



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

“Variación y diferenciación genética de *Nothofagus alpina*: proyecciones para su domesticación y análisis de sus estrategias evolutivas en el contexto del cambio climático global”



TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

Autor: Lic. Virginia Gisela Duboscq Carra

Director: Dr. Mario J. Pastorino

Codirector: Dr. Federico J. Letourneau

2018

RESUMEN

En el contexto del cambio climático global, entender cómo reaccionarán los bosques y plantaciones forestales a los rápidos cambios climáticos futuros es uno de los mayores desafíos para los biólogos e ingenieros forestales. En Patagonia actualmente las plantaciones forestales se llevan a cabo con coníferas exóticas y con un exclusivo fin productivo, ocasionando un gran impacto en los ecosistemas naturales. En este sentido, la domesticación de especies nativas con alta calidad maderera podría ser la clave para cumplir el doble propósito de plantar para la producción y para la restauración de ecosistemas forestales degradados. Para esto debemos contar con material genético adaptado no sólo al clima actual, sino con la capacidad de adaptarse a los veloces cambios climáticos en curso. *Nothofagus alpina* (Raulí) es una especie de árbol angiosperma nativa de la Patagonia, muy valorada no sólo por su importancia ecológica en los bosques que conforma sino también por su utilidad como especie maderable. Hasta el momento este uso se restringe a la extracción directamente del bosque. El objetivo de este trabajo es analizar la variación y diferenciación genética de poblaciones naturales argentinas de *N. alpina* en caracteres cuantitativos con el fin de aportar información para la domesticación de esta especie, así como para ayudar al entendimiento de las posibles estrategias evolutivas de sus poblaciones naturales. Creemos que la variación y diferenciación genética en caracteres fuertemente susceptibles al efecto de procesos de selección direccional (*caracteres de fitness*) es amplia, mientras que en los menos susceptibles a este efecto (*caracteres morfológicos*) la variación y la diferenciación genética son restringidas.

La tesis se organiza en seis capítulos; el **Capítulo 1** corresponde a la introducción con el marco teórico necesario para el estudio y con los objetivos, general y específicos, así como la hipótesis formal. Le sigue un capítulo de metodología general (**Capítulo 2**), presentando los dos ensayos evaluados: 1) el Ensayo Principal ubicado en el paraje Las Golondrinas, de carácter permanente y constituido por 1290 plantas producidas de semillas, correspondientes a 86 familias de polinización abierta provenientes de ocho poblaciones naturales, y 2) un Ensayo Complementario, de carácter temporario, constituido por 592 plantas producidas de semillas, correspondientes a 74 familias de polinización abierta provenientes de siete poblaciones naturales. En este capítulo también se detallan los análisis estadísticos generales a utilizar y el cálculo de los parámetros genéticos.

El **Capítulo 3** se focaliza en las mediciones realizadas en el Ensayo Complementario sobre plantines producidos en vivero y descalzados luego de una temporada de crecimiento. Se midieron relaciones alométricas entre caracteres de tallo y raíz, se analizó la varianza mediante modelos lineales mixtos y se calcularon los parámetros genéticos intra e inter-poblacionales. En general la variación intrapoblacional fue baja (h^2 media = 0,20 y CV_A media = 14,65), mientras que la diferenciación inter-poblacional fue moderada (Q_{ST} medio = 36 %). De acuerdo con las comparaciones *post hoc*, Tromen es la población más diferente, y según el análisis de componentes principales (ACP) las poblaciones Tromen y Paimún son las más diferentes entre sí. Dado que las correlaciones genéticas aditivas fueron en general mayores que las correlaciones fenotípicas, las correlaciones ambientales resultaron ser bajas, lo que destaca la posibilidad de utilizar una combinación de varios de

estos rasgos como criterios de selección temprana.

Los Capítulos 4 y 5 se centran en las mediciones realizadas en los árboles juveniles del Ensayo Principal. El **Capítulo 4** analiza caracteres de crecimiento, con mediciones de altura y diámetro a la altura del cuello (DAC). Se analizó la varianza del proceso de crecimiento mediante modelos lineales mixtos de medidas repetidas y mediante modelos lineales mixtos sobre parámetros de curvas de crecimiento individuales ajustadas por regresión a un modelo sigmoideal (Boltzmann). Se registró baja variación genética intra-poblacional en el crecimiento de altura y DAC en general para todos los años medidos, y también baja diferenciación entre poblaciones. Las estimaciones de heredabilidad en general, fueron menores a las calculadas para plantines en vivero en el Capítulo 3. En el **Capítulo 5** se estudian caracteres morfológicos, fenológicos y fisiológicos. Se analizó la varianza a través de modelos lineales mixtos y lineales mixtos generalizados, en el caso de caracteres binomiales. Los caracteres de supervivencia, índice de ramosidad, índice de esbeltez y presencia de hojas marcescentes se midieron cuatro años seguidos en la temporada invernal, y en todos ellos se encontraron diferencias significativas entre los años, pero no se encontró una interacción significativa entre año y población. El valor de los parámetros genéticos calculados sobre el mismo ensayo durante diferentes años fue muy variable tanto intra como inter-poblacionalmente. La variación intra-poblacional en los caracteres fenológicos, fisiológicos y morfológicos de hoja medidos en una temporada fue de moderada a baja en la mayoría de ellos, excepto en apertura de yema, donde la heredabilidad fue alta ($h^2_{media} = 0,61$). Por otro lado la diferenciación entre poblaciones fue baja o nula, excepto para el valor del índice de contenido de clorofila (SPAD) donde fue alto ($Q_{ST}^{media} = 77\%$).

En el **Capítulo 6** se realiza un análisis multivariado (ACP) entre todos los caracteres medidos del Ensayo Principal y se unifica la información de los capítulos anteriores para abordar la conclusión final del trabajo. En el ACP se evidenció principalmente un contraste entre la población Boquete y el resto de las poblaciones, a diferencia del análisis realizado para el Ensayo Complementario. Los dos ensayos mostraron varianzas intra-poblacionales bajas en la mayoría de los caracteres, evidenciando una baja adaptabilidad de todas las poblaciones. Por otro lado, el patrón de diferenciación general encontrado para la especie es bajo. Sin embargo resaltan varios caracteres importantes para la producción donde la diferenciación encontrada es relevante para la adaptabilidad y supervivencia de los árboles. Se destacan el momento de apertura de yemas y el inicio de crecimiento en altura, que para forestaciones en ambientes fríos deberían considerarse, seleccionando las poblaciones Tromen Alto, Tromen Bajo y Tren Tren. Asimismo, para ambientes con estrés hídrico debería considerarse la longitud de raíz específica y la relación entre biomasa de raíz y biomasa aérea, y en base a estos caracteres debería seleccionarse la población Tromen Alto.

SUMMARY

In the context of global climate change, understanding how forests and forest plantations will react to rapid future climate change is one of the biggest challenges for forest biologists and foresters. In Patagonia, forest plantations are currently carried out with exotic conifers and with an exclusively productive purpose, causing a great impact on natural ecosystems. In this sense, the domestication of native species with high timber quality could be the key to fulfill the dual purpose of planting for production and for the restoration of degraded forest ecosystems. For this we must have genetic material adapted not only to the current climate, but with the ability to adapt to the rapid climate changes underway. *Nothofagus alpina* (Raulí) is an angiosperm tree native to the Patagonia, highly valued not only for its ecological importance in the forests it forms but also for its usefulness as a timber species. So far this use is restricted to extraction directly from the forest. The aim of this work is to analyze the variation and genetic differentiation of Argentinean populations of *N. alpina* in quantitative traits in order to provide information for the domestication of this species, as well as to help understanding the possible evolutionary strategies of their natural populations. I expect that the variation and genetic differentiation in traits strongly susceptible to the effect of processes of directional selection (*fitness* traits) are wide, while in those less susceptible to this effect (morphological traits) variation and genetic differentiation are restricted.

This thesis is organized into six chapters; **Chapter 1** corresponds to the introduction with the theoretical framework necessary for the study and with the general and specific objectives, as well as the formal hypothesis. It is followed by a general methodology chapter (**Chapter 2**), presenting the two evaluated trials: 1) the Main Trial located in Las Golondrinas, of a permanent nature and made up of 1290 plants produced from seeds, corresponding to 86 families of open pollination from eight natural populations, and 2) a Complementary Trial, of temporary character, constituted by 592 plants produced from seeds, corresponding to 74 families of open pollination from seven natural populations. In this chapter we also detail the general statistical analyzes to be used and the calculation of the genetic parameters.

Chapter 3 focuses on the measurements made in the Complementary Trial on seedlings produced in the nursery and removed from their pots after a growing season. Allometric relationships among traits of stem and root were measured, variance was analyzed by mixed linear models and intra- and inter-population genetic parameters were calculated. In general, the intra-population variation was low ($h^2_{\text{mean}} = 0.20$ and $CV_{A\text{mean}} = 14.65$), while the inter-population differentiation was moderate ($Q_{ST\text{mean}} = 36\%$). According to the *post hoc* comparisons, Tromen is the most different population, and according to the multivariate analysis (PCA) Tromen and Paimún populations are the most different from each other. Since the additive genetic correlations were generally greater than the phenotypic correlations, the environmental correlations turned out to be low, which highlights the possibility of using a combination of several of these traits as early selection criteria.

Chapters 4 and 5 focus on the measurements made on the juvenile trees of the Main Trial. **Chapter 4** analyzes growth traits, with repeated measurements of height and collar diameter (CD). The variance of the growth process was analyzed by means of mixed linear models of repeated measurements and by means of linear mixed models on parameters of individual growth curves adjusted by regression to a sigmoidal model (Boltzmann). Low intra-population genetic variation was recorded in height growth and CD in general for all years measured, and also low differentiation between populations. Estimates of heritability in general were lower than those calculated for seedlings in nursery in Chapter 3, showing a low genetic control for the traits studied in this trial. In **Chapter 5**, morphological, phenological and physiological traits are studied. The variance was analyzed through mixed linear, and generalized mixed linear models in the case of binomial traits. The traits of survival, branching index, slenderness index and presence of marcescent leaves were measured during four years in the winter season, and in all of them significant differences were found between the years, but no significant interaction was found between year and population. Both inter- and intra-population genetic parameters calculated on the same trial were very variable among years. The intra-population variation in the phenological, physiological and morphological leaf traits measured in one season was moderate to low in most of them, except in bud burst, where the heritability was high ($h^2_{\text{mean}} = 0.61$). On the other hand, the differentiation between populations was low or null, except for the chlorophyll content index (SPAD) which was high ($Q_{ST\text{mean}} = 77\%$).

In **Chapter 6**, a multivariate analysis (PCA) is performed among all the measured characters of the Main Trial, and the information of the previous chapters is unified to address the final conclusions of the work. The PCA evidenced mainly a contrast between Boquete and the rest of the populations, unlike the analysis made for the Complementary Trial. The two trials showed low intra-population variances in most of the traits, showing a low adaptability for all populations. On the other hand, the general differentiation pattern found for the species is low. However, several important traits for afforestation stand out since the differentiation they cause is relevant for the adaptability and survival of the trees. For cold environments, the populations Tremen Alto, Tremen Bajo and Tremen Tren should be selected considering the moment of buds burst and the beginning of growth in height. For environments with water stress, the specific root length and the relationship between root biomass and aboveground biomass should be considered, and based on these traits, Tremen Alto population should be selected.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
CAPÍTULO 1. Introducción.....	14
1.1. MARCO TEÓRICO.....	14
1.2. OBJETO DE ESTUDIO.....	19
1.3. OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
1.4. HIPÓTESIS.....	25
CAPÍTULO 2. Generalidades metodológicas.....	26
2.1. ENSAYOS.....	26
Ensayo Principal.....	28
Ensayo Complementario.....	34
2.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS EN EL ENSAYO PRINCIPAL DURANTE EL PERIODO DE MEDICIÓN.....	35
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
2.4. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS CUANTITATIVOS.....	38
Valor fenotípico y valor mejorante.....	38
Variación genética intra-poblacional.....	39
Variación genética entre poblaciones.....	41

Correlaciones fenotípicas y genéticas entre caracteres	43
Plasticidad fenotípica y normas de reacción.....	44
CAPÍTULO 3. Caracteres morfológicos en plantines.....	46
3.1. INTRODUCCIÓN	46
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.3. RESULTADOS	49
3.4. DISCUSIÓN	53
CAPÍTULO 4. Crecimiento en plantas juveniles	56
4.1. INTRODUCCIÓN	56
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.3. RESULTADOS	63
Variables de crecimiento medidas en invierno.....	63
Tasa de Crecimiento diaria (2014-2015 y 2015-2016).....	71
Parámetros de las curvas individuales de crecimiento	75
4.4. DISCUSIÓN	82
CAPÍTULO 5. Caracteres morfológicos, fenológicos y eco-fisiológicos en plantas juveniles.....	87
5.1. INTRODUCCIÓN	87
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	90
5.3. RESULTADOS	99
Supervivencia y caracteres arquitecturales	99
Caracteres fenológicos.....	105
Caracteres de hojas Preformadas y Neoformadas.....	110
Caracteres eco-fisiológicos.....	115

5.4.	DISCUSIÓN	117
CAPÍTULO 6. Discusión y Conclusiones finales.....		122
6.1.	CORRELACIONES Y ANÁLISIS MULTIVARIADO DEL ENSAYO PRINCIPAL.....	122
6.2.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....		141
AGRADECIMIENTOS		155
ARTÍCULO DE RESPALDO.....		157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Poblaciones de <i>N. alpina</i> incluidas en el ensayo principal.	29
Tabla 2. Poblaciones de <i>N. alpina</i> utilizadas en el Ensayo Complementario.....	47
Tabla 3. Parámetros genéticos y estadísticos de todos los caracteres medidos en cada población natural de <i>N. alpina</i> incluidas en el Ensayo Complementario.....	51
Tabla 4. Correlación fenotípica (arriba de la diagonal) y correlación genética aditiva (debajo de la diagonal) entre caracteres morfológicos de plántulas de <i>N. alpina</i> (error estándar entre paréntesis).....	52
Tabla 5. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para altura acumulada en cm para cada año de medición en cada población natural de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.	66
Tabla 6. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para diámetro a la altura del cuello (DAC) acumulado para cada año de medición en cada población natural de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.....	68
Tabla 7. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para Crecimiento Relativo (CR) en altura (%) para cada año de medición en cada población natural de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.....	69
Tabla 8. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para Crecimiento Relativo (CR) en diámetro a la altura del cuello (DAC) (%) para cada año de medición en cada población natural de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.	70
Tabla 9. Correlación entre altura y diámetro acumulados de todos los años medidos.....	71
Tabla 10. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para las variables tasa diaria de crecimiento en altura (TCd Alt) para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y tasa diaria de crecimiento en DAC (TCd DAC), para cada una de las poblaciones naturales de <i>N. alpina</i> incluidas en el ensayo principal.....	74
Tabla 11. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el inicio del crecimiento (t_{10}) en Alt para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y en DAC 2014-2015 para cada	

una de las poblaciones naturales de <i>N. alpina</i> incluidas en el ensayo principal. ...	77
Tabla 12. Tabla de grados día necesarios para el inicio de crecimiento en altura en las temporadas de crecimiento 2014-2015 y 2015-2016.....	78
Tabla 13. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el fin de crecimiento (t_{90}) en Alt para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y en DAC 2014-2015 para cada una de las poblaciones naturales de <i>N. alpina</i> incluidas en el ensayo principal. ...	79
Tabla 14. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el momento en el que se alcanza la mitad de crecimiento (t_{50}) en Alt para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y en DAC 2014-2015 para cada una de las poblaciones naturales de <i>N. alpina</i> incluidas en el ensayo principal.....	81
Tabla 15. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el parámetro S de las curvas de crecimiento en Alt para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y en DAC 2014-2015 para cada una de las poblaciones naturales de <i>N. alpina</i> incluidas en el ensayo principal.	82
Tabla 16. Tabla de poblaciones y familias incorporadas en el sub-muestreo para mediciones fisiológicas.....	96
Tabla 17. Caracteres analizados en el Capítulo 5 con sus respectivas abreviatura, unidad y distribución.....	98
Tabla 18. Número y porcentaje acumulado de plantas vivas por año de <i>N. alpina</i> en el Ensayo Principal.	100
Tabla 19. Parámetros genéticos calculados para la supervivencia de las plantas para los años comprendidos entre 2012 y 2017 para cada población de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.	100
Tabla 20. Número y porcentaje de plantas que presentaron hojas marcescentes en cada año en el Ensayo Principal.	101
Tabla 21. Parámetros genéticos calculados para la presencia de hojas marcescentes para los años 2014, 2015, 2016 y 2017 para cada población natural de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.	102

Tabla 22. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el Índice de Ramosidad (IR) (cm.r ⁻¹) para los años 2014, 2015, 2016 y 2017 para cada población natural de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.....	103
Tabla 23. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el Índice de Esbeltez [cm/mm] (IE) para los años 2014, 2015, 2016 y 2017 para cada población natural de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.	105
Tabla 24. Días julianos, fecha y grados días para la apertura de yema apical promedio de cada población de <i>N. alpina</i> en el Ensayo Principal.	106
Tabla 25. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para caracteres fenológicos de la temporada de crecimiento 2015-2016 para cada población natural de <i>N. alpina</i> incluida en el Ensayo Principal.....	109
Tabla 26. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para caracteres morfológicos de hoja pre y neoformada para cada una de las poblaciones naturales de <i>N. alpina</i> incluidas en el Ensayo Principal.	113
Tabla 27. Correlación entre variables morfológicas de los dos tipos de hoja (Preformadas y Neoformadas).....	115
Tabla 28. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para caracteres eco-fisiológicos de cada una de las poblaciones naturales de <i>N. alpina</i> incluidas en el Ensayo Principal.	116
Tabla 29. Correlación entre variables fenológicas y morfológicas relevantes medidas en la misma temporada de crecimiento (2015-2016).	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de diferentes factores genéticos y ambientales que contribuyen al fenotipo de un árbol (modificado de White et al. 2007).....	18
Figura 2. Mapa de distribución de poblaciones naturales de <i>N. alpina</i>	27
Figura 3. Foto satelital del Ensayo Principal (rectángulo delimitado con líneas negras). ...	29
Figura 4. Foto del Ensayo Principal. Noviembre de 2012. Se ven la media sombra y los protectores individuales.....	32
Figura 5. Detalle de una planta con el protector individual en Noviembre 2012.	32
Figura 6. Foto del Ensayo Principal. Julio de 2014. Detalle de mulching de aserrín.	33
Figura 7. Foto de una planta del Ensayo Principal. Enero 2016.	33
Figura 8. Foto del Ensayo Principal, medición diámetro. Septiembre 2016	34
Figura 9. Foto del Ensayo Complementario.....	35
Figura 10. Representación gráfica conceptual de las normas de reacción.	45
Figura 11. Gráfico de ACP de <i>N. alpina</i> del Ensayo Complementario.....	50
Figura 12. Gráfico de interacción entre años de medición (2014-2017) y la media de crecimiento en altura por población.	64
Figura 13. Gráfico de cajas con la mediana y extremos de altura para cada población en cada año.	65
Figura 14. Gráfico de interacción entre años de medición (2014-2017) y la media de crecimiento en diámetro del cuello (DAC).	67
Figura 15. Gráfico de cajas con la mediana y extremos de diámetro el cuello (DAC) para cada población en cada año.	67
Figura 16. Gráfico de crecimiento en altura comparando las dos temporadas medidas....	72
Figura 17. Gráfico de crecimiento en altura por población para la temporada 2014-2015. .	73
Figura 18. Gráfico de crecimiento en altura por población para la temporada 2015-2016. .	74

Figura 19. Gráfico de crecimiento en DAC por población para la temporada 2014-2015....	75
Figura 20. Fotografías de los estadios de apertura de yema.....	92
Figura 21. Proceso de “impresión” de estomas sobre película de esmalte	94
Figura 22. Foto del campo visual en el microscopio óptico donde se visualizan los estomas entre las células epidérmicas.	95
Figura 23. Gráfico de correlación entre el contenido total de clorofila y el valor de SPAD medido con Clorofilio ® para hojas de <i>N. alpina</i>	97
Figura 24. Porcentaje de supervivencia acumulada de plantas de cada población de <i>N. alpina</i> por cada año.....	100
Figura 25. Gráfico extraído de la prueba post hoc de Tukey del modelo realizado para todos los años del Índice de Ramosidad.....	103
Figura 26. Gráfico de cajas con los predictores de fecha de apertura de yema apical para cada población del Ensayo Principal.....	107
Figura 27. Proporción de individuos de cada población con sólo hojas preformadas (Pref; en rojo) y con hojas preformadas y neoformadas (Neof; en azul).....	108
Figura 28. Hojas escaneadas de un mismo individuo, a la izquierda se muestran hojas neoformadas y a la derecha hojas preformadas.....	110
Figura 29. Gráficos de interacción entre tipo de hoja y las poblaciones de <i>N. alpina</i> del Ensayo Principal para la media de: área foliar específica (AFE), área foliar (AF), relación longitud/ancho (LAN) y densidad estomática (DE).	111
Figura 30. Gráfico de ACP dimensiones 1 y 2 del Ensayo Principal de <i>N. alpina</i>	125
Figura 31. Gráfico de ACP dimensiones 2 y 3 del Ensayo Principal de <i>N. alpina</i>	126
Figura 32. Correlación entre altitud del sitio de origen y la media poblacional de la apertura de yema en días julianos (DJY3).....	127
Figura 33. Correlación entre altitud del sitio de origen y la media poblacional del inicio de senescencia foliar (DJ10SF).....	128

Figura 34. Correlación entre altitud del sitio de origen y la media poblacional del fin de senescencia foliar (DJ90SF).....	128
Figura 35. Correlación entre temperatura media en Julio del sitio de origen (°C) y la media poblacional de la apertura de neoformación en días julianos (DJneof).....	129
Figura 36. Correlación entre latitud del sitio de origen y la media poblacional de densidad estomática (DE) de hojas preformadas.....	129
Figura 37. Correlación entre altitud del sitio de origen y la media poblacional de la forma de la curva de crecimiento en altura 2014-2015 (parámetro S).	130
Figura 38. Correlación entre longitud (O) del sitio de origen y la media poblacional de la altura (Alt) de las plantas en 2016.....	130
Figura 39. Correlación entre temperatura media de enero del sitio de origen (°C) y la media poblacional de altura (Alt) de las plantas en 2016.....	131
Figura 40. Correlación entre temperatura media anual del sitio de origen (°C) y la media poblacional del diámetro a la altura del cuello (DAC) de las plantas en 2016. .	131
Figura 41. Correlación entre temperatura media en enero del sitio de origen (°C) y la media poblacional del diámetro a la altura del cuello (DAC) de las plantas en 2016.....	132
Figura 42. Correlación entre temperatura media en julio del sitio de origen (°C) y la media poblacional del diámetro a la altura del cuello (DAC) de las plantas 2016.	132

CAPÍTULO 1. Introducción

1.1. MARCO TEÓRICO

Estudios palinológicos y filogeográficos demuestran que las especies de árboles forestales de zonas templadas han experimentado históricamente numerosos cambios ambientales en el pasado (Bryson et al. 1970; Brewer et al. 2002; Petit et al. 2002; Magri et al. 2006), incluso en Patagonia (Premoli et al. 2000; Pastorino and Gallo 2002; Marchelli and Gallo 2006; Millerón et al. 2008; Azpilicueta et al. 2009; Pastorino et al. 2009). Sin embargo la respuesta que podrían tener a cambios ambientales futuros todavía no es clara (Kremer 2007; Aitken et al. 2008; Marchelli et al. 2017). Si bien las especies arbóreas actuales fueron capaces de sobreponerse a los cambios ambientales del pasado y adaptarse a las nuevas condiciones (Kremer et al. 2010), hoy en día, el Cambio Climático (CC) causado por las actividades humanas está ocurriendo a una velocidad sin precedentes (IPCC 2014) y podría superar la velocidad de adaptación que poseen los árboles. Por lo tanto numerosos trabajos se han concentrado en estudiar la capacidad de los árboles para responder al CC (Saxe et al. 2001; Lindner et al. 2010).

Los aumentos en temperatura y variación climática predichos en el contexto del CC (IPCC 2014) están asociados con futuros incrementos en frecuencia, magnitud y duración de eventos climáticos extremos, tales como tormentas, olas de calor y períodos de sequía extrema (Dai 2011; Smith 2011). Estos eventos son importantes en la dinámica de los ecosistemas forestales, caracterizados por la longevidad de sus principales componentes: los árboles (Bréda et al. 2006; Pretzsch et al. 2013). Hay dos mecanismos mediante los cuales las plantas pueden persistir in situ ante estos eventos: cambiando sus frecuencias genéticas de una generación a otra como resultado de la selección natural (a lo que llamamos adaptación), o modificando la expresión fenotípica de su acervo genético (a lo que llamamos plasticidad fenotípica). El primer mecanismo se basa en la diversidad genética, mientras que el segundo lo hace en cierta capacidad que tiene todo genoma de expresar un rango de fenotipos (siendo el fenotipo el conjunto de las características de un individuo que se pueden medir u observar), en función de las condiciones ambientales a

las que está sometido, a través de un proceso al que llamamos de “aclimatación” en contraposición a la “adaptación” que implica un cambio genético entre generaciones (Scheiner 1993; Pigliucci 2006).

En los ecosistemas, si bien están constituidos por numerosas especies, hay ciertas relaciones que hacen que unas sean más relevantes que otras. En los bosques identificamos a los árboles como especies clave, ya que funcionan como estructurantes, al punto que sin ellos el ecosistema sería totalmente diferente (Whitham et al. 2006; Bailey et al. 2009). Muchas características de las poblaciones de árboles indican que, en comparación con especies herbáceas, éstos están singularmente calificados para soportar cambios ambientales direccionales (Conkle 1980; Hamrick et al. 1992). Su longevidad, junto con la plasticidad fenotípica, les permitiría sobrevivir algunas décadas bajo condiciones ambientales adversas, dando posibilidad a la instalación de una nueva generación con nuevos genotipos producto de la recombinación de los de la generación presente. Esta nueva generación podría así contar con genotipos adaptados al nuevo régimen ambiental. Por el contrario, si el cambio ambiental es extremo, rápido y direccional durante un largo período, tal como lo es el cambio climático global, la longevidad, en el sentido de un recambio generacional lento (i.e. muchos años hasta la instalación de una nueva generación), podría ser una desventaja, debido a que la respuesta adaptativa de la población podría requerir un tiempo más prolongado que la velocidad de ocurrencia del cambio climático, lo que podría agravarse si la plasticidad fenotípica fuese limitada (Hamrick 2004). En este sentido, para los bosques así como para las plantaciones forestales de ciclos largos, el cambio climático representa un verdadero desafío que deberán enfrentar aclimatándose o adaptándose para persistir in situ.

Domesticar especies silvestres para plantaciones forestales implica el desarrollo de tecnologías para su plantación comercial, lo que involucra todas las etapas de producción, comenzando por la elección del material genético a propagar. Una especie arbórea es considerada domesticada cuando ha sido seleccionada intencionalmente debido a características genéticas específicas y cuando es propagada y cultivada en un sistema manejado por el hombre (Leakey & Newton 1994). Dadas las características intrínsecas de largo plazo de la actividad, en la planificación de un desarrollo forestal no puede ignorarse

el marco general impuesto por el cambio climático global. Además, la disminución de la productividad forestal (Ciais et al. 2005) y la ocurrencia de eventos masivos de mortalidad de los árboles (Suarez & Kitzberger 2008; Allen et al. 2010; Carnicer et al. 2011) conllevan riesgos adicionales para el cultivo de varias especies de árboles económicamente relevantes en todo el mundo.

Una de las preguntas más importantes en biología y ciencias forestales es si las especies forestales tienen la suficiente variación genética intra-específica como para poder afrontar el cambio climático (Aitken et al. 2008; Alberto et al. 2013), ya sea *in situ* o en plantaciones forestales. La diversidad genética proporciona la base para la adaptación y resiliencia de las especies de árboles al estrés y al cambio ambiental (Hamrick 2004). La conservación genética eficaz y eficiente de la generalidad de las especies arbóreas representa un desafío sustancial debido principalmente a la falta de información genética básica sobre la mayoría de ellas. Junto con la plasticidad fenotípica de los genotipos, que permite una respuesta rápida pero limitada a los cambios ambientales, el nivel de diversidad genética de las poblaciones naturales será crítico para la adaptación futura de las especies arbóreas (Jump et al. 2009).

La diversidad genética de las poblaciones, los patrones de variación genética entre poblaciones, así como también procesos evolutivos y las relaciones filogenéticas entre las especies, se valen habitualmente de los marcadores genéticos para su estudio. Un marcador genético es cualquier carácter observable en forma directa o a través de un experimento, que está controlado por un gen o porción de material genético para el cual los alelos del locus individual se segregan de una manera mendeliana (White et al. 2007). Debido a que en las especies no-modelo se desconocen marcadores morfológicos con segregación mendeliana (e incluso la mayoría de los que se encuentran son a causa de mutaciones con efectos deletéreos), durante muchos años los estudios genéticos en árboles no eran posibles, hasta que en la década de 1970 se descubrieron los marcadores bioquímicos: terpenos y aloenzimas (isoenzimas que corresponden a alelos de un mismo locus). Sin embargo, de estos marcadores bioquímicos hay un número pequeño y limitado de loci conocidos y por lo tanto no representan bien la variación total del genoma. Este problema es superado luego en la década de 1980 con los marcadores moleculares,

referidos a la molécula de ADN en forma directa, y no a productos de su expresión. Así, cualquier variación detectada en la secuencia nucleotídica del ADN a través de diversas técnicas de laboratorio puede utilizarse como un marcador genético (White et al. 2007).

Los marcadores genéticos se centran en los rasgos bajo control de locus único (mendelianos) y habitualmente no tienen incidencia en una expresión diferencial sobre el fenotipo, por lo que miden la variabilidad genética selectivamente neutra, es decir la variación que no se halla sometida a procesos de selección por efecto del ambiente. Sin embargo, la mayoría de los caracteres de importancia evolutiva están controlados por muchos loci y son fuertemente afectados por el medio ambiente. Estos caracteres representan la variación genética cuantitativa (Frankham et al. 2002). En general la evolución adaptativa de las especies resulta de cambios en los caracteres cuantitativos (Vrijenhoek 1994). La relevancia de los marcadores genéticos neutros se focaliza en su gran robustez para el estudio de procesos evolutivos demostocásticos (o el resultado de ellos), o sea los relacionados con las variaciones demográficas de las poblaciones naturales, incluyendo los factores evolutivos de la deriva genética y el flujo génico. La selección causa que los patrones de variación de un carácter cuantitativo difieran de los patrones de variación de marcadores neutrales (Lande 1988; McKay & Latta 2002; Whitlock 2008; Leinonen et al. 2013). Entonces los caracteres cuantitativos, medidos en el fenotipo, son los que representan de un modo más integral el efecto de todas las fuerzas evolutivas y particularmente expresan los cambios adaptativos de las poblaciones naturales.

El fenotipo del árbol está influenciado tanto por el factor genético como por el ambiente que lo rodea. La ecuación $F = G + A$ (fenotipo = genotipo + ambiente) se usa para definir que el genotipo del árbol y el ambiente en el que se desarrolla son los efectos que producen su fenotipo (Figura 1). Debido a que no es posible realizar mediciones en la naturaleza y utilizar estas mediciones para separar el aporte de las varianzas genéticas y las ambientales en la varianza fenotípica total observada, es necesario establecer ensayos de ambiente común para proporcionar a todos los genotipos un mismo ambiente. Para separar el medio ambiente y las influencias genéticas del fenotipo se utilizan los ensayos de ambiente común, manteniendo constante el medio ambiente, lo que aísla los efectos genéticos sobre la variabilidad fenotípica. Para lograrlo, se colectan semillas de árboles que

crecen en los distintos ambientes de interés, y las progenies provenientes de esas semillas se plantan en un ensayo aleatorizado y de iguales condiciones ambientales en toda su amplitud. Por lo tanto, se crean influencias ambientales similares para todos los árboles y las diferencias encontradas entre las progenies de diferentes árboles (y/o de diferentes poblaciones) se deberán principalmente a causas genéticas (White et al. 2007). Estos experimentos se conocen como ensayos de ambiente común, y fueron formalmente definidos en forma temprana en el desarrollo de la experimentación con diferentes procedencias (Turesson 1922).

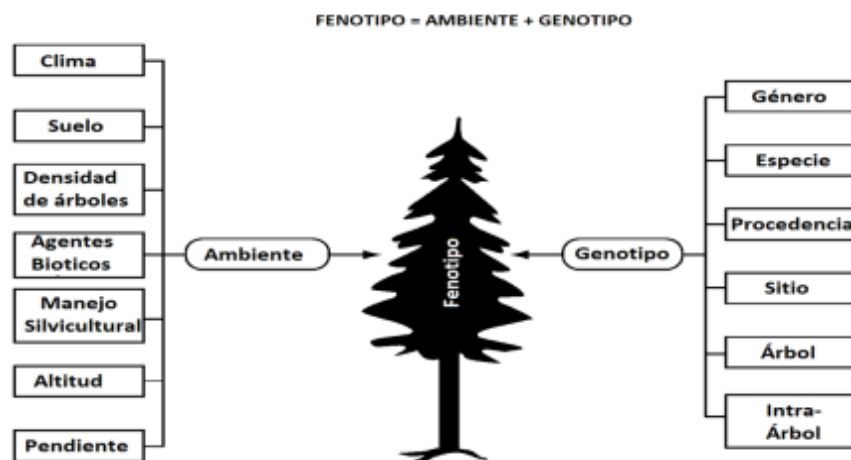


Figura 1. Gráfico de diferentes factores genéticos y ambientales que contribuyen al fenotipo de un árbol (modificado de White et al. 2007).

Cuando existe interacción del genotipo con el ambiente, el valor fenotípico de un individuo ya no está dado únicamente por el efecto aditivo del genotipo y del ambiente, sino que debe agregarse esta interacción, dando lugar a una nueva fuente de variación (Barnes et al. 1984). Una variación en el ambiente puede tener un efecto diferencial en los distintos genotipos. Si no hay interacción, el mejor genotipo en un ambiente será mejor también en cualquier otro. La interacción puede ser muy importante si los genotipos se crían en ambientes diferentes. Parte de la interacción “genotipo x ambiente” puede deberse a una sensibilidad ambiental diferencial de cada genotipo, lo que permite reconocer para cada uno de ellos un rango de fenotipos posibles, a lo que se llama “norma de reacción” (Lynch & Walsh 1998). Para medir la sensibilidad ambiental y calcular la variación de interacción debido a ésta, deben criarse los distintos genotipos en una gama de ambientes. Este mismo efecto de variantes ambientales puede lograrse mediante la

comparación del mismo individuo medido en distintos años (en los que las condiciones ambientales sean diferentes) (White et al. 2007).

Dentro de la variedad de caracteres cuantitativos susceptibles de ser considerados en los árboles, Merilä & Sheldon (1999) definieron dos grupos. Los caracteres de *fitness* (= aptitud reproductiva), que son aquellos que están estrechamente asociados al rendimiento del organismo y están relacionados a caracteres de historia de vida o fertilidad, están bajo una continua selección direccional y poseen mayor variación genética aditiva. Por otro lado, los caracteres *no-fitness* son aquellos que están débilmente relacionados con el rendimiento del individuo y están bajo menor presión de selección. La baja correlación de la mayoría de los caracteres morfológicos con la aptitud reproductiva del individuo hace que éstos sean comúnmente considerados entre los caracteres *no-fitness*, de tal modo que se suele utilizar ambas expresiones como sinónimos (sin embargo hay excepciones en las que caracteres morfológicos tienen un valor relevante para el fitness del individuo). Hay mayor cantidad de loci involucrados en la expresión de los caracteres de *fitness* frente a los de *no-fitness*, y por lo general presentan menores heredabilidades, debido a los altos valores de variación residual (Merilä & Sheldon, 1999).

Siguiendo los criterios de Merilä & Sheldon (1999), en la presente tesis se consideraron como caracteres *fitness* a los fenológicos, fisiológicos, tasa y parámetros de crecimiento, presencia de hojas marcescentes y supervivencia; y como caracteres *no-fitness* a los morfológicos: índice de ramosidad (IR), índice de esbeltez (IE), bifurcaciones y altura (Alt) y diámetro a la altura del cuello (DAC) acumulados.

1.2. OBJETO DE ESTUDIO

El género *Nothofagus* ha evolucionado durante aproximadamente 70 millones de años (Sauquet et al. 2012), originando diferentes subgéneros y especies, algunas de las cuales se encuentran en el extremo sur del continente americano. Estas se han adaptado a los enormes cambios geológicos y macro-climáticos que sucedieron en la región (Rabassa & Clapperton 1990). Procesos evolutivos importantes como la selección adaptativa, migración y deriva genética, modelaron un patrón observable de diferenciación específica adaptada a diversas situaciones de altitud, suelos, humedad, irradiación, etc. (Marchelli et al. 1998; Marchelli & Gallo 2004; Azpilicueta et al. 2009; Premoli et al. 2010, Vergara et al.

2014).

El género *Nothofagus* comprende 42 especies de árboles forestales distribuidos disyuntamente en el hemisferio sur: en América del Sur (sudoeste de Argentina y sur de Chile), Australia (sudeste de Australia y Tasmania), Nueva Zelanda, Nueva Guinea (Papua Nueva Guinea, Indonesia, y también Nueva Bretaña y archipiélago D'Entrecasteaux) y Nueva Caledonia. En Sudamérica está representado por diez especies distribuidas naturalmente en los bosques templados de Chile y Argentina. Según el Instituto de Botánica Darwinion: en Argentina existen 7 especies distribuidas en toda la cordillera patagónica, desde el norte de la provincia de Neuquén hasta Tierra del Fuego, en una franja sobre la Cordillera de Los Andes. *Nothofagus antarctica* (Forst) Oerst. (Ñire), *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser (Lenga), presentes prácticamente en la totalidad de esta área; *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst. (Coihue), ocupa una porción central de esta distribución; *Nothofagus betuloides* (Mirb.) Oerst. (Guindo) está presente en las provincias de Santa Cruz y en Tierra del Fuego; *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. (Roble Pellin) y *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst. (= *Nothofagus nervosa*, Raulí) que tienen una distribución restringida en Argentina (es mucho más amplia en Chile), encontrándose al oeste de la provincia de Neuquén. Recientemente se ha reportado la presencia de *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser (Coihue de Chiloé) en el Parque Nacional los Alerces ubicado al oeste de la Provincia de Chubut (Mathiasen et al. 2017). Las tres especies restantes sólo se encuentran en el territorio chileno: *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser, *Nothofagus alessandri* Espinosa., y *Nothofagus macrocarpa* (A. DC.) F.M. Vázquez & R. Rodr. (Donoso & Landrum, 1979; Donoso 1987). De estas 10 especies, *N. alpina*, *N. obliqua* y *N. pumilio* son consideradas las de mayor importancia forestal en Chile y Argentina por su excelente calidad de madera, cuyo valor comercial causó que desde hace muchos años se exploten sus bosques seleccionando a los mejores individuos, reduciendo así su superficie y posiblemente empobreciéndolos genéticamente (Ipinza et al. 2000; Donoso & Soto 2010).

El Raulí es un árbol decíduo de gran magnitud, con crecimientos por encima de 40 m de altura. Cuenta con dispersión anemófila del polen y anemócora de la semilla. De los cuatro tipos de polen que se pueden encontrar en *Nothofagus* (Hill & Read 1991), el Raulí tiene el tipo *menziesii* con una estructura de grano microequinado oblado de 30 x 45 µm

(Markgraf & D'Antoni 1978; Dettmann et al. 1990). Las flores son estaminadas o pistiladas (Puntieri et al. 2009). En un mismo árbol, las flores masculinas maduran antes que las flores femeninas lo que redundaría en una baja probabilidad de autopolinización (Riveros et al. 1995). La polinización ocurre preponderantemente a una distancia muy corta, con un promedio menor a 35 m, llegando en muy baja frecuencia (0,5 %) a una más de 250 m (la curva de dispersión de polen efectivo es fuertemente leptocúrtica). La especie tiene bajos niveles de endogamia biparental, siendo el número de padres (polen) efectivos de entre 9,4 y 9,9 por progenie anual de cada madre (Marchelli et al. 2012).

El Raulí forma bosques puros o mixtos, generalmente asociado con Roble Pellín o Lenga. La especie muestra preferencia por suelos volcánicos o arenosos (Echeverría & Lara 2004) y es tolerante a heladas. Sin embargo, en una plantación experimental fuera del rango natural de distribución, se encontró un gran número de plantines con muerte apical en su primer año de plantación, lo que fue adjudicado a heladas tardías en primavera (Davel et al. 2003). Esta susceptibilidad podría prevenirse con la correcta elección de la procedencia para producción (Mason et al. 2017). Se distribuye en Chile entre los 35° y 41° 30' S tanto en los Andes como en la Cordillera de la Costa (Donoso 1993), y en Argentina tiene una pequeña área de distribución fragmentada, entre 39° 25' y 40° 35' S, casi exclusivamente relacionada a las cuencas lacustres de origen glacial que discurren transversalmente a los cordones montañosos de los Andes en dirección oeste-este, dentro del Parque Nacional Lanín, noroeste de la Patagonia argentina (Figura 2). Su hábitat altitudinal se encuentra por debajo del de la Lenga, que forma el límite altitudinal del bosque, pero por encima del hábitat del Roble Pellín, con el que en ciertos lugares se lo encuentra en simpatria. Se ha reportado que en Argentina está presente sobre una superficie de casi 80.000 ha (Sabatier et al. 2011). En los sitios donde habita, las precipitaciones medias anuales varían desde 1.200 a más de 4.000 mm, y en la mayoría de los sitios el verano es seco con períodos de hasta 3 meses de sequía.

La madera de *N. alpina* es utilizada para la fabricación de muebles, artesanías y construcción de casas, principalmente aberturas (Echeverría & Lara 2004). Su valor comercial está muy por encima de las maderas mayormente utilizadas en la región, como el Pino Oregón o Ponderosa (Barbero et al. 2011). Muestra rápido crecimiento inicial y se

han reportado individuos con más de 450 años de edad (Pollmann 2005). En algunas plantaciones de la especie se han registrado crecimientos anuales en altura de más de 100 cm y diametrales de 2 cm, lo que refleja la gran potencialidad de uso en plantaciones comerciales (Barbero et al. 2011). Por otro lado, aunque no hay mucho desarrollo tecnológico en la implantación a escala industrial, existen algunas experiencias alentadoras para la producción forestal fuera del área de distribución natural (Davel et al. 2003) y se ha desarrollado de manera muy eficaz la tecnología para la producción del plantín, desde semilla hasta el primer año de crecimiento en vivero (Schinelli Casares 2012). Si bien falta información para mejorar la tecnología de plantación, esta especie tiene mucho potencial para plantaciones forestales, y es muy apreciada por su calidad de madera y la rectitud de su tronco, no sólo en la región de origen sino en todo el mundo, especialmente en Gran Bretaña donde hay experiencias que han demostrado un muy buen rendimiento (Mason et al. 2017).

El Raulí se halla incluido en un programa de domesticación en curso de los *Nothofagus* de mayor potencialidad productiva de Patagonia llevado a cabo en Argentina por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) desde hace más de una década. Justamente este programa ha comenzado con las caracterizaciones genéticas (Marchelli & Gallo 2001, 2006; Azpilicueta et al. 2013) y ha incluido estudios fisiológicos a nivel de especie (Varela 2010; Varela et al. 2012), y se ha propuesto la generación de materiales básicos de propagación (Pastorino et al. 2011). En este sentido, ya se ha inscripto un Área Productora de Semilla (APS) de la especie (Yuco Alto, ubicada en la cuenca del Lago Lácar: 40° 09'38" S; 71° 30'7,622 O) en el Instituto Nacional de Semillas de Argentina (INASE), y se está creando un Huerto Semillero ubicado en el Campo Forestal Trevelin del INTA (Chubut) (Azpilicueta et al. 2016). Asimismo, se ha reportado también un estudio sobre áreas potenciales de cultivo del Raulí en la Provincia de Río Negro (Barbero et al. 2011).

Ya se han llevado a cabo caracterizaciones genéticas generales de Raulí en toda su área de distribución Argentina a través de marcadores génicos isoenzimáticos (Marchelli & Gallo 2001), de marcadores de ADN de cloroplasto (Marchelli & Gallo 2006) y de microsatélites nucleares (Azpilicueta et al. 2013). Sin embargo para el estudio de la

variación intra-específica en caracteres cuantitativos existen escasas publicaciones (Marchelli & Gallo 1999; Puntieri et al. 2013; Torres et al. 2009). Marchelli et al. (1998) plantean que bajo la hipótesis aceptada del escenario glaciario existente a fines del Pleistoceno, las glaciaciones habrían fragmentado la distribución natural del Raulí, con lo que la supervivencia de la especie habría ocurrido en refugios glaciarios en los cuales se habría dado un proceso de diferenciación por deriva genética y posiblemente también un proceso de selección natural divergente, originando distintas estructuras genéticas en cada refugio en función de las distintas presiones ambientales. En un estudio posterior, Marchelli & Gallo (2004) sugieren la hibridación natural con *N. obliqua* y el flujo de polen unidireccional (de Roble Pellín a Raulí) a lo largo de distintas poblaciones como los factores determinantes de la variación genética del Raulí. Posteriormente, Azpilicueta et al. (2013) definieron cinco zonas genéticas de Raulí dentro de Argentina en base a siete microsatélites nucleares de 14 poblaciones naturales (incluidas 5 de las poblaciones naturales que serán analizadas en esta tesis) y calcularon una diferenciación entre poblaciones F_{ST} de 6 %. Estos cinco grupos identificados concordaron con dos linajes encontrados con DNA de cloroplasto que dividía a las poblaciones en dos grupos principales: norte y sur (Marchelli & Gallo 2006).

La comparación entre el parámetro de diferenciación cuantitativa Q_{ST} y la F_{ST} estimada con marcadores neutros puede arrojar luz sobre el papel de la adaptación en el modelado de los patrones de variación genética de las poblaciones naturales (Merilä & Crnokrak 2001). No se analizaron las plántulas del presente ensayo con marcadores neutros, pero existen estudios de poblaciones argentinas (incluidas las muestreadas) que informaron los valores de F_{ST} estimados con marcadores neutros, y éstos pueden considerarse como una referencia general. Para *N. alpina*, el F_{ST} se estimó en 5 % con isoenzimas (Marchelli & Gallo 2004) y en 6 % con SSR (Azpilicueta et al. 2013).

Las predicciones de Cambio Climático prevén para Patagonia una disminución de la precipitación media (Castañeda & González 2008), un aumento de la temperatura media (Rusticucci & Barrucand 2004) y, fundamentalmente, un aumento de la frecuencia y la severidad de fenómenos climáticos extremos (Alexander et al. 2006), asociados a periodos de sequía más frecuentes y/o intensos que pueden tener impactos negativos en la

supervivencia, regeneración y productividad de algunos sistemas de vegetación en esta región (Suarez et al. 2004). Adicionalmente, un reciente informe argentino de expertos (Centro Inv. Mar & Atm 2015) ha reportado para la Patagonia un aumento en la temperatura media anual de 0,4 °C como promedio patagónico, y una importante disminución de la precipitación media particularmente en el noroeste patagónico, para el lapso 1960 - 2010. A su vez este informe pronostica para lo que resta del siglo XXI y dependiendo del escenario de CC elegido, un nuevo aumento de temperatura, al menos de similar magnitud, y una disminución significativa de la precipitación en la Cordillera, del orden del 10 % al 30 % de las medias anuales del presente. En concordancia con estas predicciones climáticas, se ha pronosticado una drástica reducción de la distribución futura del Raulí en base a modelos predictivos de nicho ecológico (Marchelli et al. 2017).

1.3. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la variabilidad y diferenciación genética cuantitativa de *N. alpina* en caracteres adaptativos como base para la domesticación de la especie y para analizar posibles estrategias evolutivas para su persistencia bajo la expectativa de cambio climático global.

Objetivos específicos

- Estudiar la variación genética cuantitativa entre y dentro de poblaciones naturales de *N. alpina* en caracteres morfológicos, fenológicos, fisiológicos y de crecimiento a través de ensayos de ambiente común de evaluación temprana en vivero y en campo.
- Estimar la capacidad adaptativa de *N. alpina* en variables de alto valor adaptativo y/o de relevancia económica en sistemas productivos forestales.
- Estimar valores de diferenciación cuantitativa (Q_{ST}) entre poblaciones naturales en base a las variables medidas, y compararlos con los de diferenciación molecular (F_{ST}) existentes en la bibliografía.
- Estimar correlaciones genéticas y fenotípicas entre las variables métricas consideradas dentro de un mismo ensayo.

1.4. HIPÓTESIS

La variación y la diferenciación genética cuantitativa de *N. alpina* en caracteres fuertemente susceptibles al efecto de procesos de selección direccional (caracteres *fitness*, en el sentido de Merilä & Sheldon 1999) es amplia, mientras que en los menos susceptibles a este efecto (caracteres *no-fitness*) la variación y la diferenciación genética son restringidas.

Predicción 1: Los caracteres *fitness* muestran una varianza genética aditiva alta, aunque una heredabilidad menor en relación a la de caracteres morfológicos.

Predicción 2: La diferenciación cuantitativa (Q_{ST}) estimada con los caracteres *fitness* es más alta que la de los caracteres morfológicos y además mayor que la estimada con marcadores moleculares (F_{ST}).

Si las predicciones se cumplieran y lográramos así apoyar la hipótesis, esto implicaría importantes consecuencias para la adaptabilidad y el cultivo de la especie, que pueden resumirse en los siguientes puntos:

a) el cultivo de la especie requiere la selección de acervos genéticos adaptados a cada condición de sitio debido a su diferenciación.

b) el cambio climático global puede provocar extinciones locales de la especie en las poblaciones donde las fuerzas selectivas superen a la capacidad adaptativa definida por la cantidad de variación intra-poblacional.

CAPÍTULO 2. Generalidades metodológicas

2.1. ENSAYOS

Idealmente, las respuestas de cada población frente a una determinada condición de cultivo deberían ser estimadas sobre experimentos de largo plazo. Sin embargo, la necesidad de obtener respuestas más rápidamente vuelve recomendable el uso de ensayos de corta o mediana duración. La distribución de la variabilidad genética de las poblaciones de árboles para los rasgos adaptativos se puede evaluar en ensayos de ambiente común. El estudio de la variación genética intra-específica de plantas se puede afrontar mediante el cultivo de la misma entidad genética en diversos ambientes o mediante el cultivo de diferentes entidades genéticas dentro de un mismo ambiente (Turesson 1922), o sea “ensayos de ambiente común”. Cuando estos ensayos están constituidos por poblaciones de distinta procedencia se los llama “ensayos de procedencias” (cuando las procedencias son autóctonas, el término adecuado es “orígenes”), y a los constituidos por hijos de diferentes madres conocidas de una o varias poblaciones se los llama “ensayos de progenies”. Aunque el objetivo original de muchos ensayos de procedencias es identificar las mejores fuentes de semilla para los sitios de cultivo, los datos de estos ensayos pueden proporcionar información sobre los efectos del cambio climático (Ducouso et al. 1996; Mátyás 1996; Morgenstern 2011). En esta tesis los utilizaré en ambos sentidos, por un lado para evaluar mejores fuentes de semillas para la actividad forestal y por otro para analizar los efectos que pueda tener el cambio climático sobre las poblaciones ensayadas.

El desarrollo de la tesis se basa en el análisis de un Ensayo Principal de campo, sobre el que se estudiaron caracteres morfológicos, fenológicos, fisiológicos y de crecimiento en plantas de 5 a 8 años, y de un Ensayo Complementario de vivero, sobre el que se analizaron caracteres de raíz y tallo de plántulas a través de mediciones destructivas y sus relaciones alométricas. Ambos ensayos fueron establecidos en forma previa al desarrollo de esta tesis.

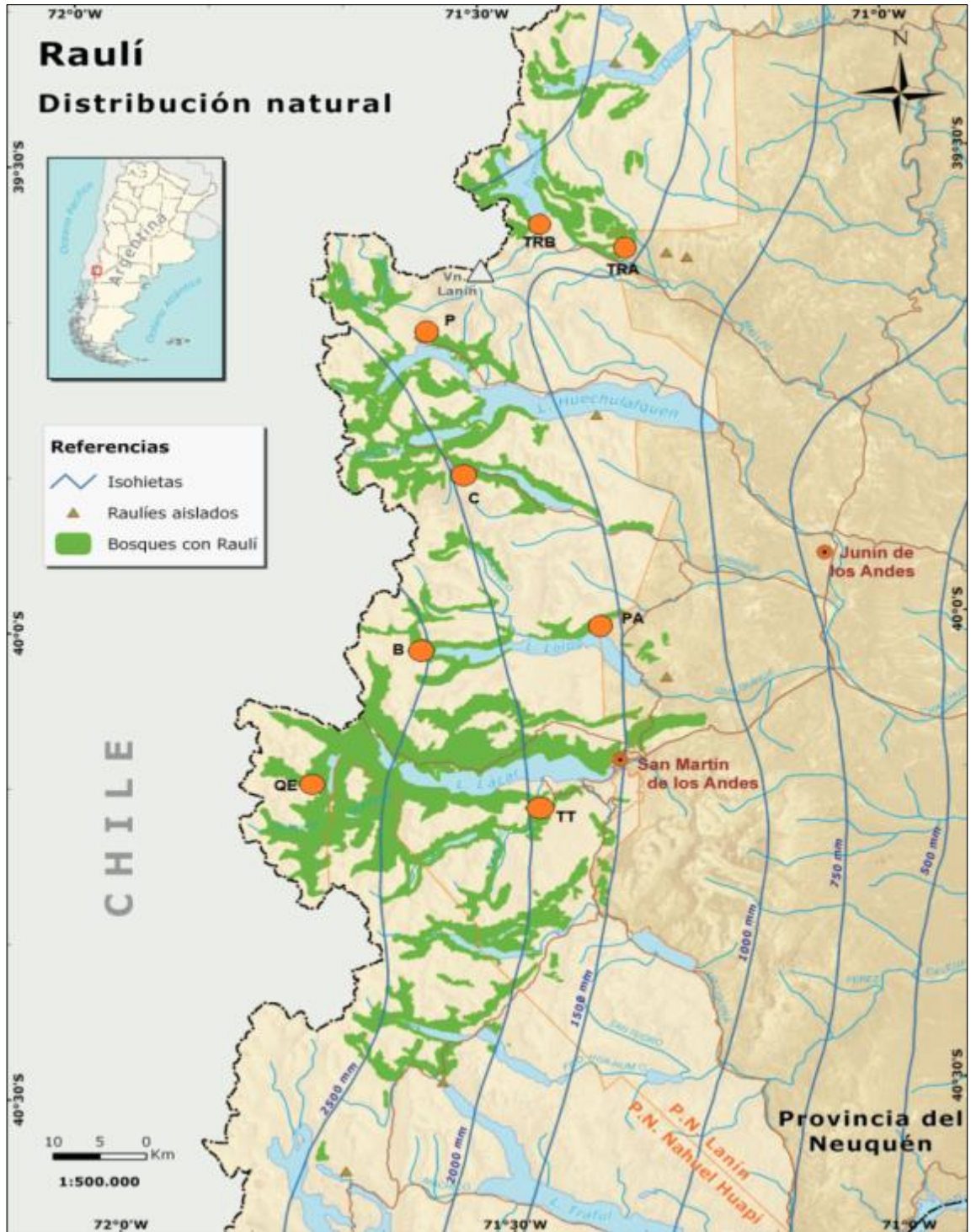


Figura 2. Mapa de distribución de poblaciones naturales de *N. alpina*. En verde se muestra la distribución actual de la especie en Argentina. Los puntos naranjas muestran las poblaciones cosechadas para realizar los ensayos (modificado de Sabatier et al. 2011).

La obtención de las semillas de *N. alpina* se realizó a través de una cosecha de árbol individual (o sea manteniendo la identificación de cada madre para cada semilla, en contraposición a la cosecha *bulk* en la que se mezclan todas las semillas cosechadas en una misma población), llevada a cabo durante la temporada del año 2009. Se cosecharon con tijera de altura las semillas de cada árbol. El muestreo abarcó 8 poblaciones cubriendo la distribución natural fragmentada de la especie en la Argentina (entre los 39° 25' S y los 40° 35' S) (Figura 2), y dentro de cada población se seleccionaron árboles distanciados al menos 30 metros entre sí con el fin de minimizar la probabilidad de cosechar árboles emparentados (Marchelli et al. 2012).

Ensayo Principal

Se trata de un ensayo de orígenes y progenies instalado en el Campo Forestal General San Martín perteneciente al INTA Bariloche y ubicado en el paraje Las Golondrinas, Lago Puelo, Chubut (41° 59' 53" S; 71° 31' 34" O). Este ensayo se encuentra ubicado a 408 m s.n.m, o sea casi 500 m por debajo de los sitios más bajos de las poblaciones naturales muestreadas. La temperatura promedio anual en el sitio de ensayo es de 10,08 °C, casi 2 °C más que la temperatura media anual de la población natural con mayor temperatura. Asimismo, las precipitaciones medias del sitio de ensayo son de 908 mm anuales, aproximadamente 300 mm menos que la registrada en la población muestreada con menor precipitación anual (Tabla 1) (Bianchi & Cravero 2010). El sitio del ensayo representa un área potencial de cultivo de la especie, según ha sido definido por Barbero et al. (2011), por lo que el estudio permitirá identificar las mejores fuentes de semilla para plantaciones forestales en esa área. Por otro lado el ensayo también sirve como simulador de un posible escenario de cambio climático predicho para las poblaciones naturales de la especie según el IPCC (2014) y la 3ra Comunicación Nacional de la República Argentina a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (Centro Inv. Mar & Atm 2015) que prevén un aumento de temperatura media de entre 0,4 a 2°C y una disminución de 10 a 30 % de precipitación media para el área de distribución natural de la especie.

Tabla 1. Poblaciones de *N. alpina* incluidas en el ensayo principal.

Ubicación, número de familias muestreadas, precipitación media anual (PMA) en mm.año⁻¹, altitud en m s.n.m, temperatura media anual (TMA) y de los meses de enero (T Ene.) y julio (T Jul.) en grados centígrados (°C) y el cociente climático de Ellenberg (EQ = (T Ene/PMA) × 1000)(Bianchi & Cravero 2010).

Población	Lat. S	Long. O	Nº fam	Altitud	PMA	TMA	T Ene.	T Jul.	EQ
Boquete (B)	40° 01' 51"	71° 34' 38"	5	910	1600	7,14	13,07	1,37	8,20
Currhué (C)	39° 50' 34"	71° 30' 30"	12	1030	1400	6,90	13,16	0,89	9,40
Paimún (P)	39° 42' 17"	71° 33' 52"	6	930	1800	6,39	12,07	0,93	6,70
Pto. Arturo (PA)	40° 01' 02"	71° 22' 19"	18	910	1200	8,21	14,57	1,93	12,10
Queñi (QE)	40° 09' 54"	71° 45' 20"	8	920	2400	4,64	9,67	-0,03	4,00
Tren Tren (TT)	40° 11' 53"	71° 25' 53"	12	1040	1400	7,10	13,81	1,61	9,90
Tromen Alto (TRA)	39° 36' 18"	71° 20' 57"	16	1110	1270	7,21	13,52	1,01	10,60
Tromen Bajo (TRB)	39° 34' 10"	71° 26' 28"	9	1064	1492	6,89	12,99	0,95	8,70

**Figura 3.** Foto satelital del Ensayo Principal (rectángulo delimitado con líneas negras).

El ensayo fue instalado al finalizar el invierno del año 2011 luego de que las plantas crecieran un año bajo invernáculo y un año fuera de él, bajo protección de media sombra. Se representaron 86 familias de polinización abierta correspondientes a 8 orígenes (Tabla 1) que abarcan toda la distribución natural de la especie en Argentina (Figura 2). Cada

familia corresponde a la progenie de uno de los árboles cosechados, de la que se desconocen los padres ya que la polinización no fue controlada sino libre (= abierta), pero se tiene certeza de la identidad del árbol madre (el árbol cosechado), por lo que cada familia está constituida por plantas que guardan una relación de parentesco de al menos medios hermanos.

Cada familia cuenta con 15 repeticiones distribuidas en 15 bloques en un diseño de parcelas monoárbol (total: 1290 plantas, plantadas a un distanciamiento entre filas y columnas de 1 m X 1 m). Las parcelas "monoárbol" (*single tree plot*) corresponden a un diseño experimental muy común en las ciencias forestales, en el cual cada tratamiento está representado en cada repetición por una parcela constituida por un único árbol. En este caso cada progenie estuvo representada por un solo árbol en cada bloque. El ensayo está protegido por dos cortinas de pino, una en el lateral oeste ubicada a tres metros de la primera fila del ensayo y la otra ubicada al norte, más alejada, a 13 metros de la primera fila del ensayo (Figura 3). Los bloques fueron lineales y se ubicaron en forma paralela a la cortina más cercana, para controlar el efecto de sombreado en los posteriores análisis estadísticos. Se muestran detalles del Ensayo Principal desde la Figura 4 a la Figura 8.

El ensayo durante los primeros años tuvo una serie de medidas de protección para aumentar la supervivencia de las plantas: las filas del tercio central (bloques 7 a 11 inclusive) estuvieron protegidas por media sombra durante los meses estivales de las segunda y tercera temporadas de crecimiento (2012-2013 y 2013-2014), y cada planta estuvo protegida en su base por un protector individual (cilindro de PET) para evitar que fueran comidas por liebres desde su plantación hasta fin de 2013, momento en que los protectores fueron removidos y se instaló un cerco perimetral de alambre tejido. A fines de 2012, fines de 2013 y comienzos de 2014 se realizaron desmalezados, hasta que en el invierno de 2014 se aplicó mulching de aserrín a cada planta sobre un radio de 25 cm para disminuir la competencia con herbáceas. En 2012 y 2013 se realizaron mediciones de supervivencia y se repusieron los individuos muertos en cada año con individuos de la misma familia y producidos en el mismo año que los originales. También se aplicó un riego anual los primeros dos años en el momento más seco del año, para disminuir la mortalidad de las plantas del ensayo y llegar a 2014 con una suficiente cantidad de plantas

para poder realizar las mediciones. A partir de 2014, tanto las mediciones como el mantenimiento del ensayo estuvieron a mi cargo en el marco de la presente tesis. Fuera de la supervivencia inicial, todas las mediciones se iniciaron en 2014, luego de que las plantas pasaran tres años de aclimatación en el sitio, y cuando ya estuvieron desprovistas de mediasombra, protectores y cualquier tipo de riego.

Si bien algunos autores sugieren como conveniente analizar más de 20 poblaciones (O'Hara 2005), en este caso utilizamos sólo 8 poblaciones, las cuales representan a toda la distribución de la especie en Argentina, priorizando enfocar el esfuerzo en el número de variables a medir. El número de familias de polinización abierta por población estuvo determinado por el éxito en la producción de plantas en el vivero, con un rango similar al utilizado en otros trabajos con árboles forestales. Por ejemplo, Navarro et al. (2005) utilizaron de 4 a 19 familias por población en un estudio de *Cedrela odorata*; Waldmann et al. (2005) utilizaron de 10 a 22 familias por población en *Pinus sylvestris*, y Viveros-Viveros et al. (2014) utilizaron 9 familias por población en *Pinus hartwegii*. Por otro lado respecto al número de individuos por familia, si bien no se tiene una idea previa de heredabilidad, la mayor precisión en la estimación de este parámetro en ensayos de medios hermanos se logra con un mínimo de 20 individuos por familia (Falconer & Mackay 1996). Este ensayo ha incluido 15 individuos por familia, ya que el análisis conjunto de 8 poblaciones multiplica significativamente la dimensión del esfuerzo de muestreo.



Figura 4. Foto del Ensayo Principal. Noviembre de 2012. Se ven la media sombra y los protectores individuales.



Figura 5. Detalle de una planta con el protector individual en Noviembre 2012.



Figura 6. Foto del Ensayo Principal. Julio de 2014. Detalle de mulching de aserrín.



Figura 7. Foto de una planta del Ensayo Principal. Enero 2016.



Figura 8. Foto del Ensayo Principal, medición diámetro. Septiembre 2016

Ensayo Complementario

Este ensayo permitió el análisis de caracteres radiculares, que por implicar mediciones destructivas no podía llevarse a cabo sobre el Ensayo Principal. Se trató de un ensayo de procedencias y progenies con plantines medidos luego de su primer ciclo vegetativo. En noviembre de 2009 fue instalado el ensayo en el vivero de la EEA Bariloche del INTA ($41^{\circ} 07' S$, $71^{\circ} 15' O$, 810 m s.n.m.). Aproximadamente un mes luego de su emergencia en bandejas de siembra, se repicaron al azar 4 plántulas por maceta de 25 litros (28 cm de diámetro, 40 cm de profundidad) rellenas de tierra negra previamente tamizada. Se optó por utilizar macetas en vez de repicar las plantas directamente sobre el suelo del vivero debido a la necesidad de mantener las raíces intactas al momento de descalzar los plantines. Las macetas con las plantas fueron colocadas al aire libre, protegidas de la insolación directa por una media sombra y regadas por un sistema de riego por aspersión dos o tres veces por semana durante la temporada de crecimiento. El sustrato se fertilizó en dos oportunidades al comienzo de la temporada de crecimiento con fertilizante NPK (0,56 g / l de NEW PLANT 18-7-17[®], N = 101 ppm, P = 18 ppm, K = 80 ppm). También se aplicaron micronutrientes dos veces, a través de fertilización foliar.

En el ensayo se utilizaron plantas correspondientes a 7 poblaciones, con 9 a 12 familias por población (74 familias en total) y 8 plantas por familia, lo que dio como resultado un total de 592 plantas (son las mismas poblaciones de la Tabla 1, con la ausencia de TRB). El ensayo fue dividido en 8 bloques, siguiendo un presumido gradiente de exposición al viento, y dentro de cada bloque las plantas fueron distribuidas completamente al azar (todas las progenies representadas una vez en cada bloque). Todo el ensayo se rodeó de una fila adicional de macetas para evitar el posible efecto de borde (Figura 9).



Figura 9. Foto del Ensayo Complementario

2.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS EN EL ENSAYO PRINCIPAL DURANTE EL PERIODO DE MEDICIÓN

A partir de datos del Atlas Climático Digital de Argentina (Bianchi & Cravero 2010) se caracterizó el sitio con variables climáticas: la temperatura promedio anual es de 10,08 °C, la temperatura media en el mes más cálido (enero) es de 16,46 °C, la temperatura media en el mes más frío (julio) es de 3,68 °C y la precipitación media anual es de 908 mm.

Mediante sensores/*dataloggers* HOBO®, se registraron las temperaturas del aire a 1,5

m de altura sobre el nivel del suelo a intervalos de 5 minutos durante el tiempo en que se desarrolló el estudio. En base a estos registros se calculó el calor acumulado (*heat sum*) en unidades grados días (°Cd) de desarrollo desde el 1° de julio hasta el momento de inicio de crecimiento o apertura de yemas para cada población en las temporadas de medición de las variables morfológicas y fenológicas que se verán en los capítulos 4 y 5. Se aplicó la siguiente fórmula ajustada del estudio de García et al. (2013) sobre fenología de yemas florales de Raulí:

$$GD = \sum_{i=1}^t \frac{(T_{i \max} + T_{i \min})}{2} - \omega$$

donde *GD* son los grados días (°Cd); $T_{i \max}$ es la temperatura máxima (°C) del día; $T_{i \min}$ es la temperatura mínima (°C) de ese mismo día y ω es una constante, igual a la temperatura umbral mínima de actividad fotosintética. t es el día juliano al momento que se quiere calcular según la variable medida para la población de interés.

La temperatura umbral mínima utilizada fue $\omega = 7$ °C, ya que se considera limitante para la actividad fisiológica de las especies forestales (García et al. 2013). Si la temperatura media diaria $((T_{i \max} + T_{i \min})/2)$ es menor a ω entonces el valor de grados día es igual a cero para el término de la sumatoria correspondiente a ese día.

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En genética cuantitativa, la elección de los modelos estadísticos utilizados para calcular las varianzas genéticas es fundamental para la correcta estimación de los parámetros genéticos. Como primer paso antes de proponer los modelos estadísticos deben explorarse los datos siguiendo protocolos tal como lo recomendaron Zuur et al. (2009). Dentro de estos protocolos están incluidos la detección de valores atípicos en las variables respuesta mediante visualización gráfica y el control de su calidad; así como la comprobación de los supuestos de cada modelo a utilizar.

Debido a que en genética cuantitativa el cálculo de los parámetros genéticos parte de la base de las varianzas calculadas, uno de los métodos de cálculo más importantes es el análisis de los componentes de la varianza. Los modelos de componentes de varianza evalúan por un lado la cantidad de variación en una variable dependiente o respuesta (carácter o fenotipo de interés) que se asocia con una o más variables de efectos aleatorios

(e.g. poblaciones, familias) y por otro lado la diferencia entre las medias de la variable dependiente asociada a distintos efectos fijos. Por lo general, se analizan mediante modelos de efectos mixtos, es decir, modelos en los que hay factores de efectos fijos y factores de efectos aleatorios. Los factores de efectos fijos son aquellos que tienen un número definido y finito de niveles posibles, y todos los niveles de interés son considerados. En cambio, los factores aleatorios contienen un número de niveles que se supone infinito, y los niveles efectivamente considerados representan una muestra al azar de todos ellos. Para los factores de efectos fijos interesa conocer si existen diferencias significativas entre las medias de sus niveles, mientras que para los de efectos aleatorios interesa conocer la variabilidad o variación que puede existir entre niveles más que el efecto específico de cada nivel. Los objetivos principales de los análisis de componentes de la varianza aplicados en esta tesis son por un lado determinar si los factores incluidos en el modelo son significativos, y por otro obtener los componentes de la varianza de los factores familiares, necesarios para la estimación de los parámetros genéticos que se describen a continuación.

En este trabajo utilizaré modelos de análisis de la varianza correspondientes a las clases de modelos lineales (LM), lineales mixtos (LMM) y lineales mixtos generalizados (GLMM) (las siglas se mantienen como en la literatura en inglés).

Los LMMs permiten incorporar efectos aleatorios a modelos lineales ordinarios (los cuales asumen errores normalmente distribuidos y efectos fijos), y son necesarios para obtener estimaciones de la variabilidad entre grupos aleatorios de un tratamiento, en lugar de simplemente una lista de valores para cada grupo. La especificación formal completa de los modelos lineales mixtos es:

$$y = X\beta + Zb + \varepsilon, \quad \varepsilon \sim N(0, \sigma^2 I) \quad b \sim N(0, \sigma^2 \Sigma), b \perp \varepsilon$$

donde y es un vector de observaciones para una variable respuesta (o una transformación de una variable); X es la matriz de incidencia para un vector β de coeficientes para los efectos fijos; Z es la matriz de incidencia para un vector b de efectos aleatorios de distribución normal multivariada y centrada en cero; y ε es un vector de errores residuales con distribución normal multivariada y varianzas no correlacionadas. Σ es la matriz relativa de varianza-covarianza de los efectos aleatorios y σ^2 simboliza a la varianza. El símbolo \perp indica independencia de las variables aleatorias y N denota la distribución normal (Gaussiana) multivariada.

Cuando un modelo de efectos mixtos se ajusta a un conjunto de datos, el set de

parámetros estimados incluye los coeficientes para los efectos fijos por un lado, y las desviaciones estándar (y/o las varianzas) de los efectos aleatorios por otro. Los GLMMs son la herramienta más adecuada cuando los errores se distribuyen de manera no-normal en modelos que involucran efectos fijos y aleatorios; aplican a la familia de distribuciones exponenciales, que incluye a la binomial, la Poisson, la exponencial y la Gamma (Bolker et al. 2008). En esta tesis aplicaré modelos lineales mixtos generalizados en los casos de variables binarias, que claramente no presentan distribución normal.

Adicionalmente los “tests de cocientes de verosimilitudes” (likelihood ratio tests: LRTs) (Baayen et al. 2008) permiten probar si un factor aleatorio contribuye de manera significativa a la bondad de ajuste de un modelo. Los LRTs comparan dos hipótesis anidadas, a través de la diferencia de verosimilitudes entre un modelo general (MG) que incluye a todos los efectos de interés y un modelo reducido (MR) que difiere del MG en el efecto a testear. En este trabajo se utiliza principalmente este tipo de test para analizar la contribución del factor “familia” utilizado, en cuyo caso se reporta el valor p asociado, para indicar la significancia estadística, es decir, el rechazo de la hipótesis nula de que incluir al factor en el modelo no cambia las estimaciones respecto del modelo reducido.

2.4. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS CUANTITATIVOS

Valor fenotípico y valor mejorante

Los únicos dos componentes que influyen en el valor fenotípico se puede decir que son: el genotipo (o sea el conjunto de genes del individuo) y el ambiente (que incluye a todo lo que influye en el fenotipo fuera del componente genético). Se puede pensar también que el ambiente produce una desviación del valor genético.

Entonces:

$$F = G + A$$

donde F es el valor fenotípico, G el valor genotípico y A la desviación ambiental.

Debido a que los padres pasan a sus hijos los genes, que se combinan para formar otro genotipo, y no los genotipos como tales, es necesaria una nueva medida que se refiera a los genes.

Variación genética intra-poblacional

Coeficiente de parentesco y varianza genética aditiva

El coeficiente de parentesco se define como la probabilidad de que, en dos individuos, dos gametas tomadas al azar, una de cada uno, lleven alelos que sean iguales por descendencia, o sea por provenir de un ancestro en común. La semejanza entre parientes para un carácter determinado está por lo tanto determinada por genes en común (Falconer & Mackay 1996). El grado de semejanza se puede calcular a partir de mediciones del carácter de interés sobre la población. Los análisis ANOVA de partición de la varianza entre y dentro de grupos de individuos emparentados son análisis clave en la estimación de parámetros genéticos: cuanto mayor es la similitud dentro de grupos de individuos emparentados, mayor es la diferencia entre dichos grupos. Tanto fuentes de variación genéticas como ambientales contribuyen a la covarianza de individuos emparentados. El objetivo es deducir las proporciones relativas de ambos tipos de fuentes de variación, y esto es posible cuando se tienen observaciones de la semejanza entre individuos cuyo grado de parentesco es conocido.

La porción genética de la varianza se puede dividir a su vez en tres componentes principales: una porción aditiva (V_A), una porción debida a efectos de dominancia (V_D) (interacción entre alelos de un mismo locus) y una porción debida a efectos de epistasia (interacción entre alelos de distintos loci) (V_I). La varianza genética aditiva es la causa de la semejanza entre parientes, y se define como la parte de la varianza genética que es debida a los efectos medios del reemplazo de un alelo por otro en un locus, o en los múltiples loci. La proporción de la covarianza entre parientes que es atribuible a la varianza aditiva depende del tipo de relación de parentesco entre los individuos.

La varianza genética aditiva es el parámetro básico para la estimación de la variación cuantitativa intra-poblacional, es una función de la varianza genética familiar estimada experimentalmente y es el único componente de la varianza genética que se puede estimar de las observaciones en un ensayo no clonal. El factor multiplicador de la varianza familiar en la fórmula de la varianza genética aditiva, depende del grado de parentesco entre los miembros de la familia usados en el ensayo, que corresponde a 2 para hermanos

completos y 4 para medios hermanos. Las familias de polinización abierta se consideran usualmente de medios hermanos, aunque en realidad es una mezcla entre medios hermanos y hermanos completos en proporciones desconocidas. En un estudio previo Pastorino et al. (2013) estimaron en base a marcadores genéticos y al cálculo de la correlación de paternidad multilocus (Ritland 2000), el coeficiente de parentesco medio ($k=0,30080 \pm 0,028$) de algunas poblaciones argentinas de *N. alpina*. Si bien no fueron utilizadas exactamente las mismas poblaciones que las estudiadas en la presente tesis, se tomó este valor medio como una mejor aproximación que la consideración arbitraria de medios hermanos. Entonces la varianza genética aditiva fue calculada como:

$$\sigma_A^2 = \frac{1}{k} \cdot \sigma_f^2$$

donde σ_A^2 es la varianza genética aditiva, k es el coeficiente de parentesco medio y σ_f^2 es la varianza familiar calculada mediante el modelo de ANOVA.

Coefficiente de varianza genética aditiva (CV_A)

Debido a que el valor de σ_A^2 es función de la unidad utilizada, desde un punto de vista práctico, estandarizar a la σ_A^2 por la media fenotípica tiene la ventaja de permitir la comparación entre caracteres y estudios distintos; este parámetro es llamado coeficiente de varianza genética aditiva CV_A (Houle 1992) y se calcula como:

$$CV_A = 100 \cdot \frac{\sqrt{\sigma_A^2}}{\mu}$$

donde CV_A es el coeficiente de varianza genética aditiva, σ_A^2 es la varianza genética aditiva y μ es la media fenotípica del carácter cuantitativo.

Varianza y heredabilidad

La partición de varianza total o fenotípica permite identificar componentes atribuibles a diferentes causas: la varianza genética (V_G , que a su vez puede dividirse en varianza aditiva o valor mejorante (V_A), dominante (V_D) y epistática (V_I)) y la varianza ambiental (V_E). Simbólicamente podemos entonces expresar a la varianza fenotípica (V_P) como:

$$V_P = V_G + V_E = V_A + V_D + V_I + V_E$$

Esto nos permite determinar la importancia relativa de cada uno de los componentes o factores en la varianza total o fenotípica. La heredabilidad expresa la importancia relativa de la herencia en la determinación de la varianza fenotípica de un carácter. La heredabilidad en sentido amplio (V_G/V_P) expresa el grado en que los fenotipos están determinados por el genotipo, y la heredabilidad en sentido estricto ($V_A/V_P = h^2$) expresa el grado en que los fenotipos están determinados por los genes transmitidos por los padres. Esta última es importante en los programas de mejora ya que determina el grado de parecido entre parientes, y en un modelo estadístico con bloques se calcula según la siguiente fórmula:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2} = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_f^2 + \sigma_b^2 + \sigma_e^2}$$

donde σ_P^2 es la varianza fenotípica, σ_b^2 es la varianza del bloque y σ_e^2 es la varianza residual.

El error estándar de la heredabilidad se calcula como:

$$SE_{h^2} = 1/k \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot [1 + (n+1) \cdot h^2/1/k]^2 \cdot (1 - h^2/1/k)^2}{n \cdot (n-1) \cdot (f-1)}}$$

donde n es el número de individuos y f es el número de familias dentro de la población.

La heredabilidad depende de la población y las condiciones ambientales donde se desarrollaron los individuos. Las heredabilidades de un mismo carácter para poblaciones diferentes suelen ser similares y las de distintos caracteres suelen ser distintas. En general los caracteres relacionados a la eficacia biológica o historia de vida (caracteres de *fitness*) suelen tener menores heredabilidades que los de *no fitness* (Hoffmann et al. 2016).

Variación genética entre poblaciones

Coeficiente de diferenciación cuantitativa Q_{ST} y su relación con el coeficiente de diferenciación molecular F_{ST}

El estadístico F_{ST} de Wright se utiliza para caracterizar el grado de la estructura genética existente entre y dentro de poblaciones a nivel de genes simples, al medir la proporción de la variación alélica total que ocurre entre poblaciones (Wright 1952); por ello, en estudios con varios tipos de marcadores moleculares frecuentemente se utiliza F_{ST}

con ese fin (Hedrick 1999). La variación genética total es particionada en un componente que toma en cuenta a la variación dentro de la población (heterocigosis dentro de las poblaciones: H_w) y otro que hace referencia a la variación entre las poblaciones (heterocigosis entre las poblaciones: H_b):

$$F_{ST} = \frac{H_b}{H_b + H_w}$$

donde F_{ST} es el estadístico de Wright, H_b es la variación genética neutra entre las poblaciones y H_w es la variación genética neutra dentro de las poblaciones.

Con rasgos cuantitativos, la variación genética entre poblaciones se puede estimar con el valor de Q_{ST} , el cual es comparable con el valor de F_{ST} en forma directa (McKay & Latta 2002). Este parámetro es calculado con valores de varianzas genéticas estimadas por medio de pruebas de progenies anidadas en procedencias en experimentos de ambiente común, particionando la variación en componentes intra e inter poblacionales. Expresa la proporción de la varianza genética aditiva de un carácter debida a diferencias entre las poblaciones (Spitze 1993, Whitlock y Guillaume 2009) y se calcula con la fórmula:

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_{pob}^2}{(\sigma_{pob}^2 + 2 \cdot \sigma_A^2)}$$

donde Q_{ST} es la diferenciación genética aditiva, σ_{pob}^2 es la varianza entre las poblaciones estimada mediante el ANOVA considerando a la población como un efecto aleatorio y σ_A^2 es la varianza genética aditiva.

La magnitud de las diferencias entre Q_{ST} y F_{ST} permite inferir el grado de adaptación local de las poblaciones; es decir, refleja el papel de la selección en la divergencia de poblaciones, con respecto al efecto ocasionado por la deriva genética (Spitze 1993; Merilä & Crnokrak 2001). Debido a que el F_{ST} está calculado mediante marcadores neutrales a la selección, para rasgos cuantitativos neutrales a la selección se esperaría que la diferenciación genética cuantitativa Q_{ST} sea igual a la diferenciación molecular F_{ST} ($F_{ST} = Q_{ST}$), entonces la selección natural probablemente tenga poca influencia en la diferenciación de las poblaciones en el rasgo cuantitativo considerado, y en cambio esté determinada fundamentalmente por los procesos demostocásticos (Merilä & Crnokrak 2001). En cambio, para rasgos sometidos a distintas presiones de selección en distintas

poblaciones, cuando el Q_{ST} excede al F_{ST} ($Q_{ST} > F_{ST}$), la selección de fenotipos alternativos probablemente esté contribuyendo a la diferenciación de la población (Spitze 1993; Whitlock & McCauley 1999), debido a la acción de la selección direccional o disruptiva (Merilä & Crnokrak 2001; McKay & Latta 2002). En ocasiones puede ser que el Q_{ST} sea menor que el F_{ST} ($Q_{ST} < F_{ST}$), lo que indica la selección del mismo fenotipo en diferentes poblaciones, limitando así la diferenciación entre las poblaciones (es decir, por debajo de lo que resultaría de la deriva genética solamente), lo que sugiere que la selección actúa alrededor de un mismo fenotipo óptimo en todas las poblaciones; es decir, una selección estabilizante que homogeneiza a los fenotipos (Spitze 1993).

La comparación del grado de diferenciación entre poblaciones para rasgos cuantitativos (Q_{ST}) con su correspondiente diferenciación para marcadores neutrales a la selección (F_{ST}), da la posibilidad de comprender mejor el papel de las fuerzas evolutivas (selección, migración, deriva génica y mutación) que han actuado en ellas. Esta información es útil para definir estrategias de manejo para la conservación y el uso de los recursos genéticos de una especie.

Correlaciones fenotípicas y genéticas entre caracteres

Los valores fenotípicos de dos caracteres en un individuo pueden estar correlacionados, o sea que la variación de uno de ellos, de un individuo a otro, va acompañada por la variación del otro carácter en una proporción que se mantiene aproximadamente constante y que no es azarosa; a esto se le llama correlación fenotípica, y puede ser debido a dos causas: la correlación ambiental (una variación ambiental tiene un efecto de proporciones constantes sobre ambos caracteres) o la correlación genética (ambos caracteres están gobernados por un mismo grupo de genes o por genes que están ligados) (Lynch & Walsh 1998). El conocimiento del mecanismo de esta correlación fenotípica es fundamental para entender el grado de integración del fenotipo y para resolver las limitaciones impuestas a los procesos evolutivos. Dependiendo del signo, las correlaciones genéticas pueden facilitar o impedir la evolución adaptativa.

La correlación genética en particular es la correlación entre el valor genético de un individuo para un carácter y el valor genético del mismo individuo para otro carácter

(Lynch & Walsh 1998). Las fórmulas para calcular las correlaciones fenotípica (r_P) y genética (r_A) se describen a continuación:

$$r_P = \frac{Cov_{xy}}{\sqrt{\sigma_x^2 * \sigma_y^2}} \quad \text{y} \quad r_A = \frac{Cov_{fxy}}{\sqrt{\sigma_{fx}^2 * \sigma_{fy}^2}}$$

donde Cov_{xy} es la covarianza entre los caracteres x e y , y donde σ_x^2 y σ_y^2 son las varianzas de los caracteres (Falconer & Mackay 1996), mientras que σ_{fx}^2 y σ_{fy}^2 son las varianzas familiares de los caracteres y Cov_{fxy} es la covarianza familiar.

A su vez, la covarianza familiar puede estimarse en forma sencilla según lo propuesto por O'Neill et al. (2001) como:

$$Cov_{fxy} = \frac{\sigma_{fxy}^2 - \sigma_{fx}^2 - \sigma_{fy}^2}{2}$$

donde σ_{fxy}^2 es la varianza familiar de una variable artificial creada a partir de la suma directa de los caracteres de interés.

Plasticidad fenotípica y normas de reacción

La plasticidad fenotípica se define como la capacidad de un genotipo de generar un rango de fenotipos distintos según el ambiente en el que se desarrolla (Chambel et al. 2005), o sea un fenotipo adecuado a cada ambiente. De este modo, el carácter representado por un determinado fenotipo no resulta heredable, ya que no es expresión del genotipo sino del ambiente que lo modela. Sin embargo, sí puede resultar heredable la plasticidad fenotípica en sí misma, o sea la capacidad de un determinado acervo genético de producir diferentes fenotipos en diferentes ambientes. Experimentalmente podemos estimar la plasticidad fenotípica de una cierta entidad genética someténdola a distintas condiciones ambientales dadas por distintos sitios de ensayo o por distintos momentos de medición. Para el caso de distintos sitios de ensayo, en un sentido estricto deberían usarse réplicas clonales. Sin embargo se asume en general un sentido más laxo, considerando entonces a entidades genéticas más amplias que el genotipo, como familias o incluso poblaciones (Schlichting & Levin 1986). Para el caso de distintos momentos de medición, es un mismo individuo el que se mide repetidamente, variando el momento del año (e.g. hojas de primavera o verano) o distintos años (e.g. altura al año 10 y al año 11). En el caso de la medición en distintos años, la diferente expresión de un carácter puede ser el resultado de

las distintas condiciones ambientales de cada año, pero también de los distintos estadios ontogénicos de la planta medida. Este segundo efecto se acentúa conforme los años de medición son más distantes entre sí, y también si los años de medición implican distintos momentos del desarrollo de la planta. Por ejemplo, será muy grande el efecto ontogénico si una medición y la otra están separadas por más de 5 años, y también si las mediciones son en los dos primeros años de vida, aunque se trate de años seguidos de medición.

Frente a un cambio ambiental dado, los fenotipos pueden cambiar o permanecer fijos, produciendo una norma de reacción (Chambel et al. 2005). Pueden suceder tres cosas cuando se compara el fenotipo de diferentes genotipos frente a un cambio ambiental: I) que no haya cambios en el fenotipo, por lo que no se expresa plasticidad fenotípica; II) que haya un cambio en el fenotipo de todos los genotipos de igual magnitud y dirección, lo que representa una respuesta plástica, o III) que haya un cambio diferencial en el fenotipo de cada genotipo, expresando un control genético en la plasticidad (Figura 10).

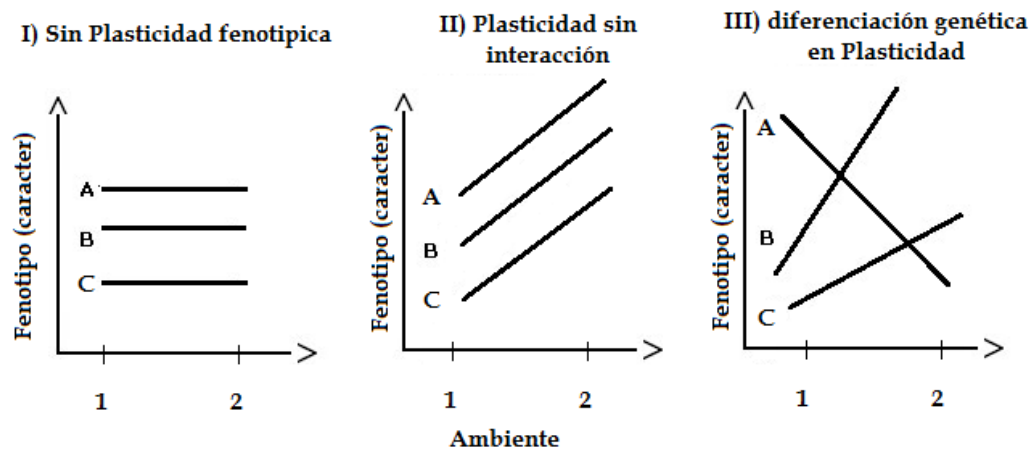


Figura 10. Representación gráfica conceptual de las normas de reacción.

La media de los genotipos a través de los ambientes están conectadas con una línea, cada línea representa a un genotipo distinto.

Por otro lado, mediante los modelos de ANOVA ya explicados, se puede evaluar estadísticamente la plasticidad, adicionando un factor de efectos fijos al modelo representando al “ambiente” y otro a la “interacción” entre este factor y el genotipo. Las diferencias significativas entre los niveles dentro del factor “ambiente” representan plasticidad fenotípica; mientras que una “interacción” (ambiente x genotipo) significativa representa el control genético de la plasticidad.

CAPÍTULO 3. Caracteres morfológicos en plantines

3.1. INTRODUCCIÓN

Las fases de plántula y plantín son las etapas de selección más agudas en la vida de una especie arbórea (Seiwa & Kikuzawa 1991; Moles & Westoby 2004). El conocimiento de los factores selectivos en estas etapas es crucial para entender los procesos evolutivos desarrollados en las plantas. Varios caracteres morfológicos, como la proporción peso de raíz/peso de tallo y longitud de raíz pueden afectar a la resistencia a sequía de las plantas (Padilla & Pugnaire 2007; Grossnickle 2012; Matías et al. 2014; Ledo et al. 2018). En este sentido, se espera que las plántulas adaptadas al estrés por sequía presenten raíces más largas y menor desarrollo de la biomasa aérea en proporción a la biomasa radicular (Cregg 1994; Paz 2003; Climent et al. 2004; Markesteijn & Poorter 2009), lo que les proporcionaría mayor capacidad para absorber agua y menor superficie relativa de transpiración. Para estudiar las relaciones alométricas raíz /tallo en *N. alpina* realicé un estudio en plantines de un año cultivados en vivero. El objetivo de este ensayo fue analizar la variación genética entre y dentro de poblaciones de *N. alpina* en caracteres cuantitativos radiculares y aéreos que presumiblemente están relacionados con la resistencia a sequía.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

En noviembre de 2009, según lo explicado en el capítulo 2, fue instalado el “Ensayo Complementario” en el vivero de la EEA Bariloche del INTA. En el ensayo se utilizaron plantas correspondientes a 7 poblaciones de *N. alpina*, compuestas por 9 a 12 familias de polinización abierta por población (74 familias en total) y 8 plantas por familia, lo que dio como resultado un total de 592 plantas (véase Tabla 2). El ensayo fue dividido en 8 bloques y dentro de cada bloque las plantas fueron distribuidas completamente al azar (parcelas de árbol individual: donde todas las progenies estuvieron representadas una única vez en cada bloque).

Cada una de las poblaciones fue caracterizada ambientalmente por medio de variables relevantes presentadas en la Tabla 2 (las variables climáticas fueron extraídas de Bianchi & Cravero 2010). También se reporta el peso medio por población de 100 semillas

llenas, calculado por Barbero (2014) para las mismas poblaciones de esta tesis y los mismos lotes de semillas utilizados para producir estas plantas.

Tabla 2. Poblaciones de *N. alpina* utilizadas en el Ensayo Complementario.

Ubicación, altitud (m s.n.m), precipitación media anual (PMA [mm.año^{-1}]), índice de aridez anual UNEP (AI_U), temperaturas medias de enero y julio (T °C), número de familias muestreadas (N° Fam) y peso promedio de 100 semillas llenas (P100 [g]).

Población	Lat.	Long.	Altitud	PMA	AI_U	T °C		N° Fam.	P100
	S	O				Ene.	Jul.		
<i>Boquete</i>	40° 01' 50"	71° 34' 38"	910	1600	2,88	13,07	1,37	10	1,37
<i>Curruhué</i>	39° 50' 34"	71° 30' 30"	1030	1400	2,45	13,16	0,89	11	1,44
<i>Paimún</i>	39° 42' 17"	71° 33' 52"	930	1800	3,35	12,07	0,93	10	1,46
<i>P. Arturo</i>	40° 01' 02"	71° 22' 19"	910	1200	2,06	14,57	1,93	12	1,31
<i>Queñi</i>	40° 09' 54"	71° 45' 20"	920	2400	5,03	9,67	-0,03	10	1,36
<i>Tromen</i>	39° 36' 18"	71° 20' 57"	1110	1300	2,35	13,52	1,01	9	1,48
<i>Tren Tren</i>	40° 11' 53"	71° 25' 53"	1040	1400	2,36	13,81	1,61	12	1,40
Tota								174	

En junio de 2009, luego de la primera temporada de crecimiento y durante el reposo invernal, se descalzaron las plantas de las macetas de forma cuidadosa y se lavaron las raíces con abundante agua corriente. Luego se midieron las siguientes variables: altura total del tallo (Alt: entre el cuello del plantín y la yema apical), diámetro a la altura del cuello (DAC) y longitud de la raíz más larga (LR), con regla y calibre digital, con una precisión de 0,1 cm, 0,01 mm y 0,1 cm respectivamente. A continuación, previa identificación, las plantas fueron colocadas en bolsas de papel individualmente para luego ser llevadas a estufa de secado a una temperatura de 72 °C durante 48 h, hasta peso constante. Finalmente fueron pesadas con una precisión de 0,0001 g, obteniéndose la biomasa de tallo (Bt) y de raíces (Br) por separado. Con los valores de Bt y Br fue calculada la relación entre la biomasa radicular y la biomasa de tallo ($RT = Br/Bt$) para determinar la distribución de la biomasa por parte de las plantas. También se calculó la longitud de raíz específica para cada plantín como: $LRE = LR/Br$, en [m/g]. Debido a que la defoliación artificial genera cambios en la distribución de carbono (Reichenbacher et al. 1996; Osier & Lindroth 2004; Wiley et al. 2017), se prefirió no colectar las hojas y esperar a que el proceso natural de crecimiento estacional se completara. Se sacrificó la medición de caracteres foliares para poder tener mayor confiabilidad en los caracteres de raíz y tallo.

Por lo tanto se estimó la biomasa foliar de cada plantín mediante una regresión

basada en datos de altura y diámetro desarrollada por Schmidt et al. (2009) para plantines de *Nothofagus pumilio* (una especie muy cercana a *N. alpina*). Para esto, primero se testeó la correlación de las ecuaciones de Schmidt para biomasa de tallo y ramas (Bt) y biomasa de raíz (Br) con los datos medidos en nuestro ensayo. Debido a que las correlaciones fueron significativas y altas ($r_{Bt} = 0,89$; $r_{Br} = 0,85$), se utilizó la ecuación de biomasa foliar publicada con la siguiente estructura:

$$Bf = 0,0010272 * DAC^{1,762} * Alt^{0,341}$$

donde Bf es la biomasa foliar, DAC es el diámetro a la altura del cuello y Alt es la altura del tallo.

Luego se calculó la biomasa aérea total (Ba) para cada plantín, sumando la medición de biomasa de tallo (Bt) más la biomasa foliar estimada (Bf). Finalmente se calculó la relación Br/Ba, a la que se simbolizó RA.

Con el fin de visualizar la relación entre los caracteres considerados, y su habilidad para discriminar a las poblaciones, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el paquete “FactoMineR” en el software R 3.3.2 (R Core Team, 2015), con todos los caracteres tomados como variables activas y las poblaciones tomadas como variables suplementarias.

Para poder testear las diferencias entre poblaciones y la variabilidad entre las familias de cada población, se realizó un test ANOVA para cada carácter medido mediante un modelo lineal mixto con la siguiente estructura:

$$y_{ijk} = \mu + \rho_i + \beta_j + \varphi_k(\rho_i) + e_{ijk}$$

donde y_{ijk} es el valor del carácter medido sobre el plantín de la familia k -ésima anidada en la población i -ésima localizada en el bloque j -ésimo; μ es la media general del carácter; ρ_i es el efecto (fijo) de la población; β_j es el efecto (aleatorio) del bloque; $\varphi_k(\rho_i)$ es el efecto (aleatorio) de la familia anidada en la población; y e_{ijk} es el error residual $\sim NID(0, \sigma^2)$.

Los parámetros genéticos calculados a partir de las varianzas del modelo fueron: heredabilidad en sentido restringido (h^2), coeficiente de variación genética aditiva (CV_A), correlaciones fenotípicas (r_p) y genéticas (r_A), y coeficiente de diferenciación cuantitativa (Q_{ST}) (para mayor información ver Capítulo 2).

Para analizar los posibles patrones de variación geográfica también se realizó un test de correlación entre la media poblacional del carácter considerado y el factor ambiental

correspondiente a cada población (latitud, altitud, precipitación media anual, temperatura media de enero, temperatura media de julio y la media anual del índice de aridez UNEP). Además, para evaluar posibles efectos maternos relacionados con el tamaño de la semilla, se testeó la correlación de la media de los caracteres con el peso medio poblacional de 100 semillas.

3.3. RESULTADOS

La media general de altura de tallos (Alt) fue de 5,4 cm; Tromen y Queñi fueron las poblaciones con plantines más bajos (4,9 cm en promedio) y Paimún fue la población con plantines más altos (6,3 cm en promedio). La media de diámetro a la altura del cuello (DAC) fue de 2,04 mm; los tallos de los plantines de Tromen fueron los más finos (1,65 mm) y los de Paimún los más gruesos (2,48 mm). La media de longitud de raíz (LR) fue 29,8 cm, siendo más de cinco veces mayor a la media de altura del tallo. Las biomásas de tallo (Bt) y de raíz (Br) variaron ampliamente entre las poblaciones, siendo dos veces mayor la media de las poblaciones más pesadas en biomasa respecto a las más livianas, y nuevamente los plantines de Tromen fueron los de medias menores y los plantines de Paimún los de medias mayores. En cambio la relación entre las biomásas de raíz y de tallo (RT) fue similar en todas las poblaciones, con una media general de 3,77. Sin embargo, incluyendo la biomasa foliar, la relación entre las biomásas de raíz y de parte aérea (RA) fue de 1,62, siendo la mitad de la anterior. Por último, la media de longitud de raíz específica (LRE) fue de 1,24 m/g, siendo los plantines de Tromen los que tuvieron la media más alta (1,61 m/g) y los plantines de Paimún los de menor media (0,84 m/g) (Tabla 3).

En el ACP la dimensión 1 fue responsable del 55,15 % del total de variación y estuvo relacionada con todas las variables excepto RT y RA, con una relación negativa entre LRE y el resto de las variables medidas. La dimensión 2 explicó el 23,21 % de la varianza, y fue asociada con RT y RA (Figura 11. a). Las poblaciones como variables suplementarias se separaron en ambas dimensiones, pero particularmente sobre la dimensión 1 (Figura 11. b). En el gráfico se observa que las poblaciones Tromen y Paimún son las más diferentes entre sí, ubicándose hacia los extremos de cuadrantes opuestos.

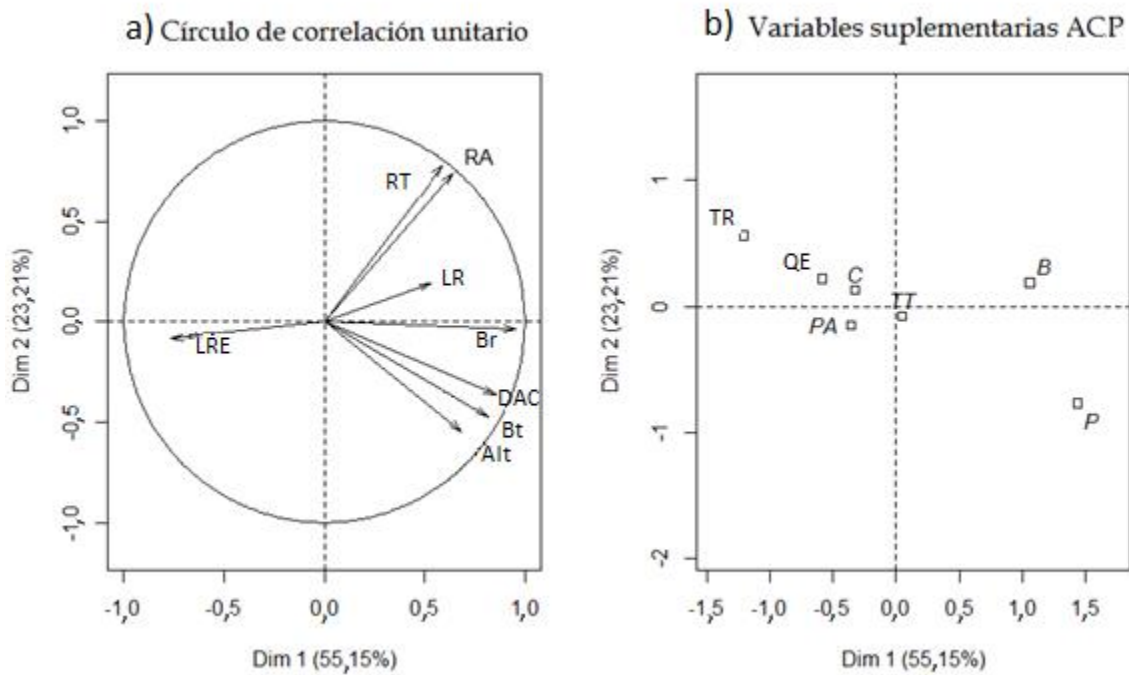


Figura 11. Gráfico de ACP de *N. alpina* del Ensayo Complementario.

a) círculo de correlación unitario de las dimensiones 1 y 2; b) variables suplementarias sobre el plano de componentes principales.

Se encontraron diferencias significativas entre las medias de las poblaciones para todos los caracteres, excepto la relación RT. De acuerdo con las pruebas *post hoc* de Tukey, Troman, con los plantines más pequeños, fue la población más diferenciada, seguida por Paimún, con los plantines más grandes (Tabla 3). La diferenciación entre las poblaciones fue moderada en general ($Q_{ST} = 36\%$), con el menor valor en LR ($Q_{ST} LR = 30\%$) y el mayor valor en LRE ($Q_{ST} LRE = 63\%$) (RT fue el único carácter en el que no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones, por lo tanto se asume que el $Q_{ST} = 0\%$). El factor familia fue significativo sólo para DAC, Bt y Br, pero incluso en esos casos este efecto explicó sólo 8,13; 6,60 y 7,22 % de la varianza total, respectivamente. La variación intra-poblacional fue poco variable entre poblaciones y caracteres, y en general tendió a ser baja para todas las poblaciones en todos los caracteres ($h^2_{media} = 0,20$ y $CV_{A media} = 14,65$). Troman fue la población que mostró la mayor variación intra-poblacional en promedio para todos los caracteres ($h^2_{TR media} = 0,42$; $CV_{A.TR media} = 30,82$) pero la heredabilidad y el coeficiente de variación genética aditiva fue estimado como cero en varias poblaciones y caracteres. En términos de heredabilidad la variación intra-poblacional más alta se estimó

en la longitud de raíz específica en Tromen ($h^2_{LRE} = 0,98$).

Tabla 3. Parámetros genéticos y estadísticos de todos los caracteres medidos en cada población natural de *N. alpina* incluidas en el Ensayo Complementario.

Media y su desviación estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). Distintas letras del test de Tukey indican diferencias significativas.

<i>Nothofagus alpina</i>										
		B	C	P	PA	QE	TR	TT	Promedio	Q _{ST}
Altura (cm)	Media (de)	5,7 (1,5)	5,0 (0,9)	6,3 (1,4)	5,6 (1,0)	4,9 (1,0)	4,9 (0,8)	5,5 (1,0)	5,4 (1,2)	47 %
	h^2 (SE)	0 (0,02)	0,65 (0,25)	0 (0,02)	0,41 (0,17)	0,24 (0,12)	0,56 (0,21)	0 (0,01)	0,27 (0,12)	
	σ^2_A	0	0,6	0	0,4	0,3	0,4	0	0,2	
	CV_A	0	15,03	0	11,29	10,62	12,81	0	7,11	
	Tukey	cd	ab	d	c	a	ab	bc		
DAC (mm)	Media (de)	2,21 (0,48)	2,00 (0,45)	2,48 (0,57)	1,91 (0,44)	1,94 (0,43)	1,65 (0,40)	2,05 (0,44)	2,04 (0,51)	35 %
	h^2 (SE)	0 (0,02)	0,57 (0,22)	0,53 (0,24)	0,03 (0,03)	0,53 (0,22)	0,17 (0,08)	0,02 (0,02)	0,26 (0,12)	
	σ^2_A	0	0,12	0,18	0,01	0,10	0,03	0	0,06	
	CV_A	0	17,12	17,00	4,04	16,26	10,28	2,89	9,66	
	Tukey	cd	bc	d	ab	b	a	bc		
LR (cm)	Media (de)	33,3 (9,9)	29,8 (9,0)	31,4 (9,0)	29,1 (8,2)	29,9 (7,6)	25,4 (8,8)	29,8 (8,0)	29,8 (8,8)	30 %
	h^2 (SE)	0 (0,02)	0 (0,02)	0 (0,02)	0,15 (0,08)	0,11 (0,07)	0,62 (0,23)	0,01 (0,02)	0,13 (0,06)	
	σ^2_A	0	0	0	10,2	6,2	49,3	0,6	9,5	
	CV_A	0	0	0	10,95	8,32	27,64	2,56	7,07	
	Tukey	b	b	b	ab	b	a	b		
Bt (g)	Media (de)	0,1099 (0,053)	0,0831 (0,039)	0,1317 (0,067)	0,0863 (0,054)	0,0763 (0,036)	0,0564 (0,026)	0,0934 (0,040)	0,0912 (0,051)	36 %
	h^2 (SE)	0 (0,02)	0,57 (0,22)	0,27 (0,14)	0,18 (0,09)	0,54 (0,23)	0 (0,01)	0,20 (0,09)	0,25 (0,12)	
	σ^2_A	0	0,0009	0,0012	0,0005	0,0007	0	0,0003	0	
	CV_A	0	35,79	26,57	26,56	35,38	0	19,35	20,52	
	Tukey	cd	b	d	b	b	a	bc		
Br (g)	Media (de)	0,4728 (0,270)	0,3113 (0,176)	0,5187 (0,318)	0,3031 (0,194)	0,2970 (0,195)	0,2184 (0,128)	0,3517 (0,202)	0,3512 (0,237)	37 %
	h^2 (SE)	0 (0,02)	0,03 (0,03)	0,35 (0,18)	0,32 (0,14)	0,39 (0,18)	0,23 (0,10)	0 (0,01)	0,19 (0,01)	
	σ^2_A	0	0,0009	0,0354	0,0125	0,0151	0,0038	0	0,01	
	CV_A	0	9,64	36,26	36,9	42,26	28,33	0	21,91	
	Tukey	cd	b	d	ab	ab	a	bc		
RT	Media (de)	4,26 (1,46)	3,69 (1,10)	3,80 (1,08)	3,53 (1,39)	3,68 (1,25)	3,90 (1,92)	3,68 (1,27)	3,77 (1,37)	-
	h^2 (SE)	0,47 (0,22)	0,03 (0,03)	0,12 (0,08)	0,10 (0,06)	0,32 (0,15)	0,34 (0,14)	0 (0,01)	0,20 (0,10)	
	σ^2_A	1,02	0,04	0,14	0,20	0,50	1,29	0	0,46	
	CV_A	23,75	5,33	9,90	12,62	19,21	29,07	0	14,27	
	Tukey	a	a	a	a	a	a	a		
LRE (m/g)	Media (de)	0,92 (0,52)	1,27 (0,73)	0,84(0,62)	1,39 (0,94)	1,47 (0,8)	1,61 (1,34)	1,17 (0,80)	1,24 (0,90)	63 %
	h^2 (SE)	0 (0,02)	0,07 (0,05)	0 (0,02)	0 (0,02)	0,05 (0,04)	0,98 (0,36)	0 (0,01)	0,16 (0,07)	
	σ^2_A	0	0,04	0	0	0,10	1,90	0	0,30	
	CV_A	0	17,4	0	0	18,7	107,6	0	20,5	
	Tukey	a	ab	a	b	b	b	ab		
RA	Media (de)	1,88 (0,63)	1,58 (0,48)	1,62 (0,47)	1,54 (0,59)	1,56 (0,54)	1,62 (0,76)	1,62(0,55)	1,62 (0,58)	43 %
	h^2 (SE)	0,39 (0,18)	~0 (0,02)	0,03 (0,03)	0,12 (0,07)	0,31 (0,15)	0,37 (0,19)	0 (0,01)	0,17 (0,09)	
	σ^2_A	0,16	<0,01	<0,01	0,04	0,09	0,22	0	0,07	
	CV_A	29,05	~0	6,07	16,83	23,96	36,92	0	16,12	
	Tukey	b	ab	ab	a	a	ab	ab		

DAC: diámetro a la altura del cuello; LR: longitud de raíz; Bt: biomasa del tallo; Br: biomasa radicular; RT: relación entre Br y Bt; LRE: longitud de raíz específica; RA: Br/Ba.

Todas las correlaciones fenotípicas fueron significativas excepto entre Alt - RT y Alt - RA. Las correlaciones fenotípicas fueron en general moderadas o altas, el valor más alto fue entre RT y RA (0,96) (Tabla 4). Las correlaciones fenotípicas de LRE con el resto de los caracteres fueron negativas y moderadas (sólo con LR la correlación fue baja). Por otro lado las correlaciones genéticas fueron generalmente altas (el valor más alto estimado fue incluso mayor a 1: $r_{A\ DAC-LR} = 1,14$). La longitud de raíz resultó altamente correlacionada con todos los caracteres. Por otro lado, la altura del tallo mostró una correlación preponderantemente baja con todos los caracteres pero presumiblemente no significativa dado el alto valor relativo de los errores estándares, en muchos casos superando al valor de la correlación. Este patrón se exceptúa en las correlaciones con LR y RT cuyos valores de error estándar fueron bajos, en el primer caso resultando levemente alta y en el segundo moderada, y cuyo sentido fue negativo. Contrariamente, el diámetro al cuello mostró una correlación positiva (excepto con LRE) y alta (excepto con Alt) con casi todos los caracteres, con bajos errores estándares que evidencian su significancia.

Tabla 4. Correlación fenotípica (arriba de la diagonal) y correlación genética aditiva (debajo de la diagonal) entre caracteres morfológicos de plántulas de *N. alpina* (error estándar entre paréntesis).

	Altura (Alt)	Diametro (DAC)	Longitud de raíz (LR)	Biomasa del tallo (Bt)	Biomasa de la raíz (Br)	Bt/Br (RT)	Longitud de raíz especifica (LRE)	Br/Ba (RA)
Alt	1,00	0,67 (0,03)	0,23 (0,04)	0,74 (0,03)	0,65 (0,03)	(n.s)	-0,45 (0,04)	(n.s)
DAC	-0,03 (0,12)	1,00	0,38 (0,04)	0,84 (0,02)	0,83 (0,02)	0,23 (0,04)	-0,64 (0,03)	0,23 (0,04)
LR	-0,74 (0,05)	1,14 (0,03)	1,00	0,35 (0,04)	0,47 (0,04)	0,38 (0,04)	-0,14 (0,04)	0,41 (0,04)
Bt	-0,06 (0,12)	0,96 (0,01)	0,89 (0,02)	1,00	0,82 (0,02)	0,10 (0,04)	-0,53 (0,04)	0,19 (0,04)
Br	-0,18 (0,12)	0,92 (0,02)	1,01 (<0,01)	0,93 (0,02)	1,00	0,54 (0,04)	-0,64 (0,03)	0,60 (0,03)
RT	-0,44 (0,09)	0,38 (0,10)	0,94 (0,01)	0,21 (0,11)	0,52 (0,09)	1,00	-0,50 (0,04)	0,96 (0,01)
LRE	0,13 (0,12)	-0,54 (0,08)	-1,03 (0,01)	-0,39 (0,10)	-0,43 (0,09)	-0,77 (0,05)	1,00	-0,54 (0,04)
RA	-0,29 (0,11)	0,37 (0,10)	0,89 (0,02)	0,29 (0,11)	0,59 (0,08)	0,97 (0,01)	-0,78 (0,05)	1,00

n.s: no significativas.

Los tests de correlación para analizar patrones geográficos de variación no resultaron significativos para ningún carácter y ningún factor ambiental. Lo mismo sucedió con el peso de 100 semillas. Estos resultados evidenciaron la falta de patrones geográficos clinales o efectos maternos de la variación de los caracteres medidos en relación a los factores ambientales considerados.

3.4. DISCUSIÓN

El factor familia fue significativo sólo en algunos rasgos, e incluso en esos casos representó una baja proporción de la variabilidad total. En términos de CV_A , la variación dentro de cada población fue baja. Este parámetro de genética de poblaciones es un proxy de la capacidad de evolución (Houle 1992), es decir, la capacidad de un organismo para evolucionar, y principalmente para adaptarse. Por lo tanto, los resultados obtenidos nos indican que las poblaciones analizadas tienen baja capacidad de adaptación en referencia a los caracteres considerados; es decir, baja capacidad de cambiar la frecuencia de sus variantes genéticas para sobrevivir in situ bajo condiciones extremas. Este es el principal resultado del presente capítulo. Por supuesto, este patrón de variación intra-poblacional baja no es constante sino que, por el contrario, varía entre poblaciones y caracteres.

En un ensayo en vivero para *N. obliqua* realizado por Barbero (2014) se encontraron valores de CV_A aún más bajos para varios caracteres de crecimiento, morfológicos y fenológicos en las plántulas. Se estimaron valores similarmente bajos para *Fagus sylvatica* y las poblaciones suecas de *Quercus robur* (Baliuckas et al. 2001), y para *Betula pendula*, *Alnus glutinosa* y *Quercus robur*, medidas a las edades de 4 a 9 años (Baliuckas & Pliūra 2008) en brotación, características de coloración en otoño y altura, el CV_A raramente superó los 25 en ambos estudios. Sin embargo, estos resultados contrastan con los de *Quercus robur* de seis poblaciones lituanas que crecen en dos sitios diferentes, donde el CV_A de rasgos adaptativos alcanzó un valor promedio de 18,52 en uno de los sitios y 31,74 en el otro (Baliuckas & Pliura 2003).

Dado que las correlaciones genéticas aditivas son en general mayores que las correlaciones fenotípicas, las correlaciones ambientales son, en consecuencia, bajas (Lynch & Walsh 1998), lo que destaca la posibilidad de utilizar algunos de estos rasgos como criterios de selección temprana. Resultan una excepción las correlaciones de la altura con la mayoría de los caracteres, las cuales resultaron presumiblemente no significativas, salvo con el largo de la raíz y la relación de biomasa entre la raíz y el tallo. Al respecto es de destacar que la correlación genética levemente alta de la altura con el largo de la raíz es de signo negativo, contrariamente a la correlación fenotípica entre los mismos caracteres, que es positiva. Esto demuestra un balance de competencia en la inversión de recursos entre la

altura de la planta o el largo de la raíz, sobre los cuales la correlación ambiental es luego positiva (las condiciones que favorecen al crecimiento en altura también lo hacen con el crecimiento radicular).

Desde el punto de vista silvícola de la especie, puede destacarse que la altura del plantín (al menos a esta corta edad) es un muy mal indicador de sus cualidades en caracteres importantes como biomasa radicular, biomasa del tallo o diámetro al cuello, y que la selección de plantines en vivero para plantación por este criterio iría en desmedro del criterio del largo de raíz, de gran importancia para otorgar adaptabilidad. En cambio el diámetro al cuello, además de ser fácilmente medible, es un indicador muy bueno para estos mismos caracteres de gran importancia silvícola y en especial para largo de raíz, con el cual guarda una relación positiva. O sea que si en el vivero seleccionamos los plantines que llevaremos a plantación por su DAC, estaremos al mismo tiempo seleccionándolos por su LR.

Por otro lado la longitud de raíz específica (LRE) tuvo una correlación (tanto fenotípica como genética) negativa con todas las variables. Siendo que una mayor LRE indica raíces más finas para igual largo (o más largas para igual grosor), la correlación genética negativa muestra que existe un balance de competencia entre esta variable y las restantes, de modo que una mayor asignación de recursos a crecimiento en DAC o incluso en biomasa y largo radicular, determina la producción de raíces más finas.

La diferenciación poblacional fue moderada, con un promedio de todos los caracteres de 36 %. Dado que los valores de Q_{ST} que estimamos son más altos que los valores de F_{ST} publicados (de 5 a 6 %) (Marchelli and Gallo 2001; Azpilicueta et al. 2013), debemos reconocer un probable efecto de adaptación a las condiciones ambientales actuales en los patrones cuantitativos de variación genética que controlan los rasgos estudiados. De acuerdo con las comparaciones *post hoc*, Tromen fue la población más diferente. Esto es consistente con estudios previos basados en marcadores de ADN de cloroplastos (Marchelli et al. 1998; Marchelli & Gallo 2006), donde se propusieron grupos de poblaciones norte y sur según diferentes haplotipos, siendo Tromen la única población de nuestro estudio perteneciente al grupo norte. Asimismo, en base a SSR, Azpilicueta et al. (2013) no pudieron agrupar Tromen con otras poblaciones de *N. alpina*. Finalmente,

Tromen también difiere de otras poblaciones en rasgos de semillas (Marchelli & Gallo 1999). Centrando el análisis en una posible adaptación (o exaptación) a sequía, y poniendo el foco consecuentemente en los caracteres de raíz, la diferenciación entre las poblaciones fue moderada en LR, Br y RA, pero nula en RT y relativamente alta en LRE. Asimismo, Tromen fue la población con el valor medio más bajo en las variables absolutas como LR y Br, pero más alto en las variables relativas como RT, RA y particularmente LRE, o sea con los mejores valores de las características radiculares en relación a las aéreas, lo que le otorgaría mejores aptitudes para sobrellevar condiciones de sequía en la crítica etapa ontogenética de instalación.

Resumiendo, el nivel de variación intra- poblacional fue bajo, lo que indica una baja adaptabilidad general de las poblaciones naturales, lo que representa una desventaja importante para responder al Cambio Climático (CC) por medio de un proceso de selección. Al mismo tiempo, la diferenciación fue moderada en general y alta en algunos rasgos adaptativamente relevantes (e.g. LRE y RA) frente al pronóstico de CC, lo que indica que las poblaciones adaptadas en la actualidad a ambientes hostiles posiblemente logren sobrevivir al CC sin cambiar sus estructuras genéticas.

CAPÍTULO 4. Crecimiento en plantas juveniles

4.1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento es el resultado de una respuesta integrada de numerosas variables a las que el árbol está sujeto durante su ontogenia (Kozlowski et al. 1991). La formación de los tejidos de las plantas sigue básicamente tres pasos: la división (o mitosis) de las células embrionarias para formar nuevas células, agrandamiento y/o alargamiento de estas células y su diferenciación en células con una función específica (Nabors 2006). El crecimiento cuando es longitudinal resulta de la actividad del meristema primario o apical, que está presente en los extremos de raíces y tallos, mientras que el crecimiento radial o diametral resulta del meristema lateral o secundario que incluye al cambium y el felógeno, que se localizan en forma cilíndrica a todo lo largo de los tallos de la planta (Raven et al. 1992).

El diámetro a la altura del cuello del tallo (unión de parte aérea con subterránea) es uno de los caracteres morfológicos de mayor valor predictivo en el desarrollo posterior de un plantín (Escobar 2007), y junto con la altura, son unas de las medidas que utilizan los viveros forestales en el momento de evaluar su calidad (Pinto 2011). Por su parte, el desarrollo en altura es uno de los caracteres morfológicos que caracterizan su adaptabilidad, ya que define su crecimiento y potencialidad de sobrevivencia en el campo (Pinto 2011). El crecimiento en altura es considerado un carácter dinámico en el cual el valor en cada momento afecta al subsecuente crecimiento (Mäkelä 1985). Los caracteres de crecimiento en los árboles son acumulativos, ya que los sucesivos incrementos anuales o estacionales se suman al crecimiento total; por ello la estimación de los parámetros genéticos de estos caracteres se encuentran correlacionados en el tiempo y permiten seleccionar árboles con una alta confiabilidad (Ismaili et al. 2016). Cuando los factores ambientales no restringen el crecimiento, la base genética de los árboles determina la velocidad de este proceso (Fosket et al 1994). Sin embargo, los factores ambientales enmascaran la variación genética en árboles.

En ciencias forestales los métodos que tradicionalmente se han usado para el análisis

de medidas repetidas en el tiempo, como lo requiere el estudio del crecimiento, pueden ser englobados en: 1) *análisis univariado* para cada periodo de tiempo; 2) *análisis univariado de parcelas divididas*; 3) *análisis multivariado*; y 4) *análisis de parámetros de funciones ajustadas*, y todos ellos tienen ventajas y desventajas al momento de usarlos (Meredith & Stehman 1991). Pero en ninguno de los modelos anteriores se tiene en cuenta la correlación entre las mediciones del mismo individuo, y el cálculo y análisis del crecimiento, requiere considerar el tiempo como una variable a la que es necesario prestar atención.

Existe otro análisis que no ha sido muy utilizado en ciencias forestales y que sirve para estudiar los procesos de cambio directamente asociados con el paso del tiempo. Examina los cambios que se producen a lo largo del tiempo, para la misma muestra de individuos y constata las diferencias interindividuales en los cambios intraindividuales (Visser 1985), es lo que se conoce como *diseño longitudinal*. Con estos diseños, la variable respuesta es función del tiempo y la característica más importante es la repetición de las medidas de respuesta de los sujetos a través del tiempo. Ware & Liang (1996) subrayan que los estudios longitudinales ofrecen la oportunidad de estudiar patrones individuales de cambio sobre el tiempo y condiciones.

En el *diseño longitudinal* cada una de las mediciones repetidas sobre una misma planta en momentos sucesivos no es independiente de las precedentes, sino que por lo contrario está correlacionada. Reconocer en el modelo estadístico una correlación distinta entre cada una de las mediciones llevaría a una sobre-parametrización del mismo. Alternativamente, puede probarse que la correlación entre cada una de las mediciones sigue patrones constantes. Por ejemplo, la correlación de dos mediciones seguidas es comúnmente más alta que la existente entre dos mediciones separadas por una tercera, y así sucesivamente. Incluso, la disminución sucesiva de las correlaciones con el aumento de la distancia temporal entre ellas puede seguir un patrón constante. Estos patrones de correlación entre cada una de las medidas repetidas pueden considerarse en la modelización reduciendo el número de parámetros del modelo. Así, la matriz de correlaciones (o matriz de varianzas - covarianzas) entre cada una de las medidas repetidas puede reducirse desde el caso más complejo donde todas son diferentes (el caso de la sobre-parametrización) a casos donde se reflejan los patrones de variación de esas

correlaciones, logrando así un modelo más simple, con menos parámetros, pero que refleja en forma suficientemente aceptable lo observado en el ensayo. Encontrar esos patrones es lo que se denomina “modelar la estructura de varianzas y covarianzas”

La matriz de varianzas-covarianzas se refiere entonces a las varianzas entre los individuos en cada momento, y a la correlación entre mediciones realizadas en un mismo individuo a lo largo del tiempo (intra-individuos). Existen diferentes modelos de correlación intra-individuos: i) el modelo de independencia, que asume que las mediciones son independientes, o sea que no hay en verdad correlación entre las mediciones repetidas; ii) el modelo de Simetría Compuesta, donde todas las mediciones tienen la misma correlación y varianza independientemente del lapso que las separe; iii) el modelo de covarianzas no estructuradas, donde todas las varianzas y covarianzas son diferentes para todas las mediciones (el modelo sobre-parametrizado); iv) el modelo de covarianzas no estructuradas de k-bandas, donde ciertos grupos de mediciones tienen iguales varianzas pero son distintas entre grupos; v) el modelo de Toeplitz, que tiene elementos iguales en las diagonales de la matriz difiriendo entre ellas; vi) el modelo autoregresivo de orden uno AR(1), donde las correlaciones van decayendo a medida que se encuentran más apartadas en el tiempo con mediciones equiespaciadas; vii) el modelo de correlación exponencial, donde las correlaciones decaen a medida que se encuentran más alejadas y con mediciones no equiespaciadas (este modelo es más parametrizado que el anterior).

Un estudio longitudinal busca conocer no sólo los cambios o perfiles individuales, sino determinar si el cambio es significativo y si se dan diferencias entre los distintos individuos de la muestra. Por lo tanto los modelos longitudinales estudian los procesos de cambio en toda su amplitud.

El objetivo de este capítulo es entonces, medir la variabilidad genética intra e inter-poblacional y la plasticidad fenotípica (entre años consecutivos) y su interacción con el factor genético (interacción entre el año y la población), en caracteres cuantitativos de crecimiento de poblaciones naturales de *N. alpina* creciendo en un ambiente común y abordando la influencia del tiempo en el crecimiento de los árboles.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el Ensayo Principal ubicado en el paraje Las Golondrinas (descrito en el capítulo 2) se midió altura total (Alt) y diámetro a la altura del cuello (DAC) de cada individuo vivo en la época invernal de cada año desde el 2014 al 2017. Todas las mediciones de altura se realizaron con regla de madera (con una precisión de 0,5 cm) desde una marca de esmalte, que se colocó por debajo de la yema apical en 2014, hasta la parte apical del individuo, y luego se sumó la altura desde el suelo hasta la marca para completar la altura total del árbol. Las mediciones de DAC se realizaron con calibre digital (con una precisión de 0,01 mm), siempre con el calibre en la misma posición y sobre una marca de esmalte que indicaba el cuello de cada individuo, de modo de repetir la medición exactamente en el mismo lugar y que las variaciones se debieran a cambios reales en el DAC.

Se realizaron tres tipos de análisis en este capítulo: Primero *análisis univariado para cada periodo de tiempo* de las medidas invernales anuales de crecimiento acumulado y relativo de Alt y DAC desde el 2014 al 2017. Luego un análisis *longitudinal* de las mediciones repetidas en el tiempo de la tasa de crecimiento en Alt y DAC de las dos temporadas medidas (2014-2015 y 2015-2016). Y por último un *análisis de parámetros de funciones ajustadas* de las mediciones repetidas en el tiempo de Alt y DAC en las dos temporadas.

Para analizar las mediciones invernales se utilizó primero como variable Alt o DAC acumulados y luego su crecimiento relativo (CR) en cada año por separado. Además para poder comparar el crecimiento entre distintos años se utilizó sólo al CR de Alt y DAC, debido que la Alt y DAC acumulados es evidente que aumentan a medida que avanzan los años.

Los CR de Alt y DAC se calcularon según la siguiente formula:

$$CR(\%) = 100 * \frac{X_f - X_i}{X_i}$$

donde X_i es la variable medida un año y X_f es la misma variable (Alt o DAC) medida al año siguiente.

Para analizar la variación intra e inter-poblacional se utilizó un modelo lineal mixto por cada año utilizando el paquete “lme4” en el software R 3.3.2 (R Core Team, 2015) con

la siguiente estructura:

$$y_{ijk} = \mu + \rho_i + \beta_j + \varphi_{k(\rho_i)} + \varepsilon_{ijk}$$

donde: y_{ijk} es la observación en el individuo de la k -ésima familia de la i -ésima población en el j -ésimo bloque; μ es la media general del ensayo para la variable medida; ρ_i es el efecto fijo de la i -ésima población; $\varphi_{k(\rho_i)}$ es el efecto aleatorio de la k -ésima familia anidada dentro de la i -ésima población; β_j es el efecto aleatorio del j -ésimo bloque y ε_{ijk} es el error residual $\sim NID(0, \sigma^2)$.

Esta aproximación, tanto con los valores absolutos como con los relativos en cada año, corresponde al método 1), o sea *análisis univariado para cada periodo de tiempo*. El análisis en cada año se realizó tanto para Alt y DAC acumulados como para el crecimiento relativo (CR) con el fin de calcular los parámetros genéticos de cada carácter y realizar una comparación de éstos entre los distintos años. En el caso de CR se realizó un análisis de covarianza, incluyendo Alt o DAC inicial (correspondiente al valor alcanzado el año anterior) como covariable, tal como se hizo en otros trabajos (Sanchez Vargas & Vargas Hernandez 2007; Barbero 2014). Por lo tanto el crecimiento acumulado se analizó para todos los años comprendidos entre 2014 y 2017, mientras que el CR sólo para 2015, 2016 y 2017, ya que para 2014 no había datos registrados del año anterior para relativizar la medición de ese año.

Para el análisis de la variación anual del CR se utilizaron sólo las plantas que estuvieron vivas hasta el último año, para así eliminar el desbalance entre años. Para esto, se ajustó un modelo lineal mixto incluyendo al “año” y la interacción “año por población” como factores fijos junto con “población”, y a “familia” y “bloque” como factores aleatorios, para testear las diferencias entre años y la existencia de interacción entre año y población.

Además de las mediciones puntuales de invierno (una por año), durante las temporadas de crecimiento 2014-2015 y 2015-2016 se realizaron mediciones repetidas en el tiempo de Alt y DAC. Las mediciones en la temporada 2014-2015 comenzaron el 20 de agosto de 2014 y finalizaron el 24 de febrero de 2015, registrándose la Alt de cada planta del ensayo cada 7 días y de DAC cada 15 días. En la temporada 2015-2016 las mediciones comenzaron el 11 de septiembre de 2015 y finalizaron el 25 de enero de 2016, registrándose sólo la altura cada 15 días. El comienzo y la finalización de cada temporada de crecimiento fueron marcados por el comienzo y fin de la elongación en altura en la mayoría de los

individuos (comenzando las mediciones antes del inicio de crecimiento y finalizando cuando sólo 10 individuos del total seguían creciendo).

Antes de comenzar los análisis de datos para las mediciones repetidas se realizó una depuración eliminando los individuos que se murieron en el transcurso de las mediciones y los que sufrieron necrosis apical y siguieron creciendo por yemas laterales (25 plantas en la temporada 2014-2015 y 17 plantas en la temporada 2015-2016 de todas las poblaciones). Este proceso de relevo de yemas dominantes genera un descenso en la curva de crecimiento en altura, y presumimos que tiene también una influencia en el crecimiento diametral, por lo cual los mismos individuos que se eliminaron para altura también se eliminaron para DAC. Por lo tanto el total de individuos analizados fue de 865 en 2014-2015 y de 739 en 2015-2016.

En este caso se utilizó en primer lugar la aproximación metodológica 5) de *diseño longitudinal*. Para analizar las medidas repetidas en la misma temporada se utilizó como variable dependiente la tasa de crecimiento diaria:

$$TCd = \frac{X_f - X_i}{d}$$

donde X_i es la variable medida en una medición, X_f es la misma variable medida en la medición siguiente y d es la cantidad de días que transcurrieron entre una medición y otra.

Se aplicaron modelos lineales mixtos longitudinales con correlación AR1 (Autoregresivo orden 1), debido a que las mediciones fueron equiespaciadas en el tiempo, con la siguiente estructura:

$$y_{ijkl} = \mu + \rho_i + \rho_i * \tau_l + \tau_l + \beta_j + \varphi_k(\rho_i) + e_{ijkl}$$

donde y_{ijkl} es el valor de la variable medida en el l -ésimo tiempo del individuo de la k -ésima familia anidada en la i -ésima población del j -ésimo bloque; μ es la media de la variable, ρ_i es el efecto (fijo) de la i -ésima población; τ_l es el efecto (fijo) del l -ésimo tiempo; β_j es el efecto (fijo) del j -ésimo bloque; $\varphi_k(\rho_i)$ es el efecto (aleatorio) de la k -ésima familia dentro de la i -ésima población, y e_{ijkl} es el error residual.

Para el análisis de este modelo se utilizó el paquete “nlme” en el software R 3.3.2 (R Core Team, 2015). Este paquete restringe la consideración del bloque como un factor de efecto fijo, pero permite modelar la matriz de correlación entre las mediciones y el tiempo utilizando el modelo autoregresivo de orden 1 (AR1), lo que resulta esencial para el

análisis. En este caso consideramos que es aceptable tomar el factor bloque como de efectos fijos.

Por otro lado, también se aplicó a este set de datos la aproximación metodológica 4) de *análisis de parámetros de funciones ajustadas*, para de esta manera modelar el proceso de crecimiento individual a lo largo del tiempo en cada una de las temporadas en las que se realizaron medidas repetidas. Para esto se ajustó para cada planta una curva sigmoidea mediante un análisis de regresión no lineal con el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). El modelo seleccionado fue el de Boltzmann, el cual ya ha sido utilizado para describir el crecimiento de plantines de especies forestales (Aparicio et al. 2010; Mondino 2014; Barbero 2014) y cuya expresión simbólica es:

$$X_t = X_i + \frac{(X_f - X_i)}{1 + e^{\left[\frac{t_{50}-t}{S}\right]}}$$

donde X_t es Alt o DAC al tiempo t , medido en días julianos (cantidad de días desde el 1° de enero del año de medición), X_i es el valor inicial de Alt o DAC, que fue el valor relevado en el primer control, X_f es el valor final de estas variables, que fue el valor registrado en la última medición, e es el número de Euler, t_{50} es la cantidad de días requeridos para alcanzar la mitad del crecimiento del período analizado y S es un parámetro de la pendiente de la curva que modela su forma (una S mayor implica una curva más achatada).

Para evaluar la exactitud en el ajuste del modelo se utilizó el R^2 y relación entre el error estándar de la estimación y el valor mejor ajustado para cada parámetro (Zar et al. 1999). Siguiendo la metodología propuesta por Notivol et al. (2007), una vez construida la curva individual de cada planta se derivaron 2 parámetros de crecimiento: t_{10} : inicio del crecimiento, y t_{90} : fin del crecimiento, que son los tiempos que según el modelo le toma a cada planta llegar al 10 % y 90 % del crecimiento total de esa temporada o estación respectivamente:

$$t_{10} = t_{50} - \ln(9) \times S$$

$$t_{90} = t_{50} - \ln\left(\frac{1}{9}\right) \times S$$

Para poder probar las diferencias entre poblaciones y la variabilidad entre las familias de cada población, en este caso se realizó un ANOVA para cada uno de los

parámetros estimados (t_{10} , t_{90} , t_{50} y S) mediante un modelo lineal mixto igual al descrito para las mediciones puntuales de Alt y DAC de invierno. También se calculó el tiempo térmico (grados día acumulados) para llegar al día medio por cada población donde inició el crecimiento (t_{10}) en Alt para las dos temporadas de medición.

En base a los modelos estadísticos presentados, se calcularon los parámetros genéticos para cada población: la heredabilidad y el coeficiente de varianza genética aditiva para cada carácter. Y en los modelos donde el factor población resultó significativo se calculó la diferenciación genética cuantitativa entre las poblaciones (Q_{ST}).

Por último, se tomaron los valores de Alt y DAC acumulados medidos en la temporada invernal de los diferentes años de medición (2014-2017) y se analizaron las correlaciones fenotípicas (se estimó el coeficiente de correlación de Pearson) entre todos los caracteres en todos los años y correlaciones genéticas entre los distintos caracteres medidos el mismo año y entre los valores de un mismo carácter medido en distintos años.

4.3. RESULTADOS

Variables de crecimiento medidas en invierno

Crecimiento Acumulado

El mayor valor absoluto de Alt al 2017 fue medido en un árbol de la familia TT12 con 491 cm. La población con la mayor media en altura acumulada en casi todos los años de medición fue Queñi (QE) comenzando con una altura media de 112,0 cm en el año 2014 y terminando con 290,6 cm en el 2017 (sólo fue levemente superada por Boquete (B) en 2017: $Alt_{B-2017} = 292,0$). Las poblaciones con la menor media en altura en casi todos los años fueron Puerto Arturo (PA) y Tromen Alto (TRA), comenzando ambos con una altura media de 105 cm en el año 2014 y finalizando PA con una altura de 261,7 cm y TRA con 262,6 cm en el 2017, aunque la población de menor altura en el último año fue Paimún ($Alt_{P-2017} = 256,6$ cm) (Figura 12).

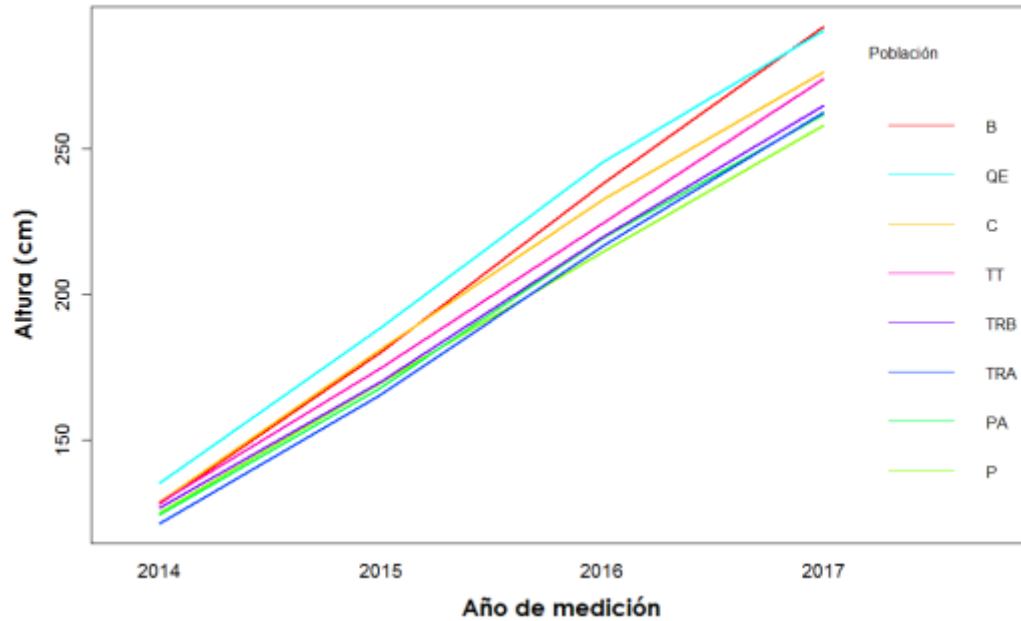


Figura 12. Gráfico de interacción entre años de medición (2014-2017) y la media de crecimiento en altura por población.

Sin embargo, el análisis de altura acumulada de cada año por separado no mostró diferencias significativas entre las medias poblacionales (Figura 13) en ninguno de los años medidos, salvo en el año 2017, donde sólo se encontraron diferencias marginalmente significativas entre las poblaciones Puerto Arturo y Queñi ($p= 0,045$). La diferenciación genética entre poblaciones para el año 2017 fue moderada/baja ($Q_{ST-2017}= 12\%$).

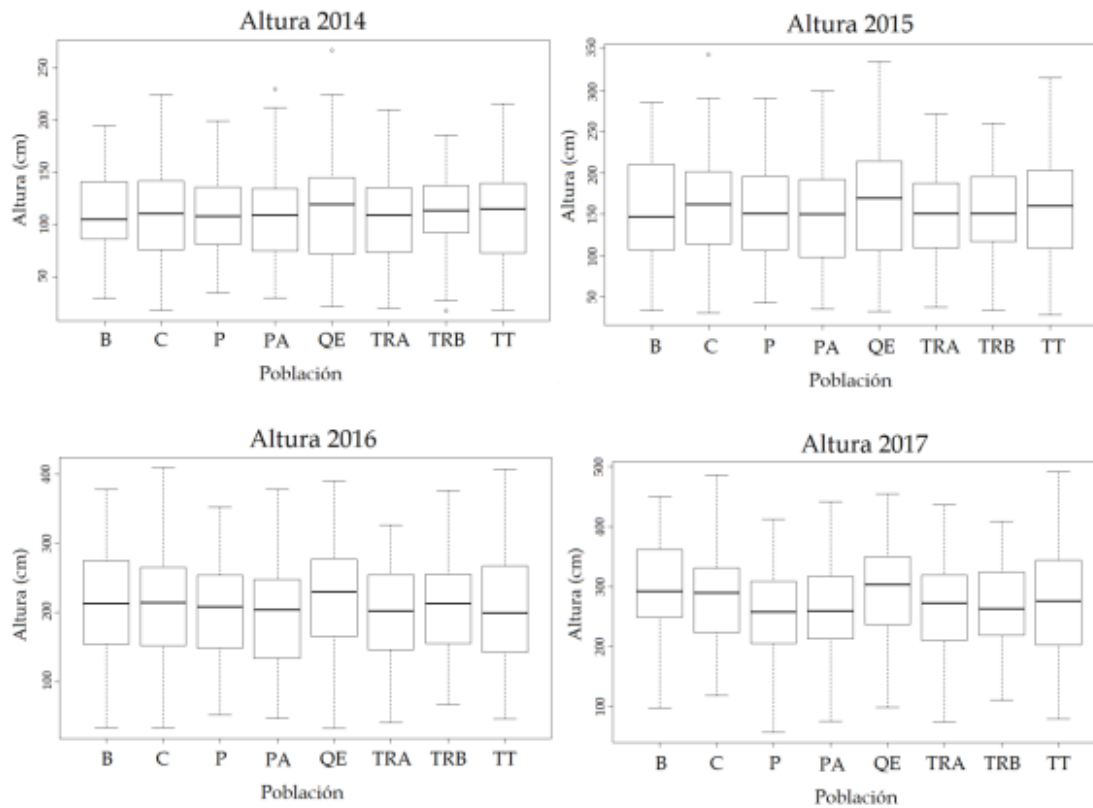


Figura 13. Gráfico de cajas con la mediana y extremos de altura para cada población en cada año.

El factor familia resultó significativo sólo para los primeros dos años ($p_{Alt-2014} = 0,002$; $p_{Alt-2015} = 0,003$) pero apenas explicó el 3,63 % de la varianza total en el 2014 y el 4,65 % en el 2015. La variación intra-poblacional fue moderada en todos los años, aunque fue disminuyendo cada año y varió entre las poblaciones y entre años en la misma población. Las poblaciones Boquete y Queñi presentaron variación intra-poblacional muy baja o nula en todos los años y la población Tren Tren mantuvo una variación moderada a través de los años (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para altura acumulada en cm para cada año de medición en cada población natural de *N. alpina* incluida en el Ensayo Principal. Media y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A).

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
Altura Acumul. 2014 (cm)	Media	110,5	108,8	111,3	107,3	112,0	105,2	112,0	107,6	109,3
	(de)	(38,9)	(43,9)	(40,2)	(42,5)	(48,2)	(39,7)	(37,5)	(45,9)	(42,4)
	h^2	0	0,14	0,51	0,96	0,09	0,08	0	0,18	0,24
	SE (h^2)	0,04	0,06	0,30	0,24	0,06	0,03	0,02	0,08	0,11
	σ^2_A	0	293,0	848,7	1826,1	209,0	137,5	0	413,6	466,0
	CV_A	0	15,7	26,2	39,8	12,9	11,1	0	18,9	15,6
Altura Acumul. 2015 (cm)	Media	153,8	159,6	151,0	149,2	163,3	148,0	154,8	158,0	154,7
	(de)	(64,3)	(61,5)	(60,3)	(59,2)	(67,4)	(54,7)	(52,3)	(61,0)	(59,5)
	h^2	0	0,19	0,56	0,12	0	0,22	0,10	0,40	0,20
	SE (h^2)	0,04	0,09	0,32	0,04	0,02	0,08	0,07	0,16	0,10
	σ^2_A	0	767,62	2091,76	421,21	0	676,53	295,31	1571,48	728,0
	CV_A	0	17,36	30,28	13,75	0	17,57	11,10	25,09	14,4
Altura Acumul. 2016 (cm)	Media	213,3	205,8	199,3	195,9	217,4	195,6	205,2	204,2	204,6
	(de)	(81,8)	(79,5)	(73,3)	(76,1)	(84,7)	(72,9)	(65,5)	(81,1)	(76,8)
	h^2	0,07	0,15	0,46	0,04	0	0	0,08	0,33	0,14
	SE (h^2)	0,09	0,07	0,28	0,02	0,02	0,01	0,06	0,14	0,09
	σ^2_A	485,04	1004,99	2606,38	256,98	0	0	350,73	2320,48	878,1
	CV_A	10,33	15,41	25,62	8,18	0	0	9,13	23,59	11,5
Altura Acumul. 2017 (cm)	Media	292,0	276,6	256,6	261,7	290,6	262,6	264,8	273,8	272,4
	(de)	(84,1)	(73,5)	(76,9)	(79,8)	(82,0)	(73,1)	(71,1)	(86,4)	(78,4)
	h^2	0	0	0,05	0,39	0	0	0,26	0,16	0,11
	SE (h^2)	0,06	0,02	0,08	0,13	0,03	0,01	0,14	0,08	0,07
	σ^2_A	0	0	289,46	2044,55	0	0	1377,33	1194,48	613,2
	CV_A	0	0	6,63	17,28	0	0	14,02	12,62	6,3

El mayor valor absoluto de DAC al 2017 fue medido en un árbol de la familia C9 con 58,04 mm. Tromen Bajo (TRB) y Queñi (QE) fueron las poblaciones que registraron los mayores valores medios de DAC, iniciando con 11,10 mm TRB y 10,85 mm QE en el año 2014 y finalizando con 32,05 mm TRB y 33,63 mm QE en el 2017. Por otro lado la población con menor valor medio de DAC varió entre los años, en el año 2014 fue Boquete con un DAC de 9,69 mm y en el último fue Paimún con un DAC de 29,71 mm (Figura 14). Sin embargo, en los análisis realizados para DAC por cada año no se encontraron diferencias significativas entre las medias de las poblaciones en ninguno de ellos (Figura 15).

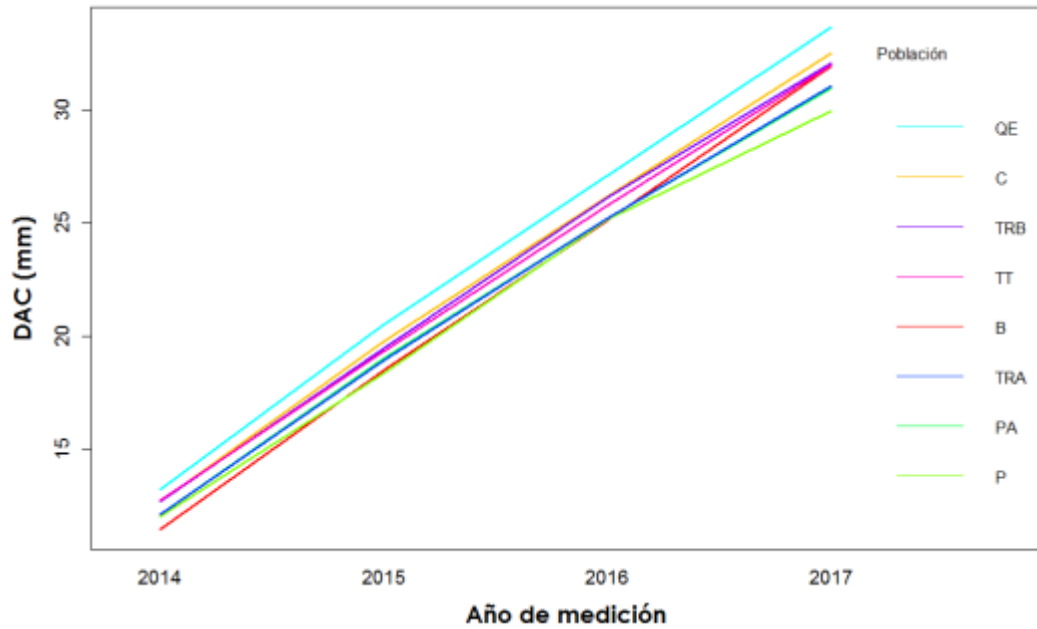


Figura 14. Gráfico de interacción entre años de medición (2014-2017) y la media de crecimiento en diámetro del cuello (DAC).

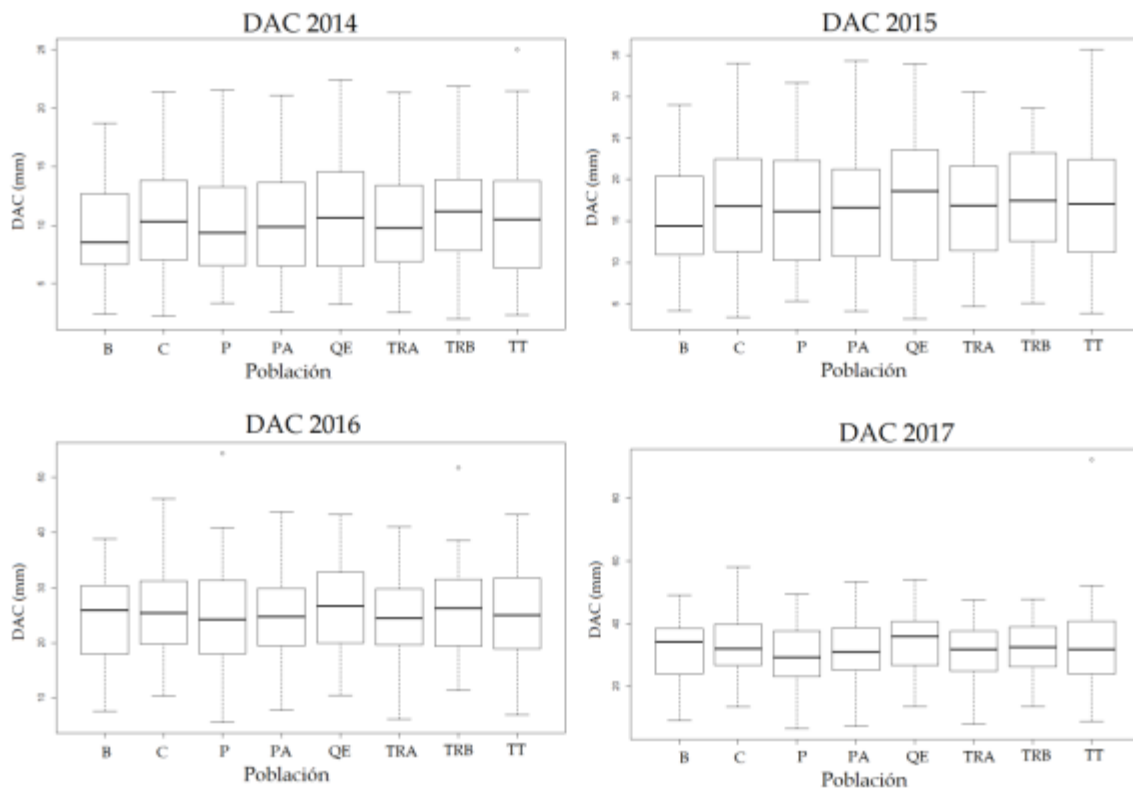


Figura 15. Gráfico de cajas con la mediana y extremos de diámetro el cuello (DAC) para cada población en cada año.

El efecto del factor familia resultó significativo sólo para los primeros años ($p_{DAC-2014} < 0,001$ y $p_{DAC-2015} = 0,004$) y explicó apenas el 5,01 % del total de la varianza en el 2014 y el 4,36 % en el 2015. La variación intra-poblacional fue moderada los primeros dos años y baja los siguientes dos años ($h^2_{media-2014} = 0,16$; $h^2_{media-2015} = 0,18$; $h^2_{media-2016} = 0,08$; $h^2_{media-2017} = 0,08$), aunque fue muy variable entre las poblaciones (Tabla 6). Las variaciones intra-poblacionales de Boquete y Tromen Bajo fueron nulas o muy bajas en todos los años y la población Paimún mostró una variación moderada en todos los años excepto en el año 2016 en el cual fue nula.

Tabla 6. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para diámetro a la altura del cuello (DAC) acumulado para cada año de medición en cada población natural de *N. alpina* incluida en el Ensayo Principal.

Media y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A).

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
DAC Acumul. 2014 (mm)	Media	9,69	10,52	10,44	10,29	10,85	10,30	11,10	10,64	10,48
	(de)	(3,91)	(4,54)	(4,61)	(4,35)	(4,99)	(4,19)	(4,14)	(4,91)	(4,47)
	h^2	0	0,08	0,34	0,23	0,02	0,15	0	0,42	0,16
	SE (h^2)	0,04	0,04	0,22	0,08	0,03	0,06	0,02	0,17	0,08
	σ^2_A	0	1,86	7,30	4,51	0,56	2,78	0	10,78	3,47
CV_A	0	12,95	25,88	20,64	6,90	16,19	0	30,84	14,18	
DAC Acumul. 2015 (mm)	Media	15,52	17,09	16,17	16,60	17,40	16,52	17,48	17,35	16,76
	(de)	(6,75)	(7,07)	(6,95)	(6,83)	(7,75)	(6,62)	(6,30)	(7,29)	(6,93)
	h^2	0	0,09	0,52	0,14	0	0,22	0	0,46	0,18
	SE (h^2)	0,04	0,05	0,30	0,05	0,02	0,08	0,02	0,18	0,09
	σ^2_A	0	4,56	25,42	6,59	0	9,83	0	25,44	8,98
CV_A	0	12,50	31,18	15,46	0	18,98	0	29,07	13,40	
DAC Acumul. 2016 (mm)	Media	24,44	25,30	24,88	24,38	26,21	24,41	25,52	25,34	25,06
	(de)	(7,98)	(7,93)	(8,85)	(7,93)	(7,99)	(7,52)	(7,68)	(8,35)	(7,94)
	h^2	0	0,08	0	0,09	0	0,10	<0,01	0,37	0,08
	SE (h^2)	0,06	0,05	0,05	0,04	0,03	0,04	0,02	0,15	0,05
	σ^2_A	0	5,37	0	5,86	0	5,79	<0,01	26,29	5,41
CV_A	0	9,16	0	9,93	0	9,86	<0,01	20,24	6,15	
DAC Acumul. 2017 (mm)	Media	31,90	32,50	29,71	30,94	33,63	31,02	32,05	32,64	31,80
	(de)	(9,59)	(9,27)	(9,17)	(9,63)	(9,84)	(9,10)	(8,90)	(12,17)	(9,81)
	h^2	0	<0,01	0,38	0,20	0	<0,01	0,01	0,03	0,08
	SE (h^2)	0,06	0,02	0,26	0,07	0,03	0,01	0,03	0,03	0,06
	σ^2_A	0	<0,01	32,70	19,50	0	<0,01	0,70	4,53	7,18
CV_A	0	<0,01	19,25	14,27	0	<0,01	2,61	6,52	5,33	

Crecimiento Relativo

Los crecimientos relativos tanto en Alt como en DAC fueron disminuyendo con los años (altura: $CR_{Alt-2015} = 36,7$ %; $CR_{Alt-2016} = 30,7$ %; $CR_{Alt-2017} = 22,1$ %; diámetro: $CR_{DAC-2015} =$

56,57 %; $CR_{DAC-2016} = 34,32$ %; $CR_{DAC-2017} = 24,80$ %). En el análisis realizado para todos los años juntos se encontraron diferencias significativas entre años ($p_{Alt} < 0,001$; $p_{DAC} < 0,001$), pero no se encontraron diferencias entre poblaciones y tampoco interacción significativa entre año y población.

La población con mayor crecimiento relativo en altura (CR_{Alt}) en promedio de los tres años fue Boquete ($CR_{Alt-B} = 29,20$ %) y la población con menor CR_{Alt} fue Paimún ($CR_{Alt-P} = 26,09$ %), aunque fue muy variable entre años. En el modelo analizado por cada año no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones en ninguno de los años y el factor familia no fue significativo en ninguno de ellos. La variación intra-poblacional fue variable entre los años ($h^2_{media\ 2015} = 0,09$; $h^2_{media\ 2016} = 0,15$; $h^2_{media\ 2017} = 0,11$) y entre poblaciones. Las poblaciones Boquete y Curruhué tuvieron una variación muy baja o nula en todos los años y las poblaciones Paimún y Tromen Bajo fueron las más heterogéneas entre los años en variación intra-poblacional (Tabla 7).

Tabla 7. *Parámetros genéticos y estadísticos calculados para Crecimiento Relativo (CR) en altura (%) para cada año de medición en cada población natural de N. alpina incluida en el Ensayo Principal.*

Media y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A).

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
CR Altura 2015	Media	35,8	37,4	32,5	33,8	37,1	33,6	32,3	34,7	34,7
	(de)	(16,9)	(18,1)	(15,4)	(16,2)	(18,1)	(17,5)	(15,5)	(17,7)	(17,1)
	h^2	0,02	<0,01	0,01	0,01	0,24	0,24	0,06	0,12	0,09
	SE (h^2)	0,06	0,01	0,04	0,01	0,14	0,09	0,05	0,06	0,06
	σ^2_A	5,38	<0,01	2,71	2,15	79,22	71,34	14,85	38,00	26,71
CV_A	6,48	<0,01	5,05	4,33	24,01	25,10	11,92	17,76	11,83	
CR Altura 2016	Media	27,9	25,2	25,5	26,9	26,3	26,2	26,6	24,0	26,1
	(de)	(16,3)	(17,2)	(19,4)	(18,7)	(15,4)	(16,2)	(14,7)	(14,5)	(16,6)
	h^2	0	<0,01	0,70	0,16	0,05	0,12	0,17	0,01	0,15
	SE (h^2)	0,05	0,01	0,38	0,06	0,05	0,05	0,10	0,02	0,09
	σ^2_A	0	<0,01	280,02	61,00	13,30	31,17	39,39	1,45	53,29
CV_A	0	<0,01	65,69	28,98	13,87	21,30	23,57	5,03	19,81	
CR Altura 2017	Media	23,9	20,4	20,2	19,9	19,4	23,5	21,3	23,6	21,5
	(de)	(17,8)	(15,6)	(11,7)	(11,6)	(10,1)	(22,8)	(12,6)	(14,9)	(15,7)
	h^2	0	0	0	0,07	0,16	<0,01	0,61	0,01	0,11
	SE (h^2)	0,06	0,02	0,05	0,03	0,11	0,01	0,27	0,02	0,07
	σ^2_A	0	0	0	9,71	15,44	0,24	96,94	2,47	15,60
CV_A	0	0	0	15,67	20,23	2,09	46,26	6,65	11,36	

En el modelo analizado por cada año en crecimiento relativo en diámetro al cuello (CR_{DAC}) no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones en ninguno de

los años analizados, y el factor familia no fue significativo en ninguno de ellos. La población con mayor valor medio de crecimiento relativo en DAC (CR_{DAC}) en promedio de los tres años fue Boquete ($CR_{DAC-B} = 41,30\%$) y la población con menor valor medio de CR_{DAC} fue Tromen Bajo ($CR_{DAC-TRB} = 36,71\%$), aunque fue muy variable entre años. La variación intra-poblacional fue baja en todos los años ($h^2_{media\ 2015} = 0,10$; $h^2_{media\ 2016} = 0,08$; $h^2_{media\ 2017} = 0,09$) y varió mucho entre poblaciones. Las poblaciones Boquete y Tromen Alto tuvieron una variación muy baja o nula en todos los años y las poblaciones Paimún y Queñi fueron las más heterogéneas entre los años en variación intra-poblacional (Tabla 8).

Tabla 8. *Parámetros genéticos y estadísticos calculados para Crecimiento Relativo (CR) en diámetro a la altura del cuello (DAC) (%) para cada año de medición en cada población natural de N. alpina incluida en el Ensayo Principal.*

Media y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A).

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
CR DAC 2015	Media	59,54	53,37	53,43	57,68	54,30	53,11	53,11	53,39	54,74
	(de)	(23,49)	(21,23)	(20,66)	(22,71)	(19,92)	(20,15)	(18,30)	(20,09)	(20,88)
	h^2	0	0,01	0,54	0	0,07	0	0,07	0,08	0,10
	SE (h^2)	0,04	0,02	0,31	0,01	0,06	0,01	0,05	0,04	0,07
	σ^2_A	0	5,49	239,76	0	30,29	0	24,36	33,34	41,65
CV_A	0	4,39	28,98	0	10,14	0	9,29	10,82	7,95	
CR DAC 2016	Media	36,89	33,70	37,10	32,86	33,22	34,20	33,66	34,52	34,52
	(de)	(9,46)	(10,42)	(26,41)	(9,80)	(12,21)	(15,29)	(13,32)	(10,66)	(13,38)
	h^2	0	0,28	0	0,11	<0,01	0	0	0,28	0,08
	SE (h^2)	0,06	0,12	0,05	0,04	0,03	0,01	0,02	0,12	0,06
	σ^2_A	0	24,86	0	9,96	<0,01	0	0	28,51	7,92
CV_A	0	14,79	0	9,60	<0,01	0	0	15,47	4,98	
CR DAC 2017	Media	27,46	24,90	21,45	22,87	24,72	23,21	23,37	27,14	24,39
	(de)	(9,64)	(8,77)	(12,78)	(8,82)	(8,23)	(8,33)	(6,62)	(31,20)	(14,54)
	h^2	0,01	0	0	0,04	0,64	0	0	0,01	0,09
	SE (h^2)	0,07	0,02	0,05	0,02	0,30	0,01	0,02	0,02	0,06
	σ^2_A	0,91	0	0	3,18	44,42	0	0	9,32	7,23
CV_A	3,48	0	0	7,79	26,96	0	0	11,25	6,19	

Correlaciones de Crecimientos Acumulados

Las correlaciones fenotípicas entre Alt a distintos años resultaron todas significativas y variaron entre $r_p = 0,78$ (2014-2017) y $r_p = 0,96$ (2015-2016). Las correlaciones entre DAC y Alt al mismo año también resultaron significativas, la mayor se dio en el 2015 ($r_p = 0,94$) y la menor en el 2014 ($r_p = 0,15$).

Las correlaciones genéticas entre alturas a distintos años resultaron moderadas o

altas, siendo la menor r_A 2016-2017= 0,52 y la mayor r_A 2014-2017= 1,44. Las correlaciones genéticas entre DAC a distintos años también resultaron altas o moderadas, excepto el DAC 2014 para el cual no se pudo calcular la correlación genética debido a que la varianza familiar resultó prácticamente nula. Las correlaciones genéticas entre altura y DAC del mismo año también resultaron altas; en 2015 y 2017 fueron positivas (r_A = 0,93 y r_A = 1,02 respectivamente), mientras que en el año 2016 fue negativa (r_A = -0,86). En la Tabla 9 se muestran las correlaciones encontradas entre los caracteres.

Tabla 9. Correlación entre altura y diámetro acumulados de todos los años medidos.

Debajo de la diagonal las correlaciones fenotípicas, arriba de la diagonal correlaciones genéticas. Entre paréntesis error estándar. Alt: Altura y DAC: diámetro a la altura del cuello. nc: no calculado debido a que la varianza familiar de la variable resultó prácticamente nula. n.s: correlaciones no significativas. Los guiones indican correlaciones no analizadas

	Alt2014	Alt2015	Alt2016	Alt2017	DAC2014	DAC2015	DAC2016	DAC2017
Alt2014	1	1,21 (0,05)	1,34 (0,09)	1,44 (0,13)	nc	-	-	-
Alt2015	0,95 (0,01)	1	1,03 (0,01)	0,88 (0,03)	-	0,93 (0,02)	-	-
Alt2016	0,89 (0,02)	0,96 (0,01)	1	0,52 (0,09)	-	-	-0,86 (0,03)	-
Alt2017	0,78 (0,03)	0,89 (0,02)	0,95 (0,01)	1	-	-	-	1,02 (0,01)
DAC2014	0,15 (0,04)	0,13 (0,04)	0,12 (0,04)	n.s	1	nc	nc	nc
DAC2015	0,89 (0,02)	0,94 (0,01)	0,92 (0,02)	0,83 (0,02)	0,14 (0,04)	1	0,79 (0,04)	1,08 (0,02)
DAC2016	0,81 (0,02)	0,89 (0,02)	0,89 (0,02)	0,84 (0,02)	0,08 (0,04)	0,96 (0,01)	1	1,21 (0,05)
DAC2017	0,76 (0,03)	0,86 (0,02)	0,88 (0,02)	0,86 (0,02)	n.s	0,92 (0,02)	0,93 (0,02)	1

Tasa de Crecimiento diaria (2014-2015 y 2015-2016)

La tasa de crecimiento diaria (TCd) en Alt promedio para todo el ensayo en la temporada 2014-2015 fue de 0,24 cm, y para la temporada 2015-2016 fue de 0,31 cm. El modelo lineal mixto longitudinal analizado para las mediciones periódicas de crecimiento en las temporadas 2014-2015 y 2015-2016, con TCd en Alt como variable respuesta y analizando las dos temporadas de crecimiento juntas, no mostró diferencias significativas entre las medias de las poblaciones, ni entre las temporadas, y no se verificó interacción entre estos dos factores. En cambio sí se comprobaron diferencias significativas entre las fechas de medición ($p_{\text{fecha}} < 0,001$), el bloque ($p_{\text{bloque}} < 0,001$) y se encontró una interacción significativa entre la fecha de medición y la temporada ($p_{\text{fecha*temp}} = 0,04$) como se puede ver en la Figura 16. El factor familia no fue significativo para la tasa de crecimiento diaria

en altura.

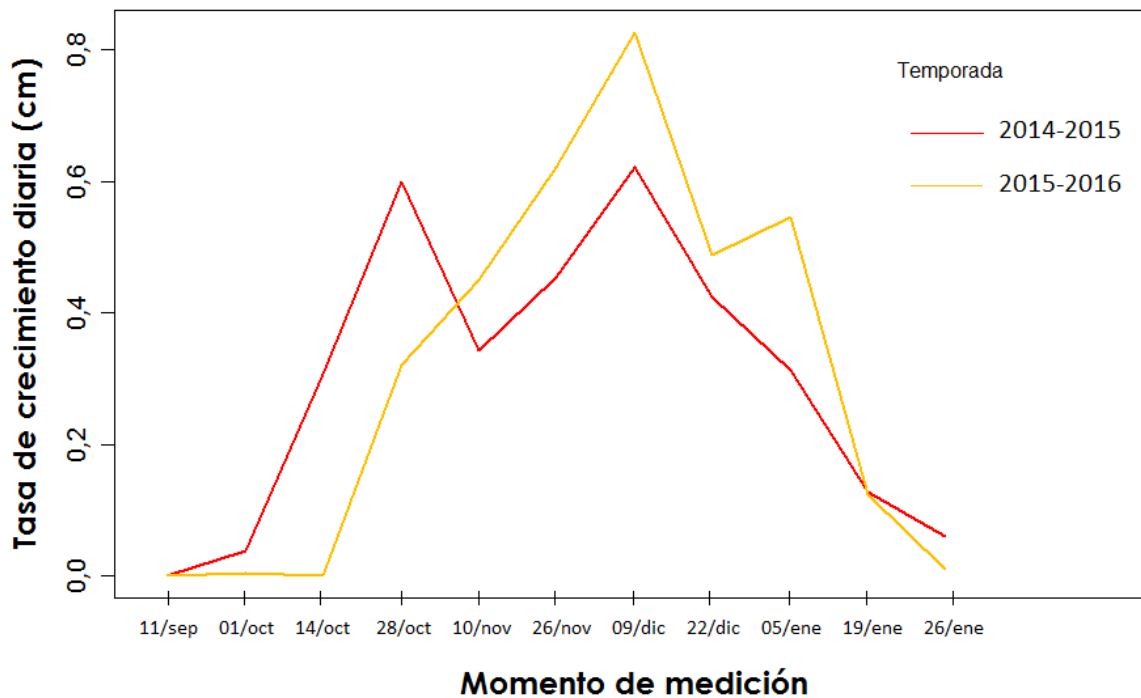


Figura 16. Gráfico de crecimiento en altura comparando las dos temporadas medidas.

Los modelos lineales mixtos longitudinales analizados para cada temporada por separado, para las variables TCd en Alt y DAC, sólo mostraron diferencias significativas entre las medias de la TCd para la fecha de medición ($p_{\text{fecha-Alt}(2014-2015)} < 0,001$; $p_{\text{fecha-DAC}(2014-2015)} < 0,001$; $p_{\text{fecha-Alt}(2015-2016)} < 0,001$; $p_{\text{fecha-DAC}(2015-2016)} < 0,001$) y los bloques ($p_{\text{bloque-Alt}(2014-2015)} < 0,001$; $p_{\text{bloque-DAC}(2014-2015)} < 0,001$; $p_{\text{bloque-Alt}(2015-2016)} < 0,001$; $p_{\text{bloque-DAC}(2015-2016)} < 0,001$). En la Figura 17 (para la temporada 2014-2015) y la Figura 18 (para la temporada 2015-2016) se muestra cómo varió la TCd en Alt en las distintas fechas de medición para cada población, mientras que la Figura 19 muestra la TCd en DAC para cada población en la temporada 2014-2015.

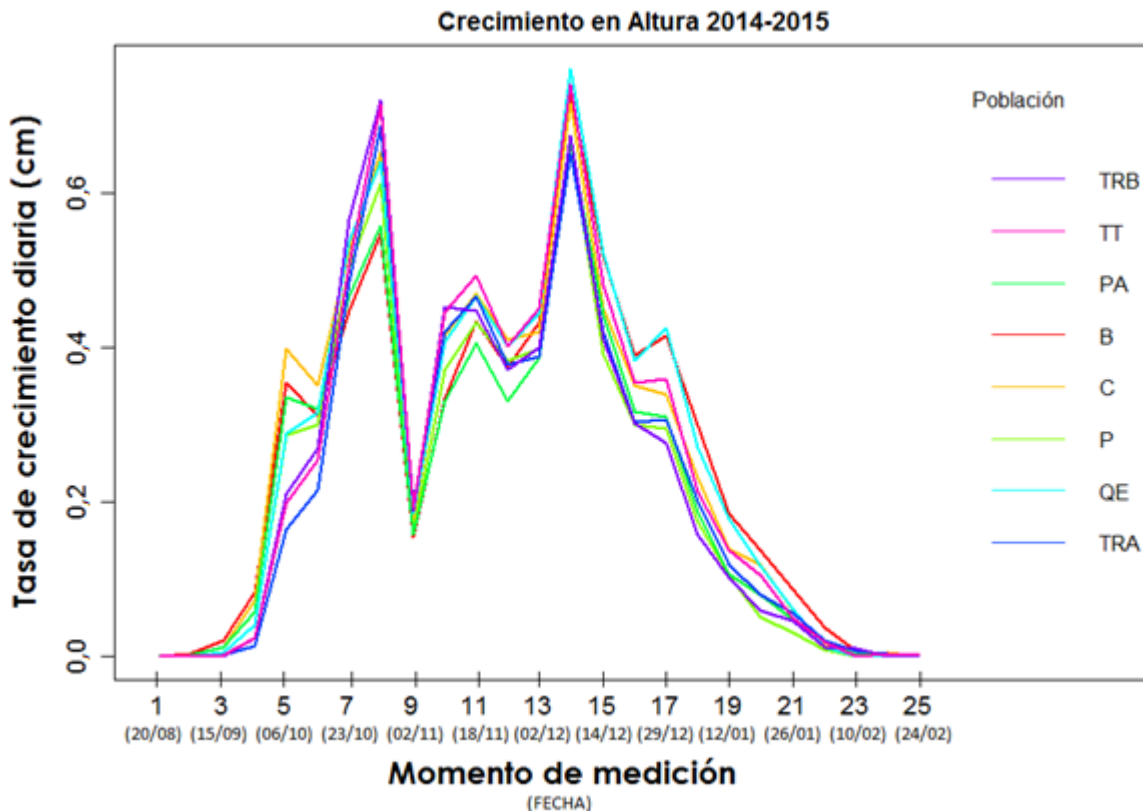


Figura 17. Gráfico de crecimiento en altura por población para la temporada 2014-2015.

El factor familia no resultó significativo para este carácter en ninguna de las dos temporadas medidas. La variación intra-poblacional en promedio fue baja entre poblaciones y temporadas para ambos caracteres, y en general tendió a ser muy baja ($h^2_{Alt(2014-2015)} = 0,0029$; $h^2_{DAC} = 0,0002$; $h^2_{Alt(2015-2016)} = 0,0005$ y $CV_{A Alt(2014-2015)} = 4,88$; $CV_{A DAC} = 1,54$; $CV_{A Alt(2015-2016)} = 2,62$) (Tabla 10). La población con mayor variación intra-poblacional fue Paimún en los dos caracteres y en ambos años, aunque igualmente fue muy baja ($h^2_{P-Alt(2014-2015)} = 0,02$; $h^2_{P-DAC} = 0,0007$; $h^2_{P-Alt(2015-2016)} = 0,002$ y $CV_{A P-Alt(2014-2015)} = 19,20$; $CVA_{P-DAC} = 3,65$; $CV_{A P-Alt(2015-2016)} = 5,98$). La diferenciación entre las poblaciones fue nula para ambas temporadas y caracteres por lo tanto el Q_{ST} no se pudo calcular, ya que el factor población no mostró diferencias significativas en ninguno de los modelos analizados.

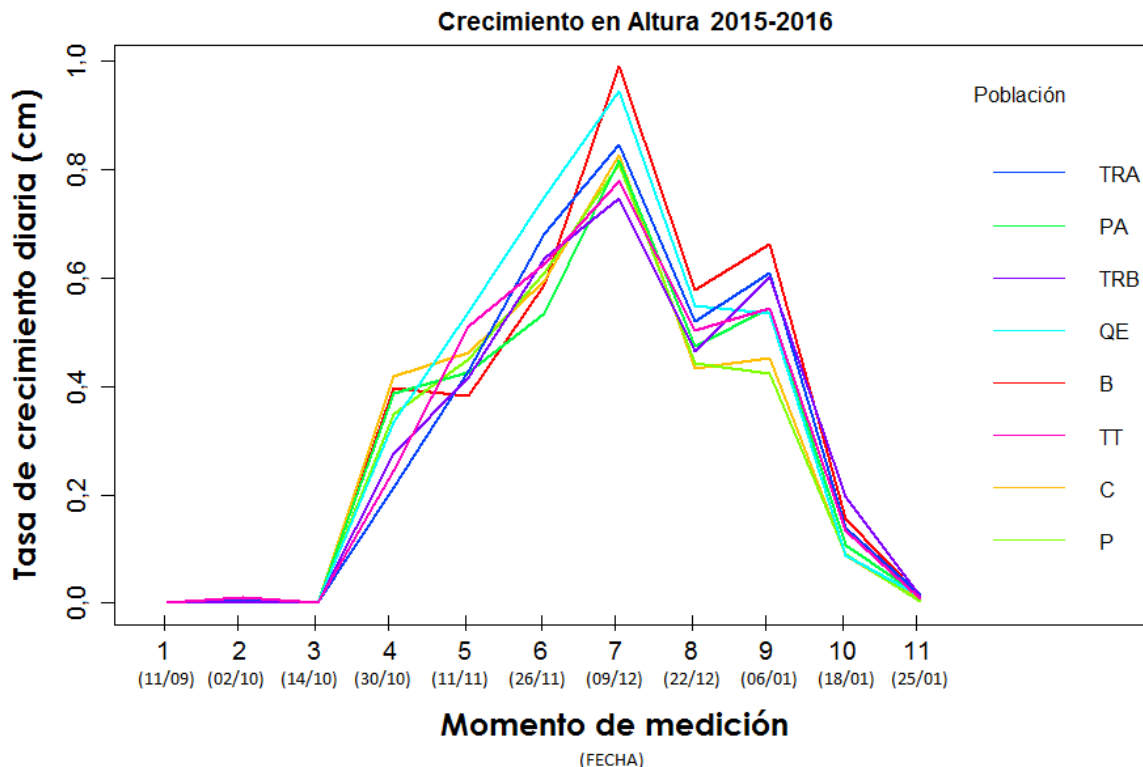


Figura 18. Gráfico de crecimiento en altura por población para la temporada 2015-2016.

Tabla 10. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para las variables tasa diaria de crecimiento en altura (TCd Alt) para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y tasa diaria de crecimiento en DAC (TCd DAC), para cada una de las poblaciones naturales de *N. alpina* incluidas en el ensayo principal.

Media (cm/día y mm/día respectivamente) y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A).

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
TCd Alt 2014-2015	Media	0,25	0,25	0,22	0,22	0,26	0,22	0,23	0,25	0,24
	(de)	(0,34)	(0,35)	(0,31)	(0,31)	(0,36)	(0,32)	(0,32)	(0,35)	(0,33)
	h^2	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	SE (h^2)	0,05	0,01	0,05	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
	σ^2_A	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	CV_A	2,73	2,46	19,20	2,05	2,03	4,18	2,44	3,92	4,88
TCd DAC 2014- 2015	Media	0,029	0,029	0,026	0,029	0,029	0,027	0,029	0,029	0,028
	(de)	(0,040)	(0,043)	(0,038)	(0,041)	(0,042)	(0,039)	(0,041)	(0,043)	(0,041)
	h^2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	SE (h^2)	0,04	0,01	0,04	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
	σ^2_A	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	CV_A	0,51	0,68	3,65	3,25	0,30	3,16	0,22	0,59	1,54
TCd Alt 2015-2016	Media	0,34	0,30	0,29	0,30	0,34	0,31	0,30	0,31	0,31
	(de)	(0,45)	(0,43)	(0,42)	(0,41)	(0,46)	(0,44)	(0,43)	(0,43)	(0,43)
	h^2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	SE (h^2)	0,05	0,01	0,05	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02
	σ^2_A	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	CV_A	2,82	4,80	5,98	2,25	2,53	0,87	0,92	0,76	2,62

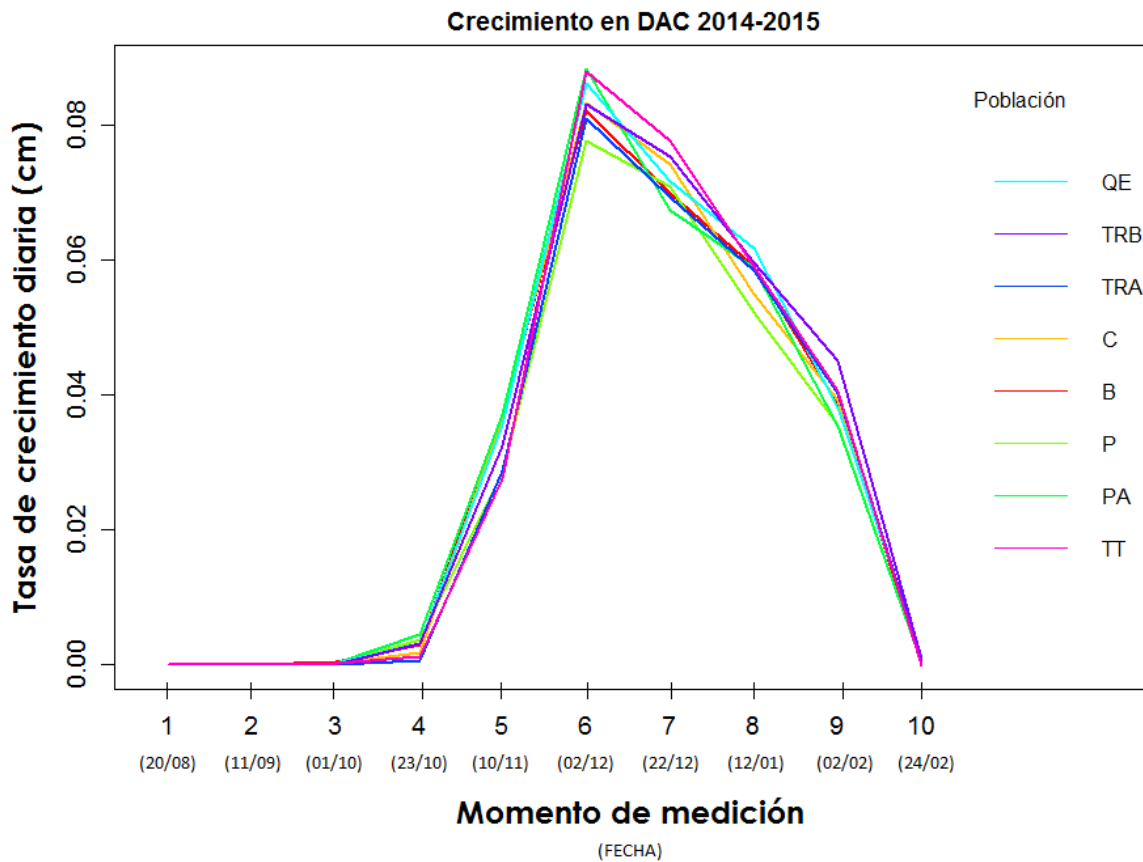


Figura 19. Gráfico de crecimiento en DAC por población para la temporada 2014-2015.

Parámetros de las curvas individuales de crecimiento

El ajuste de los datos a curvas individuales con la función de Boltzmann fue alto, con un promedio de coeficiente de determinación (R^2) de $R^2_{Alt\ 2014-2015} = 0,99 \pm 0,02$; $R^2_{DAC\ 2014-2015} = 0,99 \pm 0,03$; $R^2_{Alt\ 2015-2016} = 0,99 \pm 0,04$. Los promedios de la relación entre el error estándar de la estimación y el valor mejor ajustado para cada parámetro fueron: $v50_{Alt2014-2015} = 3,78E-05 \pm 3,65E-05$; $S_{Alt2014-2015} = 0,08 \pm 0,06$; $v50_{DAC2014-2015} = 7,94E-05 \pm 0,0004$; $S_{DAC2014-2015} = 0,29 \pm 0,17$; $v50_{Alt2015-2016} = 6,41E-05 \pm 6,17E-05$; $S_{Alt2015-2016} = 0,21 \pm 0,48$.

Inicio de crecimiento (t_{10})

Con respecto a los parámetros de las curvas individuales de crecimiento, el análisis de inicio del crecimiento en Alt para la temporada 2014-2015 ($t_{10\ Alt2014-2015}$) reveló que el valor medio en todo el ensayo fue el día juliano 278 (equivalente al 04 de octubre) y hubo cierta variación para este carácter, siendo Paimún la población que inició más temprano,

en el día juliano 275 (equivalente al 30 de septiembre), y Tren Tren la población que inició el crecimiento más tardíamente, el día juliano 282 (equivalente al 08 de octubre). El modelo lineal mixto analizado mostró diferencias significativas entre las medias de las poblaciones ($p_{t_{10Alt}2014-2015} < 0,001$) y la prueba *post hoc* de Tukey mostró que las diferencias se encontraron entre Puerto Arturo y Tromen Alto; Puerto Arturo y Tren Tren; y también entre Paimún y Tromen Alto. Pero el factor familia no resultó significativo. En cuanto a la variación intra-poblacional hubo dos grupos de poblaciones: aquellas en las cuales la variación fue cero (Boquete, Curruhué, Paimún y Queñi) y aquellas que tuvieron variación moderada: Puerto Arturo, Tromen Alto, Tromen Bajo y Tren Tren ($h^2_{PA-t_{10Alt}2014-2015} = 0,36$; $h^2_{TRA-t_{10Alt}2014-2015} = 0,26$; $h^2_{TRB-t_{10Alt}2014-2015} = 0,21$; $h^2_{TT-t_{10Alt}2014-2015} = 0,24$ y $CVA_{PA-t_{10Alt}2014-2015} = 3,29$; $CVA_{TRA-t_{10Alt}2014-2015} = 2,25$; $CVA_{TRB-t_{10Alt}2014-2015} = 1,65$; $CVA_{TT-t_{10Alt}2014-2015} = 2,16$). La diferenciación genética entre las poblaciones fue moderada: $Q_{ST t_{10Alt}2014-2015} = 15 \%$. Estos datos pueden verse en la Tabla 11.

El inicio del crecimiento en DAC (t_{10DAC}) no fue tan variable entre las poblaciones, y se registró un mes después del crecimiento en Alt. El modelo lineal mixto no mostró diferencias significativas entre las medias de las poblaciones ($p_{t_{10DAC}} = 0,11$) y tampoco resultó significativo el factor familia. El valor medio fue el día juliano 310 (equivalente al 05 de noviembre) siendo Puerto Arturo y Queñi las poblaciones que registraron el menor valor promedio de t_{10} en DAC: 308 (equivalente al 03 de noviembre); y Paimún, Tromen Alto y Tren Tren las que registraron el mayor valor promedio de t_{10} en DAC: 311 (equivalente al 06 de noviembre). La variación intra-poblacional fue baja en la mayoría de las poblaciones excepto en Boquete donde fue moderada ($h^2_{B-t_{10DAC}} = 0,58$ y $CV_{A-B-t_{10DAC}} = 3,46$) como se puede observar en la Tabla 11. El Q_{ST} no fue calculado debido a que el factor población no resultó significativo.

Para la temporada 2015-2016 el inicio de crecimiento en Alt ($t_{10Alt}2015-2016$) fue casi un mes más tardío que en la temporada anterior, registrándose como valor medio el día juliano 301 (equivalente al 27 de octubre). La población que comenzó más tempranamente su crecimiento en Alt fue Curruhué el día juliano 297 (equivalente al 23 de octubre); y la que lo hizo más tardíamente fue Tromen Alto, el día juliano 304 (equivalente al 30 de octubre). Se encontraron diferencias significativas entre las medias de las poblaciones (p

$t_{10Alt} 2015-2016 < 0,001$), y la prueba *post hoc* de Tukey mostró que esas diferencias se debían particularmente a las diferencias entre Tromen Alto y Curruhué, y entre Tromen Alto y Puerto Arturo. El factor familia no resultó significativo.

La variación intra-poblacional fue entre baja y moderada en todas las poblaciones, excepto en la población Paimún en la cual la variación fue alta en términos de heredabilidad ($h^2_{P t_{10Alt} 2015-2016} = 0,83$) aunque baja en términos de coeficiente de variación genética aditiva ($CV_{AP t_{10Alt} 2015-2016} = 3,01$) como muestra la Tabla 11. La diferenciación entre poblaciones fue similar al año anterior $Q_{ST t_{10Alt} 2015-2016} = 17 \%$.

Tabla 11. *Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el inicio del crecimiento (t_{10}) en Alt para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y en DAC 2014-2015 para cada una de las poblaciones naturales de N. alpina incluidas en el ensayo principal.*

Media [días julianos] y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). Alt: altura; DAC: diámetro a la altura del cuello.

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
t₁₀ Alt 2014-2015	Media	276	276	274	275	279	281	278	282	278
	(de)	(15)	(18)	(15)	(15)	(14)	(12)	(10)	(12)	(14)
	h^2	0	0	0	0,36	0	0,26	0,21	0,24	0,13
	SE (h^2)	0,04	0,01	0,04	0,12	0,02	0,09	0,12	0,10	0,07
	σ^2_A	0	0	0	82,38	0	40,16	21,07	37,23	22,61
CV_A	0	0	0	3,29	0	2,25	1,65	2,16	1,17	
t₁₀ DAC 2014-2015	Media	310	309	311	308	308	311	310	311	310
	(de)	(14)	(11)	(10)	(11)	(8)	(11)	(11)	(9)	(10)
	h^2	0,58	0,06	0,02	0,06	0	0	0,13	0,22	0,13
	SE (h^2)	0,37	0,04	0,05	0,03	0,02	0,01	0,08	0,10	0,09
	σ^2_A	115,23	7,03	1,78	7,79	0	0	17,65	20,65	21,27
CV_A	3,46	0,86	0,43	0,90	0	0	1,35	1,46	1,06	
t₁₀ Alt 2015-2016	Media	302	297	299	298	301	304	302	301	301
	(de)	(11)	(11)	(9)	(13)	(9)	(11)	(13)	(12)	(12)
	h^2	<0,01	0,20	0,83	0	<0,01	0,01	<0,01	0,48	0,19
	SE (h^2)	0,06	0,09	0,43	0,01	0,03	0,01	0,02	0,19	0,10
	σ^2_A	<0,01	26,17	81,15	0	<0,01	1,87	<0,01	69,81	22,38
CV_A	<0,01	1,72	3,01	0	<0,01	0,45	<0,01	2,77	0,99	

Los grados día acumulados en promedio para el inicio de crecimiento en Alt en la temporada 2014-2015 fueron 423,60 °Cd y en la temporada 2015-2016 fueron 444,46 °Cd. Las poblaciones que acumularon menos grados días hasta el t_{10} en las dos temporadas fueron Paimún, Puerto Arturo y Curruhué, mientras que la que acumuló más grados días en las dos temporadas fue Tromen Alto (Tabla 12).

Tabla 12. *Tabla de grados día necesarios para el inicio de crecimiento en altura en las temporadas de crecimiento 2014-2015 y 2015-2016.*GD: *grados día acumulados desde el 01 de julio hasta el t_{10} del año correspondiente.*

Población	GD 2014	GD 2015
B	404,60	462,40
C	404,60	403,67
P	380,46	426,10
PA	390,37	415,87
QE	442,51	451,34
TRA	468,30	482,56
TRB	429,68	462,40
TT	468,30	451,34

Fin de crecimiento (t_{90})

En cuanto al fin de crecimiento en Alt de 2014-2015 ($t_{90\text{ Alt}2014-2015}$) el modelo lineal mixto utilizado no mostró diferencias significativas entre las poblaciones y tampoco se encontró un aporte significativo del factor familia. El valor medio para todas las poblaciones fue el día juliano 353 (equivalente al 18 de diciembre) y varió entre el día 350 en Tromen Bajo (equivalente al 15 de diciembre) y el día 358 en Boquete (equivalente al 23 de diciembre). La variación intra-poblacional en términos de heredabilidad y CV_A fue en general baja, excepto la heredabilidad en Paimún y Tromen Bajo donde fue moderada ($h^2_{P\text{-Alt}2014-2015} = 0,36$; $h^2_{\text{TRB-Alt}2014-2015} = 0,46$) como se muestra en la Tabla 13.

El fin del crecimiento en diámetro ($t_{90\text{DAC}}$) fue casi un mes más tarde que el fin del crecimiento en Alt, y el modelo ajustado no mostró diferencias entre las medias de las poblaciones y tampoco resultó significativo el factor familia. El promedio en días julianos para todas las poblaciones fue 378 (equivalente al 12 de enero) y varió entre el día 376 en Puerto Arturo (equivalente al 10 de enero) y el día 379 en Queñi y Tromen Alto (equivalente al 13 de enero). La variación intra-poblacional fue baja en todas las poblaciones excepto en Paimún donde fue moderada en cuanto a heredabilidad ($h^2_{P\text{ t}90\text{DAC}} = 0,25$) ver Tabla 13.

A diferencia de la temporada de crecimiento 2014-2015, la temporada 2015-2016 mostró un fin de crecimiento en Alt ($t_{90\text{Alt}2015-2016}$) más tardío y más variable también. En promedio el fin de crecimiento ocurrió el día juliano 363 (equivalente al 27 de diciembre). La población que finalizó antes el crecimiento fue Paimún el día 358 (equivalente al 23 de

diciembre) y la que finalizó más tarde fue Tromen Bajo el día 364 (equivalente al 03 de enero). El modelo mixto usado mostró diferencias significativas entre las medias de las poblaciones ($p_{t_{90}Alt2015-2016} = 0,030$) y la prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias entre las poblaciones Curruhué y Tromen Bajo. El factor familia no fue significativo en este parámetro. La variación intra-poblacional sólo fue moderada en las poblaciones Tromen Alto y Tren Tren en heredabilidad ($h^2_{TRA-t_{90}Alt2015-2016} = 0,33$; $h^2_{TT-t_{90}Alt2015-2016} = 0,28$) tal como muestra la Tabla 13. La diferenciación entre poblaciones fue baja $Q_{ST t_{90}Alt2015-2016} = 9 \%$.

Tabla 13. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el fin de crecimiento (t_{90}) en Alt para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y en DAC 2014-2015 para cada una de las poblaciones naturales de *N. alpina* incluidas en el ensayo principal.

Media y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). Alt: altura; DAC: diámetro a la altura del cuello

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
t ₉₀ Alt 2014-2015	Media	358	352	351	353	355	353	350	352	353
	(de)	(29)	(25)	(20)	(26)	(24)	(24)	(21)	(22)	(24)
	h^2	0,09	0,06	0,36	0,03	0,04	0,07	0,46	0,04	0,14
	SE (h^2)	0,10	0,04	0,23	0,02	0,04	0,03	0,21	0,03	0,09
	σ^2_A	75,20	41,79	153,59	22,95	21,84	41,02	211,97	22,30	73,83
CV_A	2,42	1,83	3,53	1,35	1,32	1,81	4,16	1,34	2,22	
t ₉₀ DAC 2014-2015	Media	378	377	377	376	379	379	380	377	378
	(de)	(14)	(14)	(15)	(15)	(14)	(13)	(15)	(14)	(14)
	h^2	<0,01	0,07	0,25	0,08	0	0,11	0,07	0,06	0,08
	SE (h^2)	0,05	0,04	0,18	0,03	0,02	0,05	0,05	0,04	0,06
	σ^2_A	<0,01	14,59	55,12	19,33	0	20,52	18,45	14,14	17,77
CV_A	<0,01	1,01	1,97	1,17	0	1,19	1,13	1,00	0,93	
t ₉₀ Alt 2015-2016	Media	367	359	358	361	360	362	369	364	362
	(de)	(16)	(22)	(17)	(21)	(18)	(20)	(26)	(20)	(21)
	h^2	0	<0,01	0,18	0	0	0,33	0,08	0,28	0,11
	SE (h^2)	0,06	0,01	0,15	0,01	0,03	0,12	0,06	0,12	0,07
	σ^2_A	0	<0,01	53,06	0	0	136,27	51,50	119,68	45,06
CV_A	0	<0,01	2,03	0	0	3,22	1,94	3,00	1,27	

Mitad del crecimiento (t_{50})

El modelo lineal mixto ajustado para el momento en el que llegaron a la mitad del crecimiento en Alt en la temporada 2014-2015 ($t_{50}Alt2014-2015$) no mostró diferencias significativas entre las medias de las poblaciones y tampoco resultó significativo el factor familia. Tuvo como valor medio 315 (equivalente al 10 de noviembre), la población con el menor valor medio fue Paimún, el día 312 (equivalente al 07 de noviembre) y luego el resto de las poblaciones se concentraron en dos grupos, uno con un valor medio de 314

(equivalente al 09 de noviembre), constituido por las poblaciones Curruhué, Puerto Arturo y Tromen Bajo, y el otro grupo con valor medio de 317 (equivalente al 12 de noviembre), constituido por Boquete, Queñi, Tromen Alto y Tren Tren. La variabilidad intra-poblacional fue baja en casi todas las poblaciones, menos en Tromen Bajo donde fue moderada considerando la heredabilidad ($h^2_{TRB\ t50Alt-2014-2015} = 0,42$). La diferenciación entre poblaciones no se pudo calcular debido a que no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones.

El modelo analizado para el momento al que llegaron a la mitad del crecimiento en DAC en la temporada 2014-2015 (t_{50DAC}) no evidenció diferencias significativas entre las poblaciones. Pero sí resultó significativo el factor familia ($p = 0,030$). El promedio de t_{50} para DAC fue 344 (equivalente al 09 de diciembre), y varió entre 342 en Queñi y 345 en Tromen Alto y Boquete. La variación intra-poblacional fue baja en promedio ($h^2_{t50DAC} = 0,11$).

Por otro lado, para la temporada 2015-2016 el modelo analizado para el momento al que llegaron a la mitad del crecimiento en Alt ($t_{50Alt2015-2016}$) mostró diferencias significativas entre las poblaciones y la prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias entre las poblaciones Curruhué, Tromen Bajo y Tromen Alto; y entre Tromen Bajo y Paimún. El promedio para todas las poblaciones fue 332 (equivalente al 27 de noviembre), la población con el menor valor medio fue Curruhué ($t_{50\ Alt2015-2016} = 328$) y la población con el mayor valor medio Tromen Alto ($t_{50\ Alt2015-2016} = 336$). El factor familia no resultó significativo y la variación intra-poblacional fue moderada en general ($h^2_{t50\ Alt2015-2016} = 0,18$), siendo Paimún la única población con variación alta ($h^2_{P-t50\ Alt2015-2016} = 0,79$). La diferenciación entre poblaciones fue moderada $Q_{ST\ t50Alt2015-2016} = 23\ \%$. En la Tabla 14 se pueden observar los valores de todos los parámetros genéticos intra-poblacionales calculados para cada población en el parámetro t_{50} .

Tabla 14. *Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el momento en el que se alcanza la mitad de crecimiento (t_{50}) en Alt para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y en DAC 2014-2015 para cada una de las poblaciones naturales de N. alpina incluidas en el ensayo principal. Media [días julianos] y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). Alt: altura; DAC: diámetro a la altura del cuello.*

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
t₅₀ Alt 2014-2015	Media	317	314	312	314	317	317	314	317	315
	(de)	(19)	(17)	(15)	(16)	(16)	(14)	(13)	(14)	(15)
	h^2	0,04	0	0	0,05	0	0,10	0,42	<0,01	0,08
	SE (h^2)	0,07	0,01	0,04	0,03	0,02	0,04	0,20	0,01	0,05
	σ^2_A	14,74	0	0	14,83	0	21,10	69,15	0,89	15,09
	CV_A	1,21	0	0	1,22	0	1,45	2,64	0,30	0,85
t₅₀ DAC 2014-2015	Media	344	343	344	342	343	345	345	344	344
	(de)	(10)	(9)	(10)	(10)	(9)	(9)	(10)	(9)	(9)
	h^2	0,29	0,03	0,21	0,08	<0,01	0,04	0,12	0,08	0,11
	SE (h^2)	0,23	0,02	0,16	0,03	0,02	0,02	0,08	0,05	0,08
	σ^2_A	30,75	2,37	21,16	8,44	0,12	3,43	13,57	7,02	10,86
	CV_A	1,61	0,45	1,34	0,85	0,10	0,54	1,07	0,77	0,84
t₅₀ Alt 2015-2016	Media	334	328	328	330	330	333	336	332	332
	(de)	(11)	(13)	(10)	(14)	(10)	(12)	(16)	(11)	(13)
	h^2	0	0	0,79	<0,01	0	0,33	0	0,29	0,18
	SE (h^2)	0,06	0,01	0,41	0,01	0,03	0,12	0,02	0,13	0,10
	σ^2_A	0	0	91,42	<0,01	0	46,54	0	33,36	21,42
	CV_A	0	0	2,91	<0,01	0	2,04	0	1,74	0,84

Forma de la curva de crecimiento (S)

En el análisis realizado para el parámetro que indica la forma de la curva de crecimiento en Alt (S), no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones para ninguna de las dos temporadas analizadas. La población que mayor valor medio de este parámetro registró en la temporada 2014-2015 fue Boquete ($S_{B-Alt2014-2015} = 18,54$) y la que registró el menor valor medio del parámetro fue Tren Tren ($S_{TT-Alt2014-2015} = 16,04$). En la temporada 2015-2016 este parámetro fue menor en relación a la anterior, y la población que mayor valor registró fue Tremen Bajo ($S_{TRB-Alt2015-2016} = 15,09$), mientras que la que menor valor registró fue Tremen Alto ($S_{TRA-Alt2015-2016} = 13,19$). La variación intra-poblacional en este parámetro fue moderada para la temporada 2014-2015 ($h^2_{Smedia2014-2015} = 0,23$) y baja para la temporada 2015-2016 ($h^2_{Smedia2015-2016} = 0,11$).

El parámetro de la forma de la curva (S) de crecimiento en DAC en promedio fue 15,47 y no se encontraron diferencias entre poblaciones. La población con mayor valor medio en este parámetro fue Queñi ($S_{QE-DAC} = 16,06$) mientras que la población que registró

el menor valor fue Tren Tren ($S_{TT-DAC} = 14,88$). La variación intra-poblacional fue muy baja ($h^2_{SmediaDAC} = 0,09$). En la Tabla 15 se muestran los parámetros genéticos calculados.

Tabla 15. *Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el parámetro S de las curvas de crecimiento en Alt para las temporadas 2014-2015 y 2015-2016; y en DAC 2014-2015 para cada una de las poblaciones naturales de N. alpina incluidas en el ensayo principal.*

Media y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). Alt: altura; DAC: diámetro a la altura del cuello.

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
S Alt 2014-2015	Media	18,54	17,31	17,33	17,79	17,25	16,21	16,29	16,04	17,09
	(de)	(6,19)	(6,15)	(4,84)	(6,17)	(4,85)	(5,57)	(4,83)	(4,87)	(5,58)
	h^2	0,05	0,07	0,66	0,19	0,09	0,12	0,42	0,26	0,23
	SE (h^2)	0,08	0,04	0,36	0,07	0,07	0,05	0,20	0,11	0,12
	σ^2_A	2,23	2,66	15,86	7,45	2,15	3,69	9,89	6,40	6,29
	CV_A	8,05	9,43	22,98	15,35	8,51	11,85	19,30	15,77	13,91
S DAC 2014-2015	Media	15,57	15,48	15,13	15,42	16,06	15,49	15,72	14,88	15,47
	(de)	(4,32)	(4,07)	(3,45)	(4,03)	(3,41)	(3,70)	(4,15)	(3,66)	(3,86)
	h^2	0,17	0,11	0,11	0,07	0	0,08	0,02	0,17	0,09
	SE (h^2)	0,15	0,06	0,10	0,03	0,02	0,04	0,03	0,08	0,06
	σ^2_A	3,20	1,94	1,31	1,16	0	1,16	0,41	2,45	1,45
	CV_A	11,49	8,99	7,56	6,97	0	6,94	4,08	10,53	7,07
S Alt 2015-2016	Media	14,62	13,96	13,51	14,40	13,39	13,19	15,09	14,32	14,06
	(de)	(3,49)	(5,34)	(4,08)	(4,98)	(4,61)	(5,15)	(5,87)	(5,84)	(5,16)
	h^2	0,03	0	0	<0,01	0,06	0,16	0,27	0,34	0,11
	SE (h^2)	0,07	0,01	0,05	0,01	0,06	0,06	0,14	0,14	0,07
	σ^2_A	0,34	0	0	<0,01	1,35	4,38	9,79	12,19	3,51
	CV_A	3,98	0	0	<0,01	8,68	15,87	20,74	24,37	9,21

4.4. DISCUSIÓN

En Alt acumulada, el único año para el cual se encontraron diferencias significativas entre las medias poblacionales fue 2017, verificando diferencias entre las poblaciones Puerto Arturo (la de plantas más altas) y Queñi (la de plantas más bajas). O sea que hasta la edad de seis años no fue posible diferenciar a las poblaciones por su crecimiento acumulado en altura. Se podría pensar entonces que las diferencias se dan recién a la edad de seis años, pero en el ensayo complementario de esta tesis se encontraron diferencias entre las poblaciones en plantines de una temporada de crecimiento lo cual invalida esta hipótesis. Antes bien, puede presumirse que el mayor grado de control de las condiciones ambientales en el ensayo de vivero (i.e. suelo preparado, riegos, fertilización, sombreado con malla mediasombra) permitió que pudieran discriminarse diferencias pequeñas, que en el ensayo de campo no se verificaron hasta su acumulación luego de 6 años. Por otro

lado podría pensarse que en los primeros años del ensayo principal no tuvieron la suficiente presión ambiental como para expresar diferencias entre las poblaciones y que sólo el último año de medición fue suficientemente estresante. Para corroborar esta hipótesis habría que realizar ensayos de estrés ambiental en condiciones controladas y ver si las diferencias se expresan.

En otro orden, se encontraron correlaciones tanto fenotípica como genética muy altas entre años para esta variable. En particular la correlación entre los años 2014 y 2017 para Alt fue muy alta (la fenotípica y mayor aún la genética), lo que permitiría pronosticar con alto grado de probabilidad la altura de las plantas al sexto año midiéndola al tercer año, contribuyendo esta característica a una estrategia de selección temprana. Por otro lado, la heredabilidad del carácter fue de moderada a baja en general, y disminuyendo con los años, aunque debe destacarse un valor alto en algunas poblaciones y años. Asimismo, el valor de diferenciación entre poblaciones resultó bajo.

En DAC acumulado se encontró un patrón de variación similar, con efecto familiar leve y sólo en los dos primeros años, con una variación intra-poblacional aún más baja que para Alt y disminuyendo con los años, y sin diferencias entre poblaciones en ninguno de los años. Estos patrones tanto de Alt como de DAC contrastan con los estudios hechos en *Quercus robur*, *Quercus petraea* (Jensen 1993; Baliuckas 2000), *Castanea sativa* (Fernandez-Lopez et al. 2005) y *Nothofagus obliqua* (Barbero 2014), donde se encontró mayor variación genética intra-poblacional y donde la diferenciación entre poblaciones fue alta en estos caracteres, excepto en *Castanea sativa* donde también se encontraron bajos valores de diferenciación inter-poblacional para altura. Además también contrasta con los valores encontrados en el capítulo 3 de esta tesis, donde se midieron los mismos caracteres pero en plántulas de un año, (esta discusión se retomará en el Capítulo 6).

El crecimiento relativo tanto en Alt como en DAC fue disminuyendo significativamente con los años, como podía presumirse de las mediciones puntuales de cada invierno. La variación para estos caracteres también resultó ser baja, sin diferencias entre poblaciones y sin efecto familiar, con variación intra-poblacional más bien baja.

La tasa de crecimiento diaria en Alt no varió significativamente de una temporada a la siguiente (aunque se midió un aumento en el valor medio), ni tampoco de una

población a otra, ni el factor familia fue significativo. La interacción verificada entre la fecha de medición y la temporada podría interpretarse como un indicio de plasticidad fenotípica. Sin embargo las condiciones ambientales pueden haberse repetido en distintas fechas para cada temporada, tratándose entonces de un corrimiento temporal para la misma respuesta antes que de distintas respuestas frente a distintos ambientes.

La fecha fue el factor que más significancia mostró en todos los análisis y el momento medio de mayor tasa de crecimiento diario en altura para las dos temporadas de crecimiento fue en la misma fecha y fue el 9 de diciembre, concordando con la media de mayor tasa de crecimiento en DAC que se registró el 2 de diciembre (momento 6 de medición).

Por otro lado se pueden detectar dos picos en el gráfico de la tasa de crecimiento diario en altura en ambas temporadas para todas las poblaciones. En la primera temporada son picos similares en magnitud, aunque en la segunda temporada se identifica un primer pico mayor seguido de un descenso de la tasa de crecimiento y luego un segundo pico de menor magnitud. Estos dos picos encontrados en ambas temporadas fueron contundentes en todas las poblaciones. Esto evidencia un patrón en el crecimiento que podría tener un condicionante biológico inherente a la especie. Para esta causal elaboré como hipótesis que el primer pico podría deberse al alargamiento de los órganos preformados en la yema de invierno y el segundo corresponder a la aparición de la neoformación (en el valle que separa ambos picos en la curva) con su posterior elongación. Sin embargo esto no se comprueba con los datos observados de neoformación, ya que observé en la temporada 2015-2016 que aparece antes del primer pico. Otra causa para la ocurrencia de los dos picos de tasa de crecimiento en altura podría ser una misma condicionante ambiental, no evaluada, que actúe de diferente manera en ambas temporadas (e.g. la humedad de suelo, por nombrar alguna).

Por otro lado, se observó un incremento en DAC luego del cese de crecimiento en altura en la temporada 2014-2015 donde fueron medidos ambos caracteres. Este desfase puede ser explicado debido a que las plantas mantienen las hojas hasta casi el mes de abril, por lo tanto tienen la capacidad de seguir fotosintetizando hasta esa fecha, y los productos de la fotosíntesis podrían redirigirse a aumentar el DAC de la planta además de la

acumulación de reservas. Sin embargo, este resultado contrasta con el encontrado en *Nothofagus obliqua*, una especie muy emparentada, donde se encontró que el diámetro empezaba a crecer antes (5 días) y finalizaba antes (20 días) que el crecimiento en altura (Barbero 2010). En otros trabajos se encontró una relación positiva del crecimiento del diámetro con la dominancia del árbol en el bosque en *Pinus strobus* L. (Borman 1965), con la cantidad de yemas epicórmicas en *Fagus sylvatica* (Colin et al. 2012) e incluso con las condiciones climáticas del año anterior en *Nothofagus pumilio* (Magnin et al. 2014), lo cual podría sugerir que el crecimiento del diámetro es un tanto impredecible si no se tiene un conocimiento total de las condiciones en las que está creciendo el árbol, debido a que hay múltiples factores que alteran este proceso.

La correlación fenotípica baja encontrada entre altura y DAC acumulados fue alta en todos los años, salvo en el primer año de medición (2014) que fue baja. Esta excepción puede deberse a una influencia mayor del micrositio a edades tempranas. Otro resultado más curioso fue la correlación genética alta y negativa entre Alt y DAC al año 2016, siendo que para los años 2015 y 2017 fueron altas y positivas. Tal vez se deba a una etapa del desarrollo de la planta en la que privilegia la inversión de recursos a uno u otro destino.

El enfoque de estudio del crecimiento a través de la construcción de curvas individuales permitió profundizar el análisis de los patrones de variación entre y dentro de las poblaciones. El momento del inicio del crecimiento en altura resultó diferente entre poblaciones, aunque no se verificó variabilidad familiar. El patrón de variación para el inicio de crecimiento en DAC fue aún menor. Resulta interesante la comprobación de que para la temporada 2015-2016 el inicio de crecimiento en altura fue casi un mes más tardío que en la temporada anterior. Sin embargo, los grados día acumulados en las dos temporadas para esta fenofase fueron muy similares, necesitando en ambas temporadas alrededor de 400 °Cd para iniciar el crecimiento. La diferencia en grados días para una misma fecha de una temporada a la otra asciende a unos 200 °Cd, lo que resalta la casi coincidencia registrada alrededor de 400 °Cd. Esta observación vuelve evidente que son las condiciones de temperatura las que regulan el desencadenamiento del proceso de crecimiento y no el fotoperiodo.

El fin de crecimiento reveló un patrón de variación intra e inter-poblacional

similarmente bajo. Se destaca la comprobación de que los árboles siguen creciendo en DAC cuando ya cesó el crecimiento en Alt, hasta casi un mes después. Tampoco el parámetro S de forma de la curva de crecimiento mostró gran variabilidad, revelando un proceso de crecimiento similar en todas las familias y en todas las poblaciones.

Aunque para las tasas de crecimiento la heredabilidad fue muy baja para todas las poblaciones sin excepción, en el resto de los caracteres la mayoría de las poblaciones fueron variables en cuanto al valor de heredabilidad. Sin embargo, hubo dos poblaciones que fueron sumamente constantes en heredabilidades muy bajas salvo un par de caracteres: estas poblaciones fueron Boquete y Curruhué. Particularmente Paimún resultó la población con mayores heredabilidades en comparación al resto de las poblaciones, y su rendimiento en cuanto a crecimiento estuvo por debajo del promedio en todos los caracteres medidos. Tren Tren fue otra población que mostró un resultado interesante, ya que fue la población que comenzó el inicio de crecimiento más tardíamente con heredabilidad moderada, esto resulta prometedor en Patagonia si pensamos en sitios de implantación con alta incidencia de heladas tardías (esta discusión se retomará en el Capítulo 6 conjugando los resultados del Capítulo 5).

CAPÍTULO 5. Caracteres morfológicos, fenológicos y eco-fisiológicos en plantas juveniles

5.1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los caracteres adaptativos más importantes, los fenológicos son probablemente los más afectados por el cambio climático global (Bertin 2008). En los árboles de zonas templadas, fases fenológicas tales como los momentos de apertura y cierre de yemas, o de la senescencia de hojas, están controladas por un balance entre supervivencia y productividad. Ya que el riesgo de daños por heladas (necrosis por congelamiento de meristemas primarios de los tallos) es más frecuente en otoño, los árboles adaptados a climas más fríos completan su crecimiento tempranamente en la temporada, formando precozmente las estructuras de resistencia invernal (yemas) (Howe et al. 2003). El cese de crecimiento, la formación de yemas y la posterior senescencia de hojas, se dan principalmente por cambios en el fotoperiodo (noches más largas) y temperaturas más bajas (noches más frías), mientras que la apertura de yemas es mayormente influenciada por la temperatura (Chuine & Cour 1999; Howe et al. 2003), siendo el predictor más preciso para la apertura de yema la suma de calor en el invierno tardío o los meses de primavera (grados día acumulados) (Bertin 2008).

Para los árboles deciduos, como *Nothofagus alpina*, los momentos de apertura de yemas en primavera y senescencia de hojas en otoño determinan la duración del follaje fotosintéticamente activo y por lo tanto el crecimiento vegetativo, lo cual tiene un evidente efecto sobre la productividad de las plantas (Bennie et al. 2010; Tang et al. 2016). Sólo unos pocos estudios que han medido el momento de senescencia a través de gradientes climáticos o temporales, son capaces de cuantificar la duración del follaje, definido como el lapso entre el momento de apertura de las yemas y la senescencia o caída de hojas (Kramer 1995; Chmielewski & Rötzer 2001; Vitasse et al. 2009b). Así, los caracteres fenológicos afectan a la capacidad de las plantas de adquirir recursos para su crecimiento (Howe et al. 2003) y a la vez tienen un gran impacto en caracteres funcionales (e.g. fotosíntesis, intercambio gaseoso) (Tang et al. 2016). Por otro lado los caracteres fenológicos están

asociados con factores climáticos y abióticos, pero también están bajo control genético (Howe et al. 2003; Wolkovich et al. 2014), y por lo tanto son importantes para el entendimiento de mecanismos adaptativos.

Las hojas son los órganos principales de fotosíntesis y están estrechamente relacionadas a la producción de biomasa: en ellas ocurre el mayor intercambio de gases entre las plantas y la atmósfera y es donde ocurre el principal intercambio de agua, energía y carbono (Taiz & Zeiger 2006). Algunos caracteres foliares son importantes para determinar la selección de árboles de buen crecimiento y alta productividad. Entre ellos, el área foliar, el intercambio gaseoso y la eficiencia del uso del agua son determinantes para la producción de fotoasimilados (Marron et al. 2007; Dillen et al. 2010; Guha & Reddy 2013). Según Poorter & Bongers (2006), los caracteres foliares son predictores de la performance de la planta. Por un lado las especies de plantas con hojas más densas, con menor área foliar específica (AFE), que generalmente son más “costosas” y se relacionan con una longitud de vida más larga y con defensa anti-herbívoros, muestran menores tasas fotosintéticas y a la vez se asocian con una mayor supervivencia de la planta y uso conservador de recursos (menor asimilación, respiración y tasas de conductancia estomática). Mientras que las plantas con hojas más finas, con mayor AFE, menos costosas y que se asocian con una longitud de vida más corta, están relacionadas con mayores tasas fotosintéticas y con crecimientos más rápidos.

Algunos *Nothofagus* pueden experimentar más de un proceso de producción foliar durante la misma temporada. En primer lugar producen hojas cuyos primordios foliares fueron diferenciados en la temporada anterior, atravesaron el invierno en forma latente dentro de la yema y se expandieron a partir de la apertura de las yemas: son las hojas “preformadas”. Luego, avanzada la temporada de crecimiento, algunos individuos, producen hojas completamente nuevas, a partir de nueva actividad meristemática y posterior expansión: son las hojas “neoformadas” (Puntieri et al. 2000, 2001, 2002; Guédon et al. 2006). Este fenómeno podría dar lugar a una combinación de características foliares relacionadas con cada uno de los tipos de hojas, de modo de favorecer el desarrollo de la planta, otorgándole una mejor habilidad competitiva (Gordon et al. 2006; Puntieri et al. 2007a).

Otro carácter visible en plantas juveniles de *N. alpina* es la persistencia de hojas senescentes en los tallos durante el invierno (no se produce la abscisión luego de la senescencia), a las que se denomina “hojas marcescentes” (Schaffalitzky de Muckadell 1962). Esta es una característica presuntamente adaptativa, común en algunas especies de Fagáceas, que les permitiría crecer en condiciones ambientales adversas, ya que funcionarían como reservorios de nutrientes en suelos pobres, cayendo y descomponiéndose en primavera, cuando la planta más los necesita (Otto & Nilsson 1981). Otra función ecológica de las hojas marcescentes podría ser la protección contra grandes herbívoros en la temporada invernal, bajando la palatabilidad de estos órganos y protegiendo así las yemas (Svendsen 2001).

Por otro lado, la arquitectura de las plantas es una característica adaptativa que ha evolucionado en respuesta a diferentes fuerzas de selección y es un importante componente de la capacidad competitiva de las especies (Puntieri et al. 2013). Si bien no existe consenso de cómo evaluar la estructura jerárquica de un árbol, hay ciertos índices que pueden usarse, como el índice de esbeltez (que es la razón entre la altura de la planta en cm y el diámetro a la altura del cuello en mm) o el de ramosidad (relación entre altura en cm y el número de ramas en el eje principal), así también como la presencia de ramas co-dominantes del eje principal (Sterck et al. 2001; Valladares & Niinemets 2007; Puntieri & Ghirardi 2010; Puntieri et al. 2013). La competencia por luz, por ejemplo, suele inducir a un mayor crecimiento en altura, en detrimento de la ramificación (King et al. 1997). Pero además de respuestas plásticas, el grado de ramificación puede presentar variación genética entre y dentro de poblaciones de una especie, asociada a variación de hábitat (Raddad 2007; Gülcü & Çelik 2009). Por lo tanto los caracteres fenológicos, eco-fisiológicos y arquitecturales son importantes tanto para la capacidad adaptativa de las especies, como para la selección de especímenes destinados a forestación.

Por último, la supervivencia puede entenderse como un carácter que representa el resultado integrador de múltiples caracteres y es un componente esencial del *fitness* de la planta. Un evento extremo negativo excede las condiciones en las que un organismo puede aclimatarse ajustando su fisiología o desarrollo (Gutschick & Bassirrad 2010) y genera efectos persistentes en el rendimiento de la planta y su consecuente muerte. Estos eventos

extremos pueden conducir entonces a una fuerte selección (Gutschick and BassiriRad 2003).

El objetivo de este capítulo es analizar la variación y diferenciación genética en caracteres fenológicos, eco-fisiológicos y arquitecturales relevantes para el crecimiento y desarrollo de plantas de 86 familias de polinización abierta correspondientes a ocho poblaciones naturales de *N. alpina* criadas en un ensayo de ambiente común.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el Ensayo Principal ubicado en el paraje Las Golondrinas, se observó y registró la supervivencia de las plantas desde el segundo año de instalación (2012) hasta el final de las mediciones (2017). Adicionalmente, además de las mediciones de crecimiento analizadas en el Capítulo 4, se realizaron en paralelo mediciones morfológicas durante cuatro temporadas invernales (desde el año 2014 al 2017). Se midieron y calcularon los siguientes caracteres morfológicos de cada planta viva: presencia de hojas marcescentes (HM; superior al 40 % de la copa), número de ramas primarias (NR), el índice de ramosidad (IR), el índice de esbeltez (IE) y la presencia de ramas co-dominantes (bifurcaciones) persistentes al año 2017 (Bi). Se consideró rama co-dominante a una rama primaria con el ángulo entre su base y el tronco menor a 25° y con una altura mayor a 2/3 de la altura del tronco, tal como fue definido por Puntieri et al. (2013). Según esta definición, se determinó la presencia de ramas co-dominantes al año 2014 y su posterior persistencia al año 2017.

También se realizaron mediciones de fenología de apertura de yema cada tres días durante la temporada de crecimiento 2015-2016 en todas las plantas vivas (783 en total), desde el inicio de la temporada (20 de septiembre) hasta que todas las plantas llegaron al estado de yema totalmente expandida (fenofase 5, definida más abajo). Se registró el estadio de apertura de la yema apical que mostraba cada árbol según una escala ordinal de cinco fenofases, categorizada fotográficamente en la Figura 20:

- **Yema 1 “cerrada”**: catáfilas todas juntas; si hay hojas entre brácteas, tienen color verde oscuro y son duras; sin exudados; yema de color marrón o verde oscuro.
- **Yema 2 “en elongación”**: con alternancia de colores marrón y verde por el inicio

del alargamiento de los primordios foliares; con exudado pegajoso.

- **Yema 3 “abierta”**: color mayormente verde claro; hojas asomando entre las catáfilas marrones.
- **Yema 4 “en expansión”**: algunas hojas totalmente a la vista; futuro tallo no visible.
- **Yema 5 “totalmente expandida”**: todas las hojas a la vista; futuro tallo visible.

Para definir esta escala se hicieron observaciones sobre una muestra de los mismos árboles el año anterior a la medición, y se introdujo una modificación sobre la escala previamente definida para *Nothofagus obliqua* por Barbero (2014).

Luego de alcanzar todas las plantas la fenofase 5, se continuó con las observaciones cada una semana hasta registrar la fecha de aparición de hojas neoformadas en todas las plantas que las tuvieran. La aparición de la hoja neoformada se identificó, luego de la finalización de la expansión de la hoja preformada más distal, como la aparición en el ápice del tallo de una estructura de dos escamas verdes muy pequeñas unidas, donde luego se expandió la hoja entre ellas. Este proceso sucedió cada vez que se formó una hoja neoformada. La diferencia principal para poder identificar el proceso de preformación y neoformación es la simultaneidad de la aparición de hojas preformadas y la secuencialidad de la aparición de las neoformadas.



Figura 20. Fotografías de los estadios de apertura de yema.

Hacia el final de esta temporada de crecimiento se realizaron observaciones cada 3 días, entre el 01 de marzo de 2016 y el 19 de mayo de 2016, para registrar el comienzo y finalización de la senescencia de hojas, mediante la estimación del porcentaje de hojas otoñales, amarillentas o rojizas, en el total de la copa de cada árbol. Se definió una escala cualitativa de dos niveles: 10 % del total de la copa con hojas otoñales se registró como “inicio” de senescencia, y 90 % del total de la copa con hojas otoñales, como “finalización” de senescencia foliar. Se realizó una observación ulterior el 26 de mayo para verificar las 17 plantas que quedaban sin llegar al 90 % de senescencia, encontrando sólo una más en la etapa de finalización de senescencia foliar, o sea que 16 plantas de las 783 observadas persistieron hasta fines del otoño con una proporción significativa de hojas verdes (estas 16 plantas correspondieron a 16 familias distintas de las 8 poblaciones distintas).

A partir de la base de datos, con el registro de la fenofase observada en cada fecha, se calcularon los días julianos (o sea el número de días desde el 1° de enero del año 2015) para alcanzar la apertura de yema (definida como yema abierta, asignada como estadio 3 de la yema: DJY3), para la aparición de neoformación (DJneo), para el inicio (DJ10SF) y la finalización (DJ90SF) de senescencia foliar. Luego se calculó la duración del follaje verde (DurF), como la diferencia de tiempo entre DJY3 y DJ90SF.

Con los datos de temperatura del aire registrados mediante sensores/*dataloggers* HOBO®, se calculó el calor acumulado en unidades grados días (°Cd) de desarrollo, necesarios para que abriera la yema en cada población, desde el 01 de julio hasta el momento de apertura de yemas (DJY3). Para cada población se aplicó la fórmula ajustada del estudio de yemas florales de García et al. (2013) que ya fue explicada en el Capítulo 2.

Durante la temporada de crecimiento 2015-2016, debido a que se había seguido la fenología de cada árbol y se había contado la cantidad de hojas preformadas expandidas en el ápice de cada árbol, se pudo tener certeza en la identificación de hojas preformadas (Pref) y neoformadas (Neof). En base a esta identificación certera, se recolectaron tres hojas de cada tipo, sobre la parte apical del eje principal en cada árbol vivo del ensayo (783 árboles) para realizar comparaciones entre los dos tipos de hojas en algunos caracteres foliares, además de las comparaciones intra e inter-poblacionales previstas. Las hojas fueron escaneadas en fresco con una resolución de 300 dpi, para luego calcular su área foliar en cm² (AF) en forma digital con el programa Hoja 3.4 (Verga 2011). Luego fueron secadas en estufa a una temperatura de 60 °C durante 48 hs y pesadas individualmente con una precisión de 0,001 gramos, para finalmente calcular su área foliar específica (AFE) con la siguiente ecuación:

$$AFE = \frac{AF(cm^2)}{Peso(g)}$$

Con el software Hoja 3.4 también se realizó una medición del largo (L) y ancho (AN) en cm de cada hoja para llegar a una relación largo/ancho (LAN) como un proxy de la forma de la hoja, permitiendo así comparar los dos tipos de hojas.

También se utilizó este muestreo de hojas para medir densidad estomática (DE), o sea la cantidad de estomas por unidad de superficie foliar. Esta variable está directamente

relacionada con la actividad fotosintética y el intercambio gaseoso, y por lo tanto con la productividad de la planta (Taiz & Zeiger 2006). Con una primera observación se identificó que en *N. alpina* los estomas están principalmente en la cara abaxial de la hoja. Para la observación y conteo de estomas se utilizó la técnica de impresión de la superficie foliar de Brewer (1992), la cual debió ser adaptada para evitar el resquebrajamiento del esmalte al sacarlo debido a las prominentes nervaduras de las hojas de *N. alpina* y a que las hojas habían sido secadas en estufa previamente para poder calcular el AFE. El método consistió entonces en colocar esmalte de uñas transparente sobre la superficie abaxial de la hoja seca, dejarlo orear, y una vez seco colocar sobre todo el esmalte un trozo de cinta adhesiva transparente, para finalmente despegarla levantando el esmalte con la impresión de la superficie foliar grabada en él. Seguidamente la cinta junto con el esmalte fue pegada en un portaobjetos previamente etiquetado, para luego ser visto bajo el microscopio óptico (Figura 21).

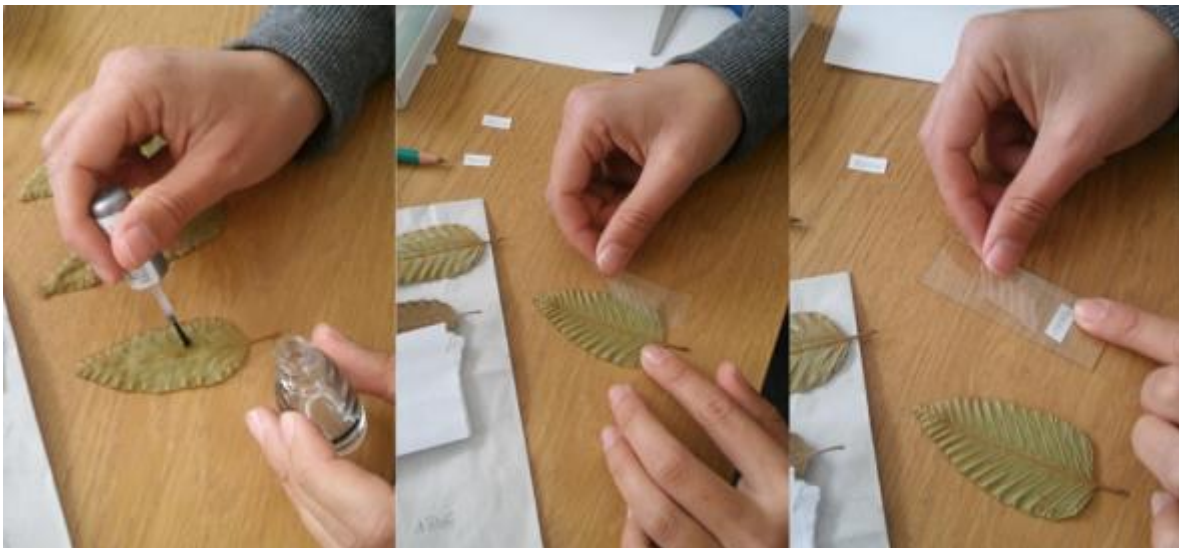


Figura 21. Proceso de “impresión” de estomas sobre película de esmalte

La densidad estomática se midió sobre una submuestra de las hojas a las que se les midió AFE. Se seleccionaron cinco plantas por familia de los bloques 1 al 6, evitando el bloque 2 debido a la gran cantidad de plantas muertas en el mismo (se agregaron plantas de otros bloques en los casos en que no se alcanzaba a completar la muestra de cinco plantas con los bloques seleccionados). Algunas familias (B16, PA13, QE16, TRA 24, TRA 29 y TRA 33) quedaron con menos de cinco plantas debido a que no había más individuos

vivos. Para realizar las observaciones se utilizó el microscopio óptico Leica® con un aumento de 500x (objetivo de 50x y ocular de 10x), con cámara integrada, enlazada a una computadora mediante el software Leica Application Suite (LAS). Se tomaron las fotografías de la superficie a medir (0,054069 mm²) y se contó visualmente el número de estomas en esa superficie (Figura 22). Para el análisis final se llevó la densidad registrada al equivalente para 1 mm² de superficie.

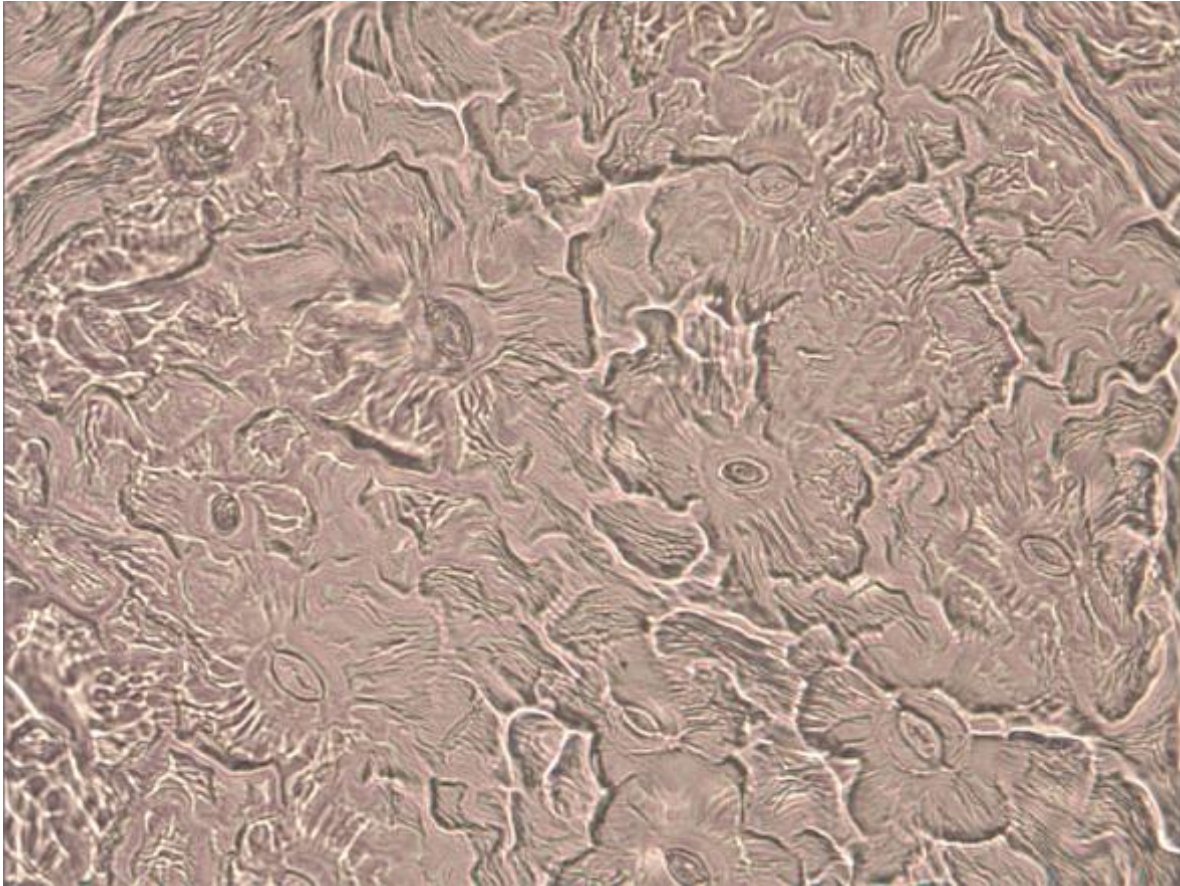


Figura 22. Foto del campo visual en el microscopio óptico donde se visualizan los estomas entre las células epidermicas.

En la temporada siguiente, 2016-2017, se realizaron mediciones de variables fisiológicas sobre hojas preformadas: eficiencia del uso del agua (EUA), conductancia estomática (CE), tasa de transpiración (TT), tasa fotosintética (TF) y un índice de concentración de clorofila (SPAD). Para estas mediciones se realizó un submuestro de árboles, tomando 5 plantas por familia (sólo en la familia de TRB17 se muestrearon 4 plantas), de entre 5 y 7 familias al azar por cada una de todas las poblaciones del ensayo,

en los bloques con mayor proporción de plantas vivas (Tabla 16). Las mediciones se realizaron sólo una vez durante la temporada de crecimiento 2016-2017, entre el 23 y el 30 de noviembre, en días calurosos y soleados. Las mediciones se realizaron entre las 9 de la mañana y las 6 de la tarde, con un total de 61 plantas por día, y el orden de medición siguió el del bloqueo espacial, de tal modo que podría considerarse que el mismo actuó como bloqueo temporal.

Tabla 16. Tabla de poblaciones y familias incorporadas en el sub-muestreo para mediciones fisiológicas.

POBLACIÓN							
Boquete	Curruhue	Paimún	Puerto Arturo	Queñi	Tromen Alto	Tromen Bajo	Tren Tren
B12	C12	P12	PA10	QE1	TRA23	TRB10	TT3
B15	C13	P2	PA3	QE12	TRA25	TRB11	TT4
B16	C6	P6	PA4	QE14	TRA26	TRB12	TT7
B3	C2	P9	PA6	QE15	TRA27	TRB17	TT12
B6	C16	P11	PA7	QE2	TRA32	TRB4	TT15
	C5	P7	PA9	QE16	TRA36	TRB8	TT19
	C11		PA5	QE3	TRA34	TRB18	TT20

Todas las mediciones, salvo la del índice de concentración de clorofila, se realizaron con un equipo Li-Cor 6400®. La radiación fotosintéticamente activa fue seteada a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y la luz fue provista por la fuente de luz LED roja/azul. La temperatura de la hoja se seteó a 20 °C; la concentración de CO₂ a 400 ppm y una tasa de flujo de 300 ml min⁻¹. El tiempo de espera fue de 3 min, con una medición por minuto (utilizando la medición donde el aparato tuvo mayor estabilidad).

Para cada hoja medida con el Li-Cor® se realizó seguidamente una medición indirecta y no destructiva del contenido de clorofila con el medidor de clorofila portátil Clorofilio® (Cavadevices, Bs. As., Argentina), el cual registra la transmitancia de luz infraroja (940 nm) y luz visible en el rango de uso de la clorofila (660 nm), y calcula la relación entre estas dos mediciones registrando como resultado el valor de un índice que es proporcional al contenido de clorofila, y que se denomina SPAD. Este índice ya ha sido utilizado en *Nothofagus obliqua*, especie en la que se probó una alta correlación con el contenido de clorofila obtenido mediante extracción con buffer de acetona/tris (Torres et al. 2018).

Para poner a prueba la correlación entre las mediciones del Clorofilio® en unidades SPAD y la concentración de clorofila específicamente en Raulí, se realizó un estudio en forma previa al análisis de las mediciones del ensayo. Sobre cada una de 100 hojas de *N. alpina* de árboles juveniles no incluidos en el ensayo se tomó una medición con el Clorofilio® y se midió el contenido de clorofila de las mismas hojas mediante extracción siguiendo el protocolo propuesto por Gould et al. (2000). Luego se analizó la asociación entre ambos valores de cada hoja, encontrando una correlación significativa y alta ($p < 0,001$; $r = 0,63$). El gráfico de la correlación y su resultado se muestran en la Figura 23.

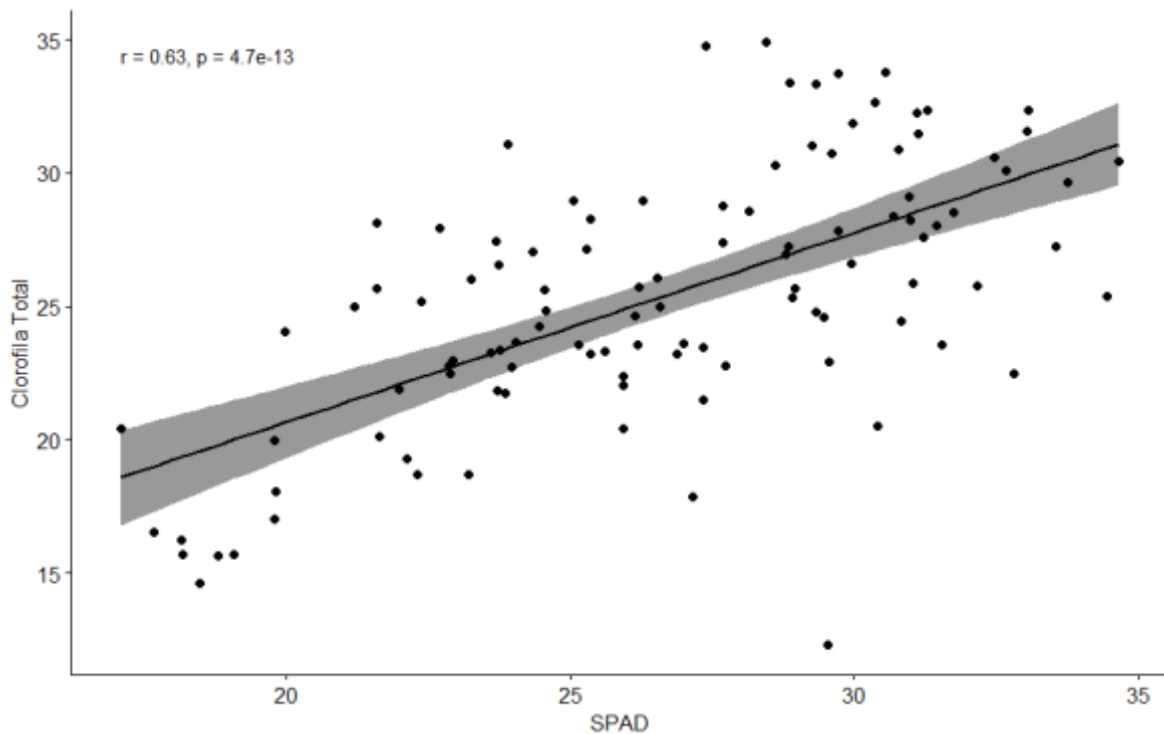


Figura 23. Gráfico de correlación entre el contenido total de clorofila y el valor de SPAD medido con Clorofilio® para hojas de *N. alpina*.

Para analizar la variación intra e inter-poblacional de las variables normales se utilizó un modelo lineal mixto con esta estructura:

$$y_{ijk} = \mu + \rho_i + \beta_j + \varphi_{k(\rho_i)} + \varepsilon_{ijk}$$

donde: y_{ijk} es la observación en el individuo de la k -ésima familia de la i -ésima población en el j -ésimo bloque; μ es la media general del ensayo para la variable medida; ρ_i es el efecto fijo de la i -ésima población; $\varphi_{k(\rho_i)}$ es el efecto aleatorio de la k -ésima familia anidada dentro de la i -ésima población; β_j es el efecto aleatorio del j -ésimo bloque y ε_{ijk} es el error residual $\sim NID(0, \sigma^2)$.

Para analizar las hojas pre y neoformadas se agregó al mismo modelo el efecto fijo

del tipo de hoja, la interacción de este factor con la población y el efecto aleatorio del individuo, ya que la medición fue sobre una hoja de las tres muestreadas por cada tipo de hoja dentro de cada individuo. Y en el caso de los caracteres medidos en más de un año se agregó como efecto fijo al año y una interacción entre el año y la población, aunque luego se realizó también un modelo por cada año para calcular los parámetros genéticos intra e inter-poblacionales.

Por otro lado, se tomaron los valores medios de los caracteres morfológicos de las hojas preformadas y neoformadas de cada individuo [área foliar específica (AFE), área foliar (AF), relación entre longitud y ancho (LAN) y densidad estomática (DE)], para realizar las correlaciones fenotípicas entre los distintos caracteres sobre el mismo tipo de hoja y de los mismos caracteres en diferentes tipos de hoja y las correlaciones genéticas entre los distintos caracteres sobre el mismo tipo de hoja.

Para analizar la variación intra e inter-poblacional de las variables binomiales (supervivencia, presencia de rama co-dominante, presencia de hojas marcescentes y presencia de neoformación) se utilizó un modelo lineal mixto generalizado utilizando la familia de distribución binomial. En este modelo el componente residual aleatorio asociado con la observación, con función de densidad acumulativa logística, tiene media=0 y varianza= $\sigma_\varepsilon = \pi^2/3$ (Rabe-Hesketh & Skrondal 2008). Sólo en el caso de presencia de hojas marcescentes se incluyó en el modelo general el año y la interacción entre el año y la población como efectos fijos, para el cual sólo se consideraron las plantas vivas al año 2017, para evitar el desbalance entre un año y otro. Para este carácter también se aplicó un modelo por año para el cálculo de los parámetros genéticos, donde se incluyeron todas las plantas vivas de cada año.

En la Tabla 17 se resumen todos los caracteres analizados en el presente capítulo con sus respectivas abreviaturas y unidades para su mayor comprensión.

Tabla 17. *Caracteres analizados en el Capítulo 5 con sus respectivas abreviatura, unidad y distribución.*

Nombre del carácter	Abreviatura	Unidades	Distribución
Supervivencia	Superviv.		Binomial
Presencia de hojas marcescentes	HM		Binomial
índice de ramosidad	IR	cm.N°R ⁻¹	Normal

Índice de Esbeltez	IE	cm.mm ⁻¹	Normal
Bifurcaciones	Bi		Binomial
Apertura de yema	DJY3	días julianos	Normal
Aparición de neoformación	DJneo	días julianos	Normal
Inicio de senescencia foliar	DJ10SF	días julianos	Normal
Finalización de senescencia foliar	DJ90SF	días julianos	Normal
Duración del follaje verde	DurF	días	Normal
Presencia de hojas neoformadas	Neof		Binomial
Área foliar	AF	cm ²	Normal
Área foliar específica	AFE	cm ² .g ⁻¹	Normal
Relación longitud/ancho de hoja	LAN	cm/cm	Normal
Densidad estomática	DE	E/mm ²	Normal
Tasa fotosintética	TF	mmol CO ² /m ² ·seg	Normal
SPAD	-		Normal
Conductancia estomática	CE	mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	Normal
Eficiencia del uso del agua	EUA	mmol CO ² /mol H ₂ O	Normal

5.3. RESULTADOS

Supervivencia y caracteres arquitecturales

La supervivencia de las plantas fue disminuyendo a medida que pasaron los años: en el año 2012, luego de un año de instalar el ensayo, la supervivencia fue de 81,45 % y el último año de medición se redujo hasta 47,75 % en el total del ensayo (Tabla 18). Si bien en los análisis realizados por año no se encontraron diferencias significativas entre la supervivencia de las poblaciones, la población que mayor valor de supervivencia tuvo en todos los años fue Tromen Bajo que comenzó con 87,41 % en el 2012 y terminó con 52,59 % en el 2017; mientras que la población que menor valor de supervivencia tuvo en todos los años fue Puerto Arturo que comenzó con 78,15 % en el 2012 y terminó con 43,33 % en el 2017 (Figura 24). La variación intra-poblacional fue baja en general ($h^2_{\text{media}} = 0,06$) (Tabla 19), y el factor familia no resultó significativo para ninguno de los años. La única población con una variación intra-poblacional moderada fue Boquete ($h^2_{\text{media-B}} = 0,21$), aunque esta variación se fue reduciendo a medida que avanzaron los años (Tabla 19). En cuanto a la diferenciación entre poblaciones, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los años analizados, por lo tanto el valor de diferenciación cuantitativa no

fue calculado.

Tabla 18. Número y porcentaje acumulado de plantas vivas por año de *N. alpina* en el Ensayo Principal.

	Año					
	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Nº Plantas Vivas	1052	1006	879	825	761	616
Total Plantas	1290	1290	1290	1290	1290	1290
% Plantas Vivas	81,55	77,98	68,14	63,95	58,99	47,75

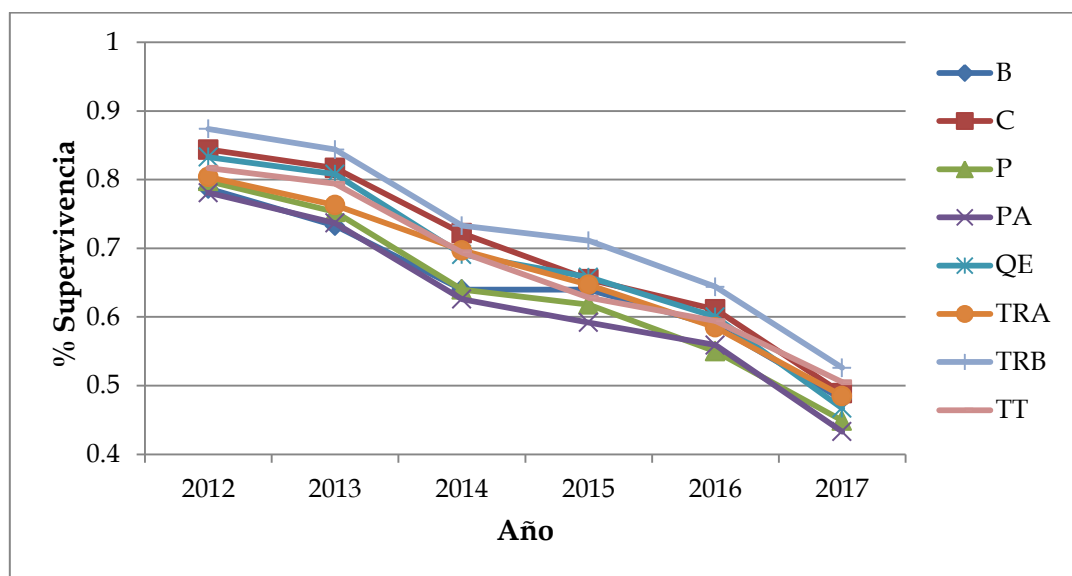


Figura 24. Porcentaje de supervivencia acumulada de plantas de cada población de *N. alpina* por cada año.

Tabla 19. Parámetros genéticos calculados para la supervivencia de las plantas para los años comprendidos entre 2012 y 2017 para cada población de *N. alpina* incluida en el Ensayo Principal. Heredabilidad (h^2) y su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A).

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
Superviv. 2012	h^2	0,38	0	0	0	<0,01	0,07	0,14	0	0,07
	SE (h^2)	0,27	<0,01	0,02	<0,01	0,01	0,03	0,08	0,01	0,05
	σ^2_A	2,65	0	0	0	<0,01	0,93	0,87	0	0,56
Superviv. 2013	h^2	0,43	0,02	0	0	0,01	<0,01	0,08	<0,01	0,07
	SE (h^2)	0,29	0,02	0,02	<0,01	0,02	<0,01	0,04	<0,01	0,05
	σ^2_A	3,04	0,21	0	0	0,05	<0,01	0,31	<0,01	0,45

Superviv. 2014	h^2	0,15	0,10	0	0	0,20	0	<0,01	<0,01	0,06
	SE (h^2)	0,13	0,05	0,02	<0,01	0,11	0,01	0,01	0,01	0,04
	σ^2_A	0,90	0,76	0	0	1,85	0	<0,01	<0,01	0,44
Superviv. 2015	h^2	0,15	0,01	0	0,03	0,21	0	0,06	0,01	0,06
	SE (h^2)	0,13	0,01	0,02	0,01	0,12	0,01	0,04	0,01	0,04
	σ^2_A	0,90	0,07	0	0,27	3,08	0	0,40	0,06	0,60
Superviv. 2016	h^2	0,12	0	0	0,16	0,14	0,02	<0,01	0	0,05
	SE (h^2)	0,11	0,01	0,02	0,05	0,09	0,01	0,01	0,01	0,04
	σ^2_A	0,88	0	0	2,10	1,79	0,16	<0,01	0	0,62
Superviv. 2017	h^2	0,06	0	0,01	0,12	0	0,03	0	<0,01	0,03
	SE (h^2)	0,07	0,01	0,03	0,04	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03
	σ^2_A	0,54	0	0,06	1,39	0	0,30	0	<0,01	0,29

La presencia de hojas marcescentes varió entre los años, siendo el 2017 el año con mayor porcentaje de hojas marcescentes (47,24 %), y 2016 el año con menor porcentaje (25,28 %) (Tabla 20). El análisis de la presencia de hojas marcescentes evidenció una diferencia significativa entre años de medición, pero no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones y tampoco una interacción de año por población. La prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias entre todos los años, excepto entre los años 2015 y 2017 (Tabla 20). Cuando se realizaron los modelos por año, los análisis realizados tampoco mostraron diferencias significativas entre poblaciones. Sin embargo, el factor familia fue significativo en casi todos los años, excepto el 2016, explicando entre el 6 y el 15 % del total de la variación. La variación intra poblacional fue de moderada a alta en general, aunque varió mucho entre las poblaciones y los años (Tabla 21), con un valor medio de heredabilidad de 0,33.

Tabla 20. Número y porcentaje de plantas que presentaron hojas marcescentes en cada año en el Ensayo Principal.

	2014	2015	2016	2017
Tukey modelo entre años	b	c	a	c
N° Plantas con hojas marcescentes	233	284	160	299
% Plantas con hojas marcescentes	36,81	44,87	25,28	47,24

Tabla 21. *Parámetros genéticos calculados para la presencia de hojas marcescentes para los años 2014, 2015, 2016 y 2017 para cada población natural de N. alpina incluida en el Ensayo Principal. Heredabilidad (h^2) con su error estándar (SE) y varianza genética aditiva (σ^2_A).*

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
	h^2	1,24	0,02	0,83	0,39	0,11	0,52	0,42	0,50	0,50
Hojas marcescentes 2014	SE (h^2)	0,57	0,02	0,42	0,12	0,07	0,17	0,20	0,19	0,22
	σ^2_A	8,32	0,08	3,63	1,46	0,38	2,03	1,60	1,93	2,43
	h^2	0,34	0,52	1,13	0,20	0,21	0,17	0,49	0	0,38
Hojas marcescentes 2015	SE (h^2)	0,25	0,20	0,49	0,07	0,12	0,07	0,22	0,01	0,18
	σ^2_A	1,74	2,34	8,27	0,73	0,76	0,65	2,78	0	2,16
	h^2	0	0,28	0,14	0,39	0,03	0,26	0	0,69	0,22
Hojas marcescentes 2016	SE (h^2)	0,05	0,12	0,12	0,12	0,04	0,10	0,02	0,24	0,10
	σ^2_A	0	1,08	0,95	1,46	0,09	1,16	0	2,90	0,95
	h^2	0,03	0	0,29	0,36	<0,01	0,54	0,10	0,46	0,22
Hojas marcescentes 2017	SE (h^2)	0,08	0,02	0,21	0,12	0,03	0,17	0,07	0,18	0,11
	σ^2_A	0,09	0	1,82	1,33	<0,01	2,27	0,39	1,78	0,96
	h^2 media	0,40	0,20	0,60	0,33	0,09	0,37	0,25	0,41	0,33

El índice de ramosidad (IR) fue poco variable entre poblaciones y disminuyó con los años: el año con mayor IR fue el 2014 (10,23 cm.rama⁻¹) y el de menor fue el 2017 (7,31 cm.r⁻¹) (Figura 25). En el análisis realizado para todos los años juntos se encontraron diferencias significativas entre los años ($p < 0,001$), pero no entre las poblaciones y tampoco una interacción entre año y población. En los análisis realizados para cada año tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre poblaciones para ninguno de los años. La variación intra-poblacional para todos los años fue moderada ($h^2_{media} = 0,18$), aunque fue muy variable entre poblaciones y años (Tabla 22).

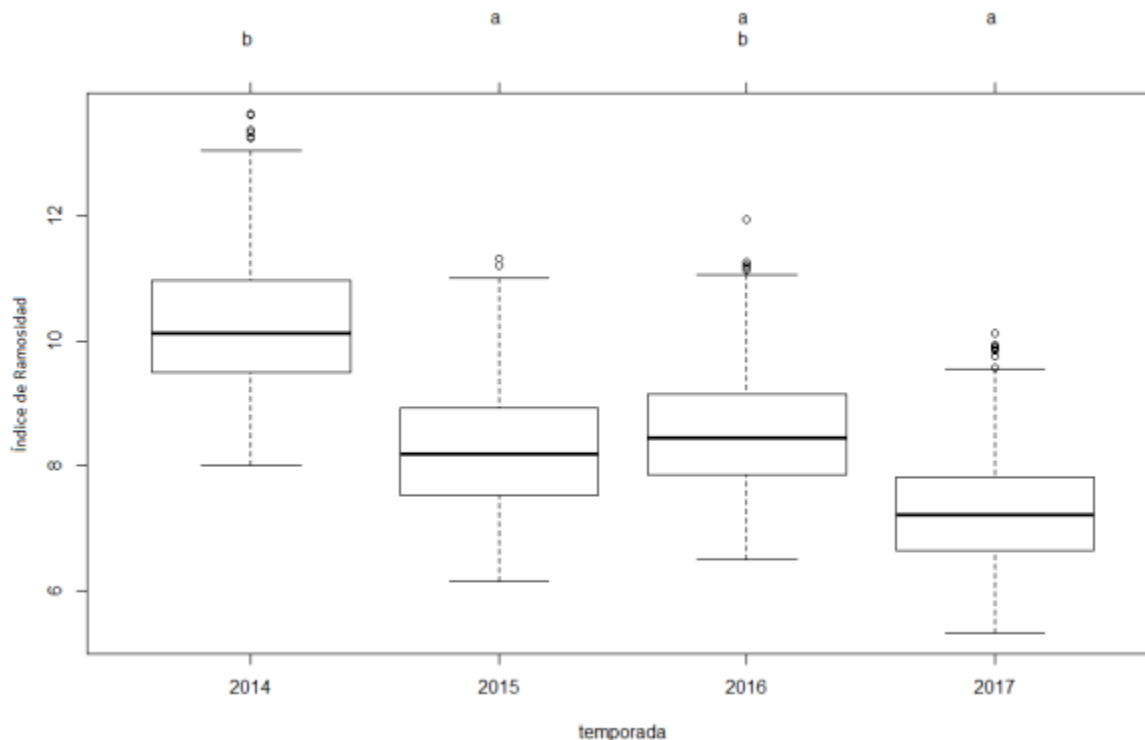


Figura 25. Gráfico extraído de la prueba post hoc de Tukey del modelo realizado para todos los años del Índice de Ramosidad.

Gráfico de cajas con mediana y cuartiles del índice de ramosidad para cada año, letras diferentes indican diferencias significativas.

Tabla 22. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el Índice de Ramosidad (IR) ($cm.r^{-1}$) para los años 2014, 2015, 2016 y 2017 para cada población natural de *N. alpina* incluida en el Ensayo Principal.

Media y su desvío estándar (*de*), heredabilidad (h^2) con su error estándar (*SE*), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A).

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
IR 2014	Media	10,31	10,15	9,89	10,36	10,44	10,83	10,03	9,80	10,23
	(<i>de</i>)	(4,67)	(6,23)	(3,14)	(6,19)	(5,50)	(7,53)	(5,76)	(5,41)	(6,04)
	h^2	0,22	<0,01	0,53	0,01	0,22	0,07	0,10	0	0,14
	SE (h^2)	0,18	0,01	0,31	0,01	0,13	0,03	0,06	0,01	0,09
	σ^2_A	4,92	3,4E-14	5,45	0,55	6,77	3,70	3,38	0	3,09
CV_A	21,50	1,8E-06	23,61	7,14	24,92	17,75	18,32	0	14,15	
IR 2015	Media	8,35	8,41	8,87	8,31	8,05	8,29	7,99	8,12	8,30
	(<i>de</i>)	(1,94)	(1,77)	(2,14)	(2,35)	(1,70)	(1,89)	(1,91)	(1,76)	(1,97)
	h^2	0	0	<0,01	<0,01	0,60	0,25	0,27	0,37	0,19
	SE (h^2)	0,04	0,01	0,04	0,01	0,28	0,09	0,14	0,15	0,10
	σ^2_A	0	0	<0,01	<0,01	1,79	0,90	1,03	1,17	0,61
CV_A	0	0	<0,01	<0,01	16,61	11,44	12,72	13,32	6,76	

IR 2016	Media	8,80	8,43	8,95	8,59	8,55	8,48	8,59	8,37	8,59
	(de)	(2,67)	(2,99)	(2,08)	(2,52)	(2,13)	(2,33)	(2,27)	(2,30)	(2,44)
	h ²	0	0	0,19	0,13	0,14	0	0,44	0,60	0,19
	SE (h ²)	0,05	0,01	0,16	0,05	0,10	0,01	0,21	0,22	0,10
	σ^2_A	0	0	0,84	0,88	0,68	0	2,29	3,31	1,00
CV _A	0	0	10,23	10,90	9,67	0	17,60	21,75	8,77	
IR 2017	Media	7,42	7,47	7,70	7,11	7,26	7,19	7,18	7,13	7,31
	(de)	(1,54)	(1,99)	(1,63)	(1,69)	(1,12)	(1,62)	(1,75)	(1,35)	(1,63)
	h ²	0	0,18	0	0,15	0,39	0	0,71	0,23	0,22
	SE (h ²)	0,06	0,09	0,05	0,06	0,21	0,03	0,30	0,10	0,11
	σ^2_A	0	0,75	0	0,44	0,53	0	2,22	0,42	0,57
CV _A	0	11,58	0	9,33	10,01	6	20,76	9,11	8,29	

El índice de esbeltez (IE) fue disminuyendo a medida que avanzaron los años: en el año 2014 fue de 10,69 cm/mm, mientras que en el 2017 fue de 8,71 cm/mm (Tabla 23). Boquete fue la población que tuvo mayor IE medio (IE_B= 10,10 cm/mm) y Tromen Alto, Tromen Bajo y Tren Tren fueron las poblaciones con menor IE (IE_{TRA}= 9,23 cm/mm; IE_{TRB}= 9,06 cm/mm; IE_{TT}= 9,26 cm/mm). El análisis realizado para todos los años mostró diferencias significativas entre años ($p < 0,001$) y entre poblaciones ($p = 0,002$), pero no mostró una interacción entre ambos factores. En el análisis realizado para cada año se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones, en todos los años, menos en el 2017. Sin embargo la diferenciación entre las poblaciones fue variable entre los años (Q_{ST2014}= 6 %; Q_{ST2015}= 30 % y Q_{ST2016}= 13 %) y el factor familia no fue significativo para ninguno. En todos los modelos donde se encontraron diferencias significativas entre poblaciones, Boquete tuvo un valor de esbeltez significativamente mayor que Tromen Alto y Tromen Bajo. La variación intra-poblacional fue baja para todos los años ($h^2_{media} = 0,11$), y muy baja en el año 2015 en promedio ($h^2_{2015} = 0,06$), aunque varió entre poblaciones y años (Tabla 23), salvo en la población Paimún cuya variación fue moderada para todos los años ($h^2_p = 0,23$).

Tabla 23. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para el Índice de Esbeltez [cm/mm] (IE) para los años 2014, 2015, 2016 y 2017 para cada población natural de *N. alpina* incluida en el Ensayo Principal.

Media y su desvío estándar (*de*), heredabilidad (h^2) con su error estándar (*SE*), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). También se muestra el coeficiente de diferenciación genética aditiva (Q_{ST}) y el resultado de la prueba post hoc de Tukey.

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio	QST
IE 2014	Media	11,68	10,57	10,96	10,68	10,59	10,42	10,30	10,29	10,69	6 %
	(<i>de</i>)	(1,82)	(1,83)	(2,42)	(2,18)	(2,29)	(1,98)	(1,72)	(2,08)	(2,06)	
	h^2	<0,01	0	0,31	0,15	0,00	0	0,05	0,21	0,12	
	SE (h^2)	0,04	0,01	0,21	0,05	0,02	0,07	0,04	0,09	0,07	
	σ^2_A	<0,01	0	1,86	0,71	0,00	1	0,16	0,95	0,56	
	CV_A	<0,01	0	12,46	7,91	0,00	9	3,83	9,45	5,29	
Tukey	b	ab	ab	ab	ab	a	a	a			
IE 2015	Media	9,89	9,47	9,56	9,11	9,46	9,20	8,98	9,33	9,38	30 %
	(<i>de</i>)	(1,37)	(1,34)	(1,40)	(1,37)	(1,53)	(1,48)	(1,39)	(1,48)	(1,44)	
	h^2	0	0,11	0,22	0,08	0	0,07	0	0	0,06	
	SE (h^2)	0,04	0,06	0,16	0,03	0,02	0,03	0,02	0,01	0,05	
	σ^2_A	0	0,19	0,45	0,15	0	0,16	0	0	0,12	
	CV_A	0	4,66	6,99	4,20	0	4	0	0	2,53	
Tukey	b	ab	ab	a	ab	a	a	ab			
IE 2016	Media	9,57	9,00	8,86	8,81	9,18	8,69	8,55	8,77	8,93	13 %
	(<i>de</i>)	(1,05)	(1,03)	(1,54)	(1,19)	(1,28)	(1,24)	(1,26)	(1,22)	(1,24)	
	h^2	0	0,09	0,17	0,62	0	0	0	0,21	0,14	
	SE (h^2)	0,06	0,05	0,15	0,18	0,03	0,01	0,02	0,10	0,07	
	σ^2_A	0	0,10	0,42	0,89	0	0	0	0,32	0,22	
	CV_A	0	3,49	7,31	10,68	0	0	0	6,46	3,49	
Tukey	b	ab	ab	ab	ab	a	a	a			
IE 2017	Media	9,27	8,71	8,77	8,57	8,75	8,61	8,39	8,63	8,71	NC
	(<i>de</i>)	(1,15)	(1,64)	(1,37)	(1,22)	(1,27)	(1,28)	(1,38)	(1,33)	(1,35)	
	h^2	0	0	0,20	0,46	0,05	0,02	0,22	0	0,12	
	SE (h^2)	0,06	0,02	0,16	0,14	0,06	0,02	0,12	0,02	0,07	
	σ^2_A	0	0	0,37	0,69	0,08	0,03	0,43	0	0,20	
	CV_A	0	0	6,96	9,71	3,22	1,89	7,81	0	3,70	
Tukey	a	a	a	a	a	a	a	a			

El GLMM realizado para la persistencia de ramas co-dominantes al año 2017 en el eje principal (bifurcaciones) no mostró diferencias significativas entre las poblaciones y tampoco resultó significativo el factor familia.

Caracteres fenológicos

El momento de apertura de yema apical (DJY3) ocurrió en promedio para todo el ensayo el día juliano (DJ) 287 del 2015 (13 de octubre). La primera población en abrir la yema apical fue Boquete con la primer planta el DJ 265 (23 de septiembre) y en promedio el DJ 282 (08 de octubre) y la última población en abrir la yema apical fue Tromen Alto con

la última planta el DJ 309 (06 de noviembre) y en promedio el DJ 292 (18 de octubre). Los grados día acumulados desde el 01 de julio hasta el 08 de octubre (día en que abrieron en promedio las plantas de la población Boquete) fue de 58,62 °Cd y los grados día acumulados hasta el 18 de octubre (día promedio de apertura en Tromen Alto) fueron 86,59 °Cd, una diferencia de 27,96 °Cd (Tabla 24). El ANOVA realizado mostró diferencias significativas entre las poblaciones ($p < 0,001$), y el test a posteriori diferenció a las poblaciones Boquete, Curruhué y Puerto Arturo de las poblaciones Tromen Alto, Tromen Bajo y Tren Tren (Figura 26). El factor familia resultó significativo y explicó el 16,34 % de la varianza total. La variación intra-poblacional fue alta en promedio en términos de heredabilidad ($h^2_{media} = 0,61$, pero $CV_{A\ medio} = 1,94$; ver Tabla 25) y la diferenciación genética aditiva fue moderada ($Q_{ST} = 14,9\%$).

Tabla 24. Días julianos, fecha y grados días para la apertura de yema apical promedio de cada población de *N. alpina* en el Ensayo Principal.

	Día Juliano	Fecha	Grados Día (°Cd)
B	282	08/10/2015	58,62
C	283	09/10/2015	59,16
P	286	12/10/2015	70,34
PA	284	09/10/2015	59,16
QE	286	12/10/2015	70,35
TRA	292	18/10/2015	86,59
TRB	291	17/10/2015	80,25
TT	291	17/10/2015	80,25

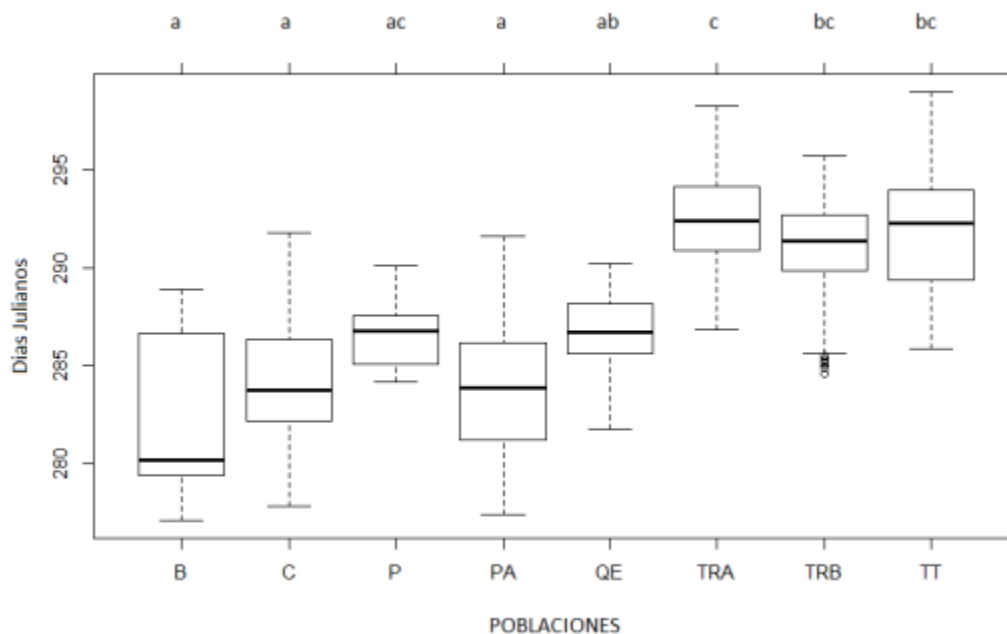


Figura 26. Gráfico de cajas con los predictores de fecha de apertura de yema apical para cada población del Ensayo Principal.

Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey.

Al momento de medir presencia de neoformación en 2016, del total de árboles vivos (718 plantas), 431 exhibieron hojas neoformadas en el ápice del eje principal, conformando el 60,03 % del total. El análisis binomial realizado no mostró diferencias significativas entre las poblaciones y el factor familia no fue significativo. La proporción de individuos con y sin hojas neoformadas por población se muestra en la Figura 27.

En promedio, el día de aparición de neoformación (DJneof), en los individuos que exhibieron hojas neoformadas, sucedió el DJ 335 del año 2015 (30 de noviembre). Las plantas que registraron la fecha de aparición de neoformación más temprana (25 plantas) lo hicieron el DJ 319 (16 de noviembre de 2015) y las que registraron la fecha más tardía (5 plantas) lo hicieron el DJ 382 (18 de enero del 2016). El modelo analizado para el día de aparición de neoformación (DJneof), no mostró diferencias significativas entre poblaciones y tampoco el factor familia fue significativo para este carácter. La variación intra-poblacional de DJneof fue baja en general ($h^2_{media} = 0,10$ y $CV_{Amedia} = 0,93$), aunque muy variable entre las poblaciones (Tabla 25).

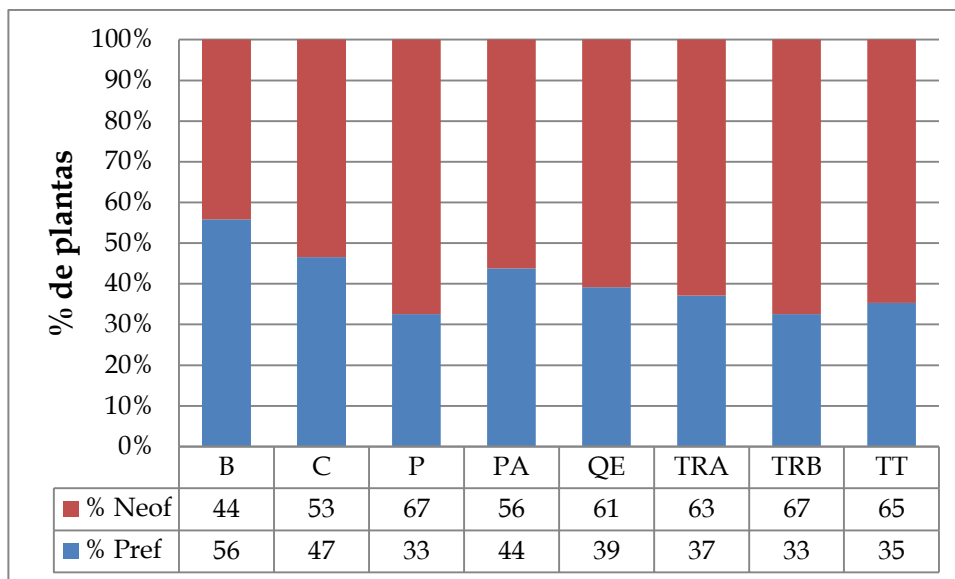


Figura 27. Proporción de individuos de cada población con sólo hojas preformadas (Pref; en rojo) y con hojas preformadas y neoformadas (Neof; en azul).

Las letras debajo de las barras indican la población representada: B: Boquete; C: Curruhué; P: Paimún; PA: Puerto Arturo; QE: Queñi; TRB: Tromen Bajo; TRA: Tromen Alto; TT: Tren Tren. Debajo de las poblaciones se presentan los porcentajes de plantas con neoformación y sin neoformación.

En promedio el inicio de senescencia foliar (DJ10SF) se produjo el DJ 425 (29 de febrero de 2016) y la finalización de senescencia (DJ90SF) se produjo en DJ 474 (18 de abril de 2016) (Tabla 25). Los modelos analizados para la senescencia foliar al 10 % y al 90 % del total de la copa del árbol no mostraron diferencias significativas entre las poblaciones pero sí fue significativo el factor familia en ambos, aunque sólo explicaron el 3,35 % y el 1,06 % de la varianza total respectivamente. Para DJ10SF la variación intra-poblacional según la heredabilidad fue baja en general ($h^2_{media} = 0,13$), pero fue variable entre las poblaciones (Tabla 25). Para DJ90SF la variación genética intra-poblacional fue muy baja en general según la heredabilidad ($h^2_{media} = 0,07$), excepto para Queñi y Tromen Bajo donde fue moderada ($h^2_{QE} = 0,22$ y $h^2_{TRB} = 0,28$).

La duración del follaje verde (DurF) promedio de todas las plantas fue de 185,2 días. El análisis no mostró diferencias significativas entre las poblaciones y el factor familia no resultó significativo. La varianza intra-poblacional fue baja o nula en general (Tabla 25) con un promedio de 0,08 en heredabilidad, aunque hubo dos poblaciones en las que las heredabilidades fueron moderadas: Tromen Bajo y Tren Tren ($h^2_{TRB} = 0,27$; $h^2_{TT} = 0,32$).

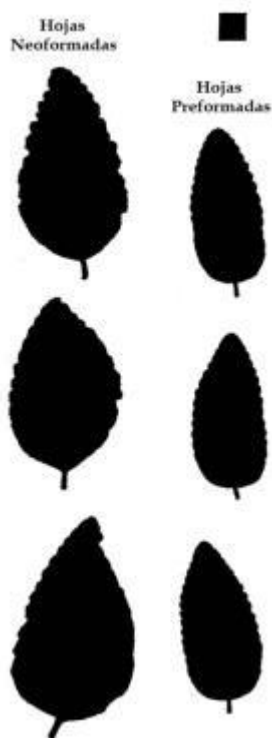
Tabla 25. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para caracteres fenológicos de la temporada de crecimiento 2015-2016 para cada población natural de *N. alpina* incluida en el Ensayo Principal.

Media y su desvío estándar (*de*), heredabilidad (h^2) con su error estándar (*SE*), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). DJY3: días Julianos al momento de apertura de yema; DJneof: días julianos al momento de aparición de neoformación; DJ10SF: días julianos al momento de senescencia del 10% de las hojas; DJ90SF: días julianos al momento de senescencia del 90% de las hojas; DurF: duración del follaje verde [días].

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
DJY3	Media	282,5	283,9	286,7	284,0	286,7	292,3	291,0	291,9	287,4
	(<i>de</i>)	(8,7)	(7,5)	(7,5)	(7,6)	(7,2)	(7,0)	(7,8)	(7,6)	(8,4)
	h^2	1,1	0,8	<0,01	1,0	0,2	0,5	0,4	1,0	0,6
	SE (h^2)	0,6	0,3	0,04	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2
	σ^2_A	92,0	45,4	<0,01	60,1	7,9	22,5	27,6	58,2	39,2
	CV_A	3,4	2,4	<0,01	2,7	1,0	1,6	1,8	2,6	1,9
DJneof	Media	335,2	337,3	336,2	333,6	336,6	334,7	335,5	335,7	335,6
	(<i>de</i>)	(16,4)	(15,6)	(12,9)	(14,4)	(11,9)	(12,8)	(14,4)	(12,9)	(13,7)
	h^2	<0,01	0,13	0	<0,01	0	0,22	0,27	0,18	0,10
	SE (h^2)	0,13	0,08	0,07	0,01	0,04	0,09	0,15	0,09	0,08
	σ^2_A	<0,01	34,14	0	<0,01	0	36,74	56,14	31,14	19,77
	CV_A	<0,01	1,73	0	<0,01	0	1,81	2,23	1,66	0,93
DJ10SF	Media	420,7	426,9	427,9	424,9	423,1	428,5	427,4	428,4	426,0
	(<i>de</i>)	(17,1)	(13,1)	(9,4)	(14,7)	(19,0)	(14,1)	(15,3)	(12,5)	(14,7)
	h^2	0,1	0,2	0	0,1	0,4	<0,01	0,3	0	0,13
	SE (h^2)	0,1	0,1	0,05	0,03	0,2	<0,01	0,1	0,01	0,08
	σ^2_A	22,8	37,0	0	12,1	160,5	<0,01	85,7	0	39,77
	CV_A	8,6	9,8	0	5,8	21,8	<0,01	14,84	0	7,6
DJ90SF	Media	469,3	475,3	472,2	473,7	474,0	476,2	477,2	475,4	474,2
	(<i>de</i>)	(27,9)	(26,8)	(25,0)	(25,3)	(25,2)	(23,6)	(26,2)	(24,1)	(25,3)
	h^2	<0,01	0,1	0	0	0,2	0,01	0,3	<0,01	0,08
	SE (h^2)	0,1	0,0	0,05	0,01	0,1	0,01	0,1	0,01	0,06
	σ^2_A	<0,01	62,0	0	0	143,6	4,8	219,6	<0,01	53,75
	CV_A	<0,01	7,1	0	0	11,0	1,9	13,2	<0,01	4,2
DurF	Media	185,3	188,9	185,6	188,3	186,5	182,0	183,4	181,6	185,2
	(<i>de</i>)	(30,3)	(27,6)	(26,6)	(27,1)	(26,8)	(24,6)	(27,5)	(26,1)	(26,8)
	h^2	0	0,02	0	0	0,02	0	0,27	0,32	0,08
	SE (h^2)	0,05	0,02	0,05	0,01	0,04	0,01	0,14	0,13	0,06
	σ^2_A	0	16,42	0	0	16,36	0	233,98	252,86	64,95
	CV_A	0	2,15	0	0	2,17	0	8,34	8,76	2,68

Caracteres de hojas Preformadas y Neoformadas

En promedio las hojas preformadas tuvieron un área foliar específica (AFE) de 112,53 cm²/g, un área foliar (AF) de 15,55 cm², con una relación entre longitud y ancho (LAN) de



2,29 y una densidad estomática (DE) de 250,0 estomas por mm².

Por otro lado las hojas neoformadas tuvieron un AFE de 112,38 cm²/g, un AF de 21,77 cm², una LAN de 1,81 y una DE de 290,93 estomas por mm².

En la Figura 28 se muestran las hojas preformadas y neoformadas escaneadas de una misma planta. El modelo analizado para todas las plantas que tuvieron los dos tipos de hojas (pre y neoformadas), considerando la interacción entre tipo de hoja (pre o neo) y población, mostró una interacción significativa entre los dos factores para AFE ($p=0,001$), DE ($p=0,03$) y AF ($p<0,001$), mientras que para LAN no fue significativa la interacción (Figura 29). Sin embargo el modelo de la variable LAN sí mostró diferencias significativas en los factores población ($p=0,002$) y tipo de hoja ($p<0,001$).

Figura 28. Hojas escaneadas de un mismo individuo, a la izquierda se muestran hojas neoformadas y a la derecha hojas preformadas.

El cuadrado en la esquina superior derecha representa una superficie de 1 cm².

La variable AFE, cuando se analizó separadamente por tipo de hoja, mostró diferencias significativas entre las poblaciones ($p_{pref}=0,001$; $p_{neof}=0,03$); y cuando se analizó por población, en Boquete y Curruhué no se encontraron diferencias entre tipos de hojas, mientras que para el resto sí ($p_P<0,001$; $p_{PA}<0,001$; $p_{QE}<0,001$; $p_{TRB}<0,001$; $p_{TRA}=0,02$; $p_{TI}=0,009$).

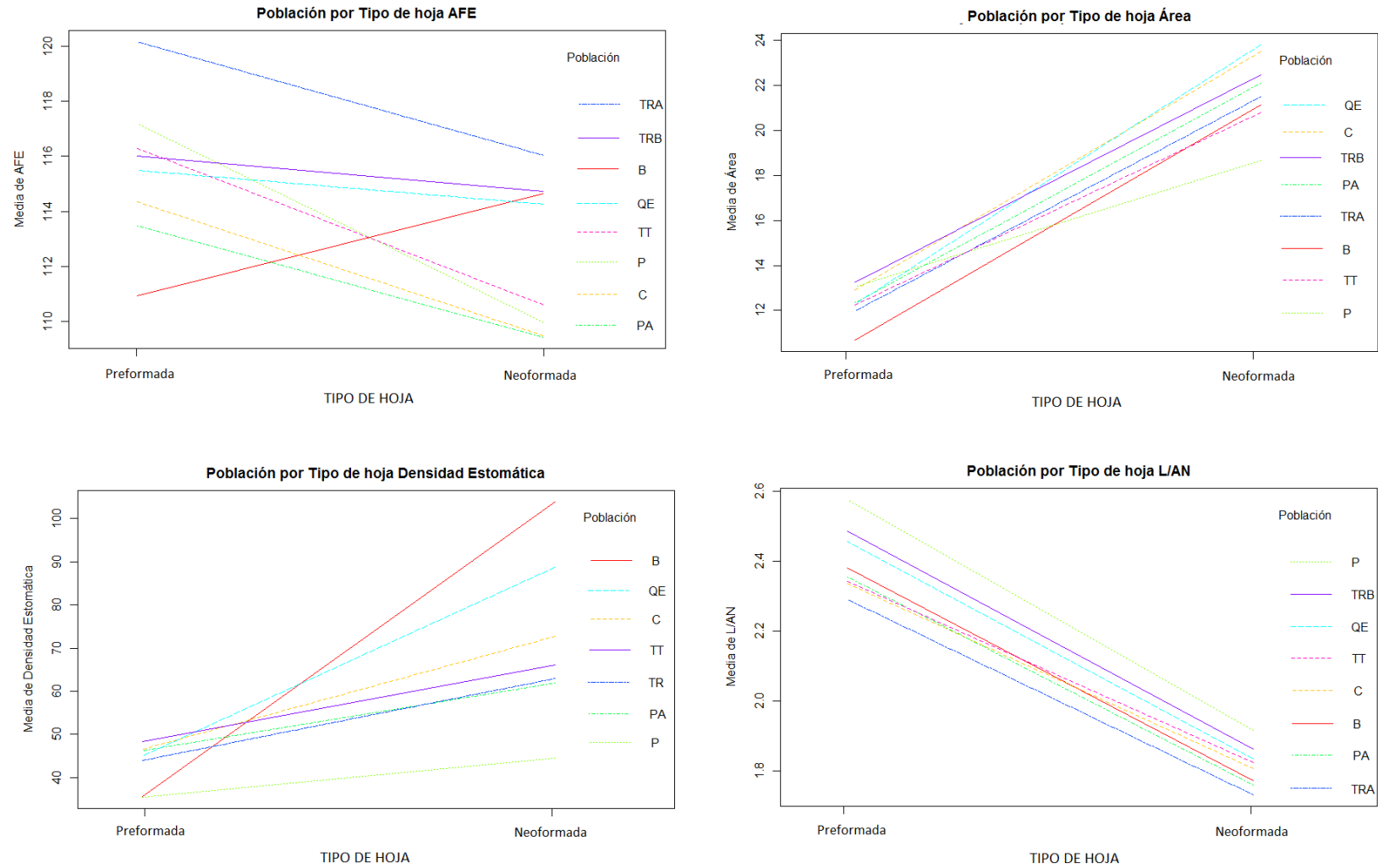


Figura 29. Gráficos de interacción entre tipo de hoja y las poblaciones de *N. alpina* del Ensayo Principal para la media de: área foliar específica (AFE), área foliar (AF), relación longitud/ancho (LAN) y densidad estomática (DE).

La diferenciación genética de AFE entre poblaciones fue muy baja en hojas preformadas ($Q_{STpref} = 7 \%$), diferenciándose sólo Boquete de Tromen Bajo (Tabla 26). Sin embargo se encontró una diferenciación total en hojas neoformadas ($Q_{STneof} = 100 \%$), aunque sólo se probaron diferencias significativas entre Puerto Arturo y Tromen Alto. El factor familia sólo resultó significativo en las hojas preformadas, aunque apenas explicó el 5 % de la variación total. La variación intra-poblacional en promedio fue moderada tanto para hojas preformadas ($CV_{A\ pref-AFE} = 5,63$; $h^2_{pref-AFE} = 0,25$), como para hojas neoformadas ($CV_{A\ neof-AFE} = 5,23$; $h^2_{neof-AFE} = 0,42$) aunque hubo poblaciones con alta heredabilidad (Tabla 26).

Para AF si bien se encontró una interacción significativa entre tipo de hoja y población, siempre fue mayor en hojas neoformadas que en hojas preformadas (Figura 29). Cuando se analizó por cada tipo de hoja, no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones en ninguno de los dos tipos ($p_{pref} = 0,55$ y $p_{neof} = 0,44$); pero cuando se analizó por cada población, se encontraron diferencias entre los tipos de hoja en todas las poblaciones. Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones en ninguno de los tipos de hoja, la diferenciación entre poblaciones no pudo calcularse. Por otro lado, el factor familia no resultó significativo en ninguno de los tipos de hoja y la variación genética intra-poblacional fue baja tanto para hojas preformadas ($CV_{A\ pref-AF} = 6,91$; $h^2_{pref-AF} = 0,17$), como para neoformadas ($CV_{A\ neof-AF} = 4,92$; $h^2_{neof-AF} = 0,12$), aunque fue muy variable entre las poblaciones (Tabla 26).

En la relación entre longitud y ancho de hoja (LAN) se encontraron diferencias significativas tanto para poblaciones como para tipos de hojas ($p_{poblaciones} < 0,001$; $p_{tipos\ de\ hojas} < 0,001$). La diferenciación entre poblaciones fue baja ($Q_{ST} = 6 \%$). El factor familia fue significativo en el modelo de hojas preformadas, aunque sólo explicó el 5 % de la varianza total, y no lo fue en el modelo de hojas neoformadas. La varianza intra-poblacional fue moderada en ambos tipos de hojas ($CV_{A\ pref-LAN} = 6,58$; $h^2_{pref-LAN} = 0,22$ y $CV_{A\ neof-LAN} = 6,89$; $h^2_{neof-LAN} = 0,32$).

Para el carácter DE se encontraron diferencias significativas entre tipos de hojas para todas las poblaciones cuando se realizaron los modelos por cada población, pero no se

encontraron diferencias entre las poblaciones en ninguno de los modelos hechos por tipo de hoja. Por lo tanto no se pudo calcular la diferenciación genética entre las poblaciones. El factor familia sólo fue significativo en hojas preformadas y explicó el 5 % de la varianza total. La variación intra-poblacional fue moderada en los dos tipos de hojas ($CV_{A \text{ pref-DE}} = 7,86$; $h^2_{\text{pref-DE}} = 0,21$ y $CV_{A \text{ neof-DE}} = 16,88$; $h^2_{\text{neof-DE}} = 0,44$).

Tabla 26. Parámetros genéticos y estadísticos calculados para caracteres morfológicos de hoja pre y neoformada para cada una de las poblaciones naturales de *N. alpina* incluidas en el Ensayo Principal.

Media y su desvío estándar (de), heredabilidad (h^2) con su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). AFE: área foliar específica; AF: área foliar; LAN: relación entre longitud y ancho de hoja; DE: densidad estomática. NC: no calculado.

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio	Q _{ST}	
Hojas Preformadas	AFE	Media	106,51	109,78	116,50	110,55	111,45	116,25	114,65	114,57	112,53	
		(de)	(15,15)	(15,67)	(13,99)	(14,17)	(15,38)	(15,46)	(12,27)	(16,58)	(15,29)	
		h^2	0,76	0,06	0,44	0,39	<0,01	0,02	0,03	0,33	0,25	
		SE (h^2)	0,46	0,04	0,33	0,15	0,03	0,02	0,04	0,14	0,15	7%
		σ^2_A	191,29	14,27	91,09	79,75	<0,01	4,94	5,07	93,92	60,04	
		CV_A	12,99	3,44	8,19	8,08	<0,01	1,91	1,96	8	5,63	
	Tukey	a	ab	ab	ab	ab	ab	b	ab			
	AF	Media	17,50	17,41	15,05	15,10	15,36	14,53	14,48	14,96	15,55	
		(de)	(10,55)	(10,96)	(7,10)	(8,94)	(8,14)	(7,31)	(6,60)	(7,74)	(8,55)	
		h^2	0,32	0,21	0,12	0	0,33	0,19	0,17	0	0,17	
		SE (h^2)	0,26	0,10	0,15	0,01	0,19	0,08	0,10	0,02	0,11	NC
		σ^2_A	0,10	0,07	0,03	0	0,09	0,04	0,03	0	0,05	
		CV_A	11,95	9,86	6,90	0	11,53	8,10	6,91	0	6,91	
	Tukey	a	a	a	a	a	a	a	a			
	LAN	Media	2,19	2,21	2,44	2,24	2,31	2,39	2,24	2,28	2,29	
		(de)	(0,37)	(0,34)	(0,44)	(0,36)	(0,38)	(0,32)	(0,35)	(0,31)	(0,35)	
		h^2	0	0,13	0,49	0,27	0,44	0,04	0,09	0,28	0,22	
		SE (h^2)	0,06	0,07	0,36	0,11	0,23	0,02	0,07	0,12	0,13	9%
σ^2_A		0	0,01	0,10	0,03	0,07	0,00	0,01	0,03	0,03		
CV_A		0	5,49	13,17	8,34	11,13	2,87	4,46	7,20	6,58		
Tukey	ab	a	b	ab	ab	b	ab	ab				
DE	Media	241,97	249,06	254,00	252,23	249,13	257,22	255,78	241,36	250,09		
	(de)	(57,30)	(63,72)	(56,34)	(60,19)	(53,46)	(59,95)	(64,01)	(61,70)	(60,42)		
	h^2	0	0,23	0,44	0,52	0	0	0	0,51	0,21		
	SE (h^2)	0,03	0,03	0,07	0,03	0,01	0,00	0,01	0,04	0,03	NC	
	σ^2_A	0	940,82	1427,53	1909,24	0	0	0	1970,08	780,96		
	CV_A	0	12,32	14,88	17,32	0	0	0	18,39	7,86		
Tukey	a	a	a	a	a	a	a	a				

Hojas Neofornadas	AFE	Media	114,63	109,47	109,95	109,43	114,26	116,03	114,73	110,54	112,38		
		(de)	(11,59)	(11,33)	(12,76)	(12,30)	(15,05)	(12,16)	(13,09)	(12,47)	(12,82)		
		h ²	0,61	0	1,57	0	0	0,94	0	0,22	0,42		
		SE (h ²)	0,49	0,05	0,65	0,03	0,07	0,26	0,05	0,11	0,21		100%
		σ ² _A	113,43	0	296,01	0	0	175,04	0	35,01	77,44		
		CV _A	9,29	0	15,65	0	0	11,53	0	5,35	5,23		
	Tukey	ab	ab	ab	a	ab	b	ab	ab				
	AF	Media	21,11	23,50	18,64	22,10	23,79	21,47	22,47	21,03	21,77		
		(de)	(10,37)	(12,17)	(11,08)	(9,83)	(9,63)	(9,90)	(10,94)	(11,46)	(10,68)		
		h ²	0,28	0,21	0,48	0	0	0	0	0	0,12		
		SE (h ²)	0,35	0,14	0,42	0,03	0,07	0,02	0,05	0,03	0,14		NC
		σ ² _A	0,08	0,06	0,33	0	0	0	0	0	0,06		
		CV _A	9,88	8,18	21,27	0	0	0	0	0	4,92		
	Tukey	a	a	a	a	a	a	a	a				
	LAN	Media	1,77	1,81	1,92	1,76	1,83	1,73	1,86	1,83	1,81		
		(de)	(0,19)	(0,27)	(0,30)	(0,26)	(0,25)	(0,23)	(0,27)	(0,24)	(0,26)		
		h ²	0	0,42	1,09	0,41	0	0,39	0,16	0,08	0,32		
		SE (h ²)	0,19	0,22	0,61	0,17	0,07	0,14	0,12	0,06	0,20		NC
σ ² _A		0	0,03	0,11	0,03	0	0,03	0,01	4,51E-03	0,03			
CV _A		0	9,79	17,66	9,61	0	8,98	5,41	3,67	6,89			
Tukey	a	a	a	a	a	a	a	a					
DE	Media	329,48	269,86	283,59	292,34	294,47	310,50	283,83	263,39	290,93			
	(de)	(123,54)	(69,95)	(94,72)	(82,63)	(97,57)	(80,59)	(82,32)	(67,92)	(84,85)			
	h ²	1,66	0,68	0	0,16	0,69	0,19	0	0,16	0,44			
	SE (h ²)	0,32	0,04	0,06	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03	0,07	NC		
	σ ² _A	29661	3415,56	0	1085,44	6797	1277,93	0	7,38E+02	5371,80			
	CV _A	52	21,66	0	11,27	28	11,51	0	10,31	16,88			
Tukey	a	a	a	a	a	a	a	a					

Las correlaciones fenotípicas entre diferentes caracteres de un mismo tipo de hoja fueron en general no significativas excepto la correlación de AF con LAN ($r_P = -0,40$) para las hojas neofornadas y las correlaciones de DE con AF y DE con AFE ($r_P = -0,32$ y $r_P = -0,20$ respectivamente) para hojas preformadas. En cambio las correlaciones entre el mismo carácter entre los dos tipos de hoja fueron todas significativas. La menor correlación se dio para LAN entre los dos tipos de hojas ($r_P = 0,19$) y la mayor se dio para AFE entre los dos tipos de hoja ($r_P = 0,48$). Las correlaciones genéticas entre los caracteres en cada tipo de hoja fueron en general altas, y sólo en las hojas neofornadas DE y AF tuvieron una correlación baja y negativa, y en preformadas LAN con AFE y DE. Las correlaciones entre los caracteres en las hojas preformadas fueron superiores a las mismas correlaciones en las neofornadas, y particularmente la de DE con AFE fue llamativa por ser alta y de signo negativo. Los valores de todas las correlaciones se presentan en la Tabla 27.

Tabla 27. Correlación entre variables morfológicas de los dos tipos de hoja (Preformadas y Neoformadas).

Debajo de la diagonal las correlaciones fenotípicas, arriba de la diagonal correlaciones genéticas. AF=área foliar; LAN=relación entre longitud y ancho de hoja; AFE= área foliar específica; DE=densidad estomática; N= neoformadas; P=preformadas. Los guiones indican correlaciones no analizadas.nc: no se pudo calcular debido a varianza 0 de AFE-N. ns: correlación no significativa.

	AF-N	LAN-N	AFE-N	DE-N	AF-P	LAN-P	AFE-P	DE-P
AF-N	1	3,40 (1,23)	nc	-0,13 (0,12)	-	-	-	-
LAN-N	-0,40 (0,04)	1	nc	1,09 (0,02)	-	-	-	-
AFE-N	ns	ns	1	nc	-	-	-	-
DE-N	ns	ns	ns	1	-	-	-	-
AF-P	0,38 (0,04)	-	-	-	1	6,25 (4,46)	4,63 (2,40)	2,34 (0,52)
LAN-P	-	0,19 (0,04)	-	-	ns	1	-0,05 (0,12)	0,07 (0,12)
AFE-P	-	-	0,48 (0,04)	-	ns	ns	1	-0,71 (0,06)
DE-P	-	-	-	0,34 (0,04)	-0,32 (0,04)	ns	-0,20 (0,04)	1

Caracteres eco-fisiológicos

La tasa fotosintética (TF) media para todas las plantas muestreadas fue de 4,04 mmol CO₂/m²·seg; el valor medio de SPAD fue de 28,62; la conductancia estomática (CE) media fue de 0,038 mol H₂O m⁻² s⁻¹; la tasa de transpiración (TT) media de 0,55 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, y la eficiencia del uso del agua (EUA) media fue de 6,28 mmol CO₂/mol H₂O. En la Tabla 28 también se muestran las medias de cada carácter para cada población.

En el análisis de los modelos probados por cada carácter el factor familia no fue significativo para ninguno de ellos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones en ninguno de los caracteres, excepto en el contenido de clorofila estimado mediante unidades de SPAD donde se diferenciaron las poblaciones Paimún (SPAD_P= 30,70) y Queñi (SPAD_{QE}= 25,69) únicamente, resultando alta la diferenciación genética entre poblaciones (Q_{ST SPAD}= 77 %).

Tabla 28. *Parámetros genéticos y estadísticos calculados para caracteres eco-fisiológicos de cada una de las poblaciones naturales de N. alpina incluidas en el Ensayo Principal.*

Media y su desvío estándar (de), heredabilidad (h²) con su error estándar (SE), varianza genética aditiva (σ^2_A) y coeficiente de variación genética aditiva (CV_A). Tasa fotosintética medida en mmol CO₂/m² seg; contenido de clorofila medido en unidades de SPAD; conductancia estomática medida en mol H₂O m⁻² s⁻¹; tasa de transpiración medida en mmol H₂O m⁻² s⁻¹; eficiencia del uso del agua (EUA) medida en mmol CO₂/mol H₂O.

		B	C	P	PA	QE	TRA	TRB	TT	Promedio
Tasa Fotosintética	Media	2,58	3,17	2,29	3,41	2,62	3,29	3,03	4,04	3,05
	(de)	(1,94)	(2,81)	(2,16)	(4,01)	(2,48)	(3,16)	(2,38)	(3,19)	(2,89)
	h ²	0,18	0,18	0,18	<0,01	0,02	0,30	1,12	0	0,25
	SE (h ²)	0,20	0,15	0,16	0,05	0,06	0,19	0,46	0,05	0,16
	σ^2_A	0,66	1,47	0,85	<0,01	0,11	2,95	7,27	0	1,66
CV _A	31,54	38,28	40,17	<0,01	12,38	52,19	89,06	0	32,95	
SPAD	Media	28,13	28,90	30,70	29,27	25,69	29,07	28,67	28,54	28,62
	(de)	(6,29)	(6,37)	(3,46)	(4,94)	(6,41)	(4,51)	(4,56)	(4,97)	(5,37)
	h ²	0,91	<0,01	0	0	0,16	0,45	0	<0,01	0,19
	SE (h ²)	0,52	0,05	0,06	0,05	0,13	0,27	0,05	0,05	0,15
	σ^2_A	37,87	<0,01	0	0	6,70	9,24	0	<0,01	6,73
CV _A	21,87	<0,01	0	0	10,07	10,46	0	<0,01	5,30	
Conductancia Estomática (log)	Media	-3,7	-3,5	-3,9	-3,5	-3,6	-3,6	-3,6	-3,4	-3,60
	(de)	(0,92)	(0,65)	(0,73)	(0,92)	(0,66)	(0,89)	(0,84)	(0,92)	(0,82)
	h ²	0,10	0,30	0,05	0,16	0	0,11	0,90	0	0,21
	SE (h ²)	0,20	0,2	0,09	0,13	0,05	0,10	0,40	0,05	0,15
	σ^2_A	0,10	0,10	0,03	0,15	0	0,10	0,50	0	0,13
CV _A	8,64	10,7	4	11	0	9,4	19,0	0	7,90	
Tasa de Transpiración	Media	0,52	0,50	0,40	0,63	0,50	0,60	0,50	0,70	0,55
	(de)	(0,33)	(0,41)	(0,39)	(0,66)	(0,45)	(0,53)	(0,34)	(0,51)	(0,47)
	h ²	0,10	0,43	0	0,10	0	0,09	0,83	0	0,19
	SE (h ²)	0,16	0,26	0,06	0,10	0,05	0,09	0,40	0,05	0,15
	σ^2_A	0,14	0,15	0	0,08	0	0,09	0,36	0	0,10
CV _A	70,33	71,93	0	45,19	0	51,64	119,07	0	44,77	
EUA	Media	6,90	5,77	6,92	5,64	5,40	6,73	5,95	6,94	6,28
	(de)	(4,17)	(2,60)	(7,09)	(3,14)	(2,87)	(5,07)	(2,53)	(4,74)	(4,25)
	h ²	0	0	0	0	0,21	0	0,18	0,11	0,06
	SE (h ²)	0,09	0,05	0,06	0,05	0,16	0,05	0,15	0,11	0,09
	σ^2_A	0	0	0	0	0,08	0	0,04	0,04	0,02
CV _A	0	0	0	0	5,09	0	3,19	2,77	1,38	

La variación intra-poblacional para la TF, el SPAD, la CE y la TT fue moderada en todos estos caracteres (Tabla 28), aunque muy variable entre las poblaciones y los caracteres en cada población. Sin embargo la variación intra-poblacional de EUA fue muy baja ($h^2_{EUA} = 0,06$ y $CV_{A\,EUA} = 3,36$).

5.4. DISCUSIÓN

La supervivencia puede considerarse que condensa la expresión de múltiples variables que confluyen en un resultado binario, representando obviamente el carácter de *fitness* por antonomasia. En nuestro caso, la supervivencia a los seis años de implantado el ensayo fue inferior al 50 %. Esta baja supervivencia podría estar asociada a las condiciones ambientales fuera del rango natural de la especie, ya que la altitud del sitio de ensayo es 500 m inferior a la de las poblaciones muestreadas, por lo que puede considerarse un sitio representativo de un escenario de cambio climático severo. En este contexto, todas las poblaciones ensayadas tuvieron supervivencia similar, y no pudieron identificarse familias con un valor diferencial de supervivencia. Debe señalarse sin embargo la consistencia de Tromen Bajo que exhibió los mayores valores de supervivencia acumulada todos los años, así como también la de Puerto Arturo que mostró los mayores valores de mortalidad acumulada todos los años.

De acuerdo con la falta de un efecto familiar en la supervivencia, la heredabilidad resultó baja en todas las poblaciones, excepto Boquete, donde resultó moderada. Estos bajos valores de variación intra-poblacional concuerdan con los encontrados en *Castanea sativa* para la cual tampoco se encontró efecto de familia (Míguez-Soto & Fernández-López 2015), aunque en otras especies se encontraron valores de heredabilidad más altos, llegando hasta 0,77 en *Quercus robur* a los seis años de edad (Bogdan et al. 2017) o hasta 0,84 en *Austrocedrus chilensis* a los 3 años (Aparicio et al. 2012).

La persistencia de hojas senescentes durante el invierno (que no parece ser un carácter que vaya disminuyendo con el tiempo), no mostró diferencias entre las poblaciones pero sí pudo verificarse un efecto familiar, lo que evidencia cierto control genético para este carácter y apoya la hipótesis de poseer valor adaptativo. De hecho, en algunas poblaciones el nivel de variación intra-poblacional, según la heredabilidad detectada, resultó muy alto (en algunos casos incluso mayor al máximo teórico de 1). La función eco- fisiológica del carácter es aún incierta, pero de verificarse la hipótesis de una función de disminución de palatabilidad de las yemas invernales por parte de grandes herbívoros (Svendsen 2001), sería un prometedor carácter de selección teniendo en cuenta la alta presión ganadera sobre los ecosistemas forestales de Patagonia. La nula

diferenciación inter-poblacional encontrada contrasta con la encontrada en *Nothofagus obliqua* por Barbero (2014) para este mismo carácter, donde se encontró diferenciación y un valor de Q_{ST} de 16% y 18% a los 2 y 3 años. Sin embargo la variación intra-poblacional alta en *N. obliqua* ($h^2 = 0,77$ y $0,55$) acompaña a los resultados encontrados en nuestro estudio.

Tanto el índice de esbeltez como el de ramosidad disminuyeron con los años, reflejando un proceso de cambio arquitectural que se desarrolla definiendo un eje dominante robusto. Si bien la ramosidad no mostró diferenciación entre poblaciones, sí lo hizo la esbeltez, llegando a un valor moderado (30%) en 2015. En concordancia, en un análisis arquitectural en plantines de varias poblaciones argentinas de *N. obliqua* se encontraron diferencias entre ellas para IE en el primer año, pero al siguiente estas diferencias se diluyeron (Puntieri et al. 2006). Asimismo, en un estudio posterior, Puntieri et al. (2007b) analizaron la variación entre progenies dentro de una única población en la arquitectura de plantines de un año de edad, encontrando diferencias en la mayoría de los caracteres relevados.

En cuanto a los caracteres fenológicos, tanto las diferencias observadas entre poblaciones, como el efecto familiar probado evidencian el control genético de la apertura de la yema apical y su probable valor adaptativo. Resultados similares se verificaron en estudios con otras especies forestales (Vitasse et al. 2009a; Alberto et al. 2011; Premoli & Mathiasen 2011). La diferencia temporal entre la primera y la última planta en abrir sus yemas apicales fue de 44 días. Medida la diferencia en la suma de calor acumulado entre la media de la población más precoz y la de la población más retrasada, encontramos una divergencia de casi 28 °Cd (en una media para todo el ensayo de 70,6 °Cd). La variación intra-poblacional fue alta en promedio ($h^2_{media} = 0,61$) y en casi todas las poblaciones, salvo Paimún. Asimismo, la diferenciación entre poblaciones resultó moderada en este carácter. Estos valores de variación inter e intra-poblacional concuerdan con numerosos estudios previos, como los realizados en *Quercus robur* y *Quercus petraea* (Jensen 1993; Baliuckas & Pliura 2003), *Acer platanoides*, *Alnus glutinosa* y *Fraxinus excelsior* (Baliuckas et al. 1999; Pliura & Baliuckas 2007) y *Castanea sativa* (Fernandez-Lopez et al. 2005; Míguez-Soto & Fernández-López 2015). La moderada diferenciación genética muestra cierta adaptación local de las poblaciones a las condiciones ambientales de donde provienen, y a la vez la

alta variación intra-poblacional les da la capacidad de adaptarse frente a eventuales cambios ambientales. Desde un punto de vista productivo, la alta heredabilidad revela la posibilidad de seleccionar individuos que broten temprana o tardíamente en la temporada, según la presión selectiva de la ocurrencia de heladas tardías en primavera del sitio de implantación.

Las hojas neoformadas podrían representar un rol ecológico importante en el ciclo anual de los raulíes. Este segundo pulso de foliación anual podría permitir la recuperación de las plantas frente a un evento biótico o abiótico de defoliación precoz, sorteando así un ataque intenso de alguna plaga folívora o un pico de estrés climático. El 60 % de las plantas del ensayo presentaron neoformaciones, lo que revela que la estrategia es extendida pero no absoluta. Por otro lado este carácter no se diferenció entre poblaciones ni mostró variabilidad entre familias. De igual manera, el momento de aparición de la neoformación, no fue diferente entre poblaciones y la variación intra-poblacional fue baja. Por lo tanto, la neoformación parece ser una respuesta plástica y no una respuesta adaptativa.

El momento de senescencia foliar marca el fin del periodo productivo en la temporada de un árbol caducifolio. En el ensayo tanto el inicio como el fin de la senescencia no fueron diferentes entre las poblaciones, concordando con estudios realizados en *Quercus robur* (Baliuckas & Pliura 2003), y aunque sí hubo control genético debido a la familia en ambos caracteres éste fue muy bajo, y acorde a este resultado, la variación intra-poblacional también fue baja o muy baja en general, excepto para fin de senescencia en Queñi y Tromen Bajo que fue moderada. Por lo tanto, ante un cambio climático o un sitio de plantación caracterizado por fuertes heladas tempranas, las poblaciones Queñi y Tromen Bajo tendrían mayor capacidad de adaptación debido a su mayor variación genética en este carácter.

La duración de follaje verde es un carácter que depende de la apertura de yema y la senescencia foliar, por lo tanto podría esperarse que hubiese variado entre las poblaciones o familias. Sin embargo, tanto las poblaciones como las familias dentro de ellas no se diferenciaron en este carácter, demostrando nulo control genético. Asimismo, la varianza intra-poblacional fue baja o nula en general, aunque cabe destacar que en Tromen Bajo y

Tren Tren fue moderada. Este dato en Tromen Bajo particularmente es interesante desde el punto de vista productivo, ya que en lugares con bajos riesgos de heladas, o bajo la expectativa del cambio climático donde se prevén menores eventos de heladas para Patagonia Norte (Centro Inv. Mar & Atm. 2015), podrían seleccionarse individuos con senescencia tardía, que aprovechen los recursos hasta más avanzada la temporada otoñal.

Analizar los distintos tipos ontogenéticos de hojas en un individuo evidencia capacidades y estrategias que los árboles utilizan para sortear los cambios ambientales durante la temporada. Las hojas preformadas y neoformadas fueron diferentes entre sí, comprobando que la neoformación es una respuesta plástica, ya que se trata de un mismo genotipo que produce hojas distintas en distintos momentos de la temporada, los que se caracterizan por condiciones ambientales diferentes. Además se comprobó que esa plasticidad fenotípica está controlada genéticamente, lo que se evidencia en las normas de reacción cruzadas que exhiben las poblaciones para distintos caracteres de las hojas (i.e. AFE, AF, DE, aunque no para LAN). Si bien se encontró interacción entre población y tipo de hoja, siempre las hojas neoformadas tuvieron menor AFE (excepto en Boquete), fueron más grandes y tuvieron mayor cantidad de estomas por unidad de área que las preformadas. Esto podría relacionarse al momento de aparición que tienen estos órganos, puesto que las neoformadas aparecen más tardíamente en la temporada, en momentos de mayor riesgo de sequías y mayor calor. A su vez hojas con menor AFE responden a una estrategia más conservadora, con menores tasas de respiración y de conductancia estomática, pero con estructuras más durables, tal vez otorgando alguna ventaja de protección a las yemas de inminente formación, quizás contra la herbivoría. En este sentido, el aparente sacrificio de productividad de la estrategia conservadora, se ve posiblemente compensado en alguna medida por la mayor densidad estomática que tienen las hojas neoformadas, aumentando la productividad. Boquete resalta sobre el resto de las poblaciones por tener hojas neoformadas con mayor AFE que las preformadas, conservando la cualidad general de mayor DE, incluso mayor que las de todas las otras poblaciones. Podría esperarse entonces que en Boquete la productividad de las hojas neoformadas sea mayor que la de las preformadas. Más allá del caso atípico de Boquete, características morfológicas tan distintas en los tipos de hoja podrían tener consecuencias

en la producción de fotoasimilados (Poorter & Bongers 2006). Esta idea coincide con mediciones fisiológicas de los dos tipos de hojas tanto para *N. alpina* como para *N. obliqua* realizadas por Varela (2010) que plantea que las hojas neoformadas les otorgarían a la planta una ventaja para la aclimatación, quizás debido a poseer un mayor contenido de sustancias de protección contra el exceso de irradiación. La formación de los dos tipos de hojas otorgaría una ventaja adaptativa, siendo las hojas preformadas “menos costosas” las que soportarían las condiciones ambientales menos estresantes de comienzos de la temporada de crecimiento y las hojas neoformadas “más costosas” poseerían la capacidad de aclimatación a las condiciones de estrés hídrico y mayor calor desde mitades y hacia fines de la temporada de crecimiento. Las hojas preformadas producen mayor cantidad de estomas en hojas más finas (correlación negativa entre DE y AFE), esto aumenta la capacidad de captación de dióxido de carbono con un menor costo de producción de hoja. Por otro lado la correlación fenotípica negativa de la densidad estomática con AF junto con la correlación genética alta y positiva entre estas variables en las hojas preformadas muestra una cierta capacidad de cambiar la cantidad de estomas según las condiciones ambientales que se presentan, aunque esta variable tenga una determinante genética que la correlacione con el área de la hoja.

Por último, respecto a los caracteres eco-fisiológicos de hojas preformadas, no pudo probarse su control genético (ni por parte del factor población ni del factor familia). Estos resultados van en contra de otros estudios sobre caracteres eco-fisiológicos (Cheng et al. 2017) donde la variación genética es alta. El único carácter que evidenció alto control genético poblacional fue el contenido de clorofila estimado mediante unidades de SPAD. Volveré sobre este tema en forma más general en la discusión final.

CAPÍTULO 6. Discusión y Conclusiones finales

La estructura de este capítulo se divide en dos secciones, la primera contiene las correlaciones y análisis multivariado de caracteres del Ensayo Principal analizados en los capítulos 4 y 5, y la segunda la discusión general de los resultados de los dos ensayos: el Principal y el Complementario, para terminar con la conclusión a la que he llegado luego de este estudio.

6.1. CORRELACIONES Y ANÁLISIS MULTIVARIADO DEL ENSAYO PRINCIPAL

Correlaciones entre variables medidas

Se consideraron los valores de los caracteres medidos durante la temporada 2015-2016 (la temporada de mayores mediciones): fenológicos [duración de follaje verde (DurF), días julianos a la apertura de yema (DJY3), días julianos al final de senescencia (DJ90SF)] y los parámetros de las curvas de crecimiento estimados a partir de las mediciones de altura repetidas [10 % de crecimiento (t_{10}) y 90 % de crecimiento (t_{90})]. En primer lugar se analizaron correlaciones fenotípicas entre ellos y con Alt y DAC acumulados correspondientes a la misma temporada invernal (2016). Todas estas correlaciones fenotípicas resultaron significativas, excepto t_{10} con DAC, Alt y DJ90SF, y DJY3 con DAC y DJ90SF. En la Tabla 29 se presentan los valores de las correlaciones.

Las variables más correlacionadas fueron DurF y DJ90SF ($r_p = 0,95$), seguidas por Alt y DAC ($r_p = 0,89$). Luego se estimaron correlaciones moderadas entre Alt y DJ90SF ($r_p = 0,51$), entre Alt y DurF ($r_p = 0,50$), entre DAC y DJ90SF ($r_p = 0,44$), entre DAC y DurF ($r_p = 0,42$) y entre DurF y DJY3 ($r_p = -0,34$). El resto de las correlaciones fueron bajas.

Las correlaciones genéticas se analizaron entre los mismos caracteres para los que se analizaron correlaciones fenotípicas, calculándolas según lo explicado en el Capítulo 2. La mayoría de las correlaciones genéticas resultaron ser altas, menos las correlaciones entre DJ90SF con DAC, DJY3 que fueron bajas y por otro lado DJ90SF con t_{10} ; y entre Alt y t_{90} que fueron presumiblemente no significativas. Las correlaciones más altas de signo positivo se encontraron para t_{90} con DurF ($r_A = 3,73$) y DJ90SF ($r_A = 2,37$), seguidas luego por las correlaciones entre Alt y DJ90SF ($r_A = 1,45$), entre Alt y DurF ($r_A = 1,05$) y entre DAC

y DurF ($r_A = 1,23$). Y las más altas de signo negativo fueron entre DJY3 y t_{90} ($r_A = -1,84$); y entre DurF con DJ90SF ($r_A = -1,09$) y t_{10} ($r_A = -1,02$). Todas las correlaciones se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Correlación entre variables fenológicas y morfológicas relevantes medidas en la misma temporada de crecimiento (2015-2016).

Debajo de la diagonal las correlaciones fenotípicas (Pearson), arriba de la diagonal correlaciones genéticas. DurF: duración del follaje verde; Alt: altura; DAC: diámetro a la altura del cuello; DJY3: días julianos a la yema abierta; t_{10} : días al 10 % de crecimiento en altura realizado; DJ90SF: días julianos al fin de la senescencia foliar; t_{90} : días al 90 % de crecimiento en altura realizado.

	DurF	Alt2016	DAC2016	DJY3	t_{10}	DJ90SF	t_{90}
DurF	1	1,05 (0,01)	1,23 (0,06)	-0,94 (0,01)	-1,02 (0,01)	-1,09 (0,02)	3,73 (1,51)
Alt2016	0,50 (0,04)	1	-0,86 (0,04)	-0,66 (0,07)	-0,32 (0,10)	1,45 (0,13)	0,03 (0,12)
DAC2016	0,42 (0,04)	0,89 (0,02)	1	-0,85 (0,03)	-0,98 (0,003)	0,18 (0,11)	0,86 (0,03)
DJY3	-0,34 (0,04)	-0,09 (0,04)	ns	1	0,66 (0,07)	0,22 (0,11)	-1,84 (0,28)
t_{10}	-0,16 (0,04)	ns	ns	0,29 (0,04)	1	0,02 (0,12)	0,89 (0,02)
DJ90SF	0,95 (0,01)	0,51 (0,04)	0,44 (0,04)	ns	ns	1	2,37
t_{90}	0,23 (0,04)	0,21 (0,04)	0,07 (0,04)	-0,01 (0,04)	0,14 (0,04)	0,23 (0,04)	1

Las correlaciones genéticas en algunos casos resultaron superiores a 1, que es el valor teórico máximo posible. Esto podría deberse a: 1) una sobrevaloración de la varianza aditiva de las variables estudiadas como consecuencia de una inadecuada selección del coeficiente de correlación genética (es posible que las relaciones de parentesco entre las plantas sean mayores que las consideradas, y por lo tanto el factor utilizado esté sobredimensionado), o bien a 2) efectos de epistasis o dominancia desconocidos (Lynch & Walsh 1998). En cualquier caso, elegí reportar los valores calculados para no ocultar “resultados incómodos” y además porque reflejan que el verdadero valor de esa correlación será necesariamente muy alto, lo cual es el punto relevante para esta tesis.

Las correlaciones fenotípicas y genéticas de signo contrario, como se explicó en el capítulo 3 se deben a que genéticamente hay una competencia entre los recursos a asignar a ambas variables y por lo tanto si una aumenta, la otra no disminuye, aunque las condiciones ambientales pueden tapar este patrón generando un aumento sincronizado entre las variables. La discusión de todas las correlaciones de esta sección se incluyen en la siguiente.

Análisis Multivariado

Con el fin de visualizar la relación entre los caracteres cuantitativos considerados en el Ensayo Principal y su habilidad para discriminar a las poblaciones, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el paquete “FactoMineR” en el software R 3.3.2 (R Core Team, 2015), con todos los caracteres medidos sobre todo el ensayo tomados como variables activas, y las poblaciones tomadas como variables suplementarias, al igual que se hizo en el Capítulo 3 con el Ensayo Complementario. Los caracteres tomados en cuenta para realizar este análisis fueron: Alt, DAC, índice de esbeltez (IE) e índice de ramosidad (IR) medidos en cada año, las variables fenológicas (DJY3, DJ10SF y DJ90SF), duración del follaje verde (DurF), los parámetros de la curva de crecimiento en DAC en la temporada 2014-2015 y en altura en las dos temporadas (2014-2015 y 2015-2016), y las variables morfológicas foliares sólo de las hojas preformadas. Debido a que el resto de los caracteres sólo se midieron en una muestra de plantas, no se tomaron en cuenta para el análisis. Tampoco se incluyeron aquellos caracteres de naturaleza binomial.

La varianza explicada por los tres primeros planos del análisis fue de 46,70 %. La dimensión 1 explica el 26,70 %, la dimensión 2 el 10,72 % y la dimensión 3 el restante 9,29 %. Las variables que más explican la dimensión 1 (con una correlación mayor a 0,4 con el eje) son: DAC y Alt (en todos los años); t_{90} y t_{50} de altura y S de altura y DAC de las curvas de crecimiento individual de la temporada 2014-2015; DurF y DJ90SF. Y en esta dimensión las poblaciones se dividieron en dos grupos no muy separados entre sí, con Queñi y Curruhué de un lado y el resto de las poblaciones del otro lado de la ordenada. En cambio las variables que más explicaron la dimensión 2 fueron IE de los años 2015, 2016 y 2017; t_{90} , t_{50} y S de la curva de crecimiento en altura de la temporada 2015-2016; y principalmente se separó la población Boquete de todo el resto de las poblaciones en esta dimensión. En la Figura 30 se muestran las variables activas más representativas y la distribución de las variables suplementarias (poblaciones) en el plano de las dimensiones 1 y 2. Las variables que más explican la dimensión 3 fueron: t_{90} y S de la curva de crecimiento en altura de la temporada 2015-2016, y t_{90} y t_{50} de DAC en la temporada 2014-2015. En esta dimensión las poblaciones que más se separaron fueron Tromen Alto, Tromen Bajo y Tren Tren de Paimún, Curruhúe y Boquete. En la Figura 31 se muestran las variables activas más

representativas y la distribución de las variables suplementarias (poblaciones) en el plano de las dimensiones 2 y 3.

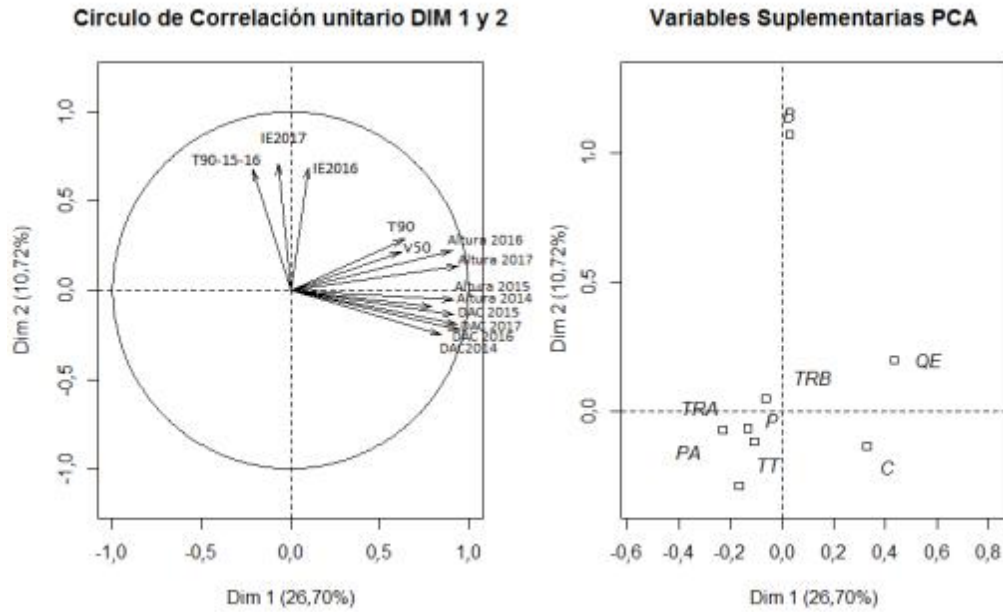


Figura 30. Gráfico de ACP dimensiones 1 y 2 del Ensayo Principal de *N. alpina*. Sobre la izquierda: círculo de correlación unitario de las dimensiones 1 y 2; sobre la derecha: variables suplementarias sobre el 1° plano de componentes principales.

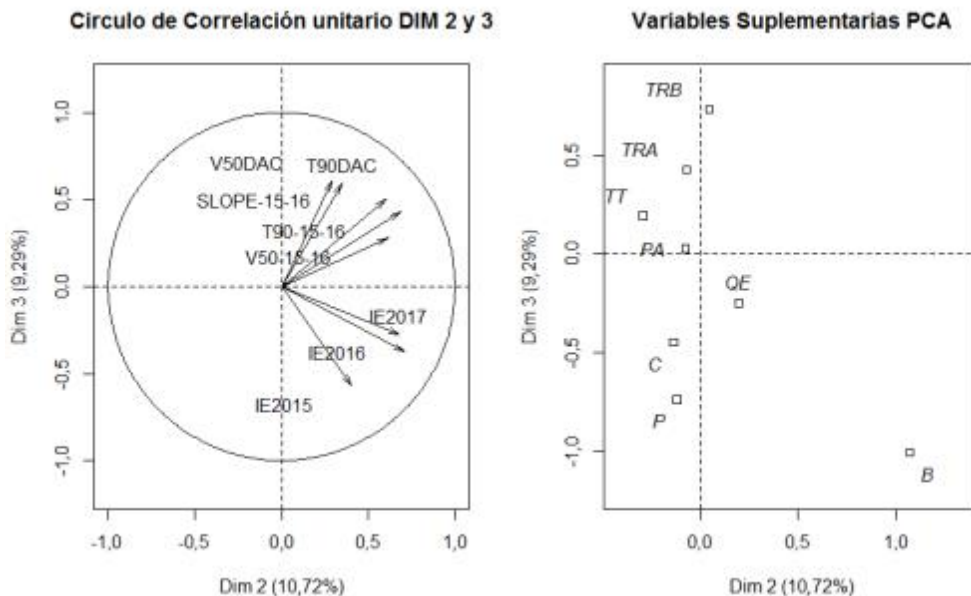


Figura 31. Gráfico de ACP dimensiones 2 y 3 del Ensayo Principal de *N. alpina*. Sobre la izquierda: círculo de correlación unitario de las dimensiones 2 y 3; sobre la derecha: variables suplementarias sobre el 2° plano de componentes principales.

Correlaciones entre variables medidas y variables ambientales del origen de cada población

Se analizaron las correlaciones (Pearson) entre las medias poblacionales de los caracteres medidos y las variables ambientales que caracterizan a los sitios de origen (Tabla 1). Debido a que las variables geográficas de los sitios de origen de las poblaciones, como latitud, longitud y altitud, son aproximaciones de las condiciones ambientales (e.g. la temperatura, la humedad y la radiación solar), y pueden usualmente reflejar patrones adaptativos a condiciones locales (Alberto et al. 2013), se analizaron de igual manera que las variables ambientales para las correlaciones con los distintos caracteres. Sólo algunas de estas correlaciones fueron significativas (8 variables de 53 medidas), y se representan desde la Figura 32 hasta la Figura 42.

Resultaron significativas las correlaciones de los caracteres fenológicos apertura de yema (DJY3), inicio (DJ10SF) y fin (DJ90SF) de senescencia con la altitud ($r = 0,77$; $r = 0,73$ y $r = 0,81$ respectivamente), pero sin embargo no resultó significativa la correlación de la altitud con la duración de follaje verde (DurF). También fueron significativas las

correlaciones entre días julianos de aparición de neoformaciones (DJneo) y la temperatura media de julio ($r = -0,72$), entre la densidad estomática de hojas preformadas (DE_{pref}) y la latitud ($r = 0,81$), y entre la altitud y la forma de la curva de crecimiento en altura 2014-2015 (parámetro S) ($r = -0,83$). La altura al año 2016 se correlacionó significativamente con la longitud planetaria y la temperatura media de enero ($r = -0,84$ y $r = -0,71$ respectivamente), y el DAC al año 2016 con la temperatura media anual, la temperatura media de enero y la temperatura media de julio ($r = -0,8$; $r = -0,78$ y $r = -0,82$ respectivamente). Por otro lado, no se encontró correlación entre ninguna de las variables analizadas y la precipitación media anual de cada población, ni con el índice de aridez. Debe tenerse en cuenta que todas estas correlaciones fueron estimadas con un bajo número de datos (8 pares) correspondientes a las ocho poblaciones incluidas en el ensayo.

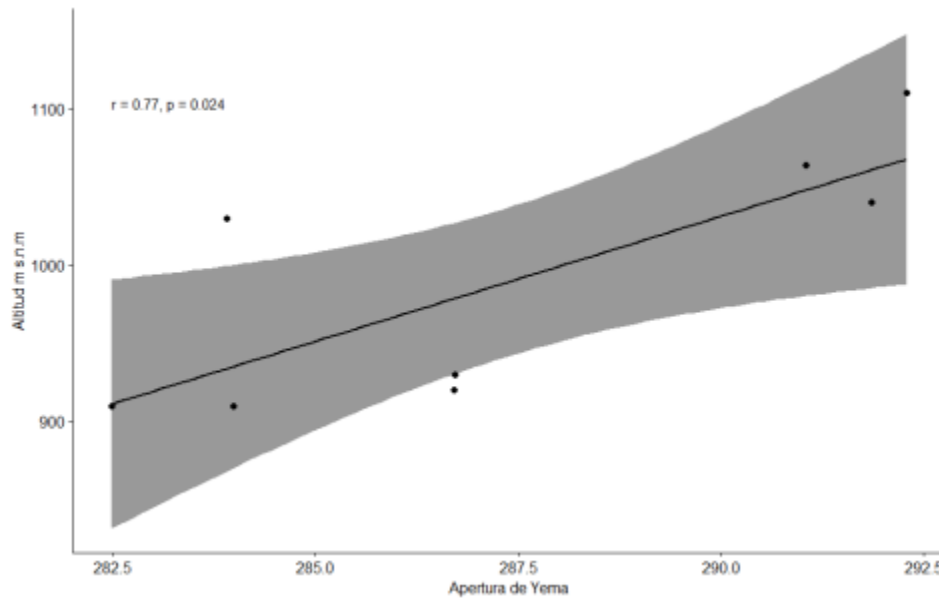


Figura 32. Correlación entre altitud del sitio de origen y la media poblacional de la apertura de yema en días julianos (DJY3).

r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

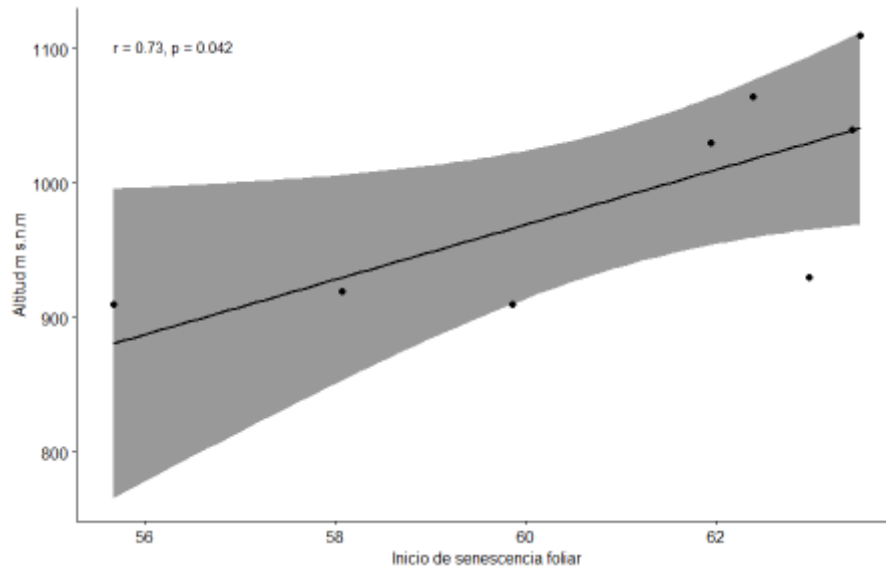


Figura 33. Correlación entre altitud del sitio de origen y la media poblacional del inicio de senescencia foliar (DJ10SF).
r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

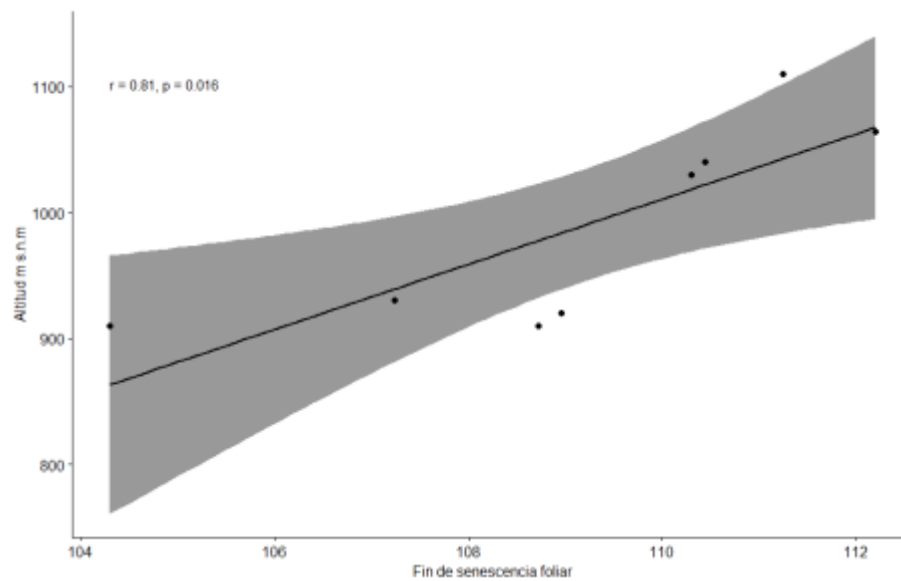


Figura 34. Correlación entre altitud del sitio de origen y la media poblacional del fin de senescencia foliar (DJ90SF).
r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

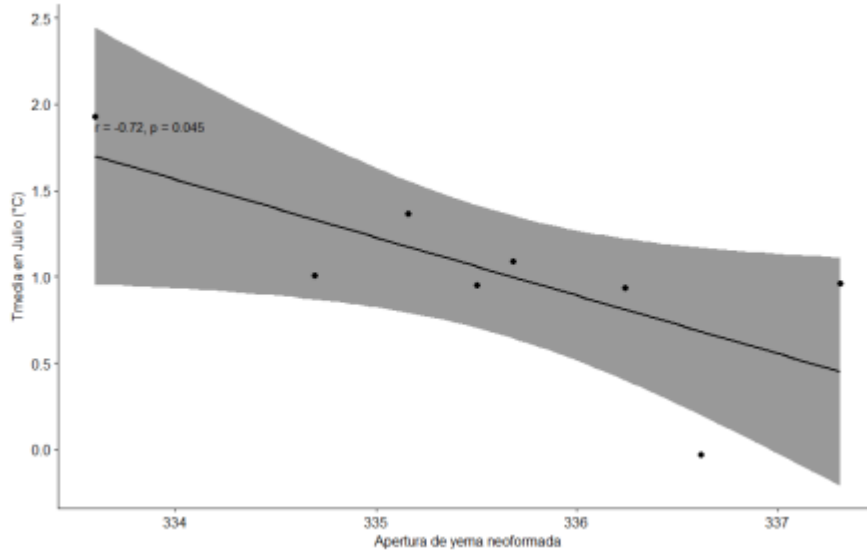


Figura 35. Correlación entre temperatura media en Julio del sitio de origen (°C) y la media poblacional de la apertura de neoformación en días julianos (DJneof).
r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

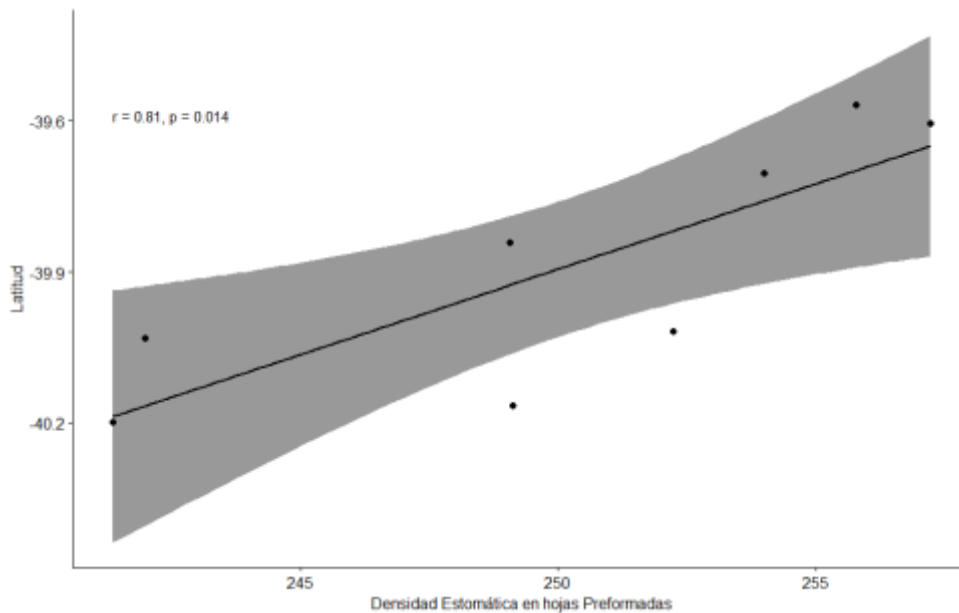


Figura 36. Correlación entre latitud del sitio de origen y la media poblacional de densidad estomática (DE) de hojas preformadas.
r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

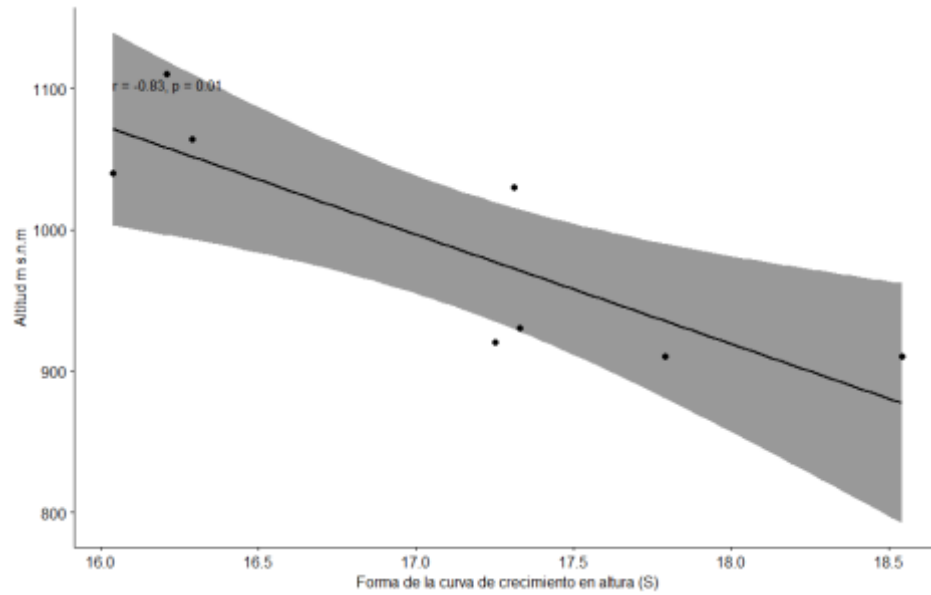


Figura 37. Correlación entre altitud del sitio de origen y la media poblacional de la forma de la curva de crecimiento en altura 2014-2015 (parámetro S).
r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

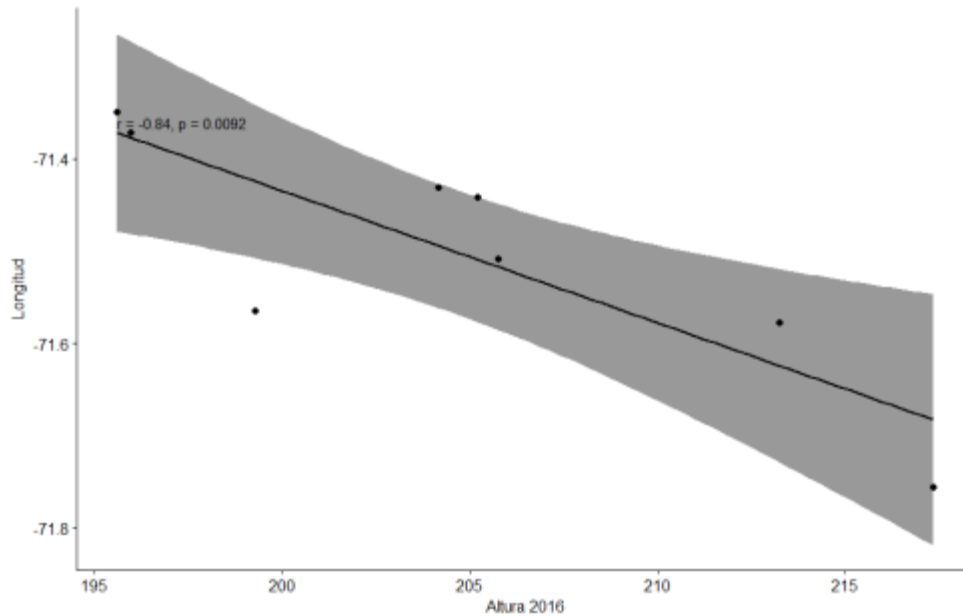


Figura 38. Correlación entre longitud (O) del sitio de origen y la media poblacional de la altura (Alt) de las plantas en 2016.
r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

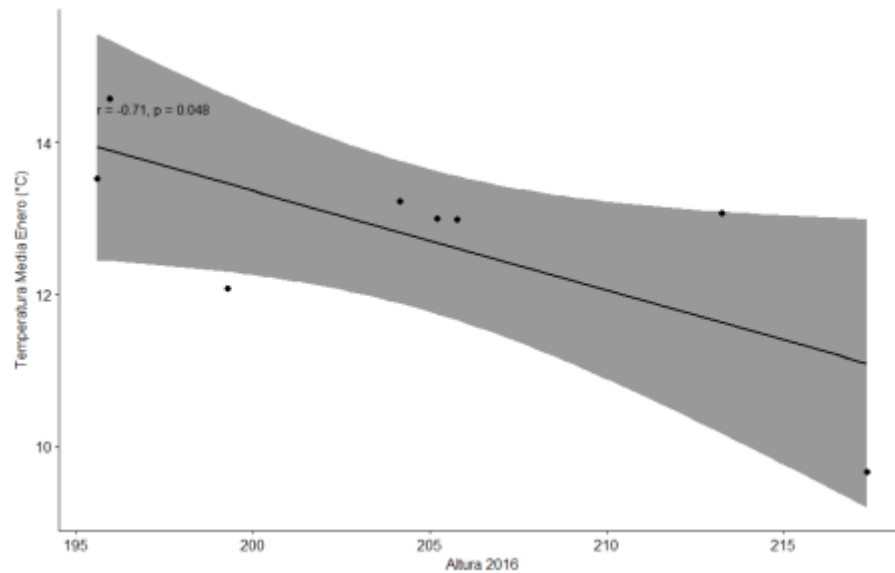


Figura 39. Correlación entre temperatura media de enero del sitio de origen (°C) y la media poblacional de altura (Alt) de las plantas en 2016.

r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

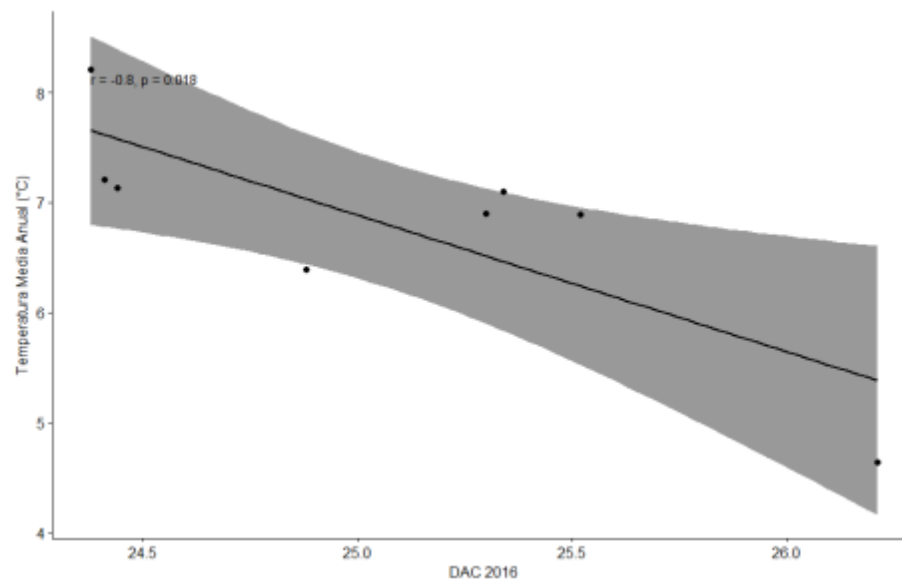


Figura 40. Correlación entre temperatura media anual del sitio de origen (°C) y la media poblacional del diámetro a la altura del cuello (DAC) de las plantas en 2016.

r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

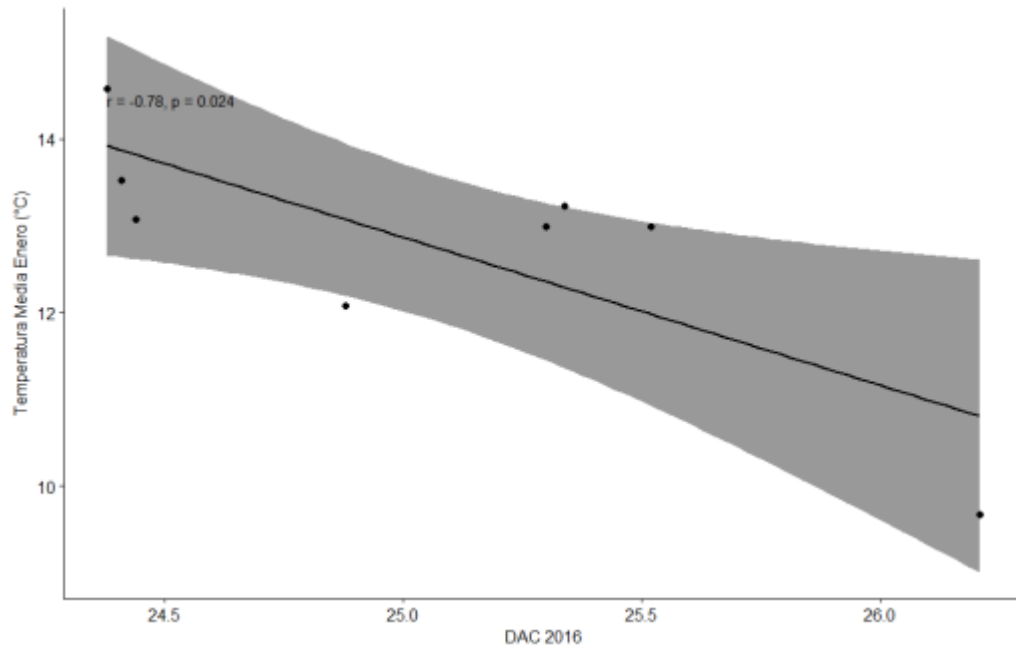


Figura 41. Correlación entre temperatura media en enero del sitio de origen (°C) y la media poblacional del diámetro a la altura del cuello (DAC) de las plantas en 2016.
r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

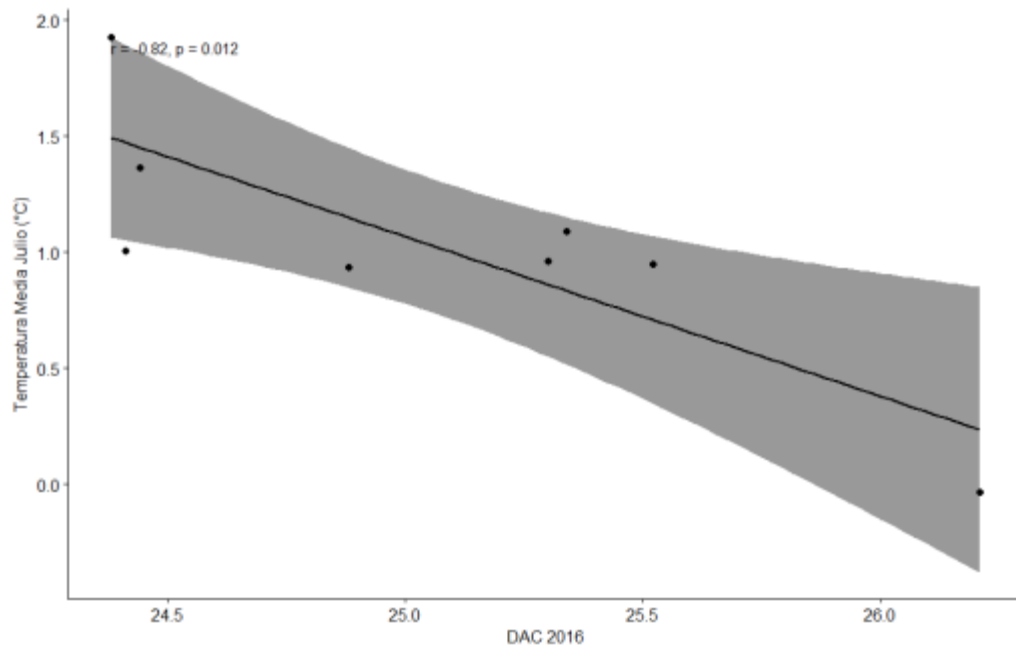


Figura 42. Correlación entre temperatura media en julio del sitio de origen (°C) y la media poblacional del diámetro a la altura del cuello (DAC) de las plantas 2016.
r: coeficiente de Pearson; *p*: valor *p* de significancia; el área gris marca la zona entre los límites de confianza.

6.2. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES

Bajo la expectativa del Cambio Climático global por la cual se prevén aumentos en la temperatura y disminuciones en la precipitación media en la región Patagónica (Centro Inv. Mar & Atm 2015), el estudio de la diversidad genética es esencial para pronosticar la adaptación o no de las especies forestales (Hamrick 2004) ya sea en las poblaciones naturales o en plantaciones forestales. En la mayoría de las poblaciones estudiadas en la presente tesis, la variación genética intra-poblacional fue baja para más de la mitad de los caracteres; para un tercio de ellos fue moderada, y sólo en un diez por ciento de los caracteres la variación fue alta. La verificación de una variación genética intra-poblacional en general baja en *N. alpina* es un resultado central de esta tesis.

Las poblaciones caracterizadas por un nivel relativamente alto de variabilidad genética en la mayoría de los caracteres como Paimún (con un tercio de los caracteres con $h^2 > 0,4$ y un tercio entre 0,1 y 0,4), y en menor medida Tromen Alto y Tren Tren (con un cuarto de los caracteres $h^2 > 0,4$ y un tercio entre 0,1 y 0,4) podrían considerarse con mayor capacidad adaptativa que las poblaciones con menor variabilidad genética intra-poblacional (Kremer et al. 2010). Esto no significa que estas poblaciones estuvieran mejor adaptadas a las condiciones particulares del ambiente en el ensayo a campo durante el período analizado; sino, que estas poblaciones tienen un mayor potencial de adaptación frente a eventuales cambios ambientales, es decir, mayor adaptabilidad.

Según la hipótesis general y la predicción 1) donde sugiero que los caracteres *fitness* muestran varianza genética aditiva alta en relación a la de caracteres morfológicos, basándome en el trabajo realizado por Merilä & Sheldon (1999), se esperaba que la variación genética aditiva de los caracteres *fitness*: caracteres fenológicos, fisiológicos, de tasa y parámetros de crecimiento, y presencia de hojas marcescentes, fuese más alta que la de los caracteres morfológicos: índice de ramosidad (IR), índice de esbeltez (IE) y Alt y DAC acumulado. La variabilidad intra-poblacional en caracteres *fitness* en términos de heredabilidad (h^2 media= 0,17), no fue muy diferente a la de los morfológicos (h^2 media= 0,16). Las heredabilidades más altas en caracteres *fitness* fueron encontradas en DJY3 (h^2 = 0,60), hojas marcescentes (h^2 = 0,50), AFE de hojas neoformadas (h^2 = 0,42) y DE de hojas

neoformadas ($h^2= 0,44$). Por otro lado, el carácter supervivencia que reúne a múltiples caracteres y es el carácter *fitness* por excelencia (Gutschick & Bassirirad 2010), mostró una heredabilidad muy baja en promedio para todas las poblaciones ($h^2= 0,05$), o sea que la mortandad de plantas casi no tuvo relación con el grupo familiar al que pertenecieran sino que todas las familias tuvieron mortalidades indiferenciadas. Esto puede deberse a que este carácter estaría influenciado por múltiples genes, seguramente muchos más que el resto de los caracteres de *fitness* y más aún que los morfológicos. Una arquitectura genética compleja (o sea un carácter gobernado por gran cantidad de genes, alélicos y no alélicos, entre los que pueden establecerse relaciones epistáticas y de dominancia que se suman a las aditivas para definir su valor fenotípico) generaría mayor probabilidad de efectos epistáticos o de dominancia que aportarían en la varianza no aditiva, contribuyendo a la varianza del error. A su vez una gran cantidad de genes generaría mayor influencia del ambiente, aumentando también de esta manera la varianza del error (Merilä & Sheldon 1999; Hoffmann et al. 2016). Por otro lado en los caracteres de *fitness* cuya heredabilidad fue alta, la varianza genética aditiva estaría cumpliendo un rol clave en el incremento de la heredabilidad, debido a que la varianza del error en muchos casos fue menor a la aditiva.

La baja variación genética intra-poblacional general observada mediante heredabilidad en base a caracteres cuantitativos no concuerda con los resultados encontrados con marcadores genéticos, con los que se reportó una variación genética relativamente alta al considerar la restringida distribución de la especie en Argentina (Marchelli & Gallo 2004). Una selección continua en la misma dirección podría ser la causa de esta aparente discordancia, la cual habría impactado sobre los caracteres cuantitativos y no sobre los marcadores genéticos que son selectivamente neutros y están más relacionados a procesos de deriva genética y flujo génico (Lande 1988; McKay & Latta 2002; Whitlock 2008; Leinonen et al. 2013).

En cuanto a la diferenciación inter-poblacional, según la primera parte de la predicción 2) donde planteé que la diferenciación cuantitativa estimada con los caracteres *fitness* sería más alta que la de los caracteres morfológicos, esperaba que el Q_{ST} de los caracteres fenológicos, fisiológicos y de crecimiento fuese más alto que el de índice de ramosidad (IR), índice de esbeltez (IE) o Alt y DAC acumulado. Sin embargo de los 50

caracteres de *fitness* considerados, en más del 80 % de ellos la diferenciación fue nula, y sólo se encontró diferenciación en nueve caracteres, que en promedio exhibieron un Q_{ST} de 39 %. Paralelamente, de los 23 caracteres morfológicos analizados, en casi la mitad de ellos (10) se encontró diferenciación, promediando un Q_{ST} de 26 %, no muy distinto al de los caracteres *fitness*. Por lo que la hipótesis original no puede ser confirmada, estos resultados sugieren que las poblaciones argentinas de *N. alpina* estarían, para la generalidad de los caracteres cuantitativos, sometidos a una continua selección estabilizadora hacia el mismo óptimo en toda la región. Alternativamente un flujo génico extendido entre todas las poblaciones también evitaría su diferenciación, pero no parece ser el caso de esta especie según los resultados de estudios previos que señalan un flujo génico restringido (la polinización efectiva tiene un alcance medio menor a 35 m, y sólo supera los 250 m con una frecuencia del 0,5 %: Marchelli & Gallo 2004; Marchelli et al. 2012) y sería de carácter unidireccional definido por los vientos preponderantes del oeste, aunque esto último no está totalmente comprobado.

Las estimaciones de Q_{ST} y heredabilidad en el Ensayo Principal en general fueron menores a las estimaciones realizadas en el Ensayo Complementario, incluso para los mismos caracteres, lo que podría interpretarse como un menor control genético para los caracteres a mayores edades. Sin embargo, es necesario señalar que los caracteres cuantitativos medidos en vivero, en general presentan mayor heredabilidad que los mismos caracteres relevados en el campo, debido a la menor variación ambiental propia de un ambiente de ensayo con mayor control (Zobel et al. 1984). Esta aparente incongruencia es por lo tanto un resultado habitual que sólo responde a un mayor poder discriminante de los ensayos con mayor control ambiental. Debemos recordar que los parámetros de genética cuantitativa como la heredabilidad caracterizan a las poblaciones ensayadas pero también a los ensayos.

Más allá de los resultados generales, es necesario detenerse en algunos casos particulares. En una revisión realizada por Howe et al. (2003) se encontró que los caracteres fenológicos en árboles forestales provenientes de poblaciones naturales tienen heredabilidades de moderadas a altas y en varios casos son los caracteres con mayores heredabilidades calculadas. Esto únicamente se corroboró en nuestro estudio con DJY3

donde la heredabilidad fue de 0,60, siendo la heredabilidad media encontrada más alta en todo el ensayo (aunque en valores absolutos por población fue superada por otros caracteres no fenológicos). Es llamativo en este carácter (DJY3) que la única población que tuvo baja heredabilidad fue Paimún, la población que mostró la mayor cantidad de caracteres con alta heredabilidad. Particularmente en dicha población podría haber una selección estabilizadora posiblemente de ocurrencia de heladas, hacia un momento de apertura de yema óptimo, para evitar heladas tardías y a la vez ampliar la duración de follaje verde para la producción de fotoasimilados.

La alta heredabilidad encontrada en presencia de hojas marcescentes sugiere un alto valor adaptativo en este carácter, quizás debido a la protección contra herbívoros mayores (Svendsen 2001). Si se comprobara este efecto, sería interesante seleccionar familias con mayor persistencia invernal de hojas para la implantación en zonas con mayor presión de herbivoría. También es relevante mencionar la heredabilidad moderada de Puerto Arturo y Paimún en dos caracteres arquitecturales sumamente importantes para la producción forestal como el índice de esbeltez ($h^2_{PA} = 0,33$; $h^2_P = 0,22$) y el índice de ramosidad ($h^2_P = 0,24$), que hace posible la selección de familias mejor calificadas para plantación con fines comerciales. Por otro lado, el carácter bifurcación temprana no evidenció control genético de ningún tipo, por lo que no tendría sentido seleccionar individuos por este carácter.

También pueden señalarse particularidades respecto a la diferenciación entre poblaciones. En este sentido se destaca la alta diferenciación estimada en cuatro de los caracteres *fitness*: área foliar específica (AFE) de hojas neoformadas ($Q_{ST} = 100$ %) y el proxy de la concentración de clorofila (SPAD; $Q_{ST} = 77$ %) en el Ensayo Principal; longitud de raíz específica (LRE; $Q_{ST} = 63$ %) y relación entre biomasa de raíz y biomasa aérea (RA; $Q_{ST} = 43$ %) en el Ensayo Complementario. También amerita considerar detenidamente la diferenciación moderada en otros cuatro caracteres: inicio de crecimiento (t_{10}) en altura en las dos temporadas medidas 2014-2015 y 2015-2016 ($Q_{ST} = 15$ % y 16 % respectivamente), momento de mitad de crecimiento (t_{50}) en altura en la temporada 2015-2016 ($Q_{ST} = 23$ %), y momento de apertura de yema (DJY3; $Q_{ST} = 15$ %).

Los dos caracteres para los cuales se calculó la mayor diferenciación (el AFE de hojas neoformadas y la concentración de clorofila) están directamente relacionados a la

producción de fotoasimilados y desarrollo de la planta (Marron et al. 2007; Dillen et al. 2010; Guha & Reddy 2013). Sin subestimar el hecho de que estos dos caracteres habrían seguido caminos de adaptación divergentes en las distintas poblaciones, es preciso señalar que la elevada diferenciación estimada parece deberse a la baja variación intra-poblacional que exhibieron, provocando que la mayor parte (o toda) de la baja variación de estos caracteres se explique por la diferencia inter-poblacional. Por otro lado, resulta notable que la diferenciación del AFE de hojas preformadas ($Q_{ST} = 7\%$) fuera mucho menor que la de las neoformadas ($Q_{ST} = 100\%$). Este resultado estaría mostrando la gran diferencia entre estos dos caracteres en cuanto a la variación intra-poblacional que poseen: mientras en AFE de neoformadas toda la variación se concentró entre las poblaciones, en preformadas existe una mayor variación intra-poblacional que la existente entre poblaciones.

También en algunos caracteres “morfológicos”, en principio débilmente relacionados a *fitness*, como el IE en los años 2014 al 2016, y Alt en 2017 en el Ensayo Principal; y la altura, DAC, longitud de raíz (LR), biomasa del tallo (B_t) y biomasa de raíz (B_r) en el Ensayo Complementario, se encontró diferenciación entre las poblaciones. Esto podría sugerir adaptación a las condiciones ambientales de cada población. En cualquier caso, desde el punto de vista productivo, la diferenciación estimada vuelve recomendable la selección de poblaciones para cada sitio de implantación, atendiendo a los caracteres más relevantes según las limitantes del sitio. De este modo podríamos esperar que Tromen Alto, que tuvo mayor IE, Br, LR y a su vez menor Alt, DAC, B_t y Alt_{2017} , podría ser una población potencialmente apropiada para sitios relativamente secos y de baja competencia por luz. Mientras que Boquete, que tuvo menor Br, LR y a su vez mayor Alt, DAC, B_t y Alt_{2017} sería una población indicada para establecer bajo dosel y en lugares con menor presión de estrés por sequía.

Merilä & Crnokrak (2001) y McKay & Latta (2002) revisaron datos disponibles para la comparación entre la diferenciación de poblaciones a través de marcadores genéticos y de caracteres cuantitativos. Estas dos revisiones coinciden en que los niveles de diferenciación genética para los rasgos cuantitativos (es decir Q_{ST}) son generalmente más altos que los observados para los marcadores genéticos. A la luz de estos antecedentes elaboré la predicción 2) por la que esperaba que la diferenciación cuantitativa (Q_{ST})

estimada con los caracteres *fitness*, sería mayor que la estimada con marcadores moleculares (F_{ST}). Esto se verificó sólo en una pequeña cantidad de caracteres, para los que pudo calcularse el Q_{ST} (en la gran mayoría de los caracteres no se encontraron diferencias entre poblaciones). En ocho de los 50 caracteres analizados los Q_{ST} fueron mucho mayores que los F_{ST} publicados (de 5 a 6 %; Marchelli & Gallo 2001; Azpilicueta et al. 2013): AFE (100 %), SPAD (77 %), LRE (63 %), RA (43 %), $t_{50\text{Alt } 2015-2016}$ (23 %), $t_{10\text{Alt } 2015-2016}$ (16 %), $t_{10\text{Alt } 2014-2015}$ (15%), DJY3 (15 %).

Por otro lado en una revisión realizada para varias especies de árboles forestales por Howe et al. (2003), se encontró que los Q_{ST} en caracteres de inicio y cese de crecimiento varían ampliamente entre las especies, pero en general el Q_{ST} es mayor al F_{ST} , sugiriendo adaptación en estos caracteres. Esto se ve reflejado en nuestro estudio, ya que la diferenciación en caracteres fenológicos de inicio de crecimiento (DJY3 y t_{10}) fue moderada y mayor al F_{ST} . Sin embargo no ocurrió lo mismo con el cese de crecimiento (t_{90}), para el cual el Q_{ST} fue estimado a 0 % (excepto en $t_{90\text{Alt}}$ en la temporada 2015-2016, $Q_{ST}= 9\%$), o sea que toda la variación en este carácter se concentra dentro de las poblaciones.

En los dos ensayos se encontraron diferentes patrones de diferenciación entre las poblaciones: mientras que en el Ensayo Complementario hubo una clara diferenciación de Tromen, concordando con los trabajos realizados en ADN de cloroplasto (Marchelli et al. 1998) y marcadores nucleares (Azpilicueta et al. 2013), en el Ensayo Principal la población que más se diferenció fue Boquete; y Tromen Alto y Bajo casi no se diferenciaron de Tren Tren. Este patrón no puede explicarse por procesos demostocásticos relacionados con la conformación de distintos refugios glaciarios, debido a que Boquete habría compartido refugio glaciario con todas las poblaciones excepto Tromen según lo encontrado por Marchelli et al. (1998), mientras que Tromen Alto y Tromen Bajo se han reportado en una zona genética separada de la de Tren Tren (Azpilicueta et al. 2013). Sin embargo, Kremer et al. (2002) demostraron para especies de roble europeo que los patrones de variación en los rasgos fenotípicos no están estrechamente asociados con los patrones de variación del DNA de cloroplasto. En cambio, es habitual que poblaciones contemporáneas resultantes de diferentes refugios glaciales tengan adaptaciones similares, debido a las condiciones ambientales de los sitios geográficos actuales. Hay una interpretación posible que estos

autores presentan y que se podría aplicar en nuestro caso: los refugios podrían haber mantenido una diversidad genética suficiente para permitir que las poblaciones recién establecidas se adaptaran a las condiciones ambientales locales después de la expansión posglacial.

El carácter fenológico apertura de yema (DJY3) siguió una clara y fuerte tendencia altitudinal demostrada por la alta correlación encontrada, y en concordancia con su alta adaptabilidad según su heredabilidad estimada. Así, las poblaciones de alta altitud (TRA, TRB y TT) tuvieron una apertura de yema apical posterior a la de las poblaciones de baja altitud (B y PA). Sin embargo debe mencionarse que Curruhué, con alta altitud, mostró un patrón opuesto con apertura de yema temprana. Esta distinción coincide con una gran diversidad genética dentro de la población ($h^2= 0,80$). Como ya lo sugirieron Vitasse et al. (2009a) y Alberto et al. (2011), la apertura tardía de las yemas de las poblaciones de mayor altitud podría ser el resultado de una adaptación con el fin de evitar los daños causados en las hojas por las heladas tardías de primavera, que se producen con mayor frecuencia en altitudes elevadas. Este carácter estaría regulado por los grados día necesarios para la apertura de la yema, inducidos por la altitud en el sitio de origen de la población. Sin embargo, en el caso de Curruhué se puede especular que podría haber otro factor microambiental que actúe desacoplando la ocurrencia de heladas tardías de la altitud del sitio (e.g. el efecto amortiguador de temperaturas por efecto de la cercanía al lago Curruhué), y eso explicaría el menor requerimiento de grados día para la apertura de yemas en esta población. Alternativamente podría ocurrir que el carácter distintivo de Curruhué se deba a pertenecer a una zona genética distinta de la de Tromen y coincidente con la de Boquete (Marchelli et al. 1998; Azpilicueta et al. 2013).

Teniendo en cuenta específicamente el carácter fenológico de apertura de yemas, resulta recomendable para la implantación de la especie en sitios altos (o sea con ocurrencia de heladas tardías), la selección de las poblaciones con mayor DJY3, y dentro de ellas, aprovechando la alta variación intra-poblacional que algunas exhiben, seleccionar los genotipos más tardíos. En cambio, si los sitios de implantación no sufren esta limitante, resulta más conveniente atender a otros caracteres de relevancia productiva como la duración del ciclo vegetativo anual (DurF) positivamente correlacionado con altura y

diámetro.

Para concluir, vuelvo sobre las implicancias de las predicciones originales:

- a) el cultivo de *N. alpina* requiere la selección de acervos genéticos adaptados a cada condición de sitio debido a su diferenciación.

El patrón de diferenciación general encontrado para esta especie es bajo. Sin embargo resaltan varios caracteres importantes para la producción donde la diferenciación encontrada es relevante para la adaptabilidad y productividad de los árboles. Para la implantación en ambientes fríos se destaca el momento de apertura de yemas y el inicio de crecimiento en altura (Howe et al. 2003), para lo que deberían seleccionarse las poblaciones Tromen Alto, Tromen Bajo y Tren Tren. Para la implantación en ambientes con estrés hídrico debería considerarse la longitud de raíz específica y la relación entre biomasa de raíz y biomasa aérea (Padilla & Pugnaire 2007; Grossnickle 2012; Matías et al. 2014; Ledo et al. 2018), y en base a estos caracteres debería seleccionarse la población Tromen Alto.

- b) el cambio climático global puede provocar extinciones locales de la especie en las poblaciones donde las fuerzas selectivas superen a la capacidad adaptativa definida por la cantidad de variación intra-poblacional.

Se comprobó en general baja variación genética intra-poblacional en la mayoría de las poblaciones para más de la mitad de los caracteres. Así, se podría esperar que algunas de las poblaciones transiten su camino hacia la extinción provocada por el aumento de la rigurosidad climática fruto del CC, coincidente con lo esperado por Marchelli et al. (2017). Resta ponderar el rol que podría cumplir la plasticidad fenotípica, lo que debería ser materia de futuros estudios específicos. Dependiendo de los factores climáticos que se agudicen, algunas poblaciones con variación genética intra-poblacional más alta, podrían sobrellevar la presión selectiva con una respuesta adaptativa. Paimún, y en segundo lugar Tromen Alto y Tren Tren, están dentro de las más promisorias para este tipo de respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, et al (2008) Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evol Appl* 1:95–111.
- Alberto F, Aitken SN, Alía R, et al (2013) Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Glob Chang Biol* 19:1645–1661.
- Alberto F, Bouffier L, Louvet JM, et al (2011) Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *J Evol Biol* 24:1442–1454.
- Alexander L V, Zhang X, Peterson TC, et al (2006) Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *J Geophys Res Atmos* 111:D5.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, et al (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For Ecol Manage* 259:660–684.
- Aparicio AG, Pastorino MJ, Gallo LA (2010) Genetic variation of early height growth traits at the xeric limits of *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae). *Austral Ecol* 35:825–836.
- Aparicio AG, Zuki S, Pastorino M, et al (2012) Heritable variation in the survival of seedlings from Patagonian cypress marginal xeric populations coping with drought and extreme cold. *Tree Genet Genomes* 8:801–810.
- Azpilicueta MM, Gallo LA, van Zonneveld M, et al (2013) Management of *Nothofagus* genetic resources: Definition of genetic zones based on a combination of nuclear and chloroplast marker data. *For Ecol Manage* 302:414–424.
- Azpilicueta MM, Marchelli P, Gallo LA (2009) The effects of Quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genet Genomes* 5:561–571.
- Azpilicueta MM, Marchelli P, Gallo LA, et al (2016) Zonas Genéticas de Raulí y Roble Pellín en Argentina, herramientas para la conservación y el manejo de la diversidad genética., INTA. San Carlos de Bariloche
- Baayen RH, Davidson DJ, Bates DM (2008) Mixed-effects modeling with crossed random effects for subjects and items. *J Mem Lang* 59:390–412.
- Bailey JK, Schweitzer JA, Ubeda F, et al (2009) From genes to ecosystems: a synthesis of the effects of plant genetic factors across levels of organization. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:1607–1616.
- Baliuckas V (2000). Eco-genetic variation of the Lithuanian *Quercus robur* L. populations and families and its consequences on gene conservation. In The annual issue of SNS meeting, held

BIBLIOGRAFÍA

in Lithuania on (pp. 6-8).

- Baliuckas V, Ekberg I, Eriksson G, Norell L (1999) Genetic variation among and within populations of four Swedish hardwood species assessed in a nursery trial. *Silvae Genet* 48:17–25
- Baliuckas V, Lagerström T, Eriksson G (2001) Within-population variation in juvenile growth rhythm and growth in *Quercus Robur* L. and *Fagus Sylvatica* L. *For Genet* 8:259–269
- Baliuckas V, Pliura A (2003) Genetic variation and phenotypic plasticity of *Quercus robur* populations and open-pollinated Families in Lithuania. *Scand J For Res* 18:305–319.
- Baliuckas V, Pliūra A (2008) Phenogenetic variation pattern in adaptive traits of *Betula pendula*, *Alnus glutinosa* and *Quercus robur* in Lithuania. *Biologija* 54:60–65.
- Barbero F (2014) Variación genética de poblaciones naturales argentinas de *Nothofagus obliqua* (“Roble Pellín”) en caracteres adaptativos tempranos relevantes para domesticación. Tesis Doctoral-Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires
- Barbero FA, Sabatier Y, Leonardo A, Bran D (2011) Áreas Potenciales de Cultivo de Raulí y Roble Pellín en la Provincia de Río Negro. Ediciones INTA, Buenos Aires.
- Barnes R, Bunrsr J, Gibson G (1984) Genotype-Environment interactions in tropical pines and their effects on the structure of breeding populations. *Silvae Genet* 33:186–198
- Bennie J, Kubin E, Wiltshire A, et al (2010) Predicting spatial and temporal patterns of bud-burst and spring frost risk in north-west Europe: The implications of local adaptation to climate. *Glob Chang Biol* 16:1503–1514.
- Bertin RI (2008) Plant phenology and distribution in relation to recent climate change plant phenology and distribution in relation to recent climate change. *J Torrey Bot Soc* 135:126–146
- Bianchi A, Cravero C (2010) Atlas Climático Digital de la República Argentina- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Ediciones INTA, Salta.
- Bogdan S, Ivanković M, Temunović M, et al (2017) Adaptive genetic variability and differentiation of Croatian and Austrian *Quercus robur* L. populations at a drought prone field trial. *Ann For Res* 60:33–46.
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, et al (2008) Generalized linear mixed models : a practical guide for ecology and evolution. 127–135 .
- Bormann FH (1965) Change in the growth pattern of white pine tree undergoing suppression. *Ecology* 46-3.
- Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses , adaptation processes and long-term consequences. *Ann For Sci* 63:625–644.

BIBLIOGRAFÍA

- Brewer CA (1992) Responses by stomata on leaves to microenvironmental conditions. In: Test Stud Laboratory Teach. 13: 67–75.
- Brewer S, Cheddadi R, de Beaulieu JL, Reille M (2002) The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. For Ecol Manage 156:27–48.
- Bryson R., Baerreis D., Wendland WM (1970) The character of late-glacial and post-glacial climate change. In: Dort W, Jones J. (eds) Pleistocene and Recent Environments of the Central Great Plains. University of Kansas Press, Lawrence, KS, p 53–74.
- Carnicer J, Coll M, Ninyerola M, et al (2011) Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. Proc Natl Acad Sci 108:1474–1478.
- Castañeda M, González M (2008) Statistical analysis of the precipitation trends in the Patagonia region in Patagonia region in southern South America. *Atmósfera* 21:303–317
- Centro Inv. Mar & Atm (2015) Cambio climático en Argentina; tendencias y proyecciones. http://3cn.cima.fcen.uba.ar/informe/ModClim_Indice.pdf
- Chambel MR, Climent J, Alía R, Valladares F (2005) Phenotypic plasticity : a useful framework for understanding adaptation in forest species. *Forest Systems*, 14(3), 334-344.
- Cheng X, Xie H, Zhang L, et al (2017) A comparative study of growth and leaf trait variation in twenty *Cornus wilsoniana* W. Families in southeastern China. *IForest* 10:759–765 .
- Chmielewski F, Rötzer T (2001) Response of tree phenology to climate change across Europe. *Agricultural and Forest Meteorology*, 108(2), 101-112.
- Chuine I, Cour P (1999) Climatic determinants of budburst seasonality in four temperate-zone tree species. *New Phytol* 143:339–349.
- Ciais P, Reichstein M, Viovy N, et al (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* 437:529–533.
- Climent J, Alonso J, Gil L (2004) Arquitectura del sistema radical en dos procedencias de *Pinus canariensis*. IV Congr For Español 5
- Colin F, Sanjines A, Fortin M, Bontemps JD, Nicolini E (2012) *Fagus sylvatica* trunk epicormics in relation to primary and secondary growth. *Annals of Botany* 110:995-1005.
- Conkle MT (1980) Amount and distribution of isozyme variation in various conifer species. In: In: Proceedings 17th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, Part 2: 109-117
- Cregg BM (1994) Carbon allocation, gas exchange, and needle morphology of *Pinus ponderosa* genotypes known to differ in growth and survival under imposed drought. *Tree Physiol* 14:883–898 .
- Dai A (2011) Drought under global warming: A review. *Wiley Interdiscip Rev Clim Chang* 2:45–

BIBLIOGRAFÍA

65 .

- Davel M, Urretavizcaya MF, Contardi L, et al (2003) Establecimiento de Plantaciones de Raulí y Roble Pellín en Chubut y Río Negro. *Patagon For* 9:9–12
- Dillen SY, Rood SB, Ceulemans R (2010) Growth and Physiology. In: *Genetics and Genomics of Populus* (pp 39–63). Springer. New York.
- Donoso Zegers C (1987) Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque* 8:85–97
- Donoso PJ, Soto DP (2010) Plantaciones con especies nativas en el centro-sur de Chile: experiencias, desafíos y oportunidades. *Rev Bosque Nativ* 47:10–17
- Donoso Zegers C (1993) Bosques templados de Chile y Argentina: variación, estructura y dinámica. Editorial Universitaria. Santiago.
- Ducouso A, Guyon JP, Kremer A (1996) Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt) Liebl). In: *Annales des Sciences Forestieres*. pp 775–782
- Echeverría C, Lara A (2004) Growth patterns of secondary *Nothofagus obliqua*-*N. alpina* forests in southern Chile. *For Ecol Manage* 195:29–43 .
- Escobar R (2007) Manual de viverización: *Eucalyptus globulus* a raíz cubierta. Instituto Forestal. Concepción
- Falconer D., Mackay TF. (1996) Introducción a la genética cuantitativa. ACRIBA, S.A, Zaragoza, España
- Fernandez-Lopez J, Zas R, Blanco-Silva R, Díaz R (2005) Geographic differentiation in adaptive traits of wild chestnut Spanish populations (*Castanea sativa* Miller). *Investig Agrar Sist y Recur For* 14:13.
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge university press, Cambridge.
- García L, Droppelmann F, Rivero M (2013) Morfología y fenología floral de *Nothofagus alpina* (Nothofagaceae) en un huerto semillero clonal en la región de Los Ríos, Chile. *Bosque* (Valdivia) 34:221–231 .
- Gordon D, Damiano C, DeJong TM (2006) Preformation in vegetative buds of *Prunus persica*: Factors influencing number of leaf primordia in overwintering buds. *Tree Physiol* 26:537–544 .
- Gould KS, Markham KR, Smith RH, Goris JJ (2000) Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. *J Exp Bot* 51:1107–1115 .
- Grossnickle SC (2012) Why seedlings survive: Influence of plant attributes. *New For* 43:711–738.
- Guédon Y, Puntieri JG, Sabatier S, Barthélémy D (2006) Relative extents of preformation and

BIBLIOGRAFÍA

- neof ormation in tree shoots: Analysis by a deconvolution method. *Ann Bot* 98:835–844.
- Guha A, Reddy AR (2013) Leaf functional traits and stem wood characteristics influencing biomass productivity of Mulberry (*Morus* spp. L) genotypes grown in short-rotation coppice system. *Bioenergy Res* 6:547–563.
- Gülcü SS, Çelik S (2009) Genetic variation in *Pinus brutia* Ten. seed stands and seed orchards for growth, stem form and crown characteristics. *African J Biotechnol* 8:4387–4394.
- Gutschick, V. P., & BassiriRad, H. (2003). Extreme events as shaping physiology, ecology, and evolution of plants: toward a unified definition and evaluation of their consequences. *New Phytologist*, 160(1), 21-42.
- Gutschick, V. P., & BassiriRad, H. (2010). Biological extreme events: a research framework. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 91(9), 85-86.
- Hamrick JL (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *For Ecol Manage* 197:323–335.
- Hamrick JL, Godt JW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For* 6:95–124.
- Hedrick PW (1999) Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53:313–318
- Hoffmann AA, Merilä J, Kristensen TN (2016) Heritability and evolvability of fitness and nonfitness traits: Lessons from livestock. *Evolution* 70:1770–1779.
- Houle D (1992) Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics* 130:195–204.
- Howe GT, Aitken SN, Neale DB, et al (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Can J Bot* 81:1247–1266.
- IPCC (2014) Cambio Climático 2014: Informe de síntesis. Ginebra
- Ipinza Carmona R, Gutierrez Caro B, Emhart Schmidt V (2000) Domesticación y Mejora Genética de raulí y roble. Universidad Austral de Chile/ Instituto forestal, Santiago de Chile
- Ismaili A, Karami F, Akbarpour O, Nejad AR (2016) Estimation of genotypic correlation and heritability of apricot traits, using restricted maximum likelihood in repeated measures data. *Canadian journal of plant science*, 96(3), 439-447.
- Jensen JS (1993) Variation of growth in Danish provenance trials with oak (*Quercus robur* L and *Quercus petraea* Mattuschka Liebl). *Ann Des Sci For* 50:203–207
- Jump AS, Marchant R, Peñuelas J (2009) Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends Plant Sci* 14:51–58.
- King DA, Leigh EG, Condit R, et al (1997) Relationships between branch spacing, growth rate and light in tropical forest saplings. *Funct Ecol* 11:627–635 .

BIBLIOGRAFÍA

- Kozłowski TT, Kramer PJ, Pallardy SG (1991) The physiological ecology of woody plants.
- Kramer K (1995) Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant Cell Environ* 18:93–104.
- Kremer A (2007) How well can existing forests withstand climate change. *Clim Chang For Genet Divers Implic Sustain For Manag Eur Bioversity Int Rome*, 3–17
- Kremer A, Kleinschmit J, Cottrell J, et al (2002) Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks? *For Ecol Manage* 156:75–87.
- Kremer A, Le Corre V, Petit RJ, Ducouso A (2010) Historical and contemporary dynamics of adaptive differentiation in European oaks. *Mol Approaches Nat Resour Conserv* 101–122
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241(4872), 1455–1460.
- Leakey RB, Newton AC (1994) Domestication of tropical trees for timber and non-timber products. Unesco, Paris.
- Ledo A, Paul KI, Burslem DFRP, et al (2018) Tree size and climatic water deficit control root to shoot ratio in individual trees globally. *New Phytol* 217:8–11 .
- Leinonen T, McCairns RJS, O'Hara RB, et al (2013) Q_{ST} - F_{ST} comparisons: Evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nat Rev Genet* 14:179–190 .
- Lindner M, Maroschek M, Netherer S, et al (2010) Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *For Ecol Manage* 259:698–709 .
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts
- Magnin A, Puntieri J, Villanba R (2014) Interannual variations in primary and secondary growth of *Nothofagus pumillio* and their relationship with climate. *Trees* 28:1463–1471.
- Magri D, Vendramin GG, Comps B, et al (2006) A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytol* 171, 171:199, 199–221, 221 .
- Mäkelä, A. (1985). Implications of the pipe model theory on dry matter partitioning and height growth in trees. *Journal of theoretical Biology*, 123(1), 103–120.
- Marchelli P, Gallo LA (1999) Annual and geographic variation in seed traits of Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil .) Dim . et Mil . *Forest ecology and Management*, 121(3), 239–250.
- Marchelli P, Gallo LA (2001) Genetic diversity and differentiation in a southern beech subjected to introgressive hybridization. *Heredity (Edinb)* 87:284–293 .

BIBLIOGRAFÍA

- Marchelli P, Gallo LA (2004) The combined role of glaciation and hybridization in shaping the distribution of genetic variation in a Patagonian southern beech. *J Biogeogr* 31:451–460 .
- Marchelli P, Gallo LA (2006) Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics*, 7(4), 591-603.
- Marchelli P, Gallo L, Scholz F, Ziegenhagen B (1998) Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theor Appl Genet* 97:642–646 .
- Marchelli P, Smouse P.E & Gallo L.A. (2012) Short-distance pollen dispersal for an outcrossed, wind-pollinated southern beech (*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil.). *Tree Genetics & Genomes* 8: 1123-1134.
- Marchelli P, Thomas E, Azpilicueta MM, et al (2017) Integrating genetics and suitability modelling to bolster climate change adaptation planning in Patagonian *Nothofagus* forests. *Tree Genet Genomes* 13(6), 119.
- Markesteijn L, Poorter L (2009) Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. *J Ecol* 97:311–325 .
- Marron N, Dillen SY, Ceulemans R (2007) Evaluation of leaf traits for indirect selection of high yielding poplar hybrids. *Environ Exp Bot* 61:103–116 .
- Mason B, Jinks R, Savill P, Wilson SM (2017) Southern Beeches (*Nothofagus* species) Rauli (*Nothofagus alpina* syn. *N. procera*), roble (*Nothofagus obliqua*) and related species. *Q J Forest Vol* 112 No.1.
- Mathiasen P, Vidoz F, Valle S, et al (2017) Primeros registros de presencia de *Nothofagus nitida* (Nothofagaceae) en Argentina y estimación de su área de distribución potencial. 38:467–477 .
- Matías L, González-Díaz P, Jump AS (2014) Larger investment in roots in southern range-edge populations of Scots pine is associated with increased growth and seedling resistance to extreme drought in response to simulated climate change. *Environ Exp Bot* 105:32–38 .
- Mátyás C (1996) Climatic adaptation of trees: rediscovering provenance tests. *Euphytica* 92:45–54 .
- McKay JK, Latta RG (2002) Genetic population divergence: markers and traits. *Trends Ecol Evol* 17:501–502 .
- Meredith M., Stehman S. (1991) Repeated measures experiments in forestry: focus on analysis of response curves. *Can J For Res* 21:957–965
- Merilä J, Crnokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. 14:892–903
- Merilä J, Sheldon BC (1999) Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: Empirical patterns and development of ideas. *Heredity (Edinb)*. 83:103–109

BIBLIOGRAFÍA

- Míguez-Soto B, Fernández-López J (2015) Variation in adaptive traits among and within Spanish and European populations of *Castanea sativa*: selection of trees for timber production. *New For* 46:23–50 .
- Millerón M, Gallo L, Marchelli P (2008) The effect of volcanism on postglacial migration and seed dispersal. A case study in southern South America. *Tree Genet Genomes* 4(3):435-443.
- Moles AT, Westoby M (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Society* 92:372–383 .
- Mondino V (2014) Variación geográfica y genética en caracteres adaptativos iniciales de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser en una zona de alta heterogeneidad ambiental. Tesis doctoral. Escuela Para Graduados de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.
- Morgenstern M (2011) Geographic variation in forest trees: genetic basis and application of knowledge in silviculture. UBC press. Vancouver.
- Nabors, M. W. (2006). Introducción a la Botánica, 712 p. Pearson Educación. Madrid.
- Navarro C, Cavers S, Pappinen A, et al (2005) Contrasting quantitative traits and neutral genetic markers for genetic resource assessment of Mesoamerican *Cedrela odorata*. *Silvae Genet* 54:281–292
- Notivol E, García-Gil MR, Alía R, Savolainen O (2007) Genetic variation of growth rhythm traits in the limits of a latitudinal cline in Scots pine. *Can J For Res* 37:540–551 .
- O’Hara RB (2005) Bias and Precision in QST Estimates: Problems and Some Solutions. *Genetics* 171:1331–1339 .
- O’Neill GA, Adams WT, Aitken SN (2001) Quantitative genetics of spring and fall cold hardiness in seedlings from two Oregon populations of coastal Douglas-fir. *For Ecol Manage* 149:305–318.
- Osier TL, Lindroth RL (2004) Long-term effects of defoliation on quaking aspen in relation to genotype and nutrient availability: Plant growth, phytochemistry and insect performance. *Oecologia* 139:55–65 .
- M. Olsthoorn , A. Pronk , E. Vanguelova , M. Weih & I. Brunner (2007) Specific root length as an indicator of environmental change, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, 141:3, 426-442,
- M. Olsthoorn , A. Pronk , E. Vanguelova , M. Weih & I. Brunner (2007) Specific root length as an indicator of environmental

BIBLIOGRAFÍA

- change, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa*
- Botanica Italiana*, 141:3, 426-442
- Otto C, Nilsson LM (1981) Why do beech and oak trees retain leaves until spring? *Oikos* 37:387–390.
- Padilla FM, Pugnaire FI (2007) Rooting depth and soil moisture control Mediterranean woody seedling survival during drought. *Funct Ecol* 21:489–495 .
- Pastorino MJ, Aparicio AG, Azpilicueta MM, et al (2011) Domesticación de Raulí y Roble Pellín en Argentina: Propuesta inicial para un programa de mejora genética de baja intensidad. In: V Reunión Grupo de Genética y Mejoramiento Forestal (GeMFo).
- Pastorino MJ, Gallo LA (2002) Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest. *J Biogeogr* 29:1167–1178 .
- Patorino MJ, Marchelli P, Azpilicueta MM (2013) ¿Cómo ajustar la precisión en la estimación de parámetros de genética cuantitativa en estudios de genética ecológica? ejemplos con especies nativas patagónicas. In: 4° Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Iguazu.
- Pastorino MJ, Marchelli P, Milleron M, et al (2009) The effect of different glaciation patterns over the current genetic structure of the southern beech *Nothofagus antarctica*. *Genetica* 136:79–88 .
- Paz H (2003) Root/shoot allocation and root architecture in seedlings: Variation among forest sites, microhabitats, and ecological groups. *Biotropica* 35:318–332 .
- Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, et al (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks. *For Ecol Manage* 156:5–26 .
- Pigliucci M (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol* 209:2362–2367 .
- Pinto JR (2011) Morphology targets: What do seedling morphological attributes tell us? *Natl Proc For Conserv Nurs Assoc Fort Collins, CO USDA For Serv Rocky Mt Res Stn* 74–79
- Pliūra A, Baliuckas V (2007) Genetic Variation in Adaptive Traits of Progenies of Lithuanian and Western European Populations of *Fraxinus*. *Balt For* 13:28–38
- Pollmann W (2005) A long-term record of *Nothofagus* dominance in the southern Andes, Chile. *Austral Ecol* 30:91–102
- Poorter L, Bongers F (2006) Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. *Ecology* 87:1733–1743 .
- Premoli AC, Kitzberger T, Veblen TT (2000) Conservation genetics of the endangered conifer *Fitzroya cupressoides* in Chile and Argentina. *Conserv Genet* 1:57–66 .

BIBLIOGRAFÍA

- Premoli AC, Mathiasen P (2011) Respuestas ecofisiológicas adaptativas y plásticas en ambientes secos de montaña: *Nothofagus pumilio*, el árbol que acapara los andes australes. *Ecol Austral* 21:251–269
- Premoli AC, Mathiasen P, Kitzberger T (2010) Southern-most *Nothofagus* trees enduring ice ages: Genetic evidence and ecological niche retrodiction reveal high latitude (54°S) glacial refugia. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 298:247–256 .
- Pretzsch H, Schütze G, Uhl E (2013) Resistance of European tree species to drought stress in mixed versus pure forests: Evidence of stress release by inter-specific facilitation. *Plant Biol* 15:483–495 .
- Puntieri JG, Brion CAM, Barthélémy D, Souza MS (2001) Variaciones en el tamaño y la composición de las yemas de *Nothofagus pumilio* y *N. dombeyi* (Fagaceae). *Darwiniana* 39:1–10
- Puntieri JG, Ghirardi S (2010) Growth-unit structure in trees: Effects of branch category and position on *Nothofagus nervosa*, *N. obliqua* and their hybrids (Nothofagaceae). *Trees - Struct Funct* 24:657–665 .
- Puntieri JG, Grosfeld JE, Stecconi M, et al (2006) Desarrollo temprano del roble (*Nothofagus obliqua*): un análisis arquitectural de procedencias de Argentina. *Bosque* 27:44–51
- Puntieri JG, Grosfeld J, Stecconi M, et al. (2007a) Bud and growth-unit structure in seedlings and saplings of *Nothofagus alpina* (Nothofagaceae). *Am J Bot* 94:1382–1390
- Puntieri, J., Grosfeld, J., Stecconi, M., et al. (2007b). Shoot development and dieback in progenies of *Nothofagus obliqua*. *Annals of forest science*, 64(8), 839-844.
- Puntieri JG, Grosfeld J, Tejera L (2013) Within-population variability in architectural traits and suitability to forestry conditions in *Nothofagus nervosa* (= *N. alpina*; Nothofagaceae). *Annals of Forest Science* 70:471–479 .
- Puntieri JG, Souza MS, Barthélémy D, et al (2000) Preformation , neoformation , and shoot structure in *Nothofagus dombeyi* (Nothofagaceae). *1054:1044–1054*
- Puntieri JG, Stecconi M, Barthélémy D (2002) Preformation and neoformation in shoots of *Nothofagus antarctica* (G. Forster) Oerst. (Nothofagaceae) shrubs from northern Patagonia. *Ann Bot* 89:665–673 .
- R Core Team (2015). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Viena.
- Rabassa J, Clapperton CM (1990) Quaternary glaciations in the southern andes. *Quat Sci Rev* 9:299–304 .
- Rabe-Hesketh S, Skrondal A (2008) Multilevel and longitudinal modeling using Stata. STATA press, Texas.

BIBLIOGRAFÍA

- Raddad EAY (2007) Ecophysiological and genetic variation in seedling traits and in first-year field performance of eight *Acacia senegal* provenances in the Blue Nile, Sudan. *New For* 34:207–222 .
- Rehfeldt GE, Tchebakova Nadejda, Milyutin LI, et al (2003) Assessing population responses to climate in *Pinus sylvestris* and *Larix* spp. of Eurasia with climate-transfer models. *Eurasian J For Res* 6–2:83–98
- Reichenbacker RR, Schultz RC, Hartl AR (1996) Artificial defoliation effect on *Pupulus* growth, biomass production, and total nonstructural carbohydrate concentration. *Entomol Am* 25:632–642
- Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Rusticucci M, Barrucand M (2004) Observed trends and changes in temperature extremes over Argentina. *J Clim* 17:4099–4107 .
- Sabatier Y, Azpilicueta MM, Marchelli P, et al (2011) Distribución natural de *Nothofagus alpina* y *Nothofagus obliqua* (Nothofagaceae) en argentina, dos especies de primera importancia forestal de los bosques templados norpatagónicos. *Bol la Soc Argentina Bot* 46:131–138
- Sanchez Vargas NM, Vargas Hernandez JJ (2007) Competencia y su relación con los parámetros genéticos en clones de eucalipto. *Cienc e Investig For* 13:361–370
- Saxe H, Cannell MGR, Johnsen O, et al (2001) Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytol* 149:369–400 .
- Sauquet H, Simon YW Ho, Gandolfo MA et al. (2011) Testing the impact of calibration on molecular divergence times using a fossil-rich group: The case of *Nothofagus* (fagales). *Syst. Biol.* 61(2):289-313.
- Schaffalitzky de Muckadell C (1962) Environmental factors in development stages of trees. *Tree Growth Ronald Press New York* 289–298
- Scheiner S (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *J Annu Rev Ecol Syst* 24:35–68
- Schinelli Casares T (2012) Producción de *Nothofagus* bajo condiciones controladas, 1ra edn. INTA, Esquel
- Schlichting CD, Levin DA (1986) Phenotypic plasticity: an evolving plant character. *Biol J Linn Soc* 29:37–47 .
- Schmidt A, Poulain M, Klein D, et al (2009) Allometric above-belowground biomass equations for *Nothofagus pumilio* (Poepp . & Endl.) natural regeneration in the Chilean Patagonia. *Ann For Sci* 66:513 .
- Seiwa K, Kikuzawa K (1991) Phenology of tree seedlings in relation to seed size. *Can J Bot Can Bot* 69:532–538 .

BIBLIOGRAFÍA

- Smith MD (2011) The ecological role of climate extremes: Current understanding and future prospects. *J Ecol* 99:651–655 .
- Spitze K (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135:367–374
- Sterck FJ, Bongers F, Newbery DM (2001) Tree architecture in a Bornean lowland rain forest: Intraspecific and interspecific patterns. *Plant Ecol* 153:279–292 .
- Suarez ML, Ghermandi L, Kitzberger T (2004) Factors predisposing episodic drought induced tree mortality in *Nothofagus*–site, climatic sensitivity and growth trends. *J Ecol* 92:954–966 .
- Suarez ML, Kitzberger T (2008) Recruitment patterns following a severe drought: long-term compositional shifts in Patagonian forests. *Can J For Res* 38:3002–3010 .
- Svendsen CR (2001) Effects of marcescent leaves on winter browsing by large herbivores in northern temperate deciduous forests. *Alces*, 37(2), 475-483.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I. Castellón de la Plana.
- Tang J, Körner C, Muraoka H, et al (2016) Emerging opportunities and challenges in phenology: A review. *Ecosphere* 7:1–17 .
- Torres CD, Puntieri J, Stecconi M (2009) Estudio comparativo del crecimiento y la ramificación de brotes anuales en dos especies de *Nothofagus* (*Nothofagaceae*) y en híbridos inter-específicos. *Bol. Soc Argent. Bot.* 44 (3-4): 287-303.
- Torres CD, Magnin A, Varela SA, et al (2018) Morpho-physiological responses of *Nothofagus obliqua* to light intensity and water status, with focus on primary growth dynamics. *Trees - Struct Funct* 0:1–14.
- Turesson G (1922) The genotypical response of the plant species to the habitat. *Hereditas* 3:211–350 .
- Valladares F, Niinemets U (2007) The architecture of plant crowns: from design rules to light capture and performance. *Funct plant Ecol.* 101-149.
- Varela SA (2010) Respuestas morfológico-fisiológicas ante distintos tipos e intensidades de estrés en dos especies patagónicas del género *Nothofagus* con aptitud comercial. Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires
- Varela SA, Fernández ME, Gyenge JE, et al (2012) Physiological and morphological short-term responses to light and temperature in two *Nothofagus* species of Patagonia , South America. *50:557–569 .*
- Verga A (2011) Programa hoja, Manual de uso version 3.x. INTA, Córdoba
- Vergara, R., Gitzendanner, M. A., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2014). Population genetic structure, genetic diversity, and natural history of the South American species of

BIBLIOGRAFÍA

- Nothofagus* subgenus *Lophozonia* (Nothofagaceae) inferred from nuclear microsatellite data. *Ecology and evolution*, 4(12), 2450-2471.
- Visser RA (1985) *Analysis of Longitudinal Data in Behavioral and Social Research: An Expository Survey*. Leiden: Dsw Press
- Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, et al (2009a) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Can J For Res* 39:1259–1269 .
- Vitasse Y, Porté AJ, Kremer A, et al (2009b) Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: Relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia* 161:187–198 .
- Viveros-Viveros H, Sáenz-Romero C, Vargas-Hernández JJ, et al (2014) Comparación de Q_{ST} vs F_{ST} en poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* Lindl. *Rev Fitotec Mex* 37:117–127
- Vrijenhoek RC (1994) Genetic diversity and fitness in small populations. In: *Conservation genetics*. (pp. 37-53). Birkhäuser, Basel.
- Waldmann P, García-Gil MR, Sillanpää MJ (2005) Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: An application to *Pinus sylvestris*. *Heredity* (Edinb) 94:623–629 .
- Ware JH, Liang KY (1996) The design and analysis of longitudinal studies: a historical perspective. *Adv biometry* 339–362
- White TL, Adams WT, Neale DB (ed.) (2007) *Forest Genetics*. Cabi. Cambridge.
- Whitham TG, Bailey JK, Schweitzer JA, et al (2006) A framework for community and ecosystem genetics: From genes to ecosystems. *Nat Rev Genet* 7:510–523 .
- Whitlock MC (2008) Evolutionary inference from Q_{ST} . *Mol Ecol* 17:1885–1896 .
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F(ST) \neq 1/(4Nm + 1)$. *Heredity* (Edinb) 82:117–125 .
- Wiley E, Casper BB, Helliker BR (2017) Recovery following defoliation involves shifts in allocation that favour storage and reproduction over radial growth in black oak. *J Ecol* 105:412–424 .
- Wolkovich EM, Cook BI, Davies TJ (2014) Progress towards an interdisciplinary science of plant phenology: Building predictions across space, time and species diversity. *New Phytol* 201:1156–1162 .
- Wright S (1952) The theoretical variance within and among subdivisions of a population that is in a steady state. *Genetics* 37:312
- Zobel B, Talbert J, others (1984) *Applied forest tree improvement*. John Wiley & Sons. New York.

BIBLIOGRAFÍA

Zuur AF, Ieno EN, Meesters E (2009) *A Beginner's Guide to R*. Springer New York, New York.

AGRADECIMIENTOS

Gratitud (Oliverio Girondo)

Gracias aroma
azul,
fogata
encelo.

Gracias pelo
caballo
mandarino.

Gracias pudor
turquesa
embrujo
vela,
llamarada
quietud
azar
delirio.

Gracias a los racimos
a la tarde,
a la sed
al fervor
a las arrugas,
al silencio
a los senos
a la noche,
a la danza
a la lumbre
a la espesura.

Muchas gracias al humo
a los microbios,
al despertar
al cuerno
a la belleza,
a la esponja
a la duda
a la semilla
a la sangre
a los toros

a la siesta.
Gracias por la ebriedad,
por la vagancia,
por el aire
la piel
las alamedas,
por el absurdo de hoy
y de mañana,
desazón
avidez
calma
alegría,
nostalgia
desamor
ceniza
llanto.

Gracias a lo que nace,
a lo que muere,
a las uñas
las alas
las hormigas,
los reflejos
el viento
la rompiente,
el olvido
los granos
la locura.

Muchas gracias gusano.
Gracias huevo.
Gracias fango,
sonido.

Gracias piedra.

Muchas gracias por todo.

Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Quiero regalarles este poema de Oliverio Gironde a todos aquellos que me ayudaron:

Primero, a mis directores quienes fueron mis guías en este camino académico y me brindaron la oportunidad de poder realizar este trabajo junto a ellos.

A todo el Grupo de Genética forestal por sus consejos y vivencias compartidas. A mis compañeros becarios por las charlas y reflexiones que compartimos.

A todos los integrantes de la EEA Bariloche. A Santi Varela por su ayuda con las mediciones fisiológicas, a Fernando Umaña por los datos climáticos, a Lau Borrelli que me orientó con las mediciones en microscopio, a Priscila Williems, a Nati Perez, a Ale Aparicio y a Gera de la Vega por su ayuda en estadística y el lenguaje R.

A Gustavo, Vicky, Marcos, Matías, Aleman, Gutierrez, Bachman, Huenchu y Mariana del Campo Forestal Gral. San Martin que compartí con ellos mis primeros dos años de trabajo.

A los docentes de los cursos que tuve, a Gustavo y a Patricia de Posgrado, a la comisión de doctorado, a los jurados y a los técnicos del parque Nacional Lanín por el aporte que cada uno me dio desde su lugar.

A CONICET, a INTA, al CRUB y a la Universidad del Comahue.

Pero principalmente quiero agradecer y regalarle este poema a mi familia, que me apoya incondicionalmente, a mis amigos que estén cerca o lejos me acompañan y a Fer particularmente que estuvo siempre a mi lado ayudándome en todo y es mi compañero de aventuras y de vida.

Todos ellos fueron la fuente de energía para seguir adelante.

A todos, de verdad, GRACIAS!

ARTÍCULO DE RESPALDO

Looking at the forest from below: the role of seedling root traits in the adaptation to climate change of two Nothofagus species in Argentina

Virginia G. Duboscq-Carra, Federico J. Letourneau & Mario J. Pastorino

New Forests

International Journal on the Biology, Biotechnology, and Management of Afforestation and Reforestation

ISSN 0169-4286

New Forests
DOI 10.1007/s11056-018-9647-3



 Springer

Looking at the forest from below: the role of seedling root traits in the adaptation to climate change of two *Nothofagus* species in Argentina

Virginia G. Duboscq-Carra^{1,2} · Federico J. Letourneau² · Mario J. Pastorino^{1,2}

Received: 9 September 2017 / Accepted: 8 May 2018
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

Abstract Global climate change (CC) is an evolutionary challenge for natural tree populations. Scientific experts forecast an increase in temperature and a decrease in precipitation in the Argentine Patagonian Cordillera. Knowledge of the variation of adaptive traits at the seedling stage is crucial to prediction the adaptability of forest tree species. We aim to analyze genetic variation in root and shoot quantitative traits among and within natural populations of two key North Patagonian forest species, in order to evaluate their ability to deal with CC through adaptation. We established two common garden nursery trials: (1) 81 open pollinated families of *Nothofagus obliqua* from eight natural populations, and (2) 74 families of *Nothofagus alpina* from seven populations. At the end of the first growing season we measured shoot height, diameter, root length and root and stem dry biomass; we also estimated foliage biomass. In addition the root to stem ratio, specific root length and the root to shoot ratio were calculated. For both species intra-population variation was generally low, and average differentiation was moderate, with high levels of differentiation in some traits related to drought stress, indicating low adaptation capacity but also adaptation to current stressful conditions, which means it may be possible for some populations to survive CC without changing their genetic structures. Further studies are needed, including phenotypic plasticity assays, to complete the picture.

Keywords Allometry · Drought resistance · Population genetics

✉ Virginia G. Duboscq-Carra
duboscq.virginia@inta.gob.ar

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), EEA Bariloche, CC 277, 8400 San Carlos de Bariloche, Argentina

Introduction

Global climate change (CC) is an evolutionary challenge for natural populations, particularly for long-lived species such as trees. In 2014 the IPCC reported a gradual rise in global temperature over recent decades, and confirmed an increase in this trend, predicting inevitable changes in global natural and economic systems. Regarding Argentina, a local panel of experts has recently reported an increase of 0.4° C in the average annual temperature of Patagonia for the period 1960–2010, and a marked decrease in average precipitation, particularly in the Andes Cordillera sector (Centro Inv. Mar & Atm 2015). This report also forecasts for the remainder of the century, and depending on the chosen CC scenario, a continuous temperature increase at least of similar magnitude as the observed in the last 60 years, and a significant decrease in precipitation in the Cordillera, from 10 to 30% of current annual averages.

In the long term, and in the absence of mitigating measures, CC is likely to overwhelm the in situ adaptive capacity of ecosystems, not due to changes in climate means, but rather due to a greater recurrence and intensity of extreme events such as droughts, heat waves, off-season frosts, torrential rains, or the effects of these physical changes, such as the occurrence of catastrophic fires or pest outbreaks. Cases of massive mortality in forest ecosystems produced by extreme drought and heat waves have already been reported in North Patagonia (Bran et al. 2001) and worldwide (Allen et al. 2010).

In the temperate forests of Patagonia two species of the emblematic tree genus *Nothofagus* stand out because of their potential for timber production: *Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst. and *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. (Tortorelli 1956). Both these species are involved in an ongoing domestication program in Argentina, conducted by the *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* (INTA). They are also key species in their ecosystems, which are mostly found in Chile but also have considerable presence on the eastern side of the Andes Cordillera. In Argentina *N. alpina* occurs from 39°20'S to 40°35'S, lying mainly within Lanín National Park, while *N. obliqua* has a wider latitudinal distribution, from 36°50'S to 40°10'S. Sympatric populations occur at the latitude of Lácar Lake; *N. obliqua* dominates from 600 to 750 m a.s.l., and *N. alpina* from 950 to 1150 m a.s.l., where *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser appears and begins to climb forming pure stands and finally the tree line (Sabatier et al. 2011). The natural range of *N. obliqua* extends further to the east than *N. alpina*, and natural populations are found in less humid sites (Sabatier et al. 2011). Accordingly, *N. obliqua* seedlings have lower vulnerability to embolism than *N. alpina* ones (Varela et al. 2010).

The predicted CC will very probably affect the natural distribution of forest tree species in North Patagonia. This topic has been specifically addressed for *N. alpina* and *N. obliqua* by means of ecological niche modelling (Marchelli et al. 2017). According to this study, the extinction of a large number of populations of *N. alpina* is likely to occur in Argentinian sub-Antarctic forests in the next 35 years. At the same time, *N. obliqua* is likely to spread gradually replacing the current mixed forests with pure stands and colonizing sites where the species is not present today.

Considering the embolism tolerance ability of both species (Varela et al. 2010), the replacement of *N. alpina* by *N. obliqua* in the sympatric forests and in adjacent pure ones is a probable consequence of climate change. Local extinction of *N. alpina* due to drought stress would likely free *N. obliqua* from competition pressure in sites still suitable for the latter species. Evidence that this process is currently occurring has been recently reported (Sola et al. 2015). An evaluation of natural regeneration in a sympatric forest logged in

1993 showed that 20 years later the proportion of established seedlings experienced a sharp increase in *N. obliqua* and decrease in *N. alpina*, even though *N. alpina* had prevailed among the remnants.

The seedling and sapling phases of plant development are the most important and acute selective stages in the life span of a tree species (Seiwa and Kikuzawa 1991; Moles and Westoby 2004; Grossnickle 2005, 2012). Knowledge of selection drivers at these stages is crucial to our understanding of the natural processes of extinction or persistence, and also to the management of afforestation for restoration (or even commercial) purposes. Several morphological attributes such as the proportion of root to shoot mass and root depth may drive drought resistance of plants (Padilla and Pugnaire 2007; Grossnickle 2012; Matías et al. 2014; Ledo et al. 2018). In this regard, seedlings of populations adapted to drought stress are expected to present longer roots but less development of aboveground biomass (Cregg 1994; Paz 2003; Climent et al. 2004; Markesteijn and Poorter 2009); that is a greater ability to absorb water and a smaller transpiration surface area.

Natural populations can survive CC locally by means of adaptation (changes in their genetic frequencies) or phenotypic plasticity (Aitken et al. 2008), two different strategies that occur simultaneously, with unknown prevalence. The ability to adapt (adaptability) of a certain species can be assessed by estimating the additive genetic variance (Houle 1992) of their populations in adaptive meaningful traits.

Taking into account the severe future scenario foreseen for Andean North Patagonia, we ask whether the next generation of natural populations of *N. alpina* and *N. obliqua* will be able to become established and survive. We aim to analyze genetic variation among and within natural populations of these two important *Nothofagus* species in root/shoot quantitative traits presumably involved in drought resistance, through a nursery common garden trial, in order to evaluate their ability to deal with CC through adaptation. Bearing in mind the evidence observed in sympatric forests, we expect *N. alpina* to have a lower level of intra-population genetic variation compared to *N. obliqua*. Similarly, given the wider amplitude of the ecological gradients occupied by *N. obliqua*, we expect greater inter-population genetic variation of this species in comparison to *N. alpina*.

Materials and methods

Plant material and measurement of variables

The intra and inter-population variation of *N. obliqua* and *N. alpina* was analyzed based on morphological root and shoot traits of seedlings at the end of their first year of growth, in two nursery common garden trials. Although planned, the high annual variation in seed production of these species (Marchelli and Gallo 1999) made it impossible to sample both of them during the same year. Unfortunately, *N. alpina* seed production was almost nil the year we collected *N. obliqua* seeds, and vice versa. Hence, the trials had to be performed separately for each species, and consequently comparisons cannot be made before making conclusions for each species independently.

In 2008 seeds of eight natural populations of *N. obliqua* (Fig. 1) were collected directly from the crowns of open-pollinated trees selected at random; a distance of at least 30 m was maintained between trees to minimize the probability of sampling related individuals. Populations were selected so as to represent the complete Argentinean range of the species. The same procedure and criteria were applied in 2009 for the collection of *N. alpina* seeds

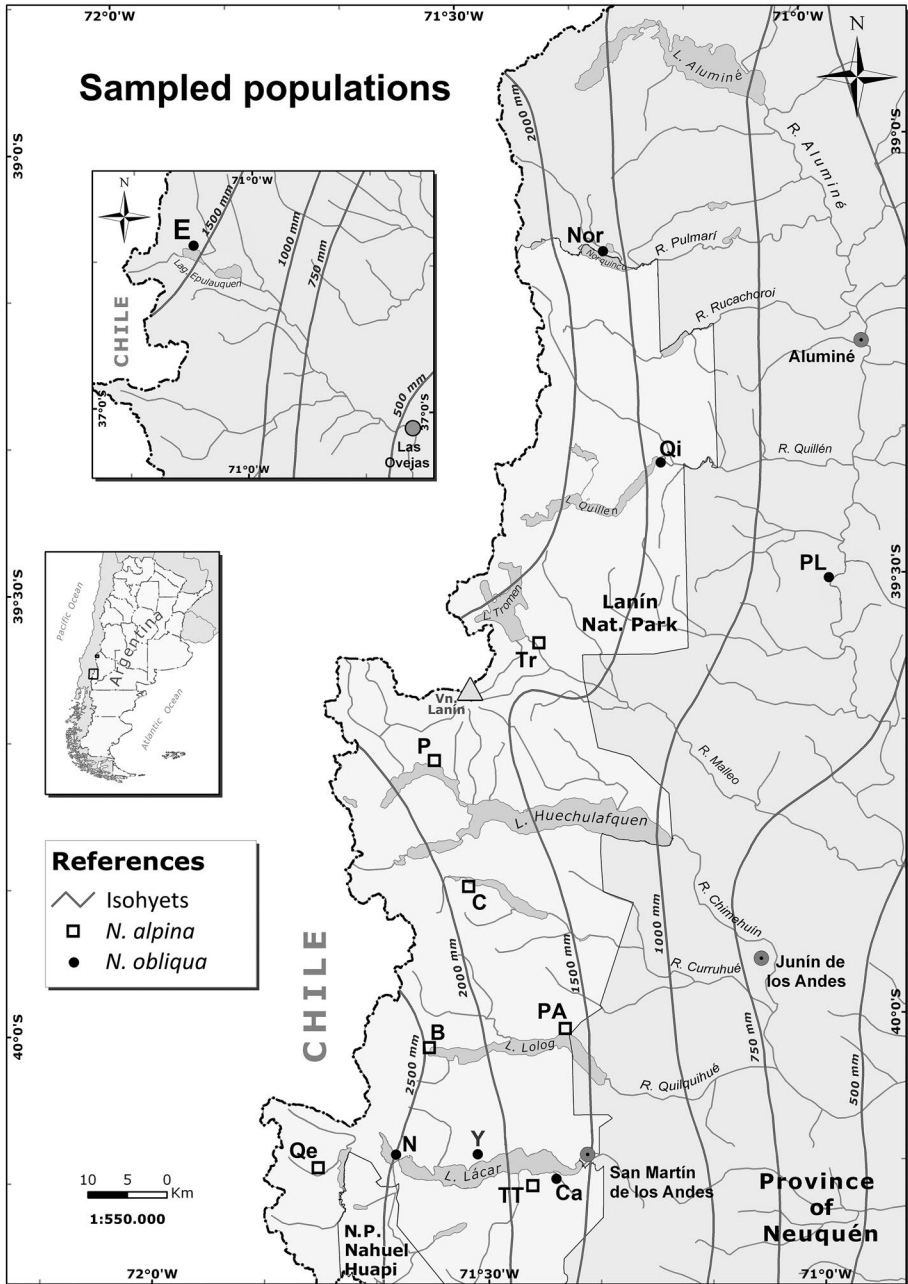


Fig. 1 Map of sampled populations. Empty squares represent *N. alpina* populations (Tr Tromen, P Paimún, C Curruhué, PA Puerto Arturo, B Boquete, Qe Queñi, TT Tren Tren) and full circles represent *N. obliqua* populations (E Epulauquen, Nor Noquienco, Qi Quillén, PL Pilo Lil, N Nonthué, Y Yuco, Ca Catritre)

Table 1 Location, mean annual precipitation (MAP), mean annual UNEP aridity index (AI_U), January and July mean temperatures (T °C), number of families sampled and mean weight of 100 filled seeds of the *N. alpina* and *N. obliqua* natural populations included in the common garden trials

Population	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m a.s.l.)	MAP (mm year ⁻¹)	AI _U	T °C (Jan.)	T °C (July)	No. of families	100 SW (g)
<i>Nothofagus alpina</i>									
B	40°01'50"	71°34'38"	910	1600	2.88	13.07	1.37	10	1.37
C	39°50'34"	71°30'30"	1030	1400	2.45	13.16	0.89	11	1.44
P	39°42'17"	71°33'52"	930	1800	3.35	12.07	0.93	10	1.46
PA	40°01'02"	71°22'19"	910	1200	2.06	14.57	1.93	12	1.31
Qe	40°09'54"	71°45'20"	920	2400	5.03	9.67	-0.03	10	1.36
Tr	39°36'18"	71°20'57"	1110	1300	2.35	13.52	1.01	9	1.48
TT	40°11'53"	71°25'53"	1040	1400	2.36	13.81	1.61	12	1.40
Total								74	
<i>Nothofagus obliqua</i>									
CaA	40°11'01"	71°23'50"	850	1250	2.24	14.31	1.98	11	0.93
CaB	40°10'26"	71°24'10"	650	1250	2.10	15.25	2.90	12	0.83
E	36°49'14"	71°03'29"	1500	1800	3.50	12.14	0.07	12	2.68
N	40°08'46"	71°37'03"	780	1850	3.29	13.30	2.09	10	1.03
Nor	39°09'11"	71°15'38"	1100	1250	2.17	13.82	1.20	5	0.94
PL	39°31'03"	70°57'33"	900	700	1.09	17.28	3.42	12	0.90
Qi	39°21'27"	71°13'12"	1050	1150	1.97	14.37	1.55	7	1.13
Y	40°09'07"	71°30'39"	700	1500	2.69	13.70	1.75	12	0.91
Total								81	

from seven natural populations (Fig. 1). An average of more than 10 trees was sampled in each population (Table 1). Both collections were carried out in “full mast” years; thus, according to Marchelli and Gallo (1999) a good genetic representation of the sampled populations is expected. Each population was environmentally characterized by several features presented in Table 1 (climatic variables were taken from Bianchi and Cravero 2010). The mean weight of 100 filled seeds is also reported for each population. In order to estimate this parameter we sampled four repetitions of 100 seeds per family, in all the families of each population, and these were subsequently fresh weighed with 0.01 g accuracy.

Seedlings of both species were produced during the same years as seeds were collected (seeding date: 9.15.2008 and 9.28.2009 for *N. obliqua* and *N. alpina* respectively). Standard protocols were followed (Azpilicueta et al. 2010), using a germination tray for each family (progeny of a single open-pollinated tree). Once an appropriate size had been reached (about 1 month after emergence) the seedlings were transplanted to 25-liter cylindrical pots (28 cm diameter, 40 cm depth) filled with pre-sifted loam soil, placing four seedlings in each pot (transplanting date: 10.20.2008 and 11.27.2009 for *N. obliqua* and *N. alpina* respectively). The potted plants were placed outdoors, with moderate sun protection (50% shade cloth transmittance) and watered by a sprinkler system two or three times a week during the growing season. Substrate fertility was supplemented with two applications of NPK fertilizer at the beginning of the growing season (0.56 g/l of NEW PLANT 18-7-17™; N=101 ppm, P=18 ppm, K=80 ppm). Micronutrients were also applied twice, through foliar fertilization.

The *N. obliqua* trial consisted of eight natural populations (two sites of contrasting altitude were sampled in the Catritre location, so we considered them as different populations), with 5–12 families per population (81 families in total) and eight seedlings per family, which resulted in a total of 648 seedlings. In the case of *N. alpina*, seven natural populations were used with 9–12 families per population (74 families in total) and eight seedlings per family, resulting in a total of 592 seedlings. The pots were first arranged in four columns, and the seedlings were then transplanted. Both trials were divided into eight blocks, following a presumed wind gradient, and within each block and pot the seedlings were randomly distributed (single-tree plot). The trial was surrounded by one line of pots to minimize edge effects. Both trials were measured on completion of the first growing season, during winter dormancy. Plants were carefully removed from the pots and roots were washed with abundant running water (date of plant harvesting: 7.31.2009 and 6.30.2010 for *N. obliqua* and *N. alpina* respectively).

For each plant we measured shoot height (SH; with 0.1 cm accuracy), root collar diameter (D; measured with a caliber, 0.01 mm accuracy) and length of longest root (RL; 0.1 cm accuracy). We then obtained the root (Rdb) and stem (Sdb) dry biomass by drying the plants for 48 h at 72° C then weighing each component separately, to 0.0001 g accuracy. The ratio between root and stem dry biomass ($R/S = Rdb/Sdb$) and specific root length ($SRL = RL/Rdb$, in [m/g]) were subsequently calculated.

Since artificial defoliation causes changes in carbon allocation (Reichenbacher et al. 1996; Osier and Lindroth 2004; Wiley et al. 2017), we preferred not to remove the leaves before measuring biomass, but rather to let the natural process be completed. We sacrificed this leaf trait so as to have more confidence in the stem and root traits. We estimated the foliage biomass of each seedling by means of a regression equation developed for *Nothofagus pumilio* (a closely related species) seedlings and saplings, based on height and diameter data (Schmidt et al. 2009). We first tested the published equations correlating predicted and measured values of Rdb and Sdb for both species. Since these correlations were significant and high (*N. obliqua* Rdb: $r_{\text{pred.meas}} = 0.86$; *N. obliqua* Sdb: $r_{\text{pred.meas}} = 0.89$; *N. alpina*

Rdb: $r_{\text{pred.meas}} = 0.85$; *N. alpina* Sdb: $r_{\text{pred.meas}} = 0.89$), we utilized the following regression equation to estimate foliage biomass

$$Fdb = 0.0010272 \times D^{1.762} \times SH^{0.341}.$$

We then calculated the total aboveground biomass (A) of each seedling by adding the measured Sdb and the estimated Fdb, and finally we calculated the ratio between Rdb and A (R/A).

Statistical analysis

In order to visualize the relationships between the traits considered, and their ability to discriminate between the populations, we performed a Principal Component Analysis (PCA) for each species with the ‘FactoMineR’ package in R 3.3.0 (Husson et al. 2017), with all traits taken as active variables and population as a supplementary variable.

In order to test differences between populations and variability among families, ANOVA for each of the traits considered was performed under the following nested mixed model:

$$y_{ijk} = \mu + \rho_i + \beta_j + \varphi_k(\rho_i) + e_{ijk}$$

where y_{ijk} is the value of the variable measured on the seedling from the k th family nested in the i th population located in the j th block; μ is the general mean of the variable, ρ_i is the effect (fixed) of the i th population; β_j is the effect (random) of the j th block; $\varphi_k(\rho_i)$ is the effect (random) of the k th family within the i th population, and e_{ijk} is the residual error $\sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

ANOVA tests were performed with the ‘lmer’ function of the ‘lme4’ package (Bates et al. 2015) in R 3.3.0., with restricted maximum likelihood (REML) estimation. For post hoc population mean comparisons, we applied simultaneous multiple Tukey contrasts with the ‘glht’ function in the ‘multcomp’ package version 1.4-5 (Hothorn et al. 2008) in R 3.3.0. The normality of the data was assessed using a histogram and qq plot for each variable. Homoscedasticity was checked by a graph of residuals versus predicted values, and in the cases of heteroscedasticity we carried out a natural log transformation (nl).

To evaluate the contribution of random effects to the model, we performed likelihood ratio tests (LRTs) for the null hypothesis that the simpler model (fitted after removing the random effect of interest from the complete model) is not different from the complete model.

In order to analyze geographical patterns of variation, we also performed correlation tests between population means of the traits considered and their main environmental features (latitude, altitude, mean annual precipitation, mean January temperature, mean July temperature and mean annual UNEP aridity index). In order to account for possible maternal effects linked to seed size, we also estimated correlations of the traits with the weight of 100 filled seeds.

Genetic parameters

Additive genetic variance is the basic parameter for estimating quantitative genetic variation within a population, and is a function of the family variance estimated experimentally. The multiplier factor of family variance in the formula of additive variance depends on the degree of kinship between members of families used, which is 2 for full-sibs and 4 for half-sibs. Open pollinated families are usually considered as half-sibs, although they are really a mixture of half and full-sibs in unknown proportions. In a previous study (Pastorino et al. 2013)

we estimated the kinship coefficient (k) of some Argentine populations of *N. alpina* and *N. obliqua*. Since they were not the same populations as in the present study we took those estimations as a reference, using a mean value, thus obtaining the result: $k_{alpina} = 0.30080$ and $k_{obliqua} = 0.27393$. Then, the additive genetic variance was estimated as:

$$\sigma_A^2 = \frac{1}{k} \cdot \sigma_f^2$$

where σ_A^2 is the additive genetic variance and σ_f^2 is the family variance.

Since the value of σ_A^2 is a function of the units used, the additive genetic coefficient of variation after Houle (1992) was calculated in order to make direct comparison possible between different variables:

$$CV_A = 100 \cdot \frac{\sqrt{\sigma_A^2}}{X}$$

where X is the variable mean.

Another useful parameter used to estimate intra-population variation is narrow-sense heritability (h^2), which was consequently estimated for each population and variable through the components of variance analysis, and according to the equation:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2} = \frac{\sigma_A^2}{(\sigma_f^2 + \sigma_b^2 + \sigma_e^2)}$$

where σ_P^2 is the phenotypic variance, σ_b^2 is the variance of the block, and σ_e^2 is the error variance.

The standard error (SE) of the heritability was calculated using the formula:

$$SE_{h^2} = 1/k \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot [1 + (n-1) \cdot h^2/1/k]^2 \cdot (1 - h^2/1/k)^2}{n \cdot (n-1) \cdot (f-1)}}$$

where f is the number of families and n is the number of individuals within each family (Falconer and Mackay 1996).

For each species we calculated the phenotypic correlation (Pearson's correlation coefficient: r_p) and additive genetic correlation (r_A) between all the possible combinations of the traits for all individuals of each species as a pool. For these parameters we preferred to pool the data of the individuals of all populations from each species to better fit the correlations since we intend to characterize the relationship between the traits instead of the populations. We utilized the following formulae:

$$r_p = \frac{Cov_{xy}}{\sqrt{\sigma_x^2 * \sigma_y^2}} \text{ and } r_A = \frac{Cov_{fxy}}{\sqrt{\sigma_{fx}^2 * \sigma_{fy}^2}}$$

where Cov_{xy} is the covariance between variables x and y , and σ_x^2 and σ_y^2 are the variances of the variables (Falconer and Mackay 1996), while σ_{fx}^2 and σ_{fy}^2 are the family variances of the

variables and $Cov_{f_{xy}}$ is the family covariance estimated according to O'Neill et al. (2001) as:

$$Cov_{f_{xy}} = \frac{\sigma_{f_{xy}}^2 - \sigma_{f_x}^2 - \sigma_{f_y}^2}{2}$$

where $\sigma_{f_{xy}}^2$ is the family variance of a new variable resulting from the sum of both variables. Standard errors of both correlations were calculated by:

$$SE_{r_p} = \sqrt{\frac{1 - r_p^2}{N - 2}} \text{ and } SE_{r_A} = \sqrt{\frac{(1 - r_A^2)^2}{f - 1}}$$

where N is the total number of individuals sampled and f is the number of families (Visscher 1998).

Partitioning the phenotypic variance of each variable into its components, and particularly distinguishing components of variance among and within populations, allows us to calculate differentiation among populations in quantitative traits, Q_{ST} (Spitze 1993):

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_{pop}^2}{(\sigma_{pop}^2 + 2 \cdot \sigma_A^2)}$$

where σ_{pop}^2 is the variance among populations estimated with the described statistical model, but considering population as a random effect.

Results

Variation among- and within-populations of *N. alpina*

In the *N. alpina* trial, the overall mean for shoot height (SH) was 5.4 cm, Tromen and Queñi being the populations with the shortest seedlings (4.9 cm on average) and Paimún the population with the tallest ones (6.3 cm on average). The overall mean for root collar diameter (D) was 2.04 mm, Tromen having the thinnest seedlings (1.65 mm) and Paimún the thickest ones (2.48 mm). The mean length of the longest root (RL) was 29.8 cm, which is more than five times the mean shoot height. Stem dry biomass (Sdb) and root dry biomass (Rdb) varied greatly between populations, with the highest population means having twice the value of the lowest ones, and again: Tromen was the population with the lowest values and Paimún the population with the largest ones. However, the ratio between root and stem dry biomass (R/S) was similar in all populations, with an overall mean of 3.77. Including foliage dry biomass, the ratio between the belowground and the aboveground biomass (R/A) reached a mean value of 1.62; that is, about half the average R/S. Finally, specific root length (SRL) had a mean value across populations of 1.24 m/g, with the highest population mean in Tromen (1.61 m/g), and the lowest in Paimún (0.84 m/g) (see Table 2).

In PCA, axis 1 accounted for 55.15% of the overall variation and was related to all variables except R/S and R/A, with a negative relationship between SRL and the other variables measured. Axis 2 explained 23.21% of the variance, and was associated with R/S and R/A. Populations, as supplementary variables, were separated on both axes,

Table 2 Mean and its standard deviation (sd), heritability (h^2) and its standard error (SE), additive genetic variance (σ^2_A) and additive genetic coefficient of variation (CVA) of all traits considered in each *N. alpina* natural population included in the common garden trial

	B	C	P	PA	Qe	Tr	TT	Mean	Q _{ST}
<i>Nothofagus alpina</i>									
SH (cm)									
Mean (sd)	5.7 (1.5)	5.0 (0.9)	6.3 (1.4)	5.6 (1.0)	4.9 (1.0)	4.9 (0.8)	5.5 (1.0)	5.4 (1.2)	0.47
h^2 (SE)	0 (0.02)	0.65 (0.25)	0 (0.02)	0.41 (0.17)	0.24 (0.12)	0.56 (0.21)	0 (0.01)	0.27 (0.12)	
σ^2_A	0	0.6	0	0.4	0.3	0.4	0	0.2	
CV _A	0	15.03	0	11.29	10.62	12.81	0	7.11	
Tukey	cd	ab	d	c	a	ab	bc		
D (mm)									
Mean (sd)	2.21 (0.48)	2.00 (0.45)	2.48 (0.57)	1.91 (0.44)	1.94 (0.43)	1.65 (0.40)	2.05 (0.44)	2.04 (0.51)	0.35
h^2 (SE)	0 (0.02)	0.57 (0.22)	0.53 (0.24)	0.03 (0.03)	0.53 (0.22)	0.17 (0.08)	0.02 (0.02)	0.26 (0.12)	
σ^2_A	0	0.12	0.18	0.01	0.10	0.03	0	0.06	
CV _A	0	17.12	17.00	4.04	16.26	10.28	2.89	9.66	
Tukey	cd	bc	d	ab	b	a	bc		
RL (cm)									
Mean (sd)	33.3 (9.9)	29.8 (9.0)	31.4 (9.0)	29.1 (8.2)	29.9 (7.6)	25.4 (8.8)	29.8 (8.0)	29.8 (8.8)	0.30
h^2 (SE)	0 (0.02)	0 (0.02)	0 (0.02)	0.15 (0.08)	0.11 (0.07)	0.62 (0.23)	0.01 (0.02)	0.13 (0.06)	
σ^2_A	0	0	0	10.2	6.2	49.3	0.6	9.5	
CV _A	0	0	0	10.95	8.32	27.64	2.56	7.07	
Tukey	b	b	b	ab	b	a	b		
Sdb (g)									
Mean (sd)	0.1099 (0.053)	0.0831 (0.039)	0.1317 (0.067)	0.0863 (0.054)	0.0763 (0.036)	0.0564 (0.026)	0.0934 (0.040)	0.0912 (0.051)	0.36
h^2 (SE)	0 (0.02)	0.57 (0.22)	0.27 (0.14)	0.18 (0.09)	0.54 (0.23)	0 (0.01)	0.20 (0.09)	0.25 (0.12)	
σ^2_A	0	0.0009	0.0012	0.0005	0.0007	0	0.0003	0	
CV _A	0	35.79	26.57	26.56	35.38	0	19.35	20.52	
Tukey	cd	b	d	b	b	a	bc		

Table 2 (continued)

	B	C	P	PA	Qe	Tr	TT	Mean	Q _{ST}
Rdb (g)									
Mean (sd)	0.4728 (0.270)	0.3113 (0.176)	0.5187 (0.318)	0.3031 (0.194)	0.2970 (0.195)	0.2184 (0.128)	0.3517 (0.202)	0.3512 (0.237)	0.37
h ² (SE)	0 (0.02)	0.03 (0.03)	0.35 (0.18)	0.32 (0.14)	0.39 (0.18)	0.23 (0.10)	0 (0.01)	0.19 (0.01)	
σ ² _A	0	0.0009	0.0354	0.0125	0.0151	0.0038	0	0.01	
CV _A	0	9.64	36.26	36.9	42.26	28.33	0	21.91	
Tukey	cd	b	d	ab	ab	a	bc		
R/S									
Mean (sd)	4.26 (1.46)	3.69 (1.10)	3.80 (1.08)	3.53 (1.39)	3.68 (1.25)	3.90 (1.92)	3.68 (1.27)	3.77 (1.37)	-
h ² (SE)	0.47 (0.22)	0.03 (0.03)	0.12 (0.08)	0.10 (0.06)	0.32 (0.15)	0.34 (0.14)	0 (0.01)	0.20 (0.10)	
σ ² _A	1.02	0.04	0.14	0.20	0.50	1.29	0	0.46	
CV _A	23.75	5.33	9.90	12.62	19.21	29.07	0	14.27	
Tukey	a	a	a	a	a	a	a		
SRL(m/g)									
Mean (sd)	0.92 (0.52)	1.27 (0.73)	0.84(0.62)	1.39 (0.94)	1.47 (0.8)	1.61 (1.34)	1.17 (0.80)	1.24 (0.90)	0.63
h ² (SE)	0 (0.02)	0.07 (0.05)	0 (0.02)	0 (0.02)	0.05 (0.04)	0.98 (0.36)	0 (0.01)	0.16 (0.07)	
σ ² _A	0	0.04	0	0	0.10	1.90	0	0.30	
CV _A	0	17.4	0	0	18.7	107.6	0	20.5	
Tukey	a	ab	a	b	b	b	ab		
R/A									
Mean (sd)	1.88 (0.63)	1.58 (0.48)	1.62 (0.47)	1.54 (0.59)	1.56 (0.54)	1.62 (0.76)	1.62(0.55)	1.62 (0.58)	0.43
h ² (SE)	0.39 (0.18)	~0 (0.02)	0.03 (0.03)	0.12 (0.07)	0.31 (0.15)	0.37 (0.19)	0 (0.01)	0.17 (0.09)	
σ ² _A	0.16	<0.01	<0.01	0.04	0.09	0.22	0	0.07	
CV _A	29.05	~0	6.07	16.83	23.96	36.92	0	16.12	
Tukey	b	ab	ab	a	a	ab	ab		

Tukey tests results are presented (different letters indicate significant differences)

SH shoot height D; root collar diameter; RL length of the longest root, Sdb stem dry biomass, Rdb root dry biomass, R/S ratio between root and shootdry biomass, SRL specific root length, R/A ratio between root and aboveground biomass

but particularly on axis 1 (Fig. 2). It is clear in this graph how different the populations Tromen and Paimún are, as they lie at the extreme ends of opposite quadrants.

Differences between populations were shown to be significant for all variables except the ratio between root and stem dry biomass ($P_{R/S}=0.1249$). According to the post hoc Tukey tests, Tromen, with the smallest seedlings, was the most different population, followed by Paimún, which produced the largest seedlings (Table 2).

Considering the complete statistical model, the family factor was significant only for D, Sdb and Rdb, and even in these cases it explained just 8.13, 6.60 and 7.22% of the total variance, respectively. Intra-population variation was quite variable among populations and traits, but in general tended to be low (mean heritability and mean additive genetic coefficients of variation of all populations for all variables: $h^2=0.20$ and $CV_A=14.65$). Tromen showed the highest inter-trait mean h^2 and CV_A ($h^2_{Tr}=0.42$; $CV_{A,Tr}=30.82$), while h^2 and CV_A were estimated as zero for several populations and traits. In terms of heritability, the highest intra-population variation was estimated in Tromen for SRL ($h^2_{SRL}=0.98$).

All correlations were significant except for the phenotypic correlations between SH and R/S, and SH and R/A. Phenotypic correlations were in general moderate to high, the highest being between R/S and R/A ($r_{P,R/S,R/A}=0.96$) (Table 3). SRL phenotypic correlations with all the other traits (except RL) were negative and moderate. Additive genetic correlations were generally high, the highest estimated value being even higher than 1 ($r_{A,D-RL}=1.14$). Root length was highly genetically correlated with all traits. A positive correlation was found between Shoot height and SRL, but these traits were inversely correlated with all the other traits.

Differentiation between populations was moderate on average ($Q_{STmean}=36\%$), with the lowest estimates in RL ($Q_{STRL}=30\%$) and the highest in SRL ($Q_{STSRL}=63\%$) (R/S was the only trait with non-significant differences between populations, thus assuming $Q_{ST}=0\%$).

Regarding the correlation tests performed to analyze geographical patterns of variation, no relationship could be shown between any environmental variable of the *N. alpina*

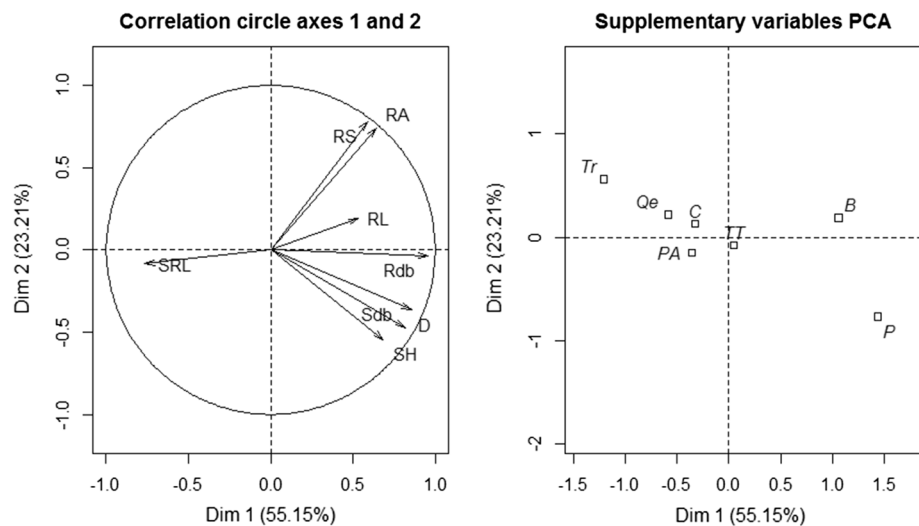


Fig. 2 *Nothofagus alpina* PCA graphics; on the left: correlation circle of axes 1 and 2; on the right: supplementary variables on the principal components plane

Table 3 Phenotypic (above diagonal) and additive genetic (below diagonal) correlations between morphological traits of *N. alpina* seedlings and their standard errors (in brackets)

	Shoot height (SH)	Diameter (D)	Root length (RL)	Stem dry biomass (Sdb)	Root dry biomass (Rdb)	Rdb-Sdb ratio (R/S)	Specific root length (SRL)	Below/above ground biomass (R/A)
SH (cm)	1.00	0.67 (0.03)	0.23 (0.04)	0.74 (0.03)	0.65 (0.03)	0.01 (n.s.)	-0.45 (0.04)	0.08 (n.s.)
D (mm)	-0.03 (0.12)	1.00	0.38 (0.04)	0.84 (0.02)	0.83 (0.02)	0.23 (0.04)	-0.64 (0.03)	0.23 (0.04)
RL (cm)	-0.74 (0.05)	1.14 (0.03)	1.00	0.35 (0.04)	0.47 (0.04)	0.38 (0.04)	-0.14 (0.04)	0.41 (0.04)
Sdb (g)	-0.06 (0.12)	0.96 (0.01)	0.89 (0.02)	1.00	0.82 (0.02)	0.10 (0.04)	-0.53 (0.04)	0.19 (0.04)
Rdb (g)	-0.18 (0.12)	0.92 (0.02)	1.01 (0.003)	0.93 (0.02)	1.00	0.54 (0.04)	-0.64 (0.03)	0.60 (0.03)
R/S	-0.44 (0.09)	0.38 (0.1)	0.94 (0.01)	0.21 (0.11)	0.52 (0.09)	1.00	-0.50 (0.04)	0.96 (0.01)
SRL (m/g)	0.13 (0.12)	-0.54 (0.08)	-1.03 (0.01)	-0.39 (0.1)	-0.43 (0.09)	-0.77 (0.05)	1.00	-0.54 (0.04)
R/A	-0.29 (0.11)	0.37 (0.1)	0.89 (0.02)	0.29 (0.11)	0.59 (0.08)	0.97 (0.01)	-0.78 (0.05)	1.00

n.s. not significant

populations and the means of the considered seedling traits. Neither were significant correlations found with seed weight.

Variation among- and within-populations of *N. obliqua*

The overall mean height (SH) of seedlings in the *N. obliqua* trial was 6.8 cm, the Epulauquen population presenting the lowest mean (4.8 cm) and the Catritre Alto population the highest mean (8.6 cm, which is almost double the former). Overall root collar diameter (D) was 1.61 mm, with small differences between population means. The average length of the longest root (RL) was 30.2 cm (that is, almost five times the mean SH), varying between 25.8 cm in Yuco and 34.0 cm in Pilo Lil. Dry biomass was also quite different between aerial and radical portions, since the mean root dry biomass (Rdb: 0.2785 g) was almost three times greater than the mean stem dry biomass (Sdb: 0.0971 g). The ratio between root and stem dry biomass (R/S) varied from 2.55 in Catritre Bajo to 3.50 in Epulauquen, with an overall average of 2.97 (Table 4). The average R/A across populations was almost half of the mean R/S value. Finally, the mean ratio between root length and root biomass (SRL) was 1.86 m/g (Table 4).

In the PCA, axis 1 accounted for 54.87% of the overall variance and was related to all traits except R/S and R/A. This axis showed a negative relationship between SRL and the other traits. Axis 2 described 25.31% of the variance and was specifically related to R/S and R/A. Populations, as supplementary variables, were separated by axis 2 into two main groups, with Epulauquen, Quillén and Ñorquinco above and Catritre B, Yuco and Nonthué below, Catritre A and Pilo Lil being positioned between these two groups (Fig. 3).

Significant differences between populations were shown for all variables except D ($P_D=0.1944$) and Sdb ($P_{Sdb}=0.4066$). The Tukey tests showed that few populations determined these significant differences. Epulauquen was one of the most differentiated populations, but did not differ from Ñorquinco and Quillén for any trait (Table 4). It is remarkable that although the seedlings of Epulauquen were the shortest, they were among those with the longest roots, and in fact presented the highest root dry biomass, thus resulting in the population with the highest R/S and R/A. Similarly, there was another set of populations which did not differ for any trait: Catritre Bajo, Catritre Alto, Yuco and Nonthué, which was reflected in the PCA grouping.

For both species there is remarkable consistency in the discriminating power of the traits in the PCA, with all but two traits explaining the variation on the principal axis, which accounts for ~55% of the variance. The remaining two traits (R/S and R/A, which are highly correlated) explained ~25% of the variance on the secondary axis. Thus, the ratio between root and aerial biomasses, although accounting for a small part of the variance, did explain the part that was not explained by the other six traits. Consequently, this secondary axis contributed decisively to the separation of the populations studied, especially in *N. obliqua*.

Analyses of variance showed that the family factor was significant only for SH and Rdb, and even in these two cases it explained a minimal part of the total variance (6.85 and 8.27% respectively). Despite some moderate heritability values, intrapopulation variation was rather low (average of all populations for all variables: $h^2=0.16$; $CV_A=21.09$), with the exception of the Epulauquen population, which more than doubled these mean values, with $h^2=0.38$ and $CV_A=45.08$ (Table 4).

Only a small number of phenotypic correlations were not significant (D vs. R/S; D vs. R/A; Sdb vs. R/S and Sdb vs. R/A). The highest correlations were the same as for *N.*

alpina ($r_{P,D-Sdb}=0.81$; $r_{P,D-Rdb}=0.83$; $r_{P,Rdb-Sdb}=0.88$; $r_{P,R/S-R/A}=0.85$) plus two more ($r_{P,D-SH}=0.80$; $r_{P,SH-Sdb}=0.83$). SRL was significantly, negatively and moderately correlated with all traits. Additive genetic correlations were high, even greater than 1 in several cases. Correlations greater than the theoretical upper limit of 1 are rare but possible values, since the procedure used is an estimation of the real correlations, where the non-additive genetic effects could be included in the estimates of genetic variance and covariance (Lynch and Walsh 1998). Correlations involving RL were a special case because estimated family variance was nil, so it was not possible to calculate additive genetic correlations (Table 5).

Inter-population variation was moderate as an average of all traits (mean $Q_{ST}=0.31\%$). However, worthy of note is the high differentiation estimated in R/A and R/S ($Q_{ST,R/A}=89\%$; $Q_{ST,R/S}=61\%$) (Table 4).

With respect to analysis of the geographical patterns of variation, significant correlations were shown for *N. obliqua* between the altitude of their populations and the traits SH, D, R/S, SRL and R/A; and also between the weight of 100 filled seeds (100 SW) and SH.

Discussion and conclusions

The family factor was significant in just a few traits, and even in those cases represented a low proportion of the total variability. In terms of CV_A , within-population variation was low in both species, but slightly lower in *N. alpina*. This population genetics parameter is a proxy for evolvability (Houle 1992), namely the ability of an organism to evolve, and mainly to adapt. Therefore, it seems that the analyzed populations of both species, but especially those of *N. alpina*, have a low capacity for adaptation; that is, a low ability to vary the frequency of their genetic variants in order to survive in situ. This is the main result of the present study. Of course, this low intra-population variation pattern is not constant but on the contrary varies between populations and traits.

In a previous *N. obliqua* nursery trial performed with 4 of the 8 populations used in the present study, Barbero (2014) found even lower CV_A values for several growth, morphological and phenological traits in seedlings (across traits average: $CV_{A,E}=9.31$; $CV_{A,PL}=5.50$; $CV_{A,Y}=6.93$; $CV_{A,CaB}=4.59$). Similar low values were estimated for *Fagus sylvatica* and Swedish populations of *Quercus robur* (Baliuckas et al. 2001), and for *Betula pendula*, *Alnus glutinosa* and *Quercus robur*, measured at ages 4–9 (Baliuckas and Pliura 2008) in bud flushing, autumn leaf coloring and height traits, CV_A rarely exceeding 25 in both studies. However, these results contrast with those of *Quercus robur* from six Lithuanian populations growing in two different sites, where the CV_A of adaptive traits reached a mean value of 18.52 at one of the sites and 31.74 at the other (Baliuckas and Pliura 2003).

Since additive genetic correlations are in general greater than phenotypic correlations, environmental correlations should consequently be low (Lynch and Walsh 1998), which highlights the possibility of using a combination of several of these traits as early selection criteria. In addition to these general trends, a surprising contrast arises between the two species: shoot height showed positive and high or moderate genetic correlations with the other traits in *N. obliqua* (except with SRL, which is negative), but negative and low or moderate genetic correlations in *N. alpina* (except with SRL, which is positive), although this contrast is not verified with respect to phenotypic correlations. This result indicates that: (1) the association between shoot height and the other traits is poorly inherited in *N. alpina*, while the opposite is true for *N. obliqua*; this could be evidence of differential

Table 4 Mean and its standard deviation (sd), heritability (h^2) and its standard error (SE), additive genetic variance (σ_A^2) and additive genetic coefficient of variation (CV_A) of all traits considered in each *N. obliqua* natural population included in the common garden trial

	CaA	CaB	E	N	Nor	PL	Qi	Y	Mean	Q _{ST}
<i>Nothofagus obliqua</i>										
SH (cm)										
Mean (sd)	8.6 (5.8)	7.6 (5.6)	4.8 (2.9)	7.3 (5.5)	6.4 (4.1)	7.2 (4.9)	5.5 (3.3)	6.6 (4.2)	6.8 (4.8)	0.09
h^2 (SE)	0.38 (0.17)	0.21 (0.10)	0.30 (0.13)	0.38 (0.18)	0 (0.07)	0.14 (0.07)	0.64 (0.33)	0.09 (0.05)	0.27 (0.14)	
σ_A^2	13.4	6.8	2.6	11.5	0	3.4	7.4	1.6	5.9	
CV_A	42.57	34.63	33.72	46.29	0	25.61	49.06	19.27	31.39	
Tukey	c	bc	a	bc	ac	bc	ab	ac		
D (mm)										
Mean (sd)	1.67 (0.66)	1.51 (0.70)	1.74 (0.71)	1.49 (0.56)	1.79 (0.80)	1.62 (0.69)	1.58 (0.58)	1.53 (0.61)	1.61 (0.67)	–
h^2 (SE)	0 (0.02)	0.25 (0.11)	0.38 (0.16)	0.06 (0.05)	0.01 (0.08)	0.03 (0.03)	0.22 (0.15)	0.09 (0.05)	0.13 (0.08)	
σ_A^2	0	0.13	0.20	0.02	0.01	0.02	0.07	0.03	0.06	
CV_A	0	23.53	25.59	9.35	5.51	7.72	17.14	12.02	12.61	
Tukey	a	a	a	a	a	a	a	a		
RL (cm)										
Mean (sd)	32.0 (15.2)	27.8 (15.9)	32.5 (12.6)	28.3 (13.3)	31.6 (13.3)	34.0 (15.0)	29.8 (13.2)	25.8 (14.9)	30.2 (14.5)	0.38
h^2 (SE)	0.04 (0.04)	0.11 (0.06)	0.48 (0.19)	0 (0.02)	0.06 (0.01)	0 (0.02)	0.26 (0.17)	0 (0.02)	0.12 (0.08)	
σ_A^2	9.1	27.9	76.7	0	9.8	0	45.8	0	21.2	
CV_A	9.43	19.01	26.94	0	9.90	0	22.76	0	11.01	
Tukey	ab	ab	b	ab	ab	b	ab	a		
Sdb (g)										
Mean (sd)	0.1069 (0.129)	0.1032 (0.129)	0.0991 (0.111)	0.0963 (0.107)	0.1073 (0.107)	0.0997 (0.102)	0.0916 (0.121)	0.0780 (0.084)	0.0971 (0.111)	–
h^2 (SE)	0 (0.02)	0.25 (0.11)	0.44 (0.18)	0.14 (0.08)	0 (0.07)	0 (0.02)	0.03 (0.06)	0 (0.02)	0.11 (0.07)	
σ_A^2	0	0.0042	0.0055	0.0016	<0.0001	0	0.0005	0	0.0015	
CV_A	0	63.19	75.08	41.57	0	0	23.74	0	25.45	
Tukey	a	a	a	a	a	a	a	a		

Table 4 (continued)

	CaA	CaB	E	N	Nor	PL	Qi	Y	Mean	Q _{ST}
Rdb (g)										
Mean (sd)	0.2864 (0.251)	0.2860 (0.437)	0.3589 (0.447)	0.2275 (0.236)	0.3444 (0.317)	0.2867 (0.281)	0.2357 (0.200)	0.2006 (0.209)	0.2785 (0.324)	0.03
h ² (SE)	0 (0.02)	0.26 (0.12)	0.56 (0.22)	0.23 (0.12)	0 (0.07)	0 (0.02)	0 (0.04)	0 (0.02)	0.13 (0.08)	
σ^2_A	0	0.0505	0.1154	0.0131	0	0	<0.0001	0	0.0224	
CV _A	0	78.57	94.64	50.24	0	0	0	0	27.93	
Tukey	ab	ab	b	ab	ab	ab	ab	a		
R/S										
Mean (sd)	2.87 (0.87)	2.55 (0.86)	3.50 (1.17)	2.63 (0.86)	3.43 (1.04)	3.12 (1.31)	3.25 (1.08)	2.54 (0.98)	2.97 (1.10)	0.61
h ² (SE)	0 (0.02)	0 (0.02)	0.17 (0.08)	0.65 (0.27)	0 (0.07)	0 (0.02)	0.17 (0.13)	0.04 (0.03)	0.13 (0.08)	
σ^2_A	0	0	0.23	0.50	0	0	0.21	0.04	0.12	
CV _A	0	0	13.61	27.02	0	0	14.3	7.87	7.85	
Tukey	ad	a	e	abc	de	cde	bde	ab		
SRL(m/g)										
Mean (sd)	1.64 (1.05)	2.30 (2.26)	1.61 (1.02)	1.95 (1.11)	1.38 (0.85)	1.98 (1.26)	1.74 (0.90)	2.02 (1.25)	1.86 (1.33)	0.49
h ² (SE)	0.48 (0.20)	0.15 (0.08)	0.31 (0.13)	0.25 (0.13)	0.57 (0.39)	0.11 (0.07)	0 (0.04)	0.06 (0.04)	0.24 (0.14)	
σ^2_A	0.55	0.84	0.34	0.32	0.42	0.19	0	0.10	0.35	
CV _A	57.8	60.3	46.0	40.7	55.4	30.8	0.0	22.8	39.24	
Tukey	ab	a	b	ab	ab	ab	ab	ab		
R/A										
Mean (sd)	1.40 (0.46)	1.22 (0.43)	1.77 (0.67)	1.26 (0.44)	1.68 (0.47)	1.46 (0.56)	1.55 (0.64)	1.17 (0.46)	1.43 (0.57)	0.89
h ² (SE)	0.10 (0.06)	0 (0.02)	0.03 (0.03)	0.44 (0.02)	0 (0.07)	0.06 (0.05)	0.20 (0.15)	0.32 (0.14)	0.14 (0.09)	
σ^2_A	0.02	0	0.01	0.09	0	0.02	0.08	0.07	0.04	
CV _A	12.14	0	8.36	26.19	0	11.88	23.28	24.11	13.25	
Tukey	abc	ab	d	ab	cd	bc	bd	a		

Tukey tests results are presented (different letters indicate significant differences)

SH shoot height, D root collar diameter, RL length of the longest root, Sdb stem dry biomass, Rdb root dry biomass, R/S ratio between root and shoot dry biomass, SRL specific root length, R/A ratio between root and aboveground biomass

adaptation to the contrasting natural ranges of the two species; and (2) *N. alpina* appears to be better adapted for light competition than *N. obliqua*, since taller seedlings will not be the ones with a larger biomass or a better ratio between belowground and aboveground biomasses.

Inter-population variation was moderate as an average of all traits in *N. alpina* and *N. obliqua* (mean $Q_{ST\ N.alpina}=36\%$; $Q_{ST\ N.obliqua}=31\%$). Comparison between this quantitative differentiation parameter and the F_{ST} estimated with neutral markers can shed light on the role of adaptation in modelling the genetic variation patterns of natural populations (Merilä and Crnokrak 2001). We did not analyze our seedlings with neutral markers, but there are studies of Argentinian populations (including the ones we sampled) of both species that reported F_{ST} values estimated with neutral markers, and these can be considered as a general reference. For *N. obliqua* a F_{ST} of 5% was estimated with isozymes (Azpilicueta et al. 2009), and with SSRs (Azpilicueta et al. 2013). For *N. alpina*, F_{ST} was estimated at 5% with isozymes (Marchelli and Gallo 2004) and at 6% with SSRs (Azpilicueta et al. 2013). Given that the Q_{ST} values we estimated are higher than published F_{ST} values, we could consequently recognize a probable adaptation effect to the present environmental conditions in the quantitative genetic variation patterns controlling the traits studied.

Two groups of undifferentiated populations were revealed through the Tukey tests and the PCA in the analysis of *N. obliqua* seedlings: a northern group formed by Epulauquen, Ñorquinco and Quillén, and a southern group comprising Catritre Bajo, Catritre Alto, Yuco and Nonthué (these four populations are distributed in the Lácar lake basin). The first group is characterized by higher altitude, ranging from 1050 to 1500 m asl, while the Lácar group grows at an altitude between 650 and 850 m asl. Pilo Lil population, with its 900 m asl, only differs from the populations of the northern group in shoot height. Besides having an intermediate altitude, this population stands out as being the driest, which is an environmental condition with an effect close to that of high altitude (e.g. Yang et al. 2010). Consequently, altitude (and relatedly, drought stress) could be the environmental driver

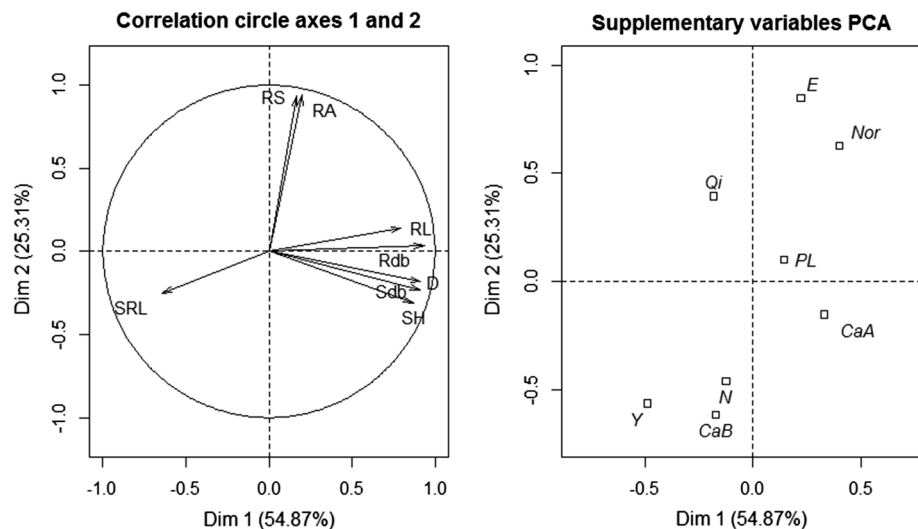


Fig. 3 *Nothofagus obliqua* PCA graphics; on the left: correlation circle of axes 1 and 2; on the right: supplementary variables on the principal components plane

Table 5 Phenotypic (above diagonal) and additive genetic (below diagonal) correlations between morphological traits of *N. obtiqua* seedlings and their standard errors (in brackets)

	Shoot height (SH)	Diameter (D)	Root Length (RL)	Stem dry biomass (Sdb)	Root dry biomass (Rdb)	Rdb-Sdb ratio (R/S)	Specific root length (SRL)	Below/Above ground biomass (R/A)
SH (cm)	1.00	0.80 (0.03)	0.63 (0.03)	0.83 (0.02)	0.74 (0.03)	-0.13 (0.04)	-0.48 (0.04)	-0.10 (0.04)
D (mm)	0.79 (0.04)	1.00	0.67 (0.03)	0.81 (0.03)	0.83 (0.02)	0.04 (n.s.)	-0.55 (0.04)	-0.05 (n.s.)
RL (cm)	n.e.	n.e.	1.00	0.63 (0.03)	0.70 (0.03)	0.24 (0.04)	-0.32 (0.04)	0.29 (0.04)
Sdb (g)	1.12 (0.03)	1.51 (0.14)	n.e.	1.00	0.88 (0.02)	-0.08 (n.s.)	-0.48 (0.04)	0.01 (n.s.)
Rdb (g)	0.59 (0.07)	1.02 (0.004)	n.e.	1.29 (0.07)	1.00	0.18 (0.04)	-0.51 (0.04)	0.24 (0.04)
R/S	0.31 (0.1)	0.45 (0.09)	n.e.	1.24 (0.06)	1.56 (0.16)	1.00	-0.27 (0.04)	0.85 (0.02)
SRL (m/g)	-0.76 (0.05)	-0.93 (0.01)	n.e.	-1.44 (0.12)	-0.90 (0.02)	-1.29 (0.08)	1.00	-0.32 (0.04)
R/A	0.12 (0.11)	0.33 (0.1)	n.e.	0.29 (0.1)	0.63 (0.07)	1.43 (0.11)	-0.78 (0.04)	1.00

n.s. not significant, *n.e.* cannot be estimated due to the nil value of one trait's family variance

of an adaptation process that would have led to the differentiation of these two groups of populations.

An alternative hypothesis could be proposed, based on information obtained through selective-neutral genetic markers. An analysis of molecular variance carried out with isozymes showed a latitudinal structure with two main groups, north and south of Lanín volcano (39°40'S) (Azpilicueta et al. 2009); the same two groups as in the present study were reported, according to cpDNA haplotypes (Azpilicueta et al. 2013). Moreover, by means of SSRs markers, the same four populations included in our northern group were shown to belong to a single genetic zone (Azpilicueta et al. 2013). These north and south groups were interpreted as having originated from two different glacial refugia (Azpilicueta et al. 2009), that is, ancient differentiation due to demographic causes.

Considering the predicted impact of climate change, R/S, R/A and SRL are probably the most relevant traits among those analyzed in the present study (Padilla and Pugnaire 2007; Grossnickle 2012; Matías et al. 2014; Ledo et al. 2018). As mentioned previously, differentiation between *N. obliqua* populations was moderate on average, but high in R/A, R/S and SRL (in decreasing order of importance). The population with the highest R/A and R/S mean values was Epulauquen, which must be highlighted in this respect, since it is probably largely responsible for this differentiation (the distinctive character of this population has been reported in a previous study by Azpilicueta et al. 2014). Thus, some populations produce seedlings with high R/A and R/S ratios, probably adapted to drought conditions, and others produce seedlings with low R/A and R/S ratios, probably adapted to competition for light. This result is in accordance with the low intra-population variation of this species in these traits, with the remarkable exception of the Nonthué population. Hence, in relation to R/A and R/S, local adaptation seems a likely response to climate change only in Nonthué, and the persistence of *N. obliqua* could depend on the already-adapted populations. A recent study on *N. obliqua* resprouting capacity supports this idea, suggesting that plastic responses and migration may also play a role in species persistence (Aparicio et al. 2015). Since the populations supposedly adapted to drought are quite distant (some hundred kilometers across the mountains) from those not adapted, natural migration is uncertain, so an assisted migration strategy (e.g., Benito-Garzón and Fernández-Manjarrés 2015) could be the key to conservation of the threatened populations in a scenario of extreme drought.

According to the post hoc comparisons, Tromen was the most different *N. alpina* population. This is consistent with previous studies based on Chloroplast DNA markers, (Marchelli et al. 1998; Marchelli and Gallo 2006), where groups of north and south populations were proposed according to different haplotypes, Tromen being the only population in our study that belonged to the north group. Likewise, based on SSRs, Azpilicueta et al. (2013) could not cluster Tromen with other *N. alpina* populations. Finally, Tromen also differs from other populations in seed traits (Marchelli and Gallo 1999).

Differentiation between *N. alpina* populations was moderate on average, and in R/A in particular, but null in R/S and relatively high in SRL (Tromen was the population with the highest SRL mean value). This relatively high differentiation in SRL could also be interpreted as a consequence of adaptation to different environments.

Two points should be mentioned in particular. Two sites of a single population were sampled in *N. obliqua* (Catritre Alto and Bajo). In spite of their contrasting altitudes they could not be differentiated by any of the traits considered (according to the Tukey tests). We could only mention a certain differentiation trend visualized in the PCA graphic. Another detail is related to seed weight. It was only possible to demonstrate that this parameter is correlated with shoot height in *N. obliqua*, and probably this case is related

to the high altitude of the population with the heaviest seeds (Epulauquen). Therefore, evidence of maternal effects cannot be reported. On the other hand, the altitude of the sampled populations was correlated with several traits in *N. obliqua*, but not in *N. alpina*. This could simply reflect the contrasting ranges of these species.

In conclusion, the two species presented similar levels of intra- and inter population variation for the seedling traits considered, some of which are likely to be related to adaptation to drought stress. The level of intra-population variation was low, indicating general low adaptability of the natural populations, thus representing an important handicap to respond to CC by means of a selection process. At the same time, differentiation was moderate in general and high in some adaptively relevant traits, indicating that those populations adapted to current harsh environments possibly manage to survive CC without changing their genetic structures.

Notwithstanding, we analyzed only one of the possible strategies of these species to persist in situ. Phenotypic plasticity should also be considered. Field trials with both species essayed together under different environmental conditions would enable us to complete the picture.

Acknowledgements We would like to thank Priscila M. Willems and Alejandro Aparicio for their help with the statistical analyses and R graphics. Thanks also go to Sebastián Zuki for his help in the installation and handling of the trials, Fernando Barbero for his collaboration in seed collection, and two anonymous reviewers for their helpful comments. This research was supported by the projects “PROMEF—Subprograma *Nothofagus*—BIRF 7520 AR”, “Domesticación de especies forestales nativas patagónicas—INTA PNFOR-44321” and “Variación genética de poblaciones naturales argentinas de Raulí y Roble Pellín en caracteres adaptativos tempranos relevantes para domesticación”. CONICET PIP 2008 No 112-200801-02867”.

References

- Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, Wang T, Curtis-McLane S (2008) Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evol Appl* 1(1):95–111
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T et al (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For Ecol Manag* 259:660–684
- Aparicio AG, Zuki SM, Azpilicueta MM, Barbero FA, Pastorino MJ (2015) Genetic versus environmental contributions to variation in seedling resprouting in *Nothofagus obliqua*. *Tree Genet Genomes* 11:23
- Azpilicueta MM, Marchelli P, Gallo LA (2009) The effects of quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast dna phylogeography of southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genet Genomes* 5:561–571
- Azpilicueta MM, Varela S, Martínez A, Gallo LA (2010) Manual de viverización, cultivo y plantación de Roble Pellín en el norte de la región andino patagónica. Ediciones INTA. San Carlos de Bariloche, 67. https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_manualroble.pdf
- Azpilicueta MM, Gallo LA, van Zonneveld M, Thomas E, Moreno C, Marchelli P (2013) Management of *Nothofagus* genetic resources: definition of genetic zones based on a combination of nuclear and chloroplast marker data. *For Ecol Manag* 302:414–424
- Azpilicueta MM, Pastorino MJ, Puntieri J, Barbero FA, Martínez-Meier A, Marchelli P, Gallo LA (2014) Robles in lagunas de Epulauquen, Argentina: previous and recent evidence of their distinctive character. *Rev Chil Hist Nat* 87:24
- Baliuckas V, Pliura A (2003) Genetic variation and phenotypic plasticity of *Quercus robur* populations and open-pollinated families in Lithuania. *Scand J For Res* 18:305–319
- Baliuckas V, Pliura A (2008) Phenogenetic variation pattern in adaptive traits of *Betula pendula*, *Alnus glutinosa* and *Quercus robur* in Lithuania. *Biologija* 54:60–65
- Baliuckas V, Lagerström T, Eriksson G (2001) Within-population variation in juvenile growth rhythm and growth in *Quercus robur* L. and *Fagus sylvatica* L. *For Genet* 8:259–269

- Barbero FA (2014) Variación genética de poblaciones naturales Argentinas de *Nothofagus obliqua* ('Roble Pellín') en caracteres adaptativos tempranos relevantes para domesticación. Dissertation. Facultad de Agronomía—Universidad de Buenos Aires
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48
- Benito-Garzón M, Fernández-Manjarrés JF (2015) Testing scenarios for assisted migration of forest trees in Europe. *New For* 46:979–994
- Bianchi AR, Cravero CAC (2010) Atlas Climático Digital de la República Argentina-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Ediciones INTA, Salta. URL: <https://inta.gob.ar/documentos/atlas-climatico-digital-de-la-republica-argentina>
- Bran D, Pérez A, Ghermandi L, Barrios-Lamuniere SD (2001) Evaluación de poblaciones de Coihue (*Nothofagus dombeyi*) del Parque Nacional Nahuel Huapi, afectadas por la sequía 98/99, a escala de paisaje aspectos integradores, Cuadernillo No 4 13 (1:250.000). I Reunión Binacional de Ecología, pp 63. San Carlos de Bariloche
- Centro Inv. Mar & Atm. (2015) Centro de Investigaciones del Mar y la Atmósfera. Cambio Climático en Argentina; Tendencias y Proyecciones. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. pp. 5–22. http://3cn.cima.fcen.uba.ar/3cn_informe.php. Accessed 7 Sept 2017
- Climent J, Alonso J, Gil L (2004) Arquitectura del sistema radical en dos procedencias de *Pinus canariensis*. IV Congreso Forestal Español, pp 5. http://secforestales.org/publicaciones/index.php/congresos_forestales/article/viewFile/16143/15986. Accessed 7 Sept 2017
- Cregg BM (1994) Carbon allocation, gas exchange, and needle morphology of *Pinus ponderosa* genotypes known to differ in growth and survival under imposed drought. *Tree Physiol* 14:883–898
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) Introducción a la genética cuantitativa. Ed. ACRIBA, S.A. Zaragoza
- Grossnickle SC (2005) Importance of root growth in overcoming planting stress. *New For* 30:273–294
- Grossnickle SC (2012) Why seedlings survive: influence of plant attributes. *New For* 43:711–738
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* 50:346–363
- Houle D (1992) Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics* 130:195–204
- Husson F, Josse J, Le S, Mazet J (2017) Package FactoMineR Multivariate exploratory data analysis and data mining. URL <http://factominer.free.fr>
- IPCC (2014) Climate Change 2014: Synthesis report. In: Contribution of working groups I, II and III to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, RK Pachauri, LA Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva
- Ledo A, Paul KI, Burslem DFRP, Ewel JJ, Barton C, Battaglia M, Brooksbank K et al (2018) Tree size and climatic water deficit control root to shoot ratio in individual trees globally. *New Phytol* 217:8–11
- Lynch M, Walsh B (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland
- Marchelli P, Gallo LA (1999) Annual and geographic variation in seed traits of Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *For Ecol Manag* 121:239–250
- Marchelli P, Gallo LA (2004) The combined role of glaciation and hybridization in shaping the distribution of genetic variation in a Patagonian southern beech. *J Biogeogr* 31:451–460
- Marchelli P, Gallo LA (2006) Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conserv Genet* 7:591–603
- Marchelli P, Gallo LA, Scholz F, Ziegenhagen B (1998) Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theor Appl Genet* 97:642–646
- Marchelli P, Thomas E, Azpilicueta MM, van Zonneveld M, Gallo L (2017) Integrating genetics and suitability modelling to bolster climate change adaptation planning in Patagonian *Nothofagus* forests. *Tree Genet Genomes* 13:119
- Marksteijn L, Poorter L (2009) Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. *J Ecol* 97:311–325
- Matías L, González-Díaz P, Jump AS (2014) Larger investment in roots in southern range-edge populations of Scots pine is associated with increased growth and seedling resistance to extreme drought in response to simulated climate change. *Environ Exp Bot* 105:32–38
- Merilä J, Crnokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *J Evol Biol* 14:892–903
- Moles AT, Westoby M (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *J Ecol* 92:372–383
- O'Neill GA, Adams WT, Aitken SN (2001) Quantitative genetics of spring and fall cold hardiness in seedlings from two Oregon populations of coastal Douglas-Fir. *For Ecol Manag* 149:305–318

- Osier TL, Lindroth RL (2004) Long-term effects of defoliation on quaking aspen in relation to genotype and nutrient availability: plant growth, phytochemistry and insect performance. *Oecologia* 139:55–65
- Padilla FM, Pugnaire FI (2007) Rooting depth and soil moisture control Mediterranean woody seedling survival during drought. *Funct Ecol* 21:489–495
- Pastorino MJ, Marchelli P, Azpilicueta MM (2013) ¿Cómo ajustar la precisión en la estimación de parámetros de genética cuantitativa en estudios de genética ecológica? Ejemplos con especies nativas patagónicas. 4 Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Iguazu, Misiones. <https://doi.org/10.13140/rg.2.2.21237.06889>
- Paz H (2003) Root/shoot allocation and root architecture in seedlings: variation among forest sites, microhabitats, and ecological groups. *Biotropica* 35:318–332
- Reichenbacher RR, Schultz RC, Hartl AR (1996) Artificial defoliation effect on *Pupulus* growth, biomass production, and total nonstructural carbohydrate concentration. *Entomol Am* 25:632–642
- Sabatier Y, Azpilicueta MM, Marchelli P, González-Peñalba M, Lozano L, García L, Martínez A et al (2011) Distribución natural de *Nothofagus alpina* y *Nothofagus obliqua* (*Nothofagaceae*) en Argentina, dos especies de primera importancia forestal de los bosques templados norpatagónicos. *Bol Soc Argic Bot* 46:131–138
- Schmidt A, Poulain M, Klein D, Krause K, Peña-Rojas K, Schmidt H, Schulte A (2009) Allometric above-belowground biomass equations for *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) natural regeneration in the Chilean Patagonia. *Ann For Sci* 66:513
- Seiwa K, Kikuzawa K (1991) Phenology of tree seedlings in relation to seed size. *Can J Bot Rev Can Bot* 69:532–538
- Sola G, Attis Beltrán H, Chauchard L, Gallo LA (2015) Effect of silvicultural management on the *Nothofagus dombeyi*, *N. alpina* and *N. obliqua* forest regeneration within the Lanín Natural Reserve (Argentina). *Bosque* 36:111–118
- Spitze K (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135:367–374
- Tortorelli L (1956) Maderas y bosques, argentinos edn. ACME, Buenos Aires
- Varela SA, Gyenge JE, Fernández ME, Schlichter T (2010) Seedling drought stress susceptibility in two deciduous *Nothofagus* species of NW Patagonia. *Trees* 24:443–453
- Visscher PM (1998) On the sampling variance of intraclass correlations and genetic correlations. *Genetics* 149:1605–1614
- Wiley E, Casper BB, Helliker BR (2017) Recovery following defoliation involves shifts in allocation that favour storage and reproduction over radial growth in black oak. *J Ecol* 105:412–424
- Yang F, Wang Y, Miao LF (2010) Comparative physiological and proteomic responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Physiol Plant* 139:388–400