética, sin embargo se ha podido verificar que ésta no se distribuiría aleatoriamente y apreciándose importantes niveles de consanguinidad. Es así como, Guttman y Weigt (1989) verificaron que 18 especies del género *Quercus* mostrarían importantes deficiencias de heterocigotos. Similares resultados fueron obtenidos por Bacilieri et al (1994) para *Q. petraea* y *Q. robur* ($F_{is}=0.304$, $F_{is}=0.244$ respectivamente), siendo por el momento, los valores más altos publicados para la familia Fagaceae.

Deficiencias de heterocigotos de una magnitud similar a las obtenidas para el Raulí, han sido publicadas para *F. sylvatica* ($F_{is}=0.130$ y $F_{is}=0.115$) por Leonardi y Menozzi (1996), Comps et al (1990) respectivamente, para *Q. suber* ($F_{is}=0.173$) por Elena-Rossello y Cabrera (1996) y para *Q. rubra* ($F_{is}=0.10$) por Sork et al, (1993). Además, en muchos casos, la deficiencias de heterocigotos se han visto asociadas a un agrupamiento de individuos emparentados en distancia cortas entre 5-10m. y a diferenciación intrapoblacional (Gregorius et al, 1986; Sork et al, 1993; Bacilieri et al, 1994; Leonardi y Menozzi, 1996).

Aunque, existen muchos antecedentes que dan cuenta de la presencia de apreciables niveles consanguinidad dentro de las poblaciones de especies alógamas. Sus causas directas no han sido totalmente aclaradas, sugiriéndose que el flujo génico limitado, deriva genética y selección serían las principales fuerzas que estarían moldeando la estructura genética interna en las poblaciones naturales.

Si bien describir la estructura dentro de las poblaciones de Raulí no fue un objetivo de esta investigación, es importante informar sobre la presencia de deficiencia de heterocigotos, pues puede servir como antecedente preliminar para futuras investigaciones. Al respecto, un aporte interesante ha sido desarrollado recientemente por Eaton et al, (1998) quienes han estudiado detalladamente la estructura genética dentro de una población de Raulí.

4.2. Distribución de la variabilidad genética en el Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst)).

Medir y analizar la distribución de la variabilidad genética permite tener una visión general de su organización en el espacio y en el tiempo, lo cual hace a este tipo de información muy interesante para estudios de biología evolutiva, biología de la conservación y mejoramiento genético.

Para estudiar la distribución de la variabilidad genética aloenzimática en el Raulí se utilizaron 2 métodos: diversidad génica de Nei (1972,1978) y estadígrafos F de Wright según Weir y Cockerham (1984). El primero permite analizar la distribución de las frecuencias alélicas, mientras que el segundo permite estudiar la distribución de las

frecuencias genotípicas y de los factores evolutivos involucrados. Además, utilizar ambos métodos facilitó hacer comparaciones con los resultados publicados en la literatura en las cuales se utiliza solo uno de ellos.

4.2.1. Variabilidad genética intrapoblacional

Los resultados obtenidos muestran que alrededor de un 95% de la variabilidad genética aloenzimática se distribuye dentro de las poblaciones de Raulí ($H_s=93.6\%$; $1-F_{st}=94.9\%$; Tabla 9). Esta a su vez, fue muy superior a la determinada para especies vegetales en conjunto ($H_s=77.6\%$) (Hamrick y Godt, 1990) pero, similar a la obtenida para especies arbóreas leñosas ($H_s=92,0\%$) (Hamrick et al, 1992), confirmándose que para las especies forestales la mayor proporción de la diversidad genética se encuentra a nivel intrapoblacional.

En la Tabla 16 se detalla la distribución de la variabilidad genética para diferentes especies de las Fagaceas. Es importante señalar que dicha tabla puede parecer excesivamente extensa, pero esta no puede ser resumida debido a las diferencias en las metodologías de cálculo empleadas por los autores.

En dicha tabla se puede apreciar que los valores reportados para Raulí ($H_s=93.6\%$; $1-F_{st}=94.9\%$) se encuentran dentro de los determinados para otras especies de la familia de las Fagaceas ya sea, si es medida por medio de la diversidad génica de Nei ($H_s=81.5\%$ a 100%) o mediante los estadígrafos F de Wright ($1-F_{st}=83.1\%$ a 99.1%). Además, es importante destacar que los resultados obtenidos para el Raulí fueron muy superiores a los reportados para otras especies del género *Nothofagus* tales

como: *N. menziesii* (Hs=87.7%) y *N. cliffortioides* (Hs=84.0%). La presencia de una elevada variabilidad genética aloenzimática dentro de las poblaciones naturales de Raulí podría ser el reflejo de varios factores los cuales serán discutidos más adelante.

4.2.2. Variabilidad genética interpoblacional

Otro importante parámetro medido fue la distribución de la variabilidad aloenzimática entre poblaciones, estimación que permite además conocer el grado de diferenciación interpoblacional. Siguiendo los criterios de Hartl (1987), la diferenciación interpoblacional del Raulí sería moderada ($F_{st}= 5.11\%$; $G_{st}= 6.4\%$). Dicho autor sostiene que valores F_{st} entre 5% a 15% se encontrarían dentro de tal clasificación.

Al comparar los resultados con los publicados para otras plantas, se pudo constatar que el Raulí presenta valores 4 veces más bajos que el promedio obtenido por Hamrick y Godt (1990) para 406 especie vegetales ($G_{st}= 22.4\%$) pero, cercana a los valores más bajos encontrados para especie leñosas perennes, cuyo polen y semillas son dispersadas por el viento ($G_{st}= 7.7\%$ a 15.0%) (Hamrick, 1990; Hamrick et al , 1992).

En la Tabla 16 se muestra la distribución de la variabilidad aloenzimática para varias especies de la familia Fagaceae. En dicha tabla se puede observar que los índices de diferenciación interpoblacional del Raulí se encuentra dentro de los habitualmente reportados para algunas especies de la familia ($G_{st}=0.0\%$ a 9.5% ; $F_{st}=0.9\%$ a 10.0%). Estos resultados se esperaban pues las especies de las Fagaceas compartirían atributos biológicos, entre los cuales la forma de vida (leñosa perenne) y el sistema apareamiento

Tabla 16. Distribución de variabilidad genética aloenzimática en especies de los géneros *Nothofagus*, *Fagus*, *Castanea* y *Quercus* incluyendo a *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst)) (Rauli).

Especies		N	L	Ht	Hs	Gst	Fit	Fis	Fst	1-Fst
<u>Nothofagus</u>					(%)	(%)			(%)	(%)
<i>N.truncata</i>	a	30	15	0.149	96.6	2.7				
<i>N.truncata</i>	b	3	4	0.205	99.0	1.0				
<i>N.fusca</i>	b	3	2	0.293	100	0.0				
<i>N.solandri</i>	b	3	7	0.083	100	0.0				
<i>N.cliffortioides</i>	b	3	5	0.175	84.0	16.0				
<i>N.menziesii</i>	b	3	6	0.414	87.7	12.3				
<i>N.alpina</i>		18	10	0.297	93.6	6.4	0.186	0.227	5.11	94.9
<u>Fagus</u>										
<i>F.crenata</i>	c	14	14	0.198	98.5	1.5				
<i>F.sylvatica</i>	d	20	16	0.252	98.1	1.9				
	e	11	8	0.303	95.7	4.3				
	f	48	12	0.308	88.0	12.0				
	g	35	6	0.310	94.8	5.2	0.156	0.115	4.6	95.4
	h	143	6	0.308	94.2	5.8	0.115	0.065	5.4	94.6
	i	21	9				0.157	0.117	4.6	95.4
<i>F.grandifolia</i>	j	2	9	0.408	96.6	3.4	0.090	0.023	6.4	93.6
<u>Castaneae</u>										
<i>C.sativa</i>	k	13	16	0.304	89.8	9.5				
	k	18	16	0.252	90.5	9.5				
	l	5	3				-0.050	-0.078	2.7	97.3
<u>Quercus</u>										
<i>Q.petraea</i>	m	81	13	0.396	97.5	2.5				
<i>Q.macrocarpa</i>	n	21	19	0.206	92.4	7.6				
<i>Q.gambelii</i>	n	4	14	0.215	88.0	12.0				
<i>Q.palustris</i>	ñ	2	16	0.058	98.3	1.7				
<i>Q.rubra</i>	ñ	2	16	0.124	92.8	7.2				
	s	8	13	0.233	98.3	1.7	0.002	-0.008	0.9	99.1
<i>Q.ilicifolia</i>	ñ	3	16	0.116	95.6	4.3				
<i>Q.marilandica</i>	ñ	3	16	0.081	83.9	16.1				
<i>Q.velutina</i>	ñ	3	16	0.123	82.9	17.1				
<i>Q.coccigena</i>	ñ	2	16	0.058	94.8	5.2				
<i>Q.ilex</i>	o	57	6	0.278	89.8	10.2	0.128	0.031	10.0	90.0
	p	16	3				0.069	-0.008	7.3	92.7
<i>Q.suber</i>	q	7	10	0.373	81.5	18.5	0.316	0.173	16.9	83.1
<i>Q.rubra</i>		5	11				0.183	0.147	4.2	95.8
<i>Q.ellipsoidalis</i>	r									

N = Número de poblaciones muestreadas; L=Número de loci estudiados;Ht=Diversidad génica total; Hs =Diversidad génica intrapoblacional ; Gst=Diversidad génica interpoblacional; Fst=Diferenciación genotípica.

Fuente: a=Hasse (1993); b=Hasse (1992); c=Takahashi et al, (1994); d=Könnet (1995); e=Belletti y Lateri, (1995); f=Gömöry et al, (1990); g=Comps et al, (1991); h=Comps et al, (1990); i=Leonardi y Menozzi (1995); j=Houston y Houston (1994); k=Villani et al, (1991); l=Frascaria et al, (1993); m=Zanetto y Kremer, (1995); n=Schnabel y Hamrick (1990); ñ=Manos y Fairbrother (1987); o=Michaud et al, (1995); p=Yacine y Lumaret (1989); q=Elena-Rosello et al, (1996); r=Hokanson et al, (1993); s=Schwarzmann y Gerhold, (1991).

(alogamia, anemofilia) han sido señalados como los factores que más influyen sobre la distribución de la variabilidad entre poblaciones (Hamrick y Godt, 1990 y Hamrick et al, 1992).

La fuerte influencia de dichas características sobre la diferenciación genética entre poblaciones, radicaría en la estrecha relación que tendrían con el flujo génico. Como se puede observar en la Tabla 17 existió un importante flujo génico entre las poblaciones de Raulí ($N_m=4.6$), el cual fue similar a los reportados para otras especies de la familia de las Fagaceae ($N_m=3.6-5.7$).

Tabla 17. Flujo génico ($N_m=(1/F_{st}-1)/4$) en especies con alogamia y anemocoría.

LUGAR		ESPECIES	Fst	Nm
	a	Especies vegetales con alogamia y anemocoría	0.045 a 0.007	5.3 a 37.8
Chile	b	<i>N. alpina</i>	0.0511	4.6
Europa	c	<i>F. sylvatica</i>	0.054	4.4
Estados Unidos	d	<i>F. grandifolia</i>	0.064	3.6
Estados Unidos	e	<i>Quercus sp.</i>	0.042	5.7

Fuente: a=Hamrick and Godt,(1990); b=este estudio;c=Cuguen,(1988); d=Houston and Houston, (1994) ;e=Hokanson et al,(1993).

Sin embargo, los niveles de flujo génico del Raulí fueron inferiores a los esperados para especies con polinización cruzada (alogamia), cuyo polen y semillas son dispersadas por el viento (anemofilia y anemocoría respectivamente), las que fluctúan entre $N_m=5.3$ a 37.8. Hasta el momento los resultados son contradictorios pues, por un lado existiría una moderada diferenciación genética interpoblacional ($F_{st}= 5.1\%$) atribuida al efecto de subdivisión poblacional y deriva genética según el modelo de Wright (1965). Mientras que por otro lado, el nivel de flujo génico estimado para Raulí ($N_m= 4.6$ migrantes por generación) sería suficiente para evitar diferenciación entre

poblaciones por efecto de la deriva genética. Estas discrepancias pueden ser atribuidas a las suposiciones del método utilizado para calcular F_{st} y N_m , cuyas implicancias serán analizadas en la siguiente sección.

4.3. Factores Evolutivos que afectan la estructura genética de las poblaciones naturales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl (Oerst)).

Hasta el momento se ha sugerido que las características biológicas del Raulí como distribución geográfica, forma de vida y sistema de reproducción, serían relevantes para determinar y predecir la composición genética de sus poblaciones naturales. Sin embargo, los atributos biológicos no explicarían totalmente los patrones de variabilidad aloenzimática encontrados en las poblaciones de Raulí, lo que permitiría sugerir que efectos de procesos evolutivos y de la historia de vida también serían importante en la organización de su estructura genética.

4.3.1. Procesos evolutivos que afectan los niveles de variabilidad genética.

Como ya se ha discutido, existe una gran cantidad de información en la literatura que indica que las especies vegetales leñosas perennes con amplia distribución geográfica, alogamia, anemofilia y anemocoria presentan elevada variabilidad genética dentro de sus poblaciones y una escasa diferenciación entre poblaciones. La mayoría de dichos atributos biológicos son compartidos por las especies la familia Fagaceae, por lo cual era factible esperar que el Raulí presentara resultados similares a los postulados en la Hipótesis 1.

Tales características habrían permitido, que el Raulí mantuviera elevados tamaños poblacionales efectivos e importantes niveles de flujo génico, impidiendo que la deriva genética disminuyera la cantidad de variabilidad aloenzimática retenida dentro de sus poblaciones. Efecto que se vería avalado por la presencia de una elevada cantidad de alelos con frecuencias menores al 10% (69.8% de los alelos revelados) que sólo se apreciarían, si el Raulí mantuvo poblaciones grandes durante la mayor parte de su historia de vida. Y aunque existiera escaso flujo génico la diversidad genética total se mantendría alta, debido a que en poblaciones grandes la tasa de pérdida de variabilidad genética por efecto de la deriva sería muy baja, del orden de 10^{-6} a 10^{-8} por generación (Varvio et al, 1986). Un efecto absolutamente opuesto se habría producido si se hubiesen reducido fuertemente sus tamaños poblaciones y éstas se hubiesen mantenido fragmentadas y aisladas. En cuyo caso, las restricciones para el flujo génico y la deriva genética habrían reducido significativamente los niveles de variabilidad aloenzimática, perdiéndose principalmente alelos en baja frecuencia (Nei, 1975), lo cual no fue el caso.

Un importante factor que puede haber aumentado los niveles de variabilidad genética en el Raulí es la hibridación interespecífica, especialmente la de tipo introgresiva. Stebbins (1950) señala, que este fenómeno sería común en especies arbóreas debido, a que no presentan mecanismos eficientes de aislamiento reproductivo, y tienen largos ciclos de vida y eficientes métodos de reproducción sexual.

Al respecto, existe una gran cantidad de estudios en especies de la familia de las Fagaceas, especialmente en especies del género *Quercus* (Stebbins, 1950; Müller, 1952; Rushton, 1993; Steinhoff, 1993; Schnabel y Hamrick, 1993; Kleinschmit, 1993;

Ducouso et al, 1993; Jensen et al, 1993; Bacilieri et al, 1993; Howard et al, 1997). En el género *Nothofagus* muchos estudios han verificado la presencia de este fenómeno. Donoso (1975, 1981, 1982), Donoso et al, (1990) y Donoso y Afienza (1983, 1984) han determinado la existencia de híbridos entre diferentes especies: *N. oblicua* X *N. glauca* (*N. leoni*); *N. oblicua* X *N. alpina*; *N. dombeyi* X *N. nitida*; *N. dombeyi* X *N. betuloides*; *N. nitida* X *N. betuloides*. Los antecedentes existentes hasta el momento indican que el Raulí hybridaría en forma introgresiva principalmente con el Roble (*N. oblicua*), situación que se vería favorecida por el hecho de que ambas especies se encuentran asociados en gran parte de su distribución geográfica natural sin embargo, no se puede descartar que el Raulí se hibride con otros *Nothofagus* caducifolios.

No obstante, la hipótesis de hibridación debe ser evaluada más detalladamente, pues la mayoría de los estudios se han basado en caracteres morfológicos los cuales en plantas son muy afectados por el medio ambiente. Por lo tanto, sería interesante estudiar este proceso con marcadores genéticos. Al respecto, Gallo et al, (1997) es el único investigador que ha verificado la hibridación de *N. oblicua* y *N. alpina* utilizando marcadores genéticos (isoenzimas).

La importancia de la hibridación introgresiva radica en que, es una considerable fuente de variación, que favorece a las plantas en términos evolutivos. Se postula que puede promover fuertes ventajas selectivas ya que, se introducen características adaptativas de una especie a otra facilitando el establecimiento en nuevos hábitat (Stutz y Thomas, 1964; Stern y Roche, 1974). Generalmente los procesos de hibridación se asocian a hábitat con características intermedias o a ambientes alterados (Morales, 1987).

A pesar de todo, la hibridación sería un proceso poco frecuente, lo cual en cierta medida explicaría el hecho de que 2 especies simpátricas (como el Roble y Raulí) puedan mantener su identidad a pesar del intercambio genético (Ducouso et al, 1993).

4.3.2. Procesos evolutivos que afectan la distribución de la variabilidad genética.

Uno de los aspectos más interesantes de este estudio fue tratar de identificar y analizar los factores que influirían sobre la diferenciación interpoblacional.

Como ya se ha discutido anteriormente los atributos biológicos tendrían una gran influencia sobre los niveles de diferenciación poblacional, especialmente las características del sistema de reproducción, sin embargo Hamrick et al (1992) sostienen que ellos solo explican un 40% de los patrones de distribución de la variabilidad aloenzimática en plantas. Por consiguiente, la presencia de una moderada diferenciación genética en la poblaciones de Raulí ($F_{st}=5.1\%$, $G_{st}=6.4\%$), unida a la existencia de correlaciones significativas entre parámetros geográficos y algunas frecuencias alélicas, podrían en parte, estar reflejando la acción combinada de la mutación, migración, deriva genética, selección y factores históricos. Dentro de los factores históricos el último ciclo glacial/interglacial del Pleistoceno pueden haber jugado un importante papel, pues habría producido contracción y expansión de la vegetación. En tales condiciones la acción de eventos fundadores, cuellos de botella y migración poblacional después del cuello de botella o evento fundador pueden haber modificado las características genéticas de las poblaciones naturales. En la actualidad se sabe que dichos procesos, influyen

considerablemente sobre los procesos de diferenciación genética (Cwynar y MacDonal, 1987).

Sin embargo, es difícil determinar el grado de importancia y la relación existente entre dichos procesos. No obstante, en base a los resultados obtenidos en esta investigación y en base a los antecedentes existentes en la literatura se trató de discutir la influencia de los factores evolutivos sobre la diferenciación genética en las poblaciones de Raulí.

4.3.2.1 Influencia de la deriva genética y flujo génico: Uno de los aspectos que se debe discutir es la influencia de la deriva genética y el flujo génico sobre los niveles de diferenciación poblacional en el Raulí. Al respecto, se debe tratar de explicar la presencia de una moderada diferenciación interpoblacional a pesar del importante nivel de flujo genético que presentan sus poblaciones ($Nm=4.6$ migrantes por generación). Al respecto, teóricamente se sostiene que, 1 migrante por generación sería suficiente para mantener pequeñas diferencias en las frecuencias alélica entre poblaciones (Lewontin, 1974 citado por Varvio et al, 1986), contrarrestaría la pérdida de alelos por efecto de la deriva genética (Allendorf 1983 citado por Varvio et al, 1986), y por consiguiente se evitaría la diferenciación poblacional (Frankel y Soulé, 1984), situación que no se apreció cabalmente.

Varias líneas de evidencia permiten sugerir que en realidad la deriva genética estaría favoreciendo en parte la diferenciación genética, mientras que los importantes

niveles de flujo génico detectados estarían siendo sobrestimados por la metodología empleada:

a) Si se considera que los loci enzimáticos son selectivamente neutros, solo la deriva genética sería capaz de producir diferenciación entre poblaciones, siempre y cuando el flujo génico sea limitado.

b) En general se sostiene que el flujo génico mantendría frecuencias alélicas homogéneas entre poblaciones sin embargo, si existen subpoblaciones de tamaño finito, como sería el caso de la especie en estudio, la deriva genética puede originar diferencias aleatorias entre ellas inclusive con migración (Hedrick, 1985). Además, en un estudio de simulación Varvio et al (1986) indican que incluso en poblaciones grandes y continuas con 1 migrante por generación se producirían valores de diferenciación genética cercanos al 6%.

c) Que en realidad los niveles de flujo génico fueron sobrestimados. Esto se sustenta básicamente en 2 aspectos:

1.- Las características de la biología reproductiva del Raulí tales como: periodicidad en la producción de flores y frutos, escasa vagilidad y viabilidad de las semillas (Donoso, 1987, 1995; Donoso et al, 1991) y la ineficiencia del mecanismo de dispersión de polen que presentarían los *Nothofagus* chilenos (Riveros et al, 1996), permiten sugerir que los niveles de flujo génico pueden ser menores que los estimados en este estudio.

2.- El método utilizado para estimar flujo génico (Nm) estaría sobrestimando sus valores, puesto que las suposiciones en que se basa son muy irreales. Según Slatkin y

Barton (1989), este método calcula el número de migrantes por generación ($Nm = (1/F_{st} - 1) / 4$) asumiendo los siguientes supuestos:

- a) Modelo de estructura poblacional de Islas, donde los genes tiene la misma probabilidad de moverse entre poblaciones.
- b) Equilibrio entre deriva genética y flujo génico
- c) Marcadores genéticos selectivamente neutros
- d) Tasa de migración es muy superior a la tasa de mutación

a) En primer lugar no sería efectivo que las poblaciones naturales de Raulí se distribuyen espacialmente como en un modelo de islas, más bien ellas se distribuirían en forma continua en una dimensión, siguiendo la geografía del país. Si esto es cierto, la estructura espacial de las poblaciones de Raulí se ajustaría a un modelo continuo, definido por Wright como aislamiento por distancia (Wright, 1943, 1946 citado por Merzeau et al, 1994), el cual predice que para 2 individuos la probabilidad de aparearse esta inversamente relacionada con su separación geográfica.

Los resultados del análisis de correlación entre las distancias genéticas y geográficas permitieron verificar la existencia de aislamiento por distancia, lo que indicaría que las poblaciones más alejadas geográficamente tendrían una menor probabilidad de intercambiar genes entre sí, favoreciéndose el apareamiento entre individuos relacionados y la diferenciación interpoblacional por deriva genética. Además el modelo de Islas sostiene que todos los alelos tienen igual probabilidad de moverse entre poblaciones lo que no es cierto para el modelo de aislamiento por distancia, por consiguiente se estaría sobrestimando los valores de intercambio genético.

b) En segundo lugar, considerar que existe equilibrio entre deriva genética y flujo génico solo sería efectivo si las poblaciones naturales de Raulí se han mantenido genética y demográficamente estables en el tiempo. Ciertamente esto es muy difícil de sostener para el Raulí, debido a que se sabe que durante su historia evolutiva reciente ha pasado por procesos de contracción y expansión (Villagrán et al, 1996).

Además, teóricamente se sostiene que para que ambos procesos alcancen un estado de equilibrio se requerirían muchas generaciones. Al respecto, de los estudios de simulación de Varvio et al (1986) se desprende que, para que una población grande con 1 migrante por generación alcance el 95% de los valores de equilibrio entre la variabilidad genética perdida por deriva y la ganada por flujo génico, se requerirían aproximadamente 1000 generaciones, que para el Raulí se traducirían en 50.000 años (considerando 50 años por generación). Obviamente si consideramos que el último movimiento masivo de las poblaciones de Raulí comenzó aproximadamente hace 12000-15.000 años antes del presente, se encontrarían lejos de haber alcanzado un estado de equilibrio (Villagrán et al, 1991;1995).

c) En tercer lugar, los loci enzimáticos son considerados selectivamente neutros, por lo tanto, ellos serían marcadores genéticos que reflejarían los efectos de la selección sobre loci que afectan a la adecuación biológica (fitness). Sin embargo, los efectos directos de la selección sobre loci enzimáticos no pueden ser descartados absolutamente, debido a que todavía no se comprende cabalmente como sus diferentes formas afectan al fitness.

d) En cuarto lugar, F_{st} y N_m fueron calculados de acuerdo al modelo de infinitas islas para alelos neutrales de Wright, en cuyo caso los efectos de la mutación son despreciables pues, ambos parámetros serían independientes de la tasa de mutación (Crow y Aoki, 1984 citado por Slatkin y Barton, 1989). Sin embargo, en poblaciones finitas con tamaños poblacionales elevados la tasa de mutación podría ser importante debido a que existiría una mayor probabilidad de que un individuo sea afectado por la mutación y además la acumulación de diferentes mutaciones en las poblaciones puede conducir a su diferenciación si ellas se encuentran aisladas (Slatkin y Barton, 1989).

4.3.2.2 Influencia de la selección y la migración: Otro aspecto importante en esta investigación fue poder identificar indirectamente los efectos de la selección y los patrones de migración sobre la diferenciación interpoblacional. En este sentido, existía evidencia que indicaba que la selección podría estar afectando la diferenciación interpoblacional :

1.- Los 10 loci analizados en este estudio presentaron notables diferencias en los valores de N_m . En general se espera que diferentes loci den valores similares de N_m si es que ellos son afectados solo por la migración y deriva genética, de lo contrario se podría pensar en efectos selectivos (Slatkin, 1985, 1987; Slatkin y Barton, 1989).

2.- Aunque la diferenciación entre poblaciones fue moderada, 5 loci enzimáticos mostraron variación geográfica continua. Al respecto, la literatura generalmente señala que las variaciones geográficas de parámetros genético se asociarían fundamentalmente a

efectos selectivos (Comp,et al, Villani et al, 1992; Hasse, 1992; Michaud et al, 1995; Yacine y Lumaret, 1989).

Sin embargo, las evidencias de efectos selectivos no son totalmente convincentes, debido a que las variaciones Nm podrían ser un efecto del método empleado para calcularlas, como ya se ha discutido anteriormente. Además, patrones geográficos de frecuencias alélicas también pueden ser formados como consecuencia de dispersión a larga distancia a partir de diferentes recursos, en cuyo caso los eventos fundadores en el frente de migración y las sucesivas migraciones establecerían gradientes para las frecuencias alélicas (Cwynar y MacDonald, 1987). Zanetto y Kremer (1995) sugieren algunas consideraciones para diferenciar entre los efectos de la selección o migración. Ellos sostienen que las gradientes geográficas de las frecuencias alélicas serán explicadas:

- a- Por la selección, si se observa gradiente para diferentes loci, a lo largo de diferentes ejes geográficos.
- b.- Por migración a largas distancias, si diferentes loci varían a lo largo de un mismo eje geográfico.

Los resultados obtenidos para Raulí se orientarían principalmente hacia efectos migración debido a que en los 5 loci que mostraron una correlación significativa con parámetros geográficos la mayoría de sus frecuencias alélicas se relacionaron con la latitud (Tabla 12). No obstante, la presencia de efectos selectivos no puede ser

totalmente descartada pues se observaron gradientes en las frecuencias alélicas para otros ejes geográficos aunque de menor cuantía.

Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, sostener la presencia de efectos selectivos en las poblaciones de Raulí en base a marcadores genéticos debe tomarse con precaución ya que, por la naturaleza neutra de los loci enzimáticos la selección sólo actuaría sobre genes relacionados con la adecuación biológica de la especie. Además las correlaciones entre parámetros geográficos y loci enzimáticos no proporcionarían suficiente evidencia de que la selección este o haya actuado directamente sobre ellos debido a que, se debe dilucidar su base fisiológica y genética (Guries y Ledig (1982) citados por Gömöry, 1992).

4.3.3. Estructura genética e historia de vida

Un importante aspecto que indirectamente se estudió fue, los efectos del último ciclo glacial sobre los patrones de variabilidad aloenzimática y el movimiento de las poblaciones de Raulí durante ese período. En muchas publicaciones se hace referencia de los efectos catastróficos de la última glaciación sobre la flora y la fauna. Un ejemplo extremo fue reportado por Hasse (1992, 1993) para 5 especies de *Nothofagus* de Nueva Zelandia donde la intensa fragmentación y aislamiento habría conducido a una severa reducción de los niveles de variabilidad aloenzimática y en algunos casos habría producido una importantes diferenciación genética entre poblaciones.

En Chile los estudios palinológicos señalan que durante ese período, aproximadamente el 70% de la superficie actual cubierta por bosque, fue devastada por

el avance de los hielos glaciares a excepción de la Cordillera de la Costa, la que habría servido de refugio para las especies animales y vegetales. Específicamente el *taxon N. alpina-N. obliqua* (Raulí-Roble) se habría refugiado al norte de a región de Los Lagos, probablemente en la Cordillera de Nahuelbuta (37°-38° S) y parte de la Depresión Intermedia (Villagrán et al, 1991; 1996).

Los estudios realizados hasta el momento no dan una respuesta certera sobre la dinámica específica de los probables refugios del Raulí. Al respecto, la información paleobotánica que intenta reconstruir la composición florística de esa época se ha basado fundamentalmente en estudios palinológicos, metodología que desgraciadamente no permite diferenciar entre el polen de Raulí (*N.alpina*) y Roble (*N.obliqua*), impidiendo conocer los efectos que tuvo sobre cada especie. Por lo tanto, la estructura genética actual de las poblaciones de Raulí podría en parte, estar reflejando los efectos de la contracción y expansión de la vegetación durante la última glaciación.

En este sentido, los resultados permiten sugerir que los tamaños poblacionales del Raulí no fueron severamente reducidos ni sobrevivió en refugios aislados, con la excepción de las poblaciones de Las Trancas y El Colegual. Al respecto, varias líneas de evidencia indicarían que la mayoría de las poblaciones analizadas en este estudio se habrían originado a partir de una gran población, que se expandió a medida que las condiciones climáticas se lo permitieron:

a- Los elevados niveles de variabilidad genética y fundamentalmente la gran cantidad de alelos en baja frecuencia (<10%) solo podrían ser mantenidos en poblaciones grandes ya

que, evitarían la pérdida de variabilidad aloenzimática por efecto de la deriva genética (especialmente los alelos raros). Además, las tasas de mutación espontánea estimada para loci enzimáticos son muy bajas, del orden de 10^{-5} a 10^{-7} por locus por generación dependiendo del locus analizado (Nei, 1978). Por lo tanto, su efecto se apreciaría solo cuando poblaciones grandes las han acumulado por un largo período de tiempo (Hartl, 1987).

b- La moderada diferenciación interpoblacional sugeriría que las poblaciones no se mantuvieron en refugios aislados a excepción de las poblaciones de Las Trancas y El Colegual. Probablemente se mantuvieron con niveles de flujo génico importantes que impidieron que la deriva genética causara una mayor diferenciación.

Además, si se hubiesen reducido fuertemente los tamaños poblacionales y se hubiesen mantenido en refugios fragmentados y aislados sería factible esperar la presencia de alelos privativos asociados a ciertos grupos poblacionales específicos. Por consiguiente, se apreciarían los efectos de la disyunción geográfica sobre la diferenciación interpoblacional (Hase, 1992), aspecto que no se evidenció en este estudio. Si bien se apreciaron alelos privativos en algunas poblaciones estos estuvieron siempre en muy baja frecuencia, lo que podría indicar que su presencia o ausencia puede ser sólo un efecto de muestreo, pues existiría una baja probabilidad de detectarlos.

c- Si las poblaciones se mantuvieron fragmentadas y aisladas sólo una migración explosiva y un flujo genético intenso podrían haber eliminado los vestigios de diferenciación genética entre refugios. Como ya se ha señalado la reducida vagilidad y

viabilidad de las semillas, unido al ineficiente mecanismo de dispersión de polen hacen improbable este escenario. Un escenario más factible sería la presencia de una gran población que paulatinamente fue recolonizando a medida que el retroceso los hielos glaciares lo permitía.

4.3.3.1. Distancia genéticas y rutas de migración

En promedio las distancias genéticas obtenidas para las poblaciones de Raulí se encuentran dentro de las reportadas para razas locales ($D= 0.01-0.03$) y subespecies ($D= 0.05$) (Nei, 1987). Sin embargo, se apreciaron muchos valores inferiores a dichos rangos lo cual permite sugerir que, a excepción de las poblaciones de las Trancas y El Colegual, la mayoría de las poblaciones actuales se habrían formado a partir de una sola gran población ubicada en la Cordillera de la Costa durante la última glaciación. Por lo tanto, las diferencias entre los 3 primeros grupos indicados en el dendrograma se pueden haber producido por efecto de diferentes rutas de migración postglaciación. Por otro lado, las poblaciones de Las Trancas y El Colegual, presentaron distancias genéticas promedios ($D= 0.034$ y $D= 0.036$ respectivamente) superiores a los valores indicados para razas locales, lo cual las hace muy diferentes a las demás. Por lo tanto, ellas pueden representar a relictos que quedaron a medida que avanzó la glaciación.

En relación a estos antecedentes cabe hacerse la pregunta ¿Hace cuanto tiempo divergieron las poblaciones de Raulí?. Para responder esta pregunta hay que recurrir a referencias teóricas, las cuales pueden dar una aproximación al problema, estas consideran:

$$D = 2 \alpha t \quad (\text{Nei, 1987})$$

dónde, D = distancia genética.

α =tasa de sustitución de codones por locus por año que es detectable por electroforesis, correspondería aproximadamente a la tasa de mutación.

t =tiempo en años.

En base a estas relaciones empíricas tenemos que, si consideramos una tasa de mutación promedio para los loci enzimáticos de 10^{-6} por locus por año, el tiempo de divergencia entre las poblaciones de los 3 primeros grupos del dendrograma fluctuaría entre los 5000 a 12500 años antes del presente, lo cual es coincidente con los procesos de contracción y expansión del taxon *N. alpina*/*N. obliqua* ocurridos entre los 15000 a 3000 años antes del presente (Villagrán,1991,1996). Al hacer el mismo ejercicio con las poblaciones de Las Trancas y El Colegual tenemos que el tiempo de divergencia con respecto a todas las demás poblaciones sería alrededor de 17000 a 18000 años antes del presente sugiriendo que ambas poblaciones habrían quedado como relictos a medida que las demás poblaciones de Raulí avanzaban hacia el norte. Tales resultados coincidirían con los obtenidos por Villagrán, (1991) quien señala que durante el máximo glacial (28.000 a 14.000 AP) la taxa *N.oblicua*/*N.alpina* encontraba representada por trazas en la Región de los Lagos (X Región).

5.CONCLUSIONES

- Los niveles de variabilidad genética ($P= 92.8\%$; $A= 3.04$; $He= 28.2\%$) en las poblaciones de Raulí fueron superiores a los promedios estimados para algunas especies de la familia de las Fagaceas ($P=56.8\%$; $A=2.03$; $He= 19.5\%$) y para las especies vegetales en conjunto ($P=50.5\%$; $A=1.96$; $He= 14.9\%$).
- Los elevados niveles de variabilidad genética observados para las poblaciones de Raulí se basaron fundamentalmente en la presencia de alelos en baja frecuencia ($<10\%$).
- Alrededor de un 95% de la variabilidad aloenzimática detectada se distribuyó dentro poblaciones de Raulí y una menor proporción se distribuyó entre poblaciones (5%).
- Se apreció una generalizada deficiencia de heterocigotos ($Fis=0.186$), como frecuentemente se reporta para especies alógamas.
- Las poblaciones de Raulí presentaron una moderada diferenciación poblacional como se desprende de los estadígrafos Fst (5.11%), Gst (6.4%) y distancias genéticas promedio ($D= 0.0215$).
- El nivel de flujo génico estimado fue importante ($Nm= 4.6$ migrantes por generación), sin embargo, las suposiciones del método habitualmente utilizado para calcularlo son irreales, por lo cual se estaría sobrestimando.

- Los atributos biológicos del Raulí como distribución geográfica y sistema de reproducción permitieron predecir en términos generales la magnitud y distribución de la variabilidad aloenzimática.

- La estructura genética de las poblaciones de Raulí se explicaría fundamentalmente por el efecto combinado de sus atributos biológicos y factores evolutivos tales como: deriva genética, flujo génico, selección y los procesos de contracción y expansión de la vegetación durante última glaciación.

- Los elevados niveles de variabilidad genética, la presencia de una gran cantidad de alelos en baja frecuencia, la moderada diferenciación y las pequeñas distancias genéticas observadas en las poblaciones de Raulí permiten sugerir que, durante la última glaciación ellas no se mantuvieron en refugios fragmentados y aislados, si no se habrían mantenido como una gran población. Las poblaciones de Las Trancas y El Colegual serían la excepción, pues mostraron ser muy diferentes a todas las demás.

- Las poblaciones de Las Trancas y El Colegual corresponderían a relictos que quedaron resagados hace 17000-18000 años antes del presente a medida que las demás poblaciones se movían hacia el norte. Las trazas de polen identificadas por Villagrán (1991) en la X Región datadas para el período máximo glacial, podrían corresponder a ambas poblaciones. La divergencia genética de las otras poblaciones podría corresponder al efecto de diferentes rutas de migración postglaciación (15000 a 3000 años antes del presente).

6.BIBLIOGRAFIA

- Auer, V.** 1960. The quaternary history of Fuego-Patagonia. Proc.Roy.Soc.B. 152: 507-516.
- Barton, N., Holliday, R. y Hewitt, G.** 1983. Rare electrophoretic variants in a hybrid zone. Heredity 50: 139-146.
- Bacilieri, R., Roussel, G. y Ducouso, A.** 1993. Hybridization and mating systems in a mixed stand of sessile and pedunculate oak. Ann. Sci. For. 50(suppl. 1):122s-127s.
- Bacilieri, R., Labbe, T., Kremer, A.** 1994. Intraspecific genetic structure in a mixed population of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Q. robur* L. Heredity 73:130-141.
- Belletti, P. y Lanteri, S.** 1995. Allozyme variation among European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands in Piedemont, North-Western Italy. Silvae Genetica 45:33-37.
- Brown, A.** 1979. Enzyme polymorphism in plant population. Theoretical Population Biology 15:1-42.
- Brown, A. y Briggs, J.** 1991. Sampling strategies for genetic variation in ex situ collections of endangered plant species. 99-119p. In: Falk, A. y Holsinger, K. (eds.), Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York.
- Comps, B., Thiébaud, B., Paule, L., Merzeau, D. y Letouzey, J.** 1990. Allozymic variability in beechwoods (*Fagus sylvatica* L.) over central Europe: spatial differentiation among and within populations. Heredity 65:407-417.

- Comps, B., Thiébaud, B., Sugar, Y., Trinajstić, I. y Plazibat, M.** 1991. Genetics variation of croatian beech stands (*Fagus sylvatica L.*): spatial differentiation in connection with the environment. *Ann. Sci. For.* 48:15-28.
- Conkle, T.; Hodgkiss, P.; Nunnally, L. y Hunter, S.** 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. USDA, Forest Service.
- Conkle, T.** 1992. Genetic diversity- seeing the forest through the trees. *New Forests* 6:2-22.
- Cuguen, J., Merzeau, D. y Thiébaud, B.** 1988. Genetic structure of European beech stands (*Fagus sylvatica L.*): F-statistics and importance of mating systems characteristics in their evolution. *Heredity* 60: 91-100.
- Cwynar, L. y MacDonald, G.** 1987. Geographical variation of lodgepole pine in relation to population history. *Am. Nat.* 129 (3): 463-469.
- Daubree, JB. y Kremer, A.** Genetic and phenological differentiation between introduced and natural populations of *Quercus rubra L.* *Ann. Sci. For.* 50 (suppl. 1) 271s-280s.
- Dobzhansky, Th., Hunter, A., Pavlovsky, O., Spassky, B. y Wallace, B.** 1963. Genetics of natural populations XXXI. Genetics of an isolated marginal population of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 48: 91-104.
- Donoso, C.** 1975. Variabilidad de las poblaciones de *Nothofagus obliqua (Mirb.) Oerst.* en su área de distribución geográfica. *Bol. Téc. N° 32, Fac. de Cs. Forestales, Univ. de Chile.*

- Donoso, C.** 1975. Distribución ecológica de las especies de *Nothofagus* de la zona mesomórfica. Bol. Téc. N° 33, Fac. de Cs. Forestales, Univ. de Chile.
- Donoso, C.** 1981. Ecología Forestal. El bosque y su medio ambiente. Editorial Universitaria.
- Donoso, C.** 1982. Reseña ecológica de los bosques mediterráneos de Chile. Bosque 4 (2): 117-146.
- Donoso, C. y Atienza, J.** 1983. Hibridación natural en especies de *Nothofagus* siempre verde en Chile. Bosque 5(1): 21-34.
- Donoso, C. y Atienza, J.** 1984. Hibridación natural entre *N. betuloides* (Mirb.) Oerst. y *N. nitida* (Phil.) Krasser. Medio Ambiente 7(1): 9-16.
- Donoso, C.** 1987. Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. Bosque 8(2):85-97.
- Donoso, C., Morales, J. y Romero, M.** 1990. Hibridación natural entre Roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst) y Raulí (*N. alpina* (Poepp. y Endl.) Oerst.) en bosques del sur de Chile. Rev. Hist. Nat. 63:49-60.
- Donoso, C.** 1995. Bosques templados de Chile y Argentina: Variación, Estructura y Dinámica (3a ed.). 484p. Editorial Universitaria. Santiago, Chile.
- Ducousso, A., Michaud, H. y Lumaret, R.** 1993. Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. . Ann. Sci. For. 50(suppl. 1):91s-106s.
- Eaton, L., Carrasco, B. y Pineda, G.** 1998. Inbreeding in outcrossing populations: heterozygote deficiency and genetic structure in a natural population of Raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl. (Oerst) Heredity (enviada).

- Elena-Rossello, J. y Cabrera, E.** 1996. Isozyme variation in natural populations of cork-oak (*Quercus suber L.*): Population structure, diversity, differentiation and gene flow. *Silvae Genetica* 45:229-235.
- Falk, D.** 1991. Joining biological and economic models for conserving plant genetic diversity. 209-223p. In: Falk, A. y Holsinger, K. (eds.). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York.
- Frankel, O. y Soulé, M.** 1981. *Conservation and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gallo, L., Marchelli, P. y Breitenbücher, A.** 1997. Morphological and allozymic evidence of natural hybridization between two southern beeches (*Nothofagus spp.*) and its relation to heterozygosity and height growth. *Forest Genetics* 4(1): 15-23.
- Gömöry, D., Vysny, J. y Comp, B.** 1992. Geographical patterns of genetics differentiation and diversity in european beech (*Fagus sylvatica L.*) populations in France. *Biológia (Bratislava)* 47(7):571-579.
- Gottlieb, L.** 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216:373-380.
- Gregorius, H., Krauhausen, J., Müller-Starck, G.** 1986. Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in a stand of *Fagus sylvatica L.* *Heredity* 57:255-262.
- Guttman, S. y Weigt, L.** 1989. Electrophoretic evidence of relationships among *Quercus* (oaks) of eastern North America. *Can. J. Bot.* 67:339-351.
- Hamrick, J.** 1979. Relationships between life history characteristic and electroforetically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10:173-200.

- Hamrick, J.** 1982. Plant population genetic and evolution. *Amer. J. Bot.* 69(10): 1685-1693.
- Hamrick, J. y Godt, M.** 1990. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A; Clegg, M.; Kahler, A. y Weir, B. *Plant population, Genetics, Breeding and Genetics Resources*. 449p. Sinauer Ass. Inc. Massachuset.
- Hamrick, J. y Godt, M., Murawski, D. y Loveless, M.** 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology. 75-86p. In: Falk, A. y Holsinger, K. (eds.). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York.
- Hamrick, J. y Godt, M. y Sherman-Broyles, S.** 1992. Factors influencing level of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6:95-124.
- Hartl, D.** 1987. *A primer of population genetics* (2ed.). Sinauer Associates Inc. Publisher, Massachusetts.
- Hasse, P.** 1992. Isozyme variability and biogeography of *Nothofagus truncata* (Fagaceae). *New Zealand Journal of Botany* 30:315-328.
- Hasse, P.** 1993. Isozyme studies of New Zealand *Nothofagus* species (Southern beech) using leaf extracts. *Silvae Genetica* 42:46-51.
- Hedrick, P.** 1985. *Genetics of Populations*. Jones and Burtlett Publishers, Boston.
- Heusser, C.** 1983. Quaternary pollen record from Laguna de Tagua-Tagua, Chile. *Science* 219: 1429-1432.

- Hokanson, S., Isebrands, J., Jensen, R. y Hancock, F.** 1993. Isozyme variation in oaks of the Apostle Island in Wisconsin: genetic structure and levels of inbreeding in *Quercus rubra* and *Q. ellipsoidalis*. *Am. J. Bot.* 80(11): 1349-1357.
- Holsinger, K. y Gottlieb, D.** 1991. Conservation of rare plant and endangered plants: Principles and prospects. 195-208p. In: Falk, A. y Holsinger, K. (eds.). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York.
- Houston, D. y Houston, D.** 1994. Variation in American beech (*Fagus grandifolia Ehrh.*): Isozyme analysis of genetic structure in selected stands. *Silvae Genetica* 43:277-284.
- Howard, D., Preszler, L. Williams, J., Fenchel, S. Y Boecklen, W.** 1997. How discrete are oak species?. Insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Quercus gambelii*. *Evolution* 51(3): 747-755.
- Huang, H., Dane, F. y Norton, J.** 1994. Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea spp.*). *Theor. Appl. Genet* 88: 981-985.
- Jensen, R., Hokanson, S., Isebrands, J. y Hancock, F.** 1993. Morphometric variation oaks of the Apostle Island in Wisconsin: Evidence of hybridization between *Quercus rubra* and *Q. Ellipsoidalis* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 80(11):1358-1366.
- Kleinschmit, J.** 1993. Intraespecific variation of growth and adaptive traits in European oak species. *Ann. Sci. For.* 50(suppl 1): 166s-185s.
- Kleinschmit, J., Bacilieri, R., Kremer, A. y Roloff, A.** 1995. Comparison of morphological and genetic traits of pedunculate oak (*Q. robur L.*) and sessile oak (*Q. petraea (Matt.) Liebl.*). *Silvae Genetica* 44 (5-6): 256-269.

- Könnert, M.** 1995. Investigations on the genetic variation of beech (*Fagus sylvatica L.*) in Bavaria. *Silvae Genetica* 44:346-350.
- Lamborot, M. y Eaton, L.** 1992. Concordance of morphological variation and chromosomal races in *Liolaemus monticola* (*Tropiduridae*) separated by riverine barriers in the Andes. *Zool. Syst. Evolut* 30: 189-200.
- Leonardi, S. y Menozzi, P.** 1995. Genetic variability of *Fagus sylvatica L.* in Italy: The role of postglacial recolonization. *Heredity* 75:35-44.
- Leonardi, S. y Menozzi, P.** 1996. Spatial structure of genetic variability in natural stands of *Fagus sylvatica L.* (beech) in Italy. *Heredity* 77:359-368.
- Li, C. y Hordvitz, D.** 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am. J. Hum. Genet.* 5:107-117.
- Lewontin, R. y Hubby, J.** 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity variations and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54:595-609.
- Löchelt, S. y Franke, A.** 1995. Bestimmung der genetischen konstitution von buchenbeständen (*Fagus sylvatica L.*) entlang eines höhentransektes von freiburg auf den schauinsland. *Silvae Genetica* 44(5-6): 312-318.
- Manos, P. y Fairbrothers, D.** 1987. Allozyme variation in populations of six northeastern american red oaks (Fagaceae: *Quercus* subg. *Erythrobalanus*). *Syst. Bot.* 12(3): 365-373.
- Merzeau, D., Comps, B., Thiébaud, B., Cuguen, J. y Letouzey, J.** 1994. Genetic structure of natural stands of *Fagus sylvatica L.* (beech). *Heredity* 72:269-277.

- Michaud, H., Toumi, L., Lumaret, R., Li, T., Romane, F. y Di Giusto, F.** 1995. Effect of geographical discontinuity on genetic variation in *Quercus ilex* L (holm-oak). Evidence from isozyme polymorphism. *Heredity* 74: 590-606.
- Morales, J.** 1987. Hibridación natural entre Roble (*Nothofagus oblicua* (Mirb.) Oerst) y Raulí (*N. alpina* (Poepp. y Endl.) Oerst.). Tesis UACH, Valdivia Chile 84p.
- Müller, C.** 1952. Ecological control of hybridation in *Quercus* : A factor in the mechanism of evolution. *Evolution* 13:152-184.
- Müller-Starck, G., Herzog, S. y Hattemer, H.** 1993. Intra- and interpopulation genetic variation in juvenile populations of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. *Ann. Sci. For.* 50(suppl. 1): 233s-244s.
- Nei, M.** 1972. Genetic distance between population *Am. Nat.* 106:283-292.
- Nei, M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:3321-3323.
- Nei, M.** 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations *Ann. Hum. Genet.* 41:225-233.
- Nei, M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M.** 1987. *Molecular evolutionary genetics.* Columbia University Press, New York.
- Ormazabal, C. y Benoit, T.** 1987. El estado de conservación del género *Nothofagus* en Chile. *Bosque* 8(2):109-120.

- Raymond, M y Rousset , F.** 1997. GENEPOP 3.1, versión adaptada de GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* (1995) 86:248-249.
- Riveros, M., Paredes, M., Rosas, M., Cardenas, E., Armesto, J., Arroyo, M. y Palma, B.** 1995. Reproductive biology in species of the genus *Nothofagus*. *Env. Exp. Bot* 35(4):519-524.
- Rushton, B.** 1993. Natural hybridization within the genus *Quercus L.* *Ann. Sci. For.* 50 (suppl 1): 73s-90s.
- Scandalios, J.** 1974. Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 25: 225-258.
- Schwarzmann, J. y Gerhold, H.** 1991. Genetic structure and mating system of Northern red oak (*Quercus rubra L.*) in Pennsylvania. *Forest Science* 37(5):1376-1389.
- Schnabel, A. y Hamrick, J.** 1993. Comparative analysis of population genetic structure in *Quercus macrocarpa* and *Q. Gambelii* (Fagaceae). *Syst. Bot.* 15(2)240-251.
- Schwarzmann, J. y Gerhold, H.** 1991. Genetic structure and mating system of Northern red oak (*Quercus rubra L.*) in Pennsylvania. *Forest Science* 37(5):1376-1389.
- Slatkin, M.** 1985. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Sys.* 16:393-430.
- Slatkin, M.** 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- Slatkin, M. y Barton 1989.** A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43(7): 1349-1368.

- Sneath, P. y Sokal, R.** 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco.
- Sokal, R. y Rolf, F.** 1973. Biometry. San Francisco: Freeman Press. 887p.
- Sork, V., Huang, S. y Wiener, E.** 1993. Macrogeographic and fine scale genetic structure in North American oak species, *Quercus rubra* L. Ann. Sci. For. 50 (suppl. 1):261s-270s.
- Stebbins, L.** 1950. Variation and evolution in plant. Columbia University Press, New York.
- Stern, K. y Roche, L.** 1974. Genetics of forest ecosystems. Ecological studies 6. Springer-Verlag. New York, Heidelberg, Berlin.
- Stutz, H. y Thomas, L.** 1964. Hybridation and introgression in *Cowania* and *Purshia*. Evolution 18: 73-74.
- Stuiver, M., Mercer, J. y Moreno, H.** 1975. Erroneous date for chilean glacial advance. Science 188:73-74.
- Swofford, D y Selander, R.** 1981. BIOSIS-1: a FORTRAN programe for the comprehensive analysis for electrophoretic data in population genetics and systematics. J. Heredity 72: 281-283.
- Takahashi, M. , Tsumura, Y., Nakamura, T., Uchida, K. y Ohba, K.** 1994. Allozyme variation of *Fagus crenata* in northeastern Japan. Can. J. For. Res. 24: 1071-1074.
- Thiebaut, B., Cuguen, J. Comps, B. y Merzeau, D.** 1990. Genetic differentiation in beech (*Fagus sylvatica* L.) during periods of invasion and regeneration. In: Di Castri, F.,

- Hansen, A. y Debussche, M. (eds). Biological invasions in Europe and Mediterranean Basin, 379-390p. Kluwer Academic Publishers, London.
- Steinhoff, S.** 1993. Results of species hybridization with *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Ann. Sci. For. (suppl. 1): 137s-143s.
- Varvio, S-L., Chakraborty, R. y Nei, M.** 1986. Genetic variation in subdivided population and conservation. Heredity 57: 189-198.
- Villagrán, C.** 1991. Historia postglacial del bosque templado de Chile. Rev. Chilena de Historia Natural 64(3):447-460.
- Villagrán, C.; Moreno, P. y Villa, R.** 1996. Antecedentes palinológicos acerca de la historia cuaternaria de los bosques chilenos. 51-69p. In: Armesto, J.; Villagrán, C. y Arrollo, M. Ecología de los bosques nativos de Chile. 469p. Editorial Universitaria. Santiago, Chile.
- Villani F., Paglucci, M., Benedettelli, S. y Cherubini, M.** 1991. Genetic differentiation among turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. Heredity 66: 131-136.
- Villani F., Paglucci, M., Lanteri, M. y Cherubini, M.** 1992. Congruence between genetic, morphometric, and physiological data on differentiation of turkish chestnut (*Castanea sativa*). Genome 35: 251-256.
- Weeden, N y Wendel, J.** 1989. Genetics of plant isozymes 46-71p. In: Soltis, D y Soltis, P. (eds). Isozymes in plant biology Vol.4. Dioscorides Press, Oregon.
- Weir, B. y Cockerham, C.** 1984. Estimating F statistics for the analysis of populations structure. Evolution 36: 1358-1370.

Workman, P. y Niswander, J. 1970. Population studies on southwestern indian tribes.

II. Local genetic differentiation in the Papago. *Am. J. Hum. Genet.* 22:24-49.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.

Yacine, A. y Lumaret, R. 1989. Genetic diversity in holm-oak (*Quercus ilex L.*):

Insight from several enzyme markers. *Silvae Genetica* 38:140-148.

Zanetto, A. Kremer, A. 1995. Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea (Matt.) Liebl.* I. Monolocus patterns of variation *Heredity* 75:506-517.

ANEXOS

Anexo 1. Características de las poblaciones muestradas en la Región del Maule.

VII Región del Maule: En la región del Maule se tomaron muestras de 3 poblaciones Curico, Agua Fría y Radal-7Tasas todas ellas cercanas a la Cordillera de los Andes.

a) **Curicó:** Población ubicada en el camino hacia el pueblo de Potrero grande a 17Km de Romeral, exposición Noroeste.

Renoval asociado a Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Roble (*Nothofagus oblicua*), Canelo (*Drimys winteri*), Lingue (*Persea lingue*), Avellano (*Gevuina avellana*), Radal (*Lomatia hirsuta*).

b) **Agua Fría:** Población ubicada a 17.5Km. al este de la bifurcación con el camino a Radal-7Tasa, exposición Sur-Sur Este.

Renoval remanente rodeado por plantaciones de *Pinus radiata* propiedad de Forestal Millahue). La vegetación nativa predominante en el lugar estaba contituída por Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Roble (*Nothofagus oblicua*), Lingue (*Persea lingue*), Avellano (*Gevuina avellana*), Radal (*Lomatia hirsuta*).

c) **Radal-7Tasas:** Población ubicada a la entrada al parque Radal-7Tasas, frente al retén de carabineros, ladera Norte,

Bosque mixto constituido principalmente por Canelo (*Drimys winteri*), Roble (*Nothofagus oblicua*), Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Arrayán (*Luma apiculata*), Radal (*Lomatia hirsuta*), Avellano (*Gevuina avellana*).

Anexo 2. Características de las poblaciones muestradas en la Región del Bío-Bío

VIII Región del Bío-Bío: Se muestrearon 4 poblaciones cercanas a la Cordillera de los Andes (San Fabian A, San Fabian B, Recinto y Monte León) y 2 poblaciones fueron muestradas en la Cordillera de la Costa (Chacay-Nahuel y Nahuelbuta).

a) **San Fabian A:** Población ubicada a 22Km. al Este del retén de San Fabian de Alico, exposición Sur.

Renoval, la mayoría de tocón asociado principalmente con Canelo (*Drimys winteri*), Roble (*Nothofagus oblicua*), Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Avellano (*Gevuina avellana*), Maqui (*Aristotelia chilensis*), Laurel (*Laurelia sempervirens*), *Sophora sp.*

b) **San Fabian B:** Población ubicada 13Km. al Oeste del retén de San Fabian de Alico, camino a San Carlos, exposición Sureste.

Renoval, la mayoría de tocón asociado principalmente Roble (*Nothofagus oblicua*), Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Avellano (*Gevuina avellana*), Maqui (*Aristotelia chilensis*), Laurel (*Laurelia sempervirens*), *Sophora sp.*

c) **Recinto:** Población ubicada en el camino a Chillán, aproximadamente a 4,5Km. del pueblo de Recinto, exposición Sur-Sureste.

Renoval asociado principalmente a Roble (*Nothofagus oblicua*), Lingue (*Persea lingue*) y Avellano (*Gevuina avellana*).

d) Monte León: Población ubicada a 37Km. al Este de Pemuco, exposición Sureste. Renoval remanente asociado a Avellano (*Gevuina avellana*), Laurel (*Laurelia sempervirens*), Roble (*Nothofagus oblicua*), Lingue (*Persea lingue*).

e) Chacay-Nahuel: Bosque asociado principalmente a Roble (*Nothofagus oblicua*), Boldo (*Peumus boldo*), Luma (*Amomyrtus luma*), Litre (*Lithraea caustica*), Lingue (*Persea lingue*).

f) Nahuelbuta: Población ubicada aproximadamente a 1.5Km. hacia el Sureste de la entrada al Parque Nacional Nahuelbuta, exposición Sur. Renoval de entre 15-20 años asociado principalmente a Roble (*Nothofagus oblicua*), Luma (*Amomyrtus luma*), Litre (*Lithraea caustica*).

Anexo 3. Características de las poblaciones muestradas en la Región de la Araucanía.

IX Región de la Araucanía: En la región de la Araucanía se muestreó 1 población de la Cordillera de la Costa (Vega Blanca) y 6 poblaciones cercanas a la Cordillera de los Andes (Malleco A, Malleco B, Selva Oscura, Curacautin, Malalcahuello, Melipeuco).

a) Vega Blanca: Bosque asociado principalmente a Roble (*Nothofagus oblicua*), Luma (*Amomyrtus luma*), Boldo (*Peumus boldus*), Litre (*Lithraea caustica*), Canelo (*Drimys winteri*).

b) Malleco B: Población ubicada camino a Inspector Fernandez a 39 Km. hacia el Este de la panamericana, exposición Noroeste. Renoval de aproximadamente 15-20 años asociado principalmente a Roble (*Nothofagus oblicua*), Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Lingue (*Persea lingue*), Avellano (*Gevuina avellana*) y Notro (*Embothrium coccineum*).

c) Malleco A: Población ubicada camino a Inspector Fernández a 53 Km. hacia el Este de la panamericana, exposición Noroeste. Bosque grande asociado a Roble (*Nothofagus oblicua*), Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Laurel (*Laurelia sempervirens*), Matico (*Buddleja globosa*)

d) Selva Oscura: Población ubicada camino a Selva oscura, 16Km. hacia el sur del camino Victoria-Curacautín, exposición Sureste. Renoval de 40-50 años de edad asociado fundamentalmente con Roble (*Nothofagus oblicua*), Olivillo (*Aextoxicom punctatum*) y Lingue (*Persea lingue*),.

e) Curacautin: Población ubicada a 14Km. hacia el Este de la salida de Curacautín, camino hacia el Volcán Lonquimay, exposición Suroeste. Renoval de 30-40 años de edad asociado a Roble (*Nothofagus oblicua*), Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Lingue (*Persea lingue*), Quila (*Chusquea quila*) y Notro (*Embothrium coccineum*).

f) **Malalcahuello:** Población ubicada camino a Curacautín-Lonquimay, 3 Km. hacia el Este del camino que se dirige al Túnel las Raíces, exposición Sureste. Bosque asociado principalmente a Coigüe (*Nothofagus dombeyi*)

g) **Melipeuco:** Población ubicada camino a Icalma, 6Km. hacia el Este del puente Tracura, exposición Noroeste. Bosque asociado principalmente a Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Laurel (*Laurelia sempervirens*) y Notro (*Embothrium coccineum*).

Anexo 4. Características de las poblaciones muestradas en la Región de los Lagos.

X Región de los Lagos: En la región de los Lagos se muestrearon 2 poblaciones de la Cordillera de la Costa (Las Trancas, El Colegual) y 1 población cercana a la Cordillera de los Andes (Neltume).

a) **Las Trancas:** Población ubicada aproximadamente a 30Km. al Oeste de las Unión, exposición. Predio de Forestal Valdivia. Renoval asociado a Roble (*Nothofagus oblicua*), Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Lingue (*Persea lingue*), Canelo (*Drimis Winteri*).

b) **El Colegual:** Población ubicada a 37Km. desde Purranque hacia la Costa, específicamente se localiza frente a la escuela del Colegual, sector con lomajes suaves. Renoval de diversas edades asociado a Roble (*Nothofagus oblicua*), Coigüe (*Nothofagus dombeyi*), Lingue (*Persea lingue*), Canelo (*Drimis Winteri*), Arrayán (*Luma apiculata*).

Anexo 5. Formulación de los Buffer de cámara y Buffer de gel para el sistema de gel A: Constituido por las enzimas AAP, AAT, ACP y PGI.

ENZIMAS	BUFFER DE GEL A	BUFFER DE CAMARA A
AAP: Alanina aminopeptidasa, AAT: Aspartato aminotransferasa, ACP: Fosfatasa ácida, PGI: Fosfogluco isomerasa	Tris citrato pH 8.3 +62.0g Trizma base +14.6g ácido cítrico +10.0lt agua destilada +Almacenar a temperatura ambiente	Borato de litio pH 8.3 +12.0g hidróxido de litio +118.9g ácido bórico +10.0lt agua destilada +Almacenar a temperatura ambiente

Anexo 6. Formulación de los Buffer de cámara y Buffer de gel para el sistema de gel D: Constituido por las enzimas MDH, MNR y SKDH.

ENZIMAS	BUFFER DE GEL D	BUFFER DE CAMARA D
MDH: Deshidrogenasa málica, MNR: Menadione reductasa, SKDH: Shikimato deshidrogenasa	Morfolina citrato pH 6.1 +15.4g ácido cítrico +2.0lt de agua destilada +Disolver el ácido cítrico y citrato a pH 6.01 en 20ml N-(3-aminopropil) morfolina. Mantener el buffer refrigerado a 4°C.	Morfolina citrato pH 6.1 +15.4g ácido cítrico +2.0lt de agua destilada +Disolver el ácido cítrico y citrato a pH 6.01 en 20ml N-(3-aminopropil) morfolina. Mantener el buffer refrigerado a 4°C.

Anexo 7. Formulación de los Buffer de cámara y Buffer de gel para el sistema de gel H: Constituido por las enzimas PER, LAP, FEST

ENZIMAS	BUFFER DE GEL H	BUFFER DE CAMARA H
PER: Peroxidasa LAP: Leucina aminopeptidasa FEST: Esterasa Fluorescente	Histidina pH 8.0 +1.05g/lt D-L-histidina - HCl monohidrato. Ajustar a pH 8.0 con NaOH 4N. Mantener a temperatura ambiente.	Citrato de Sodio pH 8.0 +103.0g Citrato de Sodio en 1 lt de agua destilada. Ajustar a pH 8.0 con ácido cítrico 0.4M.

Anexo 8. Formulación de los Buffers de tinción.

BUFFER	pH	FORMULACION	
Buffer acetato ACP	4.0	Acetato de sodio trihidrato	2.43g
		Ac. acético glacial	4.70ml
		Clruo de magnesio 1.0M	5.00ml
		Agua destilada	1.00lt
Buffer aminopeptidasa	4.5	Trizama base	12.10g
		Anhídrido maleico	9.80g
		Hidróxido de sodio	1.60g
		Agua destilada	1.00lt
Buffer peroxidasa	5.6	Ac. arsénico sal de sodio	5.74g
		Ac. acético glacial	1.20ml
		Agua destilada	1.00ml
Buffer fosfato 0.2M	7.5	Fosfato de sodio monobásico	3.84g
		Fosfato de sodio dibásico	23.86g
		Agua destilada	1.00lt
Buffer tris hidroclicídrico 1.0M *	8.0	Trizma base	74.00g
		Trizma hidroclicídrico	61.40g
		Agua destilada	1.00lt

*Diluir esa solución a las concentraciones especificadas en el protocolo de tinción.

Anexo 9. Procedimientos de tinción para el sistema de gel A: Constituido por las enzimas AAP, AAT, ACP y PGI

ENZIMAS	BUFFER DE TINCIÓN	COMPONENTES DE LA TINCIÓN	PROCEDIMIENTO
ACP:Fosfatasa ácida	80ml de buffer Acetato ACP	+100mg --naftil ácido fosfato +100mg.de Sal Fast Garnet	Mezclar bien los componentes de la tinción con el buffer. Desarrollar a temperatura ambiente. Incluir el corte catodal.
PGI:Fosfogluco isomerasa	75ml de buffer tris HCL 0.05M pH 8.0	+25mgD-fructosa 6 fosfato +1ml Solución MgCl ₂ 1% +1ml NADP +1ml NBT +0.5ml PMS +20u G6PDH	Adicionar los componentes a buffer tibio. Adicionar al gel e incubar en oscuridad.

continuación Anexo 9.

AAP: Alanina aminopeptidasa	75ml de buffer aminopeptidasa	+30mg L-alanina - naftilamida disuelta en 2ml de dimetilsulfóxido +20mg de Sal Fast Black K	adicionar los componentes al buffer de tinción e incubar el gel en oscuridad
AAT: Aspartato aminotransferasa	25ml de buffer fosfato (0.2M) pH 7.5	+0.8ml de solución piridoxal 5-fosfato 5% (0.5g/100ml agua destilada) +1.6ml solución de albúmina de bovino 3.0% (3g/100ml agua destilada) +6.8ml ácido L-aspartico 0.2M (ajustar a pH 7.5 con 2N KOH) +2.0ml solución de-ketoglutarato +120mg de Sal Fast Blue BB disuelta en 8ml de agua destilada.	Combinar los primeros 4 componentes con el buffer de tinción y al momento de teñir adicionar la solución de Fast Blue BB a los componentes de la solución. Adicionar al gel y desarrollar a temperatura ambiente. Incluir el corte catodal.

Anexo 10. Procedimiento de tinción para el sistema de gel D: Constituido por las enzimas MDH, MNR y SKDH.

ENZIMAS	BUFFER DE TINCIÓN	COMPONENTES DE LA TINCIÓN	PROCEDIMIENTO
MDH: Deshidrogenasa málica	75ml de buffer tris HCL 0.05M pH 8.0	+5ml Solución de ácido málico (134.1g ácido DL-málico, 80g NaOH, 1.0lt agua destilada, ajustar a pH 7.0 con alrededor de 18ml de NaOH 4N) +1ml NAD +1ml NBT ó MTT +0.5ml PMS	Adicionar los componentes al buffer de tinción e incubar el gel en oscuridad
MNR: Menadione reductasa	75ml de buffer tris HCL 0.05M pH 7.0	+25mg NADH +20mg Menadione +1ml NBT	Adicionar los componentes al buffer de tinción e incubar el gel en oscuridad
SKDH: Shikimato deshidrogenasa	75ml de buffer tris HCL 0.05M pH 8.0	+100mg ácido shikimico +1ml NADP +1ml NBT +0.5ml PMS +20u G6PDH	Adicionar los componentes al buffer de tinción e incubar el gel en oscuridad

Anexo 11. Procedimiento de tinción para el sistema de gel H: Constituido por las enzimas PER, LAP, FEST.

ENZIMAS	BUFFER DE TINCIÓN	COMPONENTES DE LA TINCIÓN	PROCEDIMIENTO
PER:Peroxidasa	75ml buffer peroxidasa	+2 ml Solución CaCl ₂ 0.1M +50mg de 3-amino9-etil carbazol disuelto en 5 ml de N,N-dimetilformamida +1ml H ₂ O ₂ 3%	Adicionar los componentes al buffer justo antes de tefir. Adicionar al gel y tefir a temperatura ambiente.
LAP:Leucina aminopeptidasa	75ml de buffer aminopeptidasa	+5ml solución L-leucina - naftilamida 4% (400mg/100ml agua destilada) +20mg Sal Black K	Adicionar los componentes al buffer tibio e incubar el gel a temperatura ambiente
FEST:Esteras Fluorescente	5ml buffer peroxidasa	+3ml de solución 4-metilumbeliferil acetato (1mg disuelto en 1.5 ml acetona	Adicionar solución al buffer y esparcir homogéneamente sobre el gel. Observar las bandas en el gel después de 5 minutos bajo luz UV.

Anexo 12. Frecuencias alélicas de 10 loci enzimáticos en 18 poblaciones de Raulí
(*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl. (Oerst))

Locus	Población								
	CU	AF	RA	NA	CN	VB	FB	FA	RE
MNR									
(N)	44	38	38	20	38	43	41	35	37
1	.034	.026	.026	.000	.184	.047	.012	.057	.014
2	.636	.750	.513	.600	.526	.686	.390	.414	.486
3	.114	.079	.184	.050	.039	.058	.146	.129	.122
4	.216	.145	.263	.350	.250	.209	.451	.400	.378
5	.000	.000	.013	.000	.000	.000	.000	.000	.000
6	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
MDH									
(N)	44	38	37	20	38	43	32	34	48
1	.045	.118	.081	.050	.132	.081	.078	.029	.073
2	.318	.408	.230	.375	.342	.384	.219	.147	.229
3	.625	.382	.581	.575	.421	.500	.594	.529	.583
4	.011	.092	.108	.000	.105	.035	.109	.294	.115
5	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
PER2									
(N)	24	47	46	20	38	43	39	35	47
1	.000	.021	.000	.075	.066	.140	.000	.000	.000
2	.917	.649	.663	.775	.816	.616	.974	1.000	1.000
3	.083	.330	.315	.150	.118	.221	.026	.000	.000
4	.000	.000	.022	.000	.000	.023	.000	.000	.000
PER3									
(N)	24	48	48	20	38	43	41	36	48
1	.000	.000	.031	.025	.000	.012	.000	.000	.000
2	1.000	.979	.896	.975	.961	.860	.976	.986	.969
3	.000	.021	.052	.000	.000	.035	.024	.014	.031
4	.000	.000	.021	.000	.039	.093	.000	.000	.000
PER4									
(N)	24	48	48	20	38	43	41	36	48
1	.000	.000	.000	.000	.026	.000	.012	.000	.000
2	1.000	.875	.896	1.000	.961	.907	.927	.972	.979
3	.000	.104	.094	.000	.013	.093	.024	.028	.021
4	.000	.021	.010	.000	.000	.000	.037	.000	.000
AAP									
(N)	44	39	34	20	38	42	38	25	32
1	.068	.141	.059	.050	.013	.036	.092	.240	.188
2	.864	.718	.765	.925	.829	.845	.553	.460	.594
3	.068	.026	.029	.025	.158	.119	.355	.300	.219
4	.000	.115	.147	.000	.000	.000	.000	.000	.000
GOT									
(N)	44	8	13	20	38	43	35	26	26
1	.102	.000	.000	.075	.092	.081	.000	.019	.000
2	.080	.125	.000	.050	.000	.058	.057	.096	.077
3	.807	.688	.923	.875	.908	.860	.929	.808	.846
4	.011	.188	.077	.000	.000	.000	.014	.077	.077
SKDH									
(N)	44	28	19	20	32	41	21	25	28
1	.091	.036	.026	.000	.078	.049	.000	.020	.018
2	.852	.946	.974	.925	.859	.841	.786	.900	.929
3	.023	.018	.000	.075	.047	.085	.214	.080	.054
4	.034	.000	.000	.000	.016	.024	.000	.000	.000
ACP									
(N)	44	44	42	20	38	43	41	36	47
1	.034	.125	.060	.050	.053	.093	.000	.000	.085
2	.943	.830	.881	.950	.947	.884	1.000	1.000	.830
3	.023	.045	.024	.000	.000	.023	.000	.000	.085
4	.000	.000	.036	.000	.000	.000	.000	.000	.000
PGI									
(N)	43	43	47	20	38	43	41	36	46
1	.047	.000	.000	.050	.066	.081	.073	.069	.033
2	.023	.058	.128	.025	.053	.070	.012	.014	.022
3	.930	.919	.851	.875	.829	.791	.902	.889	.880
4	.000	.023	.021	.050	.053	.058	.012	.028	.065

CU=Curico;AF=Agua Fria;RA=Radal-Tasas;NA=Nahuelbuta;CN=Chacay-Nahuel;VB=Vega Blanca;FB=San Fabian B;FA=San Fabian A;RE=Recinto.

Continuación del Anexo 12.

Población									
Locus	ML	MB	MA	SO	CU	MH	MP	LT	EC
MNR									
(N)	39	48	43	36	44	42	47	39	40
1	.103	.021	.035	.000	.011	.012	.011	.000	.000
2	.538	.500	.523	.653	.648	.631	.585	.372	.800
3	.064	.021	.047	.014	.023	.024	.032	.013	.150
4	.295	.458	.384	.319	.318	.333	.372	.603	.050
5	.000	.000	.012	.014	.000	.000	.000	.000	.000
6	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.013	.000
MDH									
(N)	37	47	40	28	40	39	45	39	41
1	.095	.064	.087	.036	.100	.013	.122	.000	.000
2	.243	.287	.200	.089	.275	.154	.144	.103	.098
3	.608	.606	.688	.768	.512	.654	.644	.872	.902
4	.054	.043	.025	.107	.100	.179	.089	.026	.000
5	.000	.000	.000	.000	.013	.000	.000	.000	.000
PER2									
(N)	40	48	43	41	43	41	48	39	41
1	.000	.000	.000	.134	.000	.098	.031	.000	.110
2	.800	.917	.965	.646	.965	.695	.854	.962	.854
3	.200	.083	.035	.085	.035	.024	.042	.038	.037
4	.000	.000	.000	.134	.000	.183	.073	.000	.000
PER3									
(N)	40	48	43	39	44	42	48	39	41
1	.000	.010	.000	.000	.000	.000	.021	.026	.049
2	1.000	.979	.988	.923	.977	.952	.948	.923	.829
3	.000	.010	.012	.051	.011	.012	.031	.051	.122
4	.000	.000	.000	.026	.011	.036	.000	.000	.000
PER4									
(N)	40	48	43	41	44	42	48	39	41
1	.000	.000	.000	.000	.011	.012	.000	.000	.000
2	.988	.885	.919	.878	.920	.810	.990	.744	1.000
3	.013	.073	.012	.073	.011	.119	.010	.064	.000
4	.000	.042	.070	.049	.057	.060	.000	.192	.000
AAP									
(N)	30	45	41	34	44	42	44	39	32
1	.183	.133	.280	.029	.068	.250	.057	.051	.109
2	.533	.522	.549	.897	.648	.643	.739	.756	.781
3	.283	.344	.171	.074	.284	.107	.205	.192	.109
4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
AAT									
(N)	28	45	27	10	41	27	38	32	41
1	.000	.011	.037	.200	.012	.037	.066	.000	.232
2	.018	.089	.074	.000	.134	.074	.132	.141	.110
3	.893	.844	.870	.800	.841	.852	.803	.828	.659
4	.089	.056	.019	.000	.012	.037	.000	.031	.000
SKDH									
(N)	40	29	18	7	7	30	21	39	38
1	.025	.017	.000	.071	.000	.033	.000	.000	.092
2	.962	.914	.917	.929	.857	.767	.667	.756	.895
3	.013	.069	.083	.000	.143	.133	.310	.192	.000
4	.000	.000	.000	.000	.000	.067	.024	.051	.013
ACP									
(N)	40	48	43	41	44	42	48	39	41
1	.000	.000	.000	.037	.045	.024	.000	.013	.000
2	1.000	.917	1.000	.963	.932	.976	1.000	.910	1.000
3	.000	.063	.000	.000	.023	.000	.000	.038	.000
4	.000	.021	.000	.000	.000	.000	.000	.038	.000
PGI									
(N)	40	48	43	38	44	42	45	38	41
1	.050	.031	.058	.092	.102	.071	.122	.039	.000
2	.000	.000	.023	.053	.023	.048	.100	.000	.012
3	.925	.938	.895	.829	.830	.881	.767	.934	.963
4	.025	.031	.023	.026	.045	.000	.011	.026	.024

ML=Monte León;MB=Malleco B;MA=Malleco A;SO=Selva Oscura;CU=Curacautín;
MH=Malalcahuello;MP=Melipeuco;LT= Las Trancas;EC=El Colegual.

Anexo 13 Resultados del análisis de significancia para los estadígrafos Fis, Fst y Fit según los métodos de Li y Harvitz, (1953) y Workman y Neiswander, (1970). Se detallan los valores de Chi Cuadrado (X^2), Grados de Libertad (g.l) y Probabilidad (P).

	MNR-1	MDH-2	PER-2	PER-3	PER-4	AAP-1	AAT-	SKDH-	ACP-	PGI-	Promedio
Fis	0.177	0.274	0.316	0.109	0.024	0.139	0.198	0.134	0.201	0.099	0.186
X^2	111.0	207.2	216.7	25.97	1.31	38.9	63.4	42.5	89.5	21.9	
g.l	15	10	6	6	6	6	6	6	6	6	
P	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.001**	0.97ns	0.001**	0.0001**	0.001**	0.0001**	0.002**	
Fit	0.216	0.308	0.391	0.133	0.069	0.199	0.217	0.174	0.230	0.113	0.227
X^2	165.9	260.9	330.8	38.9	10.5	78.5	76.2	71.6	118.0	28.0	
g.l	15	10	6	6	6	6	6	6	6	6	
P	0**	0**	0**	0.001**	0.11ns	0**	0**	0**	0**	0.001**	
Fst	0.048	0.046	0.109	0.027	0.046	0.068	0.024	0.046	0.037	0.015	0.051
X^2	33.9	253.9	472.4	119.6	202.0	271.7	77.1	217.7	165.8	64.0	
g.l	85	68	51	51	51	51	51	51	51	51	
P	0**	0**	0**	0.001**	0**	0**	0.01**	0**	0**	0.1ns	

ns = no significativo, **= Altamente significativo (P<0.01).

1 = $X^2 = Nt^2 F(k-1); g.l = k(k-1)/2$ (Li y Harvitz (1953))

2 = $X^2 = 2 Nt Fst(k-1); g.l = (k-1) (s-1)$ (Workman y Neiswander, 1970)

k = Número de alelos; s = Número de subpoblaciones; Nt = Número total de individuos

Anexo 14. Matriz de coeficientes de distancia genética, bajo la diagonal: Distancia modificada de Rogers (Wright, 1978), sobre la diagonal: Distancia genética no sesgada de Nei (1978).

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	*****	0.019	0.015	0.001	0.006	0.01	0.023	0.028	0.012	0.014	0.018	0.014	0.013	0.008	0.017	0.015	0.033	0.017
2	0.141	*****	0.012	0.015	0.021	0.011	0.056	0.051	0.034	0.023	0.036	0.038	0.035	0.027	0.032	0.047	0.076	0.045
3	0.125	0.118	*****	0.008	0.013	0.01	0.033	0.037	0.022	0.014	0.026	0.025	0.016	0.025	0.022	0.032	0.045	0.038
4	0.07	0.137	0.109	*****	0.003	0.001	0.025	0.035	0.016	0.015	0.019	0.017	0.008	0.01	0.016	0.015	0.033	0.028
5	0.091	0.141	0.116	0.086	*****	0.005	0.021	0.027	0.016	0.012	0.019	0.02	0.019	0.008	0.022	0.018	0.044	0.04
6	0.112	0.112	0.106	0.088	0.09	*****	0.039	0.049	0.03	0.021	0.03	0.031	0.012	0.017	0.02	0.023	0.054	0.033
7	0.144	0.21	0.166	0.154	0.138	0.178	*****	0.004	0.005	0.01	0.003	0.006	0.039	0.005	0.019	0.01	0.016	0.052
8	0.157	0.203	0.174	0.176	0.153	0.196	0.084	*****	0.003	0.01	0.007	0.006	0.043	0.01	0.02	0.022	0.032	0.051
9	0.112	0.169	0.14	0.13	0.123	0.158	0.089	0.08	*****	0.007	0.002	0.002	0.03	0.003	0.017	0.017	0.024	0.037
10	0.119	0.15	0.12	0.126	0.113	0.14	0.107	0.106	0.093	*****	0.003	0.004	0.025	0.007	0.015	0.021	0.035	0.035
11	0.13	0.173	0.149	0.138	0.131	0.158	0.075	0.093	0.07	0.076	*****	0.002	0.031	0.003	0.017	0.019	0.018	0.044
12	0.116	0.182	0.149	0.132	0.135	0.164	0.09	0.092	0.073	0.08	0.072	*****	0.025	0.005	0.009	0.014	0.018	0.031
13	0.12	0.175	0.128	0.112	0.135	0.119	0.181	0.189	0.161	0.152	0.164	0.151	*****	0.024	0.01	0.019	0.032	0.016
14	0.101	0.156	0.147	0.116	0.101	0.129	0.091	0.108	0.079	0.099	0.079	0.089	0.15	*****	0.013	0.006	0.025	0.034
15	0.133	0.164	0.139	0.137	0.139	0.132	0.136	0.137	0.128	0.124	0.125	0.109	0.111	0.119	*****	0.012	0.025	0.03
16	0.122	0.191	0.161	0.128	0.128	0.14	0.108	0.142	0.127	0.139	0.129	0.119	0.137	0.093	0.11	*****	0.021	0.033
17	0.166	0.238	0.187	0.117	0.187	0.202	0.125	0.165	0.144	0.171	0.129	0.13	0.166	0.149	0.149	0.137	*****	0.052
18	0.125	0.197	0.181	0.161	0.183	0.17	0.205	0.204	0.176	0.172	0.189	0.164	0.129	0.171	0.164	0.169	0.204	*****