

Universidad del Bío-Bío

Facultad de Ciencias

Departamento de Ciencias Básicas



Diversidad y estructura genética en el árbol endémico y amenazado, *Nothofagus alessandrii* (Nothofagaceae), mediante marcadores microsatélites.

Karem Grandón Malverde

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias biológicas

Profesor Guía: Dr. Cristian Rodrigo Torres Díaz.

CHILLAN, 2021.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	3
INTRODUCCION	6
MATERIALES Y METODOS	10
1. <i>Sitios de estudios</i>	10
2. <i>Estrategia de muestreo</i>	11
3. <i>Métodos moleculares</i>	11
3.1. <i>Extracción de ADN</i>	11
3.2. <i>Análisis de PCR y genotipificación</i>	12
3.3. <i>Genotipificación de microsatélites y Análisis de datos genéticos</i>	12
4. <i>Diversidad genética intra-poblacional</i>	13
4.1. <i>Estructura Poblacional y Análisis estadísticos</i>	14
RESULTADOS	15
<i>Diversidad Genética Intra-poblacional</i>	15
<i>Estructuración poblacional</i>	16
(1) <i>Diferenciación inter-poblacional mediante R_{ST} y F_{ST}</i>	16
(2) <i>Análisis de varianza molecular (AMOVA) a priori</i>	16
(3) <i>Análisis de agrupamiento Bayesiano no espacial usando STRUCTURE</i>	17
4) <i>Análisis discriminante de componentes principales (DAPC)</i>	19
(5) <i>Análisis de varianza molecular (AMOVA) a posteriori</i>	21
DISCUSION & CONCLUSIONES	22
Referencias Bibliográficas	27

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis de Magíster, Dr. Cristian Torres Díaz, por la dedicación y apoyo incondicional que ha brindado a este trabajo, por el respeto hacia mis sugerencias, equivocaciones, por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza y motivación ofrecida desde que llegue al Magíster.

Asimismo, agradezco a la Universidad del Bío Bío, por ser una institución que me doto de herramientas, profesionales e instalaciones para poder crecer y perfeccionarme en diferentes áreas de interés. Agradecida también de todos los profesores y profesoras por el conocimiento entregado y darnos las bases fundamentales para nuestro desarrollo profesional.

Pero un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Gracias a mi familia, a mis padres y a mis hermanos, por ser siempre el pilar y los motores de mi vida.

Gracias a mis amigos y amigas, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles para contenerme y no rendirme.

Pero, sobre todo, gracias a ti que a pesar de la distancia siempre has sido y serás mi inspiración.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

El bosque mediterráneo del centro de Chile, es considerado un *hotspot* o “punto caliente” de biodiversidad, donde alberga una distribución más antigua producida por oscilaciones climáticas pasadas. En estos bosques se haya una de las reliquias más longevas. *Nothofagus alessandrii*, conocido comúnmente como ruil, es un árbol endémico restringido históricamente a la zona costera de la VII Región de Chile. Es la especie más antigua de la familia de las *Fagaceae* del hemisferio sur, la cual ha sido declarada como “fósil viviente”. Los bosques de *N. alessandrii* se encuentran cada vez más amenazados. A fines del siglo XIX, esta especie fue diezmada y reemplazada por plantaciones comerciales de árboles exóticos, que hoy en día cubren alrededor del 76% del paisaje de esta región, existiendo sólo restos del bosque Maulino como fragmentos pequeños y aislados en un paisaje dominado por *Pinus radiata* y *Eucalyptus spp*, lo que ha afectado su reconocimiento y protección, es por eso que a pesar de su importancia, el ruil es considerado como una de las especies más amenazadas de Chile. En 1998 fue incorporada en la “lista roja” de la IUCN. Además del recambio de uso de suelo por plantaciones forestales, los fragmentos de ruil se han visto afectados por incrementos en la intensidad de incendios de origen antrópico. El verano de 2017 casi el 50% de la superficie distribuida por ruil, es decir, 314 ha se quemaron en algún grado en un mega incendio que consumió cerca de 14.000 ha en la región del Maule. Si bien esta especie tiene la capacidad de rebrotar después de los incendios, producir semillas y germinación de semillas bajo condiciones naturales, existen estudios que han documentado que la sobrevivencia de plántulas en el campo es limitada, donde su desempeño es muy diminuto, con crecimientos lentos y con bajo éxito reproductivo. En el contexto de la conservación de bosques especialmente en un escenario de cambios, es fundamental conocer la diversidad intra-específica de múltiples rasgos que existe en una especie, con el propósito de orientar la toma de decisiones. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad y estructura genética de *Nothofagus alessandrii* mediante el uso de marcadores moleculares (SSR, conocido también como microsatélites), con el fin de proponer lineamientos para futuros programas de conservación de los recursos genéticos o la restauración de los bosques de esta especie. Se genotipificaron un total de 304 individuos (232 adultos y 72 plántulas, pertenecientes a 9 y 3 poblaciones, respectivamente) mediante el uso de 12 loci de microsatélites recientemente desarrollados por Torres-Díaz *et al.* (2021). Para los análisis de los datos obtenidos se utilizaron los programas GENALEX 6.5.1, STRUCTURE 2.3.2 y R *adegenet* versión 2.1.1. Los valores de diferenciación fueron significativamente distintos de cero y mayores para R_{ST} (0,287) que para F_{ST} (0,184), considerando que es una especie polinizada por el viento. La variación genética de las plántulas fue similar a la de los adultos. En promedio, la heterocigosidad esperada ($H_E = 0,408$) fue menor que la heterocigosidad observada ($H_O = 0,469$). La estructura genética se organizó espacialmente en 6 grandes *clúster* o grupos genéticos bien definidos. Se compararon los niveles de endogamia de plántulas y adultos, teniendo como resultado, altos niveles de endogamia en plántulas ($F_{Adultos} = -0,151$ vs. $F_{Plántulas} = -0,055$) que en adultos. La diversidad genética es un requisito para el cambio evolutivo. Por consiguiente, la conservación de la diversidad y estructura genética dentro de las especies es importante para asegurar el potencial de adaptación en un medio ambiente cambiante. Los resultados de este estudio permiten tener una visión biológica de conservación más clara, para definir unidades de manejo y restauración ecológica, basadas en datos genéticos para *N. alessandrii*, que facilitaran prácticas sostenibles para su conservación.

INTRODUCCION

El cambio climático, las actividades antropogénicas y naturales, tales como: el cambio en el uso de suelo, la tala indiscriminada, la fragmentación del hábitat y frecuentes incendios forestales, se encuentran entre las principales amenazas a la biodiversidad del planeta (Mattera *et al.* 2020). La alteración de los paisajes naturales se considera como una de las principales causas de pérdida de la biodiversidad a nivel mundial (Wilson 1985, Hanski 2005, Lindernmayer & Fischer 2006, Krauss *et al.* 2010). Desde fines del siglo XIX, el aumento significativo de las actividades antropogénicas anteriormente mencionadas, han alterado el paisaje natural, generando ecosistemas fragmentados, lo que conlleva como consecuencias cambios en los procesos ecológicos (alteración y distribución de las especies) distintas escalas poblacional, comunitaria y ecosistémica (Eriksson *et al.* 2006, Peters 1990). Fischlin *et al.* (2007) señala que entre el 20% al 30% de las especies de plantas y animales, se pueden considerar en mayor riesgo de extinción si el aumento de la temperatura promedio excede los 2°C a 3°C, mencionando además que existirían cambios sustanciales en la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas.

La zona de clima mediterráneo de Chile central (33-39°S) ha sido catalogada como *hotspot* o “punto caliente” de biodiversidad, debido a su alta riqueza de especies y endemismo (Myers *et al.* 2000). Se ha visto enfrentada a una serie de procesos de cambios en el uso de suelo, originados por actividades agronómicas, ganaderas, y forestales (Echeverría *et al.* 2006). Ejemplos de estos procesos, es lo que evidencia el bosque Maulino, el cual se encuentra distribuido entre los Altos de Lincantén (35°55' S) y el río Itata (37°20' S), entre los 100 y 900 msnm. Esta zona del país es una unidad vegetacional en la que predominan especies arbóreas caducifolias (San Martín & Donoso 1996). Parte importante de este bosque se encuentra dominado por *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser (Fagaceae, “hualo”), la restringida *Nothofagus alessandrii* Esp. (Fagaceae, “ruil”) y *Pitavia punctata* (R. et P.) Mol. (Rutaceae, “pitao”), las cuales quedaron restringidas a Chile Central, respecto a otras con mayor área distribucional alcanzando, incluso, territorio Argentino. Estas especies actualmente se encuentran en peligro de extinción.

Actualmente, el bosque templado del sur de Chile, en particular el bosque Maulino, se encuentra amenazado debido a la alta tasa de deforestación y fragmentación, principalmente por la introducción de plantaciones de *Pinus radiata* (Pinaceae, “pino”). Las plantaciones de pino insigne se iniciaron en terrenos agrícolas y de pastoreo, abandonados y erosionados, pero pronto se expandieron a las extensas superficies de bosques nativos secundarios o degradados por roces o tala selectiva (Gómez *et al.* 2011). El Estado, a través de Decreto Ley 701 de 1974, comenzó a subsidiar el costo de establecer plantaciones principalmente de especies exóticas, en áreas que habían perdido su cubierta forestal original. Muchas de estas áreas fueron superficies de bosques nativos degradados (Donoso 1983). Como consecuencia de esta política de desarrollo forestal, los bosques nativos prácticamente desaparecieron de las Regiones VII y VIII, donde hoy existen escasas áreas protegidas (Elizalde 1970). Los terrenos reforestados con pino cubrieron los sectores donde se ubicaron los antiguos refugios pleistocénicos del bosque, justamente en las áreas de mayor diversidad y endemismo (Donoso 1983).

Actualmente las plantaciones forestales cubren alrededor del 76% del paisaje de esta región, existiendo sólo restos del bosque Maulino como fragmentos pequeños y aislados en un paisaje dominado por pino (Donoso 1993, Dinerstein *et al.* 1995, San Martín & Donoso 1996, Grez *et al.* 1998, Bustamante & Castor 1998). Los bosques nativos han sido reducidos a menos un 10% de su extinción original (Echeverría *et al.* 2006). Los parches remanentes de bosque nativo muestran un significativo grado de degradación. Después de más de un siglo de explotación humana moderna y modificación del paisaje, la vegetación natural está extremadamente fragmentada (Bustamante & Castor 1998). Estas actividades incluyen la deforestación de los bosques para uso de la agricultura, la producción de madera, leña, carbón y la introducción de plantaciones de monocultivo forestales, que conllevan un ciclo de rotación de 20 años establecidas en un proceso que comenzó a inicios de la década de 1970 y que continuó a una tasa acelerada, han afectado gravemente al bosque de la Cordillera de la Costa de la región del Maule. Cabe destacar que además del reemplazo directo, estudios han concluido que *Pinus radiata* también invade continuamente los fragmentos de bosque Maulino (Gómez *et al.* 2011) generando una reducción de la cobertura y cambio en el modelo de distribución de los bosques, así como efectos en la estructura de la biodiversidad y biología de las especies (San Martín *et al.* 2020).

El escaso aprecio histórico por los bosques nativos y el uso indiscriminado del fuego, para expandir las tierras agrícolas, ganaderas y forestales, ha tenido como resultado una dramática fragmentación, modificación del hábitat y, en algunos sitios, extinción de las poblaciones, otras especies asociadas a los bosques y reducción del área que ocupaba originalmente el bosque nativo chileno (Echeverría *et al.* 2007). Por lo tanto, podemos afirmar que la zona central de Chile ha sido sometida a una presión antropogénica constante, especialmente durante los últimos dos siglos, sin considerar que el bosque maulino presenta un alto valor biológico y riqueza ecosistémica (San Martín *et al.* 2020). En definitiva, la región ha experimentado una reducción drástica en la cubierta forestal superficial, que hoy en día mantiene en peligro los bosques nativos del país (Donoso & Lara 1996).

Nothofagus alessandrii Espinosa, comúnmente llamado ruil, corresponde a una especie arbórea, endémica de la flora chilena que define uno de los singulares bosques templados de Chile central. Es también uno de los nueve elementos que representan al género *Nothofagus* en Sudamérica y uno de las 35 especies para el hemisferio sur (San Martín *et al.* 2020). Es considerado una de las especies más importantes del bosque Maulino, pero a la vez una de las especies más amenazadas de Chile (Benoit 1989). Tiene un área de distribución natural muy restringida, limitada a la Cordillera de la Costa de la Región del Maule, en una faja que no supera los 100 km de extensión latitudinal, variando entre los 100 a los 450 metros de altitud (San Martín *et al.* 1991). Es la especie más antigua de la familia de las Nothofagaceae del hemisferio sur, la cual ha sido declarada como “fósil viviente” (Serra *et al.* 1986), por lo tanto, estos bosques son una de las formaciones más antiguas de Sudamérica. Esta especie forma parte de la asociación conocida como Bosque Maulino Costero y tiende a formar bosques puros en exposición de umbría. El ruil es un árbol con una excelente forma que puede llegar a medir 30 m de altura y 1 m de diámetro (Muñoz 1973, Rodríguez *et al.* 1983, Serra *et al.* 1986, Rodríguez & Quezada 2003). Tiene características muy reconocidas, como la calidad de su madera, especialmente por su resistencia a la pudrición (Aravena & Molina 1976,

Donoso 1983, Fierro & Pancel 1998), por lo que se han encontrado localidades cercanas a su distribución natural, estacas de cerco que superan los 80 años conservadas y en buen estado (Aravena & Molina 1976, Donoso 1983). Estas características han llevado a que la especie, fuese declarada “monumento natural” por el gobierno de Chile en 2007. Lamentablemente a pesar de la importancia de esta especie por su longevidad, en 1998 fue incluida en la “lista roja” de la IUCN (González 1998). Las poblaciones remanentes se encuentran muy fragmentadas y rodeadas por plantaciones de *Pinus radiata*. La superficie de los fragmentos es muy reducida, aproximadamente el 95% de ellos tiene una superficie inferior a las 12 ha (Bustamante & Grez 1995). En la situación que se encuentra el ruil, considerada incluso el árbol más amenazado de Chile, y por su alto valor biológico, debería tener alta prioridad de conservación (Hechenleitner *et al.* 2005). Sobre todo aún más que continúan presentes hoy en día los procesos antropogénicos que han llevado a su actual estado de degradación y vulnerabilidad. Además de las consecuencias antropogénicas y naturales, en las últimas décadas la frecuencia e intensidad de los incendios forestales han aumentado el riesgo de extinción del ruil. Por ejemplo, el verano de 2017 casi el 50% de la superficie por ruil, es decir, 314 ha se quemaron en algún grado en un mega incendio que consumió cerca de 14.000 ha en la región del Maule. Esta especie se encuentra en el nivel más alto de fragilidad ecológica, la disminución de los bosques de *N. alessandrii* es uno de los modelos más claros en Chile de degradación ambiental, como resultado de las actividades antropogénicas. En efecto, la mayor parte de los trabajos empíricos apuntan hacia consecuencias negativas de estos procesos, revelando pérdida de diversidad taxonómica y genética a diversas escalas (Palma 2004). Además desde un punto de vista genético, la disminución del tamaño poblacional efectivo que está ocurriendo hoy en día en la población de ruil, con el grado de aislamiento, podría hacer que las poblaciones fragmentadas sean aún más susceptibles a la deriva génica y a la endogamia, disminuyendo el éxito y el potencial evolutivo e incrementando el riesgo de extinción (Ellstrand & Elam 1993, Young *et al.* 1996). Estudios han señalado que el ruil tiene la capacidad de rebrotar, producir semillas y germinación de semillas bajo condiciones naturales, sin embargo, la sobrevivencia de plántulas, es decir, el éxito reproductivo son generalmente limitadas y altamente variables entre poblaciones, además necesitan protección contra la insolación directa, ya que solo requiere de luz natural de manera indirecta (San Martín & Donoso 1996, Olivares *et al.* 2005). En un intento de restauración, CONAF en alianza con investigadores de la Universidad Católica del Maule, desarrollaron diversos proyectos para preservar y recuperar esta especie y procurar su reproducción, lo cual fue todo un desafío. El investigador español Antonio Cabrera de la U. Católica del Maule (2005) señala que durante ese año se recolectaron semillas que fueron entregadas a Universidades locales, donde se lograron 3.500 plantas para reforestación, pero apenas 90 de ellas lograron sobrevivir en el campo (Nota publicada en el Diario el Mercurio, 2015). Los expertos señalan que el ruil es relativamente fácil de producir en viveros, con buen crecimiento (diámetros de 3 a 4 milímetros y alturas que varían entre los 20 y 30 centímetros) en un periodo de ocho meses. El problema con esta especie se presenta en el campo, donde su desempeño es muy bajo, con crecimientos lentos y baja sobrevivencia. Por lo que los encargados del manejo forestal generalmente encuentran serias dificultades para restaurar esta especie (Santelices *et al.* 2018). A todo esto se suma además, que el ruil necesita condiciones climáticas específicas para su sobrevivencia, se adapta fácilmente en zonas húmedas y de relativa calidez, creciendo fuertemente en las

laderas sur del bosque Maulino. Esta sensibilidad de la especie demuestra su intolerancia para un clima cálido-seco, respecto a otra especie acompañante como *N. glauca*, “Hualo” (San Martín *et al.* 2020). Lo antecedentes señalados anteriormente, nos indica la grave situación que se encuentra actualmente esta especie, si se considera además, el aislamiento de este ecosistema de otras áreas de bosques sudamericanos, lo que limita las posibilidades de inmigración y de recolonización natural por otras especies de plantas y animales (Mattera *et al.* 2020). Por lo tanto, es importante definir un adecuado manejo de conservación, como por ejemplo, uso de marcadores moleculares, específicos para la especie, que permitan evaluar la Diversidad genética del ruil y así asignar políticas de desarrollo que consideren una sólida base ecológica que podrían llevar a revertir el riesgo de extinción.

La caracterización genética de las poblaciones, individuos y especies es un método que aporta datos importantes de la biología y ecología de los seres vivos. Los marcadores moleculares están basados en el ADN (ácido desoxirribonucleico); molécula que se encuentra en casi todos los seres vivos del planeta y que contiene la información genética altamente variable entre individuos, poblaciones y especies (Freeland *et al.* 2011). Estos marcadores permiten identificar “variantes alélicas” (i.e., grupo de genotipos de determinado gen) que son consecuencias de algún tipo de mutación en la información genética de las poblaciones a escala de tiempo evolutivo (también llamadas polimorfismos). Esta información permite identificar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos (Astorga 2008, Freeland *et al.* 2011) y tomar decisiones rápidas y precisas para la asignación de prioridades de conservación (Shivaji *et al.* 2003).

Los microsatélites son secuencias cortas que consisten de dos a tres nucleótidos repetidas varias veces (Weber & May 1989). Su análisis se basa en el uso de la técnica de PCR para identificar polimorfismos y en el número de repeticiones de un alelo en un locus (Astorga 2008). En las últimas décadas, los microsatélites se han convertido en uno de los principales marcadores genéticos, ya que son abundantes, están distribuidos regularmente en el genoma, se heredan de forma co-dominante y poseen un elevado grado de variabilidad en las poblaciones. Debido a ello, estos marcadores han sido ampliamente utilizados en estudios sobre análisis de variabilidad genética tanto en estudios de genética de poblaciones como en estudios de manejo genético para la conservación o genética ecológica, debido a que podría facilitar la identificación de área de conservación prioritaria, al ser marcadores con mayor resolución (Mattera *et al.* 2020).

Considerando las características biológicas de *N. alessandrii* es posible hacer predicciones respecto de su diversidad genética y estructuración poblacional. Dado que *N. alessandrii* un árbol longevo es de esperar una alta diversidad genética intra-poblacional. Por otro lado, dado que la especie es polinizada por viento (anemófila) es de esperar una baja diferenciación entre poblaciones. No obstante, por otro lado, considerando que las poblaciones de la especie se encuentran restringidas a laderas de exposición sur / sur-este, en una zona de topografía compleja (zona semi-montañosa) en la que existen barreras geográficas como el río Maule, que potencialmente pueden restringir el flujo de genes, es posible predecir diferenciación inter-poblacional moderada. Adicionalmente, considerando la alta longevidad de la especie y su capacidad de rebrotar después de ser cortada o quemada, es de esperar que la especie mantenga altos niveles de

diversidad genética a pesar de la fragmentación del hábitat, debido a que los individuos que actualmente sobreviven son representantes previos a la fragmentación antrópica. Por último, el bajo éxito reproductivo de la especie, podría estar relacionada, al menos en parte, a la fuerte selección en contra de los homocigotos que comúnmente ocurre en los árboles longevos y a la fragmentación a través de un incremento en la endogamia a causa de la reducción de los tamaños poblacionales (Echeverría *et al.* 2006). Concordantemente, el estudio realizado por Torres-Díaz *et al.* (2007), basado en la variación genética de aloenzimas, encontró que *N. alessandrii* mantienen altos niveles de diversidad genética similares a los encontrados en sus congéneres de distribución amplia y una alta diferenciación genética moderada a pesar de ser dispersada por el viento. Sin embargo, el estudio realizado por Torres-Díaz *et al.* (2007) fue realizado en un número reducido de poblaciones (7 localidades) y marcadores (7 loci), siendo necesario ampliar el número de poblaciones y de marcadores para obtener una imagen más resolutiva de cómo se distribuye la diversidad genética dentro y entre poblaciones de la especie. Consecuentemente, los objetivos de la presente investigación fueron: (1) estimar la diversidad y la estructura genética en la especie arbórea endémica y amenazada *N. alessandrii*, mediante el uso de marcadores moleculares (SSR, microsatélites), (2) comparar los niveles diversidad genética y endogamia de adultos y plántulas y (3) proponer, a partir de los resultados genéticos, potenciales acciones para la conservación de la especie de *N. alessandrii*. Para lo anterior, en este estudio se genotipificaron un total de 304 individuos (232 adultos y 72 plántulas, pertenecientes a 9 y 3 poblaciones, respectivamente) mediante el uso de 12 loci de microsatélites recientemente desarrollados por Torres Díaz *et al.* (2021)

MATERIALES Y METODOS

1. *Sitios de estudios.*

Nothofagus alessandrii es una especie de árbol con alto nivel de endemismo, que presenta una distribución restringida e históricamente limitada en la cordillera de la costa a baja altitud, 160 a 440 msnm en las áreas más húmedas de las provincias de Talca y Cauquenes en la VII región de Chile (Santelices *et al.* 2012). Su mayor concentración se encuentra en la localidad de Curepto y Empedrado (Figura 1), sectores conocidos como bosque Maulino por su alta riqueza de especies y endemismo (Tabla 1) (Myers *et al.* 2000).

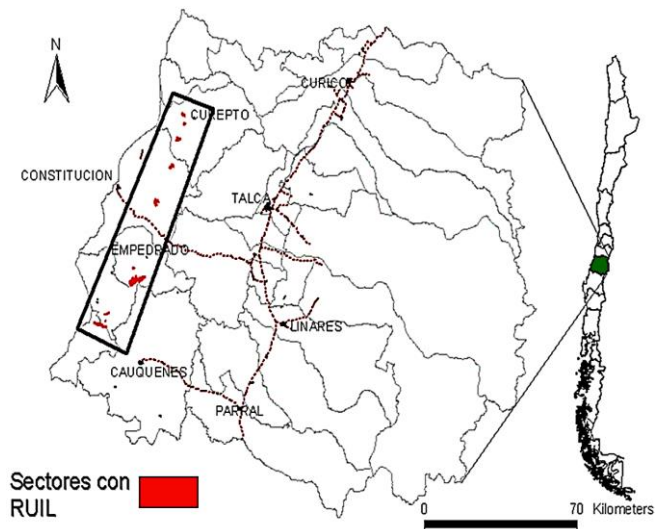


Figura 1. Mapa de distribución de *Nothofagus alessandrii*, en la región del Maule. (Extraído y modificado de CONAMA, 2005)

Tabla 1. Poblaciones muestreadas, códigos, elevación y coordenadas geográficas (S/W) para las 12 poblaciones muestreadas de *Nothofagus alessandrii*

Población	Código	Elevación (m a,s,l,)	Tamaño muestral	Superficie (ha)	Coordenadas (S/W)	Exposición	Año de muestreo
ADULTOS							
1. Calzoncillos	CAL	200	21	10,8	35°10'/72°06'	Este	2017
2. Coipué	COI	412	28	3,0	35°07'/72°07'	Este	2020
3. Piragua	PIR	300	22	1,8	35°07'/72°06'	Este	2020
4. El Roble	ERO	350	28	48,9	35°39'/72°22'	Sur-Este	2019
5. La Montaña	LMO	350	23	30,9	35°39'/72°18'	Sur Este	2019
6. Fundo el Desprecio	FED	403	30	45,4	35°40'/72°18'	Sur-Este	2017
7. RLR- Empedrado	EFE	338	30	13,5	35°37'/72°20'	Sur-Este	2013
8. RLR- Chanco	RLR	228	30	73,8	35°49'/72°30'	Sur	2013
9. El Desprecio	DES	400	35	63,3	35°40'/72°19'	Sur-Este	2019
PLÁNTULAS							
1. Coipué Plántulas	COI_PI	412	21	3,0	35°15'/72°07'	Sur-Este	2017
2. RLR- Empedrado - Plántulas	EFE_PI	338	24	13,5	35°37'/72°20'	Sur-Este	2013
3. RLR- Chanco - Plántulas	RLR_PI	228	27	73,8	35°49'/72°30'	Sur	2013

2. Estrategia de muestreo.

El material vegetal para investigar el polimorfismo en *N. alessandrii* fue recolectado en terreno en nueve poblaciones (**Tabla 1**). Para cada población, se recolectaron hojas jóvenes de árboles adultos, es decir, individuos con una identidad morfológica inequívoca y se secaron en sílica gel para su secado rápido antes de su posterior procesamiento de laboratorio.

3. Métodos moleculares

3.1. Extracción de ADN

El ADN genómico (ADNg) de cada individuo se extrajo usando DNeasy Plant mini Kit (Qiagen Valencia, CA, EE, UU,). De hojas secas siguiendo el protocolo del fabricante. Todos los extractos de ADN se cuantificaron y estandarizaron mediante el método fluorométrico Qubit® 3.0 (Invitrogen).

3.2. Análisis de PCR y genotipificación.

Para la prueba de amplificación, las PCR se realizaron en un volumen final de 10 µL que contenía: PCR, 10 µM de cebadores fluorescentes directo e inverso. Los cebadores de avance se marcaron con tintes fluorescentes PET, FAM, VIC y NED (Applied Biosystems), para realizar la secuenciación capilar en un analizador genético. El protocolo de amplificación fue el siguiente: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos que consisten en un paso de desnaturalización a 95 °C durante 30 min, con una temperatura de hibridación específica (Ta) de cada par de cebadores durante 30 s (**Tabla 2**), un paso de extensión a 72 °C durante 35 s, seguido de un paso final de extensión de ADN a 72 °C durante 7 min. Los productos finales de la PCR se observaron en un analizador genético ABI PRISM 310 con GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) en el servicio de secuenciación de ADN de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC), Santiago de Chile.

3.3. Genotipificación de microsatélites y Análisis de datos genéticos.

Para la genotipificación de los adultos y plántulas se utilizaron los marcadores moleculares de microsatélites (especie-específicos) recientemente desarrollados por Torres-Díaz *et al.* (2021) para *N. alessandrii*. Específicamente, se amplificaron los 12 marcadores indicados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de 12 marcadores de microsatélites desarrollados para *Nothofagus alessandrii*. Modificado de Torres-Díaz *et al.* (2021).

Locus	Secuencia del partidor (5'-3')	Motivo repetido	Tamaño alélico (bp)	Marcador fluorescente	Ta (°C)	Código GenBank
0Na02	F: CGCTGACACCATAGATCGAG R: CCATATCCAATATGAGAATGGCA	(AG) ₂₀	254-266	NED	59	MW387625
Na04	F: TGGGCTTGTTGAAGCTATGA R: ACACGTTGATAGCCTTTTCGC	(AG) ₅	125-127	6-FAM	59	MW387626
Na05	F: ACATGCCTTGCCAGCATAAT R: GGAGCAAATGTCATGTTGGA	(AG) ₉	288-290	VIC	60	MW387627
Na07	F: GCGCCGACTCTTGTTTACTC R: TGTCAGACTCGACCTGTATTA	(AT) ₁₆	214-234	6-FAM	60	MW387628
Na08	F: GCACTTTCAACCCATACGGT R: CAGTTCCTTGCCCTGTAATAGTCG	(AT) ₅	234-236	PET	60	MW387629
Na09	F: CAACAATGATGACCGATGAGA R: TGTAGGGAAGACGAGTGCTG	(AT) ₆	152-154	VIC	60	MW387630

Na10	F: AATAACGAGATCCTGCGGAC R: CCAAGGAGAACTATGGAATACACA	(AAT) ₅	136-145	NED	59	MW387631
Na11	F: TTCCATGACATTGACGATGC R: CAATGCTCCAACATTCTCTCA	(AG) ₁₄	151-177	PET	60	MW387632
Na12	F: CAAGGTTGAGTACCATTACAAGC R: CCCTGAACCTGTCCAAATACT	(AG) ₇	120-128	VIC	58	MW387633
Na13	F: AAATGACATTATAGACCTTATGGAGAT R: TACCCAAATATCTTATTTCTATCAAT	(AG) ₉	102-110	PET	57	MW387634
Na14	F: GCGTTCCGCATAAAATAACGA R: AGACCGAAGAGACTCATGGC	(AAG) ₈	186	6-FAM	61	MW387635
Na16	F: ACAGCCTAAGAACCTTCAACCC R: CAACCCTGACTGACCATGACC	(AG) ₁₅	173-189	PET	52	MW387636
Na17	F: CAAACATTACAACAACGAAGCC R: CCACTTTATAAAATCCCATTCTTCG	(AG) ₁₄	212-218	VIC	51	MW387637
Na28	F: AAGTTCTTCGTCATCCGTCG R: TGA AAAAGCGTTGAAATAGGACC	(AT) ₁₃	315-319	PET	51	MW387641

4 .Diversidad genética intra-poblacional

Para adultos y plántulas, se calcularon los siguientes índices de diversidad genética intra-poblacional utilizando GENALEX 6.5.1 (Peakall & Smouse 2006). Incluyendo el número de alelos por locus (A), número de alelos efectivos por locus (A_E), número de alelos privados (A_P), heterocigosidad esperada (H_E), heterocigosidad observada (H_O), Índice de fijación (F), porcentaje de loci polimórfico (PLP). Todos los árboles muestreados fueron geo-referenciados usando un GPS de alta precisión (3-5 m), marcados y su posición fue registrada en una base de datos.

4.1. Estructura Poblacional y Análisis estadísticos.

Los patrones de la estructuración genética fueron estudiados a partir de aproximaciones múltiples mediante diferentes programas: (1) Estadísticos F_{ST} de Wright (Wright 1951) y R_{ST} (Slatkin 1995), mediante el programa GENALEX 6.5.1, (2) Análisis de varianza molecular (AMOVA) *a priori* mediante el programa GENALEX 6.5.1, considerando cada localidad de muestreo como una población, (3) Análisis discriminante de componentes principales DAPC, mediante el paquete R *adegenet* versión 2.1.1 (Jombart 2008), (4) Análisis de agrupamiento Bayesiano no espacial mediante STRUCTURE 2.3.2, que permite la obtención de parámetros de la estructura poblacional de genotipos multi-locus (Pritchard *et al.* 2000) y (5) Análisis de varianza molecular (AMOVA) *a posteriori* mediante el programa GENALEX 6.5.1, reasignando los individuos a los cluster genéticos (K) definidos por los programas DAPC y STRUCTURE.

Específicamente, para los análisis en el programa DAPC, los datos del genotipo multi-locus se transformaron mediante el análisis de componentes principales (ACP) para derivar posteriormente las variables no correlacionadas que sirven como entrada para el análisis discriminante (AD). Para los primeros análisis se generaron conjuntos de datos simulados para loci de microsatélites, se modelaron genotipos en 12 loci, 304 individuos y 40 alelos, luego, se utilizaron asignaciones de poblaciones *a priori* como identificador de población. Para automatizar el procedimiento de asignación, se utilizó el criterio de “diffNgroup”, esto determina automáticamente “el mejor” número de poblaciones (K) basado en el criterio de información bayesiano (BIC) (Miller *et al.* 2020). Este análisis tiene un poder de detección de estructura genética similar al de STRUCTURE (Patterson *et al.* 2006). Los análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier 1992), fueron realizados a diferentes niveles jerárquicos de varianza (AMOVA *a priori* y *a posteriori* después de realizar los análisis de agrupamiento Bayesiano mediante STRUCTURE y DAPC), estos fueron realizados mediante GENALEX 6.5.1 (Excoffier *et al.* 2005) STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) permite al usuario encontrar el número óptimo de grupos genéticos (K), y asignar individuos a diferentes grupos sobre la base de las frecuencias alélicas en cada locus. Se utilizó un modelo “*admixture*” para determinar el número de grupos genéticos (K), es decir, que los genotipos pudieran haber estado mezclados ancestralmente por lo que cada individuo ha heredado alguna fracción del genoma de sus ancestros en la población (K) (Pritchard *et al.* 2000). La probabilidad promedio y la distribución estándar se estimaron para cada (K) a partir de sus 10 repeticiones, para analizar cuales diferencias entre ΔK son significativas, para finalmente seleccionar el número de grupos (K) más probable (Evanno *et al.* 2005), usando STRUCTURE2.3.2 (Earl & vonHoldt 2012).

RESULTADOS

En total, se amplificaron consistentemente doce loci de microsatélites en un total de 304 individuos de *N. alessandrii* pertenecientes a doce poblaciones (**Tabla 1**) a lo largo de la región costera de la VII Región del Maule, Chile.

Diversidad Genética Intra-poblacional

Los resultados de los primeros análisis, indican que la variación genética promedio para la especie fue moderada (**Tabla 3**), considerando solo los adultos de la especie. La heterocigosidad esperada promedio fue de 0,408, variando entre 0,296 (ERO) y 0,454 (PIR), mientras que la heterocigosidad observada fue mayor que la esperada, con un promedio de 0,469, variando entre 0,425 (EFE) y 0,509 (COI). Consecuentemente, todas las poblaciones mostraron valores negativos del coeficiente de endogamia (F), con un promedio de -0,127. La riqueza alélica para los adultos fue de 3,222 alelos por locus, variando entre 2,500 (ERO) y 3,750 (DES). El número efectivo de alelos por locus fue en promedio de 2,08 variando entre 1,683 (ERO) y CAL (2,308). Las poblaciones de DES, RLR, FED, LMO y PIR presentaron 3, 3, 2, 2 y 1 alelos privados, respectivamente. El porcentaje de loci polimórfico fue en promedio de 86,8%, variando entre 75% (CAL, ERO) y 91,7% (COI, PIR, EFE y DES).

Tabla 3. Resumen de los estadísticos de diversidad genética intra-poblacional para cada una de las poblaciones estudiadas de *Nothofagus alessandrii*.

Población	N	A	A_E	A_P	PLP	H_E	H_O	F	P
ADULTOS									
CAL	21	3,083	2,30	-	75,0	0,455	0,488	-0,076	0,000
COI	28	3,250	2,22	-	91,7	0,404	0,509	-0,212	0,000
PIR	22	3,250	2,20	1	91,7	0,454	0,492	-0,062	0,000
ERO	28	2,500	1,68	-	75,0	0,296	0,476	-0,350	0,000
LMO	23	3,167	2,05	2	83,3	0,378	0,467	-0,208	0,000
FED	23	3,667	2,14	2	83,3	0,418	0,431	-0,031	0,000
EFE	20	2,750	1,80	-	91,7	0,362	0,425	-0,174	0,000
RLR	41	3,583	2,22	3	83,3	0,364	0,443	-0,195	0,000
DES	26	3,750	2,09	3	91,7	0,435	0,478	-0,048	0,000
Media Adultos	25,8	3,222	2,08	-	85,2	0,396	0,467	-0,151	-
(E.E.)	2,13	0,138	0,07	-	2,32	0,017	0,01	0,035	-
PLÁNTULAS									
COI_PI	21	3,000	1,93	1	91,7	0,422	0,472	-0,062	0,000
EFE_PI	24	2,917	2,07	-	91,9	0,453	0,497	-0,109	0,000
RLR_PI	27	3,250	2,53	-	91,9	0,450	0,454	0,006	0,000
Media Plántulas	24,0	3,055	2,18	-	91,8	0,441	0,474	-0,055	-
(E.E.)	1,73	0,100	0,18	-	0,07	0,001	0,012	0,033	-
Media Global	25,3	3,180	2,12	-	86,85	0,408	0,469	-0,127	-
(E.E.)	1,635	0,107	0,07	-	1,92	0,014	0,008	0,033	-

N = tamaño de muestra, A = número promedio de alelos por locus, A_P = número de alelos privados, A_E = número efectivo de alelos por locus (Nielsen *et al.* 2003), H_E = heterocigosidad esperada, H_O = heterocigosidad observada, F = coeficiente de endogamia individual, P = p-valor para $F = 0$ después de 1000 randomizaciones de copias de genes entre individuos. E.E. = Error estándar.

En general, la variación genética de las plántulas fue similar el de los adultos. En promedio, la heterocigosidad esperada ($H_E = 0,408$) fue menor que la heterocigosidad observada ($H_O = 0,469$), no obstante, en promedio, la endogamia fue mayor en plántulas que en adultos ($F_{Adultos} = -0,151$ vs. $F_{Plántulas} = -0,055$) negativos en las poblaciones de El Despreco y El Fin Empedrado ($F = -0,048$ y $F = -0,031$, respectivamente) y no distintos de cero en Reserva Los Ruiles ($F = +0,006$). La riqueza alélica promedio para las plántulas fue de 3,055, variando entre 2,917 (EFE_PL) y 3,250 (RLR_PL). El número promedio de alelos efectivos por locus fue, de 2,181, y varió entre 1,930 (COI) y 2,538 (RLR_PL). Sólo se detectó un alelo privado en COI_PL. El porcentaje de loci polimórfico promedio fue de 91,8% siendo similar entre las 3 poblaciones de plántulas.

Estructuración poblacional

(1) Diferenciación inter-poblacional mediante R_{ST} y F_{ST}

La **Tabla 4** muestra los estadísticos de diferenciación inter-poblacional R_{ST} y F_{ST} . Los valores de diferenciación fueron significativamente distintos de cero y mayores para R_{ST} (0,287) que para F_{ST} (0,184). Los valores de endogamia a escala intra-poblacional fueron no significativos R_{IS} (-0,003) y F_{IS} (-0,142). Los valores de endogamia total R_{IT} (0,285) y F_{IT} (0,068) fueron positivos y significativos. Los valores de flujo génico entre poblaciones calculados en base a R_{ST} y F_{ST} fueron 0,622 y 1,108 respectivamente.

Tabla 4. Resumen de los estadísticos F_{ST} de Wright (Wright 1951) y R_{ST} (Slatkin 1995) calculados para los 12 loci en las 12 poblaciones de *Nothofagus alessandrii*.

Estadístico	Valor	P	Estadístico	Valor	P
R_{ST}	0,287	0,010	F_{ST}	0,184	0,010
R_{IS}	-0,003	0,490	F_{IS}	-0,142	1,000
R_{IT}	0,285	0,010	F_{IT}	0,068	0,010
Nm	0,622	-	Nm	1,108	-

(2) Análisis de varianza molecular (AMOVA) a priori

El análisis de varianza molecular considerando las 12 poblaciones como entidades discretas (AMOVA a priori) calculada mediante el índice de diferenciación inter-poblacional R_{ST} indicó que un 29% de la varianza genética total se distribuye entre poblaciones y un 71% de la varianza genética total se distribuye dentro de poblaciones (**Tabla 5**).

Tabla 5. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) *a priori* para *Nothofagus alessandrii*. El análisis fue realizado a partir del estadístico de R_{ST} basado en un $K=12$ considerando cada localidad de muestreo como una población.

Fuente de variación	g.l.	SC	SCM	Varianza estimada	% Varianza
Entre poblaciones	11	15880,4	1443,670	27,272	29%
Dentro de poblaciones	304	20681,5	68,031	68,031	71%
Total	607	56315,2	-	95,303	100%

g.l.= grados de libertad, SC = suma de cuadrados, SCM = suma de cuadrados medios.

(3) Análisis de agrupamiento Bayesiano no espacial usando STRUCTURE.

El análisis bayesiano de estructuración muestra que las poblaciones analizadas se dividen preferentemente en dos grandes grupos genéticos o *clúster* ($K=3$ y $K=6$), incluidas las 12 localidades de muestreo (**Fig. 2**). Sin embargo, observamos una fuerte asignación de grupos genéticos, con un óptimo resultado en $K=6$, determinado mediante la visualización de los análisis del recurso externo STRUCTURE Harvester (Evanno *et al.* 2005) (**Fig. 3**). Un $K=6$ determina que genéticamente sólo existen 6 grupos bien definidos a lo largo de la distribución geográfica de la especie, dicho de otro modo, la especie presenta estructuración genética, representada por los 6 grupos obtenidos, designados por 6 *clúster* con sus respectivos colores.

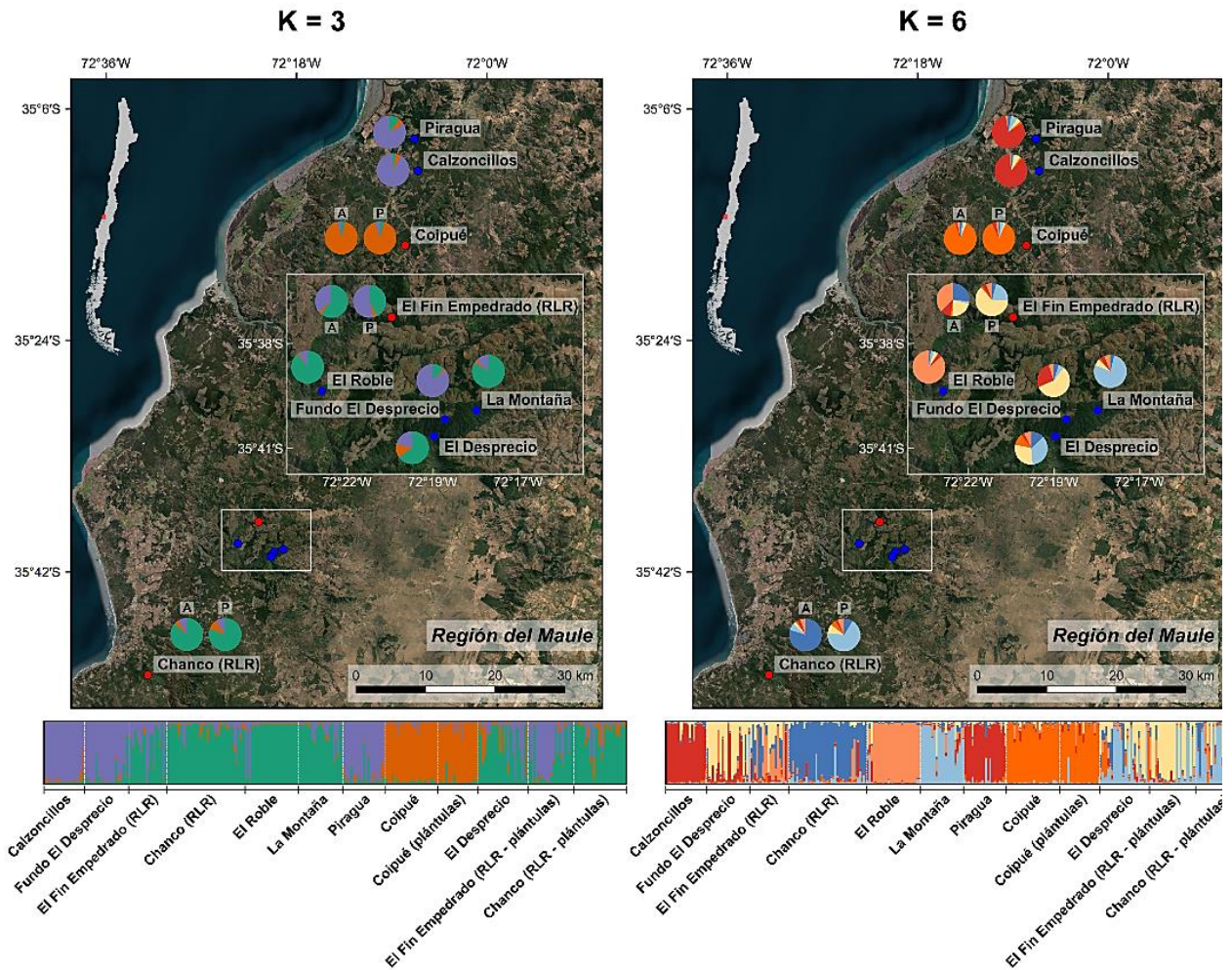


Figura 2. Mapa de distribución de las 12 localidades a partir de los resultados del análisis de la STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard *et al.* 2000) muestran los agrupamientos más probables $K=3$ y $K=6$. En el mapa se observan los grupos de poblaciones representados por los gráficos de tortas y distintos colores. En el barplot las poblaciones están definidas por líneas verticales. Dentro de los individuos, la proporción de cada color indica la pertenencia al grupo dado o define la proporción de membresía de los 6 clúster.

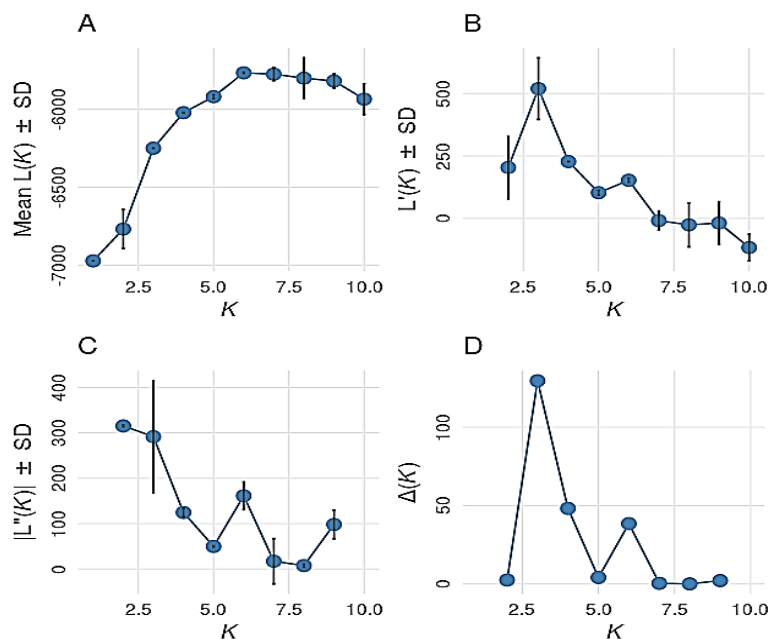


Figura 3. Probabilidad promedio y distribución estándar para cada (K) a partir de sus 10 repeticiones, valores de ΔK (Evanno *et al.* 2005) frente a K (número de conglomerados de población). Obtuvimos todos los valores usando la STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard *et al.* 2000).

4) Análisis discriminante de componentes principales (DAPC).

En primer lugar definimos el número de grupos en base a los resultados obtenido de la función del Criterio de información Bayesiano (CIB) (**Fig. 4**). Con la noción de los resultados de STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard *et al.* 2000), definimos el número óptimo de clúster, $K=6$. Una vez definido el K , se describe a partir del análisis discriminante de componentes principales (DAPC). La cual es una función del paquete R *adegenet* versión 2.1.1 (Jombart 2008) que reúne dos métodos de análisis para evaluar la estructura de la población (Jombart *et al.* 2009). Se obtuvieron los resultados de los datos del genotipo multi-locus, los cuales fueron transformados mediante el análisis de componentes principales (ACP), con el número de clúster ya definido anteriormente, para derivar las variables no correlacionadas que sirvieron como entrada para el análisis discriminante (AD). Los ACP, entregaron una primera visión de cómo se encuentran distribuidos espacialmente estos 6 clúster (**Fig. 5**). Una vez obtenidos los resultados de los análisis de componentes principales (ACP), sirven como entrada para el análisis discriminante (AD), que indica una máxima variación entre los grupos y una mínima variación dentro de los grupos de las localidades estudiadas (**Fig. 6**). Los resultados del DAPC, busca identificar cuál de los grupos se encuentran aislados uno del otro. La **Figura 7** muestra la composición de cada grupo encontrado. **Clúster 1** La montaña (LMo) 12,5%; El roble (Ero) 2,5%; RLR-Chanco (LRu) 2,5%; RLR-Empedrado (Emp) 2,5% y Mininco-Fundo el desprecio (Min) 2,5%. **Clúster 2** RLR-Chanco (LRu_PI) 17,5%; RLR-Empedrado plántulas (EFE_PI) 12,5%; Desprecio (Des) 7,5%; Coipué plántulas (Coi_PI) 2,5% y Coipué (Coi) 2,5%. **Clúster 3** Calzoncillo (CAL) 17,5%; Piragua (PIR) 12,5% y Coipué (COI) 2,5%. **Clúster 4** Mininco-Fundo el desprecio (Min) 12,5%; RLR-Empedrado (Emp) 12,5%; RLR-

Chanco (LRu) 7,5%; El roble (Ero) 12,5%; La montaña (LMO) 2,5%; Piragua (PIR) 2,5%; Desprecio (Des) 12,5% y RLR-Empedrado plántulas (EFE_PI) 7,5%. **Clúster 5** por Coipué (Coi) 17,5%; Coipué plántulas (Coi_PI) 12,5% y el Desprecio (DES) 2,5%. **Clúster 6** definido por RLR-Chanco (LRu) 17,5%; Mininco-Fundo el desprecio (Min) 2,5 y Piragua (PIR) 2,5%. Los análisis de DAPC sustentan la existencia de 6 grandes grupos o clúster, concordantes con los resultados en STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard *et al.* 2000)

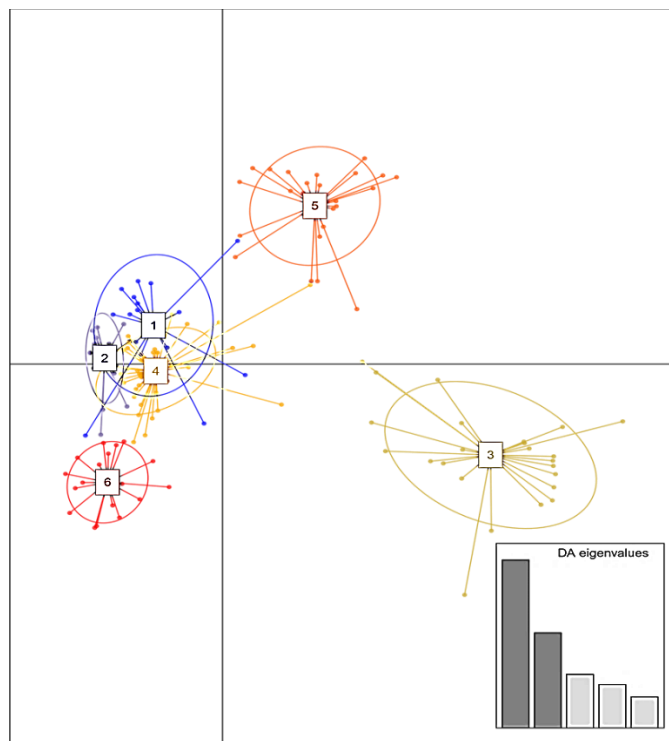
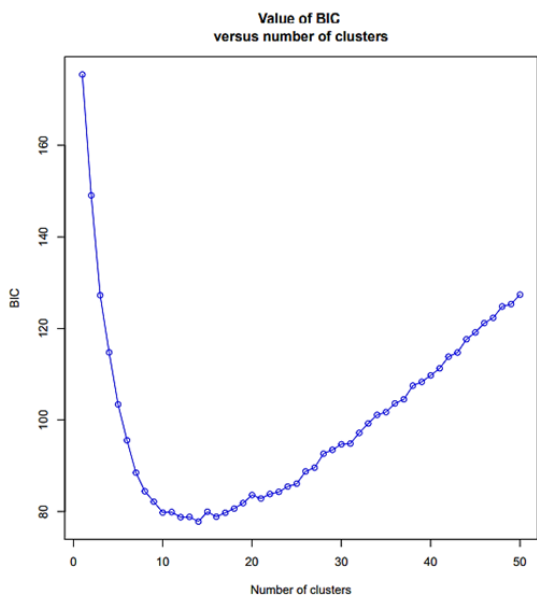


Figura 4. Criterio de información Bayesiano v/s número de clúster, utilizando el paquete R adegenet versión 2.1.1 (Jombart 2008) para definir el número de cluster.

Figura 5. Análisis de componentes principales (ACP) asumiendo el número de localidades muestreadas, utilizando el paquete R adegenet versión 2.1.1 (Jombart 2008).

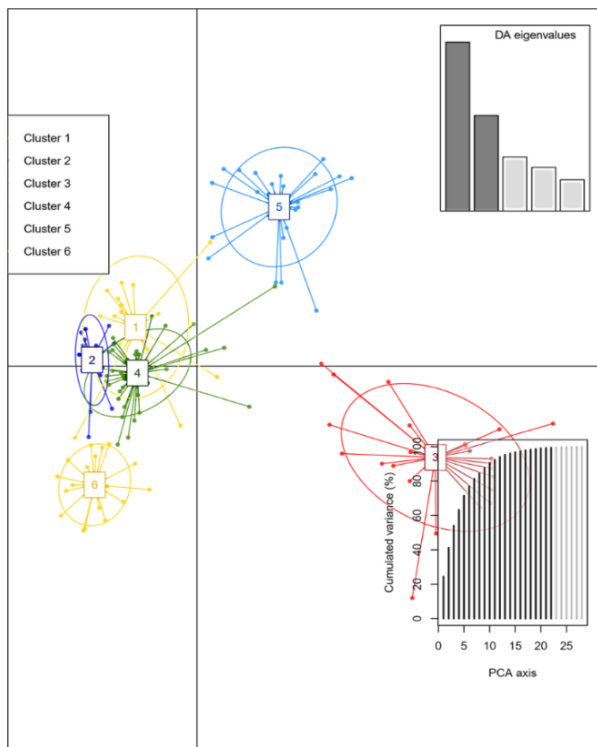


Figura 6. Análisis discriminante (AD), análisis discriminantes de componentes principales (DAPC) y número de funciones discriminantes para las localidades estudiadas.

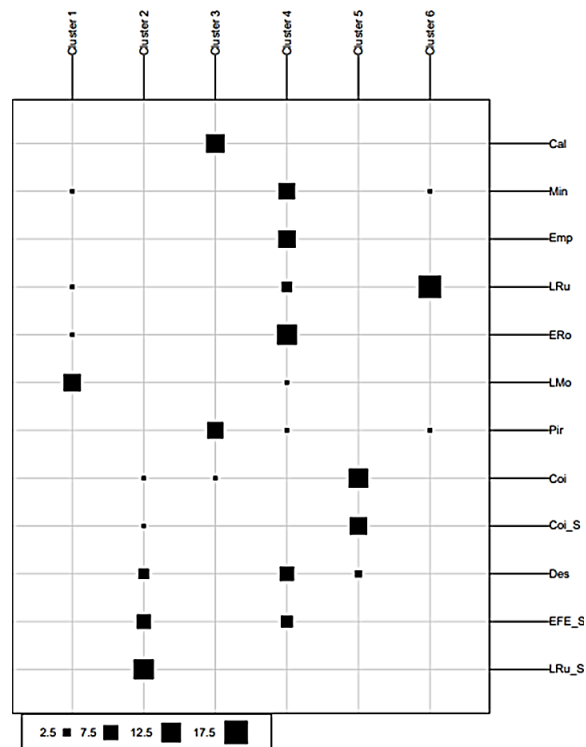


Figura 7. Composición de cada clúster encontrados en las 12 localidades estudiadas, utilizando el paquete R adegenet versión 2.1.1 (Jombart 2008)

(5) Análisis de varianza molecular (AMOVA) *a posteriori*.

El análisis de varianza molecular *a posteriori* realizado luego de reasignar los individuos de *N. alessandrii* a los 6 clusters definidos por el análisis bayesiano de agrupamiento STRUCTURE, revelaron una diferenciación similar a la encontrada mediante el AMOVA *a priori*.

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) *a posteriori* para *Nothofagus alessandrii*. El análisis fue realizado a partir del estadístico de R_{ST} considerando un $K=6$ obtenido mediante DAPC y STRUCTURE.

Fuente de variación	g.l.	SC	SCM	Varianza estimada	% Varianza
Entre poblaciones	5	13597	2719	26,9	28%
Dentro poblaciones	304	20681	68,0	68,0	69%
Total	607	56315		97,9	100%

g.l.= grados de libertad, SC = suma de cuadrados, SCM = suma de cuadrados medios.

DISCUSION & CONCLUSIONES

La biodiversidad, en sentido amplio, se define como la diversidad de la vida, en todas sus formas; es decir, desde genes hasta ecosistemas. Actualmente, la biodiversidad se encuentra amenazada a nivel global (Myers *et al.* 2000), por lo cual la conservación de las especie impone la necesidad de generar conocimiento detallado de biodiversidad a todos los niveles, particularmente de la diversidad genética de las especies amenazadas. Específicamente, los análisis de diversidad genética intra-poblacional de las especies, son fundamentales para el desarrollo de estrategias de la conservación, debido a su utilidad para determinar la persistencia y potencial adaptativo de una especie (Mattera *et al.* 2020). Por lo tanto, los indicadores de diversidad genética deben considerarse al momento de desarrollar criterios y directrices para la conservación de especies, por sobre todo aquellas que se encuentran en peligro de extinción (Myers *et al.* 2000).

Los resultados del presente estudio indican que, a pesar de la fuerte fragmentación que ha sufrido la distribución original de *N. alessandrii*, la especie mantiene niveles significativos de diversidad genética intra-poblacional. Asimismo, los resultados indican tienden a ratificar los hallazgos de estudios previos (Torres-Díaz *et al.* 2007, Torres-Díaz *et al.* 2021) los cuales indican que a pesar de que la especie es polinizada por viento, esta mantiene niveles significativos de diferenciación inter-poblacional.

Al nivel de la especie completa, la heterocigosidad esperada ($H_E = 0,408$) fue menor que la heterocigosidad observada ($H_O = 0,469$), lo cual se tradujo en un fuerte exceso de heterocigotos ($F = -0,127$). En comparación a las especies congénicas chilenas de distribución restringida como *N. glauca* ($H_E = 0,502$) y *N. macrocarpa* ($H_E = 0,625$) y de distribución amplia como *N. obliqua* ($H_E = 0,662$) y *N. alpina* ($H_E = 0,617$), *N. alessandrii* presentó baja diversidad genética (Tabla 7). Similarmente, los valores de heterocigosidad esperada presentados por *N. alessandrii* fueron menos a los reportados por especies no congénicas como *Fagus sylvatica* ($H_E = 0,765$) y *Quercus mulleri* ($H_E = 0,540$) (Tabla 7). No obstante, los valores de Heterocigosidad observada ($H_O = 0,471$) estimados para *N. alessandrii* fueron similares a los encontrados en las especies restringidas *N. glauca* ($H_O = 0,457$) y mayores a los reportados para *N. macrocarpa* ($H_O = 0,405$).

Los análisis de estructuración poblacional revelaron la existencia de seis grupos genéticos ($K = 6$) que se anidan en tres regiones ($K = 3$). Dichos clusters genéticos fueron consistentes con la existencia de un grupo propio de la zona norte (Grupo 1: Coipué), un grupo que contiene poblaciones del norte y centro (Grupo 2: Piragua, Clazoncillos y Fundo El Desprecio) y de un grupo proveniente de la zona centro-sur (Grupo 3: Reserva los Ruiles – Chanco, El Fin Empedrado, El Roble, La Montaña y El Desprecio). El análisis de varianza molecular AMOVA *a posteriori* (después de reagrupar las poblaciones de acuerdo a la estructuración sugerida por STRUCTURE y DAPC) revelaron una alta diferenciación entre clusters (28%). Por otro lado, considerando que *N. alessandrii* es una especie polinizada por el viento (anemófila), la diferenciación genética alta ($F_{ST} = 0,184$). Dicho valor fue mayor que los valores reportados para otras especies no congénicas como *Fagus spp* ($F_{ST} = 0,765$) y *Quercus spp* ($F_{ST} = 0,014$) (Tabla 7). Similarmente, el estimador de diferenciación poblacional (R_{ST}) fue sustantivamente mayor para *N. alessandrii* ($R_{ST} = 0,287$) que para las especies congénicas sudamericanas de distribución amplia como *N. obliqua* (R_{ST}

= 0,110) y *N. alpina* ($R_{ST} = 0,160$) y de distribución restringida como *N. glauca* ($R_{ST} = 0,087$) y *N. macrocarpa* ($R_{ST} = 0,084$). Dichos hallazgos son concordantes con los resultados reportados por Torres-Díaz *et al.* (2007) y Torres-Díaz *et al.* (2021) quienes reportaron valores altos niveles de diferenciación genética. En términos globales, los altos niveles de diferenciación entre poblacional reportados en el presente estudio podrían explicarse por dos razones. Por un lado, la topografía compleja en la cual se distribuye la especie (zona montañosa 400-800 m y restringida a laderas de exposición sur sur-este) podría restringir el flujo génico entre poblaciones aumentando la deriva génica entre las mismas. Futuros estudios podrían evaluar esta explicación mediante estudios de flujo génico de polen mediante estudios de paternidad que cuantifiquen la distancia a la cual pueden dispersarse los granos de polen de la especie. Alternativamente, la alta diferenciación entre poblaciones podría atribuirse al alto grado de fragmentación de la distribución de la especie a causa de la acción antrópica. No obstante, explicación parece poco probable debido a que la especie es altamente longeva y los árboles muestreados corresponden a rebrotes de árboles previamente cortados o quemados que muy probablemente más antiguos (más de 300 años) que el inicio del proceso de fragmentación del hábitat (200 años). **Lo anterior deja de manifiesto la necesidad de tener estimaciones precisas de la longevidad máxima de la especie.** No obstante, actualmente prácticamente todos los árboles remanentes corresponden a rebrotes de base siendo casi imposible encontrar árboles con fustes íntegros que no hayan sido cortados o quemados. En un estudio reciente realizado en *N. alessandrii*, Millanao (2021) estudió la estructura poblacional a escala fina en dos poblaciones (Reserva Los Ruiles - Chanco y Reserva Los Ruiles - El Fin Empedrado). En aquel estudio se encontró una señal significativa de parentesco genético entre pares de árboles a distancias cortas (< 20m) para Chanco (Índice de Moran = 0,135) y El fin empedrado (Índice de Moran = 0,114). En otras palabras, dichos resultados indican que los árboles cercanos entre sí están altamente emparentados y que dicho parentesco disminuye a medida que aumenta la distancia entre pares de árboles. Esto sugiere que la especie regenera en claros pequeños (perturbaciones naturales de escala como por ejemplo la caída de un árbol) como ocurre en otras especies de características biológicas similares (árboles longevos polinizados por viento) del género *Nothofagus*.

Por otro lado, los valores de heterocigosidad observada para plántulas y adultos fueron similares ($H_O = 0,474$ y $H_O = 0,467$, respectivamente). No obstante, los niveles de endogamia en plántulas ($F = -0,055$) fueron sustancialmente mayores que en los adultos ($F = -0,151$). Si bien la diversidad genética de plántulas sólo pudo ser estimada en tres poblaciones (las únicas en las cuales se encontraron regeneración natural), al comparar los niveles de endogamia de plántulas con la de los adultos de su respectiva población, el aumento de endogamia de plántulas respecto de los adultos fue consistente. Desafortunadamente, dichos resultados no pueden ser atribuidos a la fragmentación debido a que para evaluar correctamente el efecto de la fragmentación sobre la endogamia, se debería evaluar la relación entre el tamaño poblacional y la endogamia en un mayor número de poblaciones de un amplio rango de tamaños poblacionales. Una relación negativa y significativa entre dichas variables sería la prueba de que la reducción del tamaño poblacional aumenta la endogamia mediante la reducción en el número de padres potenciales. La mayor endogamia de las plántulas respecto de los adultos, puede explicarse por la fuerte selección en contra de los homocigotos que generalmente ocurre en árboles longevos. Ledig (1986) sugirió que los árboles pueden acumular mucha

carga genética (entendida como la reducción en *fitness* de genotipos particulares en comparación al *fitness* de genotipos promedio) a través de mutaciones somáticas a causa de su gran tamaño. Esta elevada carga genética en plantas de gran tamaño, podría favorecer la polinización cruzada si la heterocigosis logra enmascarar los alelos deletéreos debido a la dominancia de alelos normales. Consecuentemente, en árboles, existiría una fuerte selección a favor de genotipos heterocigotos (vigor híbrido). Una explicación adicional, que podría contribuir a la correlación entre la longevidad y la polinización cruzada, está también asociada con las diferencias en tamaño entre formas de vida. Debido a que las plantas de larga vida son a menudo grandes, ellas podrían por una cuestión de probabilidades, ser más propensas a auto-fertilizarse. Como resultado existiría una selección más fuerte para mecanismos que tiendan a restringir la auto-fertilización en las perennes/longevas (Lande & Schemske 1985, Barrett & Eckert 1990).

Por otro lado, los mayores niveles de endogamia encontrados en plántulas en comparación a los adultos de *N. alessandrii* se complementan con los hallazgos reportados por Millanao (2021). En su conjunto, la mayor endogamia en plántulas que en adultos y la mayor de parentesco entra plantas cercanas espacialmente, indican que sólo unas pocas plántulas llegan al estado adulto después de años de selección en contra de los homocigotos. En términos prácticos, el escenario ecológico más probable para la regeneración natural de la especie, es aquel en el cual las plántulas de sólo tendrán una oportunidad de llegar adulto sólo si: (i) ocurre la caída de un árbol que libere produzca la apertura del dosel y (ii) que las plántulas que germinen en dicho claro, sean lo suficientemente variables genéticamente desplazar competitivamente al resto de plántulas que hayan germinado en dicho claro. Consecuentemente, ambos procesos explican los altos niveles de variación genética de los adultos de la especie.

En su conjunto, los resultados de este estudio tienen el potencial de contribuir a tomar medidas para la conservación de la especie. En primer lugar, la estructuración genética de la especie sugiere que existen al menos 3 grandes grupos genéticos, uno de los cuales está conformado exclusivamente por la población de Coipué proveniente del límite norte de la distribución de la especie, que si bien no presenta alelos privados presenta la mayor heterocigosis observada de todas las poblaciones muestreadas y que, adicionalmente, corresponde a un grupo que, en términos de su frecuencias alélicas, se diferencia significativamente del resto de las poblaciones aledañas de más al sur. Estos resultados justifican la protección de dicho grupo genético en alguna área de conservación. Aunque lo anterior es difícil en términos administrativos, debido a que las poblaciones remanentes de *N. alessandrii* están en manos de particulares, las actuales normas ambientales exigen a las empresas forestales declarar los predios con presencia de ruil como zonas de alto valor para la conservación, lo que implica que no deben ser intervenidas. Por otro lado, los resultados obtenidos para las plántulas sugieren que las plántulas producidas por regeneración natural pueden ser utilizadas para la restauración de la especie ya sea para expandir las poblaciones ya existentes y/o ser utilizadas para crear nuevas poblaciones, ya que de no producirse la apertura de un claro en el bosque, las plántulas están destinadas a morir debido sus tasas de crecimiento son demasiado bajas como para llegar a adultos a causa de que son sombra-intolerantes (Santelices *et al.* 2012, Santelices *et al.* 2019).

Este estudio presenta en parte, evidencia científica para la definición de estrategias de conservación para *N. alessandrii* basado en el conocimiento genético. Los resultados obtenidos son de gran importancia en la biología de conservación, debido a que permite comprender la historia evolutiva pasada y actual de la especie, para proporcionar y/o implementar planes o estrategias de conservación y restauración ecológica. Un ejemplo es la identificación de áreas prioritarias que podrían liderar acciones de conservación *in situ*, con el propósito de crear unidades operativas de manejo genético que mejor se adapten a la estructura genética del ruil. Los análisis propuestos permiten además, la elaboración de mapas que indiquen el rango de distribución o zonas “óptimas” de la especie. Esto permitiría transferir el material reproductivo dentro de estas zonas específicas, con el objetivo de reducir el riesgo de alterar la estructura genética original (Mattera *et al.* 2020).

Este estudio es importante al momento de elaborar proyectos de restauración ecológica que se han y vienen desarrollando en la Universidad Católica del Maule y en instituciones como la Corporación Nacional Forestal (CONAF). Además los datos obtenidos son de gran importancia para el cumplimiento de la ley N° 20.283, sobre Recuperación del Bosque Nativo y Fomento Forestal, con el objetivo de promover la preservación y disminución del riesgo de extinción de la especie endémica chilena.

Estudios futuros deberían incrementar el número de marcadores genéticos y el número de poblaciones con el propósito de mejorar las probabilidades de detectar potenciales núcleos de diversidad genética que sean prioritarios para la conservación.

Especie	N_{POPS}	A	A_E	PLP	H_O	H_E	F_{IS}	R_{ST}	F_{ST}	G_{ST}	Rango	Referencia
<i>N. alessandrii</i>	12	3,1	2,1	86,7	0,471	0,409	-	0,287	0,184	0,172	Restringido	Este estudio
<i>N. glauca</i>	9	4,5	-	-	0,457	0,502	0,142 0,089	0,087	-	-	Restringido	Vergara <i>et al.</i> (2014)
<i>N. alpina</i> *	12	5,5	-	-	0,620	0,617	-	0,160	-	-	Regional	Vergara <i>et a.</i> , (2014)
<i>N. obliqua</i>	20	6,2	-	-	0,600	0,662	0,014 0,094	0,110	-	-	Amplio	Vergara <i>et al.</i> (2014)
<i>N. macrocarpa</i>	116	10,3	3,67	-	0,405	0,625	-	0,084	-	-	Restringido	Mathiasen <i>et al.</i> (2020)
<i>N. pumilio</i>	35	-	-	-	-	0,656	0,017	-	-	0,065	Amplio	Mattera <i>et al.</i> (2021)
<i>Quercus mulleri</i>	22	-	-	-	0,540	0,560	-	-	0,014	-		Pingarroni <i>et al.</i> (2020)
<i>Fagus sylvatica</i>	13	10,5	5,1	-	0,697	0,765	-	-	0,017	-		Cvrčková <i>et al.</i> (2017)

N_{POPS}= Numero de poblaciones estudiadas, A = Número de alelos por locus, A_E = Número de alelos efectivos por locus, PLP = Porcentaje de loci polimórfico, H_E = Heterocigosidad esperada, H_O = Heterocigosidad observada, F_{IS} = Endogamia promedio intra-poblacional (Wright 1951), R_{ST} = índice de diferenciación intrer-poblacional específico para microsatélites (Slatkin 1995), F_{ST} = Índice de diferenciación genética inter-poblacional (Wright 1951), G_{ST} = Índice de diferenciación inter-poblacional (Nei 1973), Rango = Amplio o Estrecho, Referencia Bibliográfica. * indica que *N. nervosa* es igual a la *N. alpina*.

Referencias Bibliográficas.

- Astorga M.P. (2008) Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. In: Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Lovatelli A., Farias A., Uriarte I. Eds. Taller Técnico Regional de la FAO. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Puerto Montt, Chile. 277–287 pp.
- Aizen M.A. & P. Feinsinger (1994) Fragmentación, polinización y reproducción de plantas en un bosque seco del Chaco., Argentina. **Ecology** 75: 330-351.
- Andrén H. (1994) Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: A review. **Oikos** 71: 355-366.
- Aguilar R., Ashworth L., Galetto L. & M.A. Aizen (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. **Ecology Letters** 9: 968-980.
- Aguilar R., Cristóbal-Pérez E.J., Balvino-Olvera F.J., Aguilar-Aguilar M.J., Aguirre-Acosta N., Ashworth L., Lobo J.A., Martén-Rodríguez S., Fuchs E.J., Sanchez-Montoya G., Bernardello G. & M. Quezada (2019) Habitat fragmentation reduces plant progeny quality: aglobal synthesis. **Ecology Letters** 22: 1162-1173.
- Alberdi M (1987) Ecofisiología de especies Chilenas del genero *Nothofagus*. **Bosque** 8: 77-84.
- Barrett S.C.H. & J.R. Kohn (1991) Consecuencias genéticas y evolutivas de pequeños tamaños de población en plantas: Implicaciones para la conservación. En: Falk, D.A. y Holsinger, K.A., Eds., Genética y Conservación de Plantas Raras, Oxford University Press, Nueva York, pp. 3-30.
- Barrett S.C.H. & G.G. Eckert (1990) Variation and evolution of mating systems in seed plants. En: Kawano S (ed.) Biological approaches and evolutionary trends in plants, 230-254. Academic Press, London.
- Barstow M., Echeverría C., Baldwin H. & M.C. Rivers (2017) *Nothofagus alessandrii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T32033A2808995.
- Benoit I. (1989) Libro rojo de la flora terrestre de Chile. Santiago, Chile. *Corporación Nacional Forestal*. 157 p.
- Bedoya S.C., Mir C., Charcosset A. & M. Warburton (2010) Migración del Maíz a partir de su Centro de Origen, Evidencias Históricas, Genéticas y Paleobotánicas. El Cultivo del Maíz, Temas Selectos, Volumen 2. Editorial Mundi Prensa. 227 p
- Buchanan, F.C., Adams L.J. & R.P. Littlejohn (1994) Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. **Genomics** 22: 397-403.
- Bustamante R. & A.A. Grez. (1995). Consecuencias ecológicas de la fragmentación de los bosques nativos. **Ambiente y Desarrollo Chile** 11: 58-63.
- Bustamante R.O. & C. Castor (1998) The decline of an endangered temperate ecosystem: the rui (*Nothofagus alessandrii*) forest in central Chile. **Biodiversity and Conservation** 7:1 607-1626
- Brookfield J.F.Y. (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency.

Molecular Ecology 5: 4534–4555.

- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K. & T.L. Madden (2009) BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics** 15: 10:421.
- Cvrčková H., Máchová P., Poláková L. & O. Trčková (2017) Evaluation of the genetic diversity of selected *Fagus sylvatica* L. populations in the Czech Republic using nuclear microsatellites. **Journal of Forest Science** 63: 53-61.
- Dinerstein E., Olson D.M., Graham D.J., Webster A.L., Primm S.A., Bookbinder M.P. & G. Ledec (1995) Una evaluación del estado de conservación de las ecoregiones terrestres de América Latina y el Caribe. Banco Mundial.
- Donoso C. (1983) Modificaciones del paisaje Forestal Chileno a lo Largo de la Historia. Simposio Desarrollo y Perspectiva de las Disciplinas Forestales en la Universidad Austral de Chile. Págs. 365-438. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Donoso C., & A. Lara (1996) Utilización de los bosques nativos en Chile: pasado, presente y futuro. En: Armesto J., Villagrán C. & M.TK. Arroyo (eds.). *Ecología de los bosques nativos de Chile*, pp. 363-388.
- Echeverría C., Coomes D., Salas J., Rey-Benayas J.M., Lara A. & A. Newton (2006) Rapid deforestation and fragmentation of Chilean temperate forests. **Biological Conservation** 130: 481-494.
- Echeverría A., Newton A., Lara A., Rey-Benayas J.M. & D. Coomes (2007) Impacts of forest fragmentation on species composition and forest structure in the temperate landscape of southern Chile. **Global Ecology and Biogeography** 16: 426-439.
- Ellstrand N.C. & D.R. Elam (1993) Consecuencias genéticas de la población de pequeño tamaño de la población: implicaciones para la conservación de las plantas. **Annual Review of Ecology and Systematics** 24: 217-242.
- Eriksson G., Ekberg I. & D. Clapham (2006) Conservación de genes de árboles forestales. Edición. Uppsala, Suecia.
- Earl, Dent & Vonholdt, Bridgett. (2012). Earl DA, VonHoldt BM. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Cons Genet Res* 4: 359-361. Conservation Genetics Resources. 4. 1-3.
- Elizalde R. (1970) La sobrevivencia de Chile. Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. Uppsala, Suecia.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Excoffier L., Laval G. & S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1: 47- 50.
- Fahrig L. & G. Merriam (1994) Conservación de poblaciones fragmentadas. **Conservation Biology** 8: 50-59.
- Fahrig L. (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology and Systematics** 34: 487-515.

- Farwig N., Bailey D., Bochud E., Herrmann J.D., Kindler E., Reusser N., Schüepp C. & M.H. Schmidt-Entling (2009) Isolation from forest reduces pollination, seed predation and insect scavenging in Swiss farmland.. **Landscape Ecology** 24: 919-27.
- Fajardo A., Torres-Díaz C. & I. Till-Bottraud (2016) Disturbance and density-dependent processes (competition and facilitation) influence the fine-scale genetic structure of a tree species' population. **Annals of Botany** 117: 67–77.
- Fierro S. & L. Pancel (1998) Experiencia Silvicultural del Bosque Nativo de Chile, recopilación de 57 especies arbóreas y evaluación de prácticas silviculturales. Proyecto Manejo Sustentable del Bosque Nativo. Santiago, Chile. CONAF y GTZ. 420 p.
- Frankham R., Briscoe D.A. & J.D. Ballou (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.
- Freeland J.R., Kirk H. & S.D. Petersen (2011) Molecular ecology. WileyBlackwell UK. 447p.
- Gómez et al., 2011 Estructura poblacional de *Pinus radiata* D. Don en fragmentos de Bosque Maulino en Chile central. **Gayana Botanica** 68: 97-101.
- González M. (1998) *Nothofagus alessandrii*. The IUCN Red List of Threatened Species 1998: e.T32033A9676129.
- Grez A.A., R.O. Bustamente R.O., J.A. Simonetti J.A. & L. Fahrig (1998) Ecología del paisaje y fragmentación del hábitat: el caso del bosque ruil en Chile. In: E. Salinas- Chavez y J. Middleton (eds.), Landscape ecology as a tool for sustainable development in Latin America.
- Hanski I. (1998) Metapopulation dynamics. **Nature** 396: 41-49.
- Hanski I. (2005) Landscape fragmentation, biodiversity loss and the societal response. **EMBO Reports** 6: 388-392.
- Hardy O. & X. Vekemans (1999) Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. **Heredity** 83: 145-154.
- Hardy O. & X. Vekemans (2002). SPAGeDI: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes** 2: 618-620.
- Hechenleitner P., Gardner M., Thomas P., Echeverría C., Escobar B., Brownless P. & C. Martínez (2005) Plantas Amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, Conservación y Propagación. Valdivia, Chile. 188p.
- Hoekstra J.M., Boucher T.M., Ricketts T.H. & C. Roberts (2005) Enfrentando una crisis de bioma: disparidades globales de pérdida de hábitat y protección. **Ecology Letters** 8: 23-29.
- IPCC (2014) Cambio climático 2014: impactos, adaptación y vulnerabilidad. Parte A: Aspectos globales y sectoriales. Contribución del Grupo de Trabajo II al Quinto Informe de Evaluación del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy,

- S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)). Cambridge Prensa universitaria, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1132.
- Jombart T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(11), 1403–1405.
- Jombart, T., Pontier, D. & Dufour, AB (2009). Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity* 102, 330–341.
- Kareiva P.M. & M. Marvier (2011) Ciencia de la conservación: equilibrando las necesidades de las personas y la naturaleza. Greenwood Village: Roberts and Co.
- Kattan G.H. (2002) Fragmentación: patrones y mecanismos de extinción de especies. En: Guariguata MR, Kattan GH (eds). Ecología y conservación de bosques tropicales. San José: Ediciones LUR.
- Knapp M., Stöckler K., Havell D., Delsuc F., Sebastiani F. & P.J. Lockhart (2005) Relaxed molecular clock provides evidence for long-distance dispersal of *Nothofagus* (southern beech). *PLoS Biology*: e–14.
- Krauss J. (2010) La fragmentación del hábitat causa pérdida inmediata y retrasada de la biodiversidad a diferentes niveles tróficos. *Ecology Letters* 13: 597-605.
- Lande R. & D.W. Schemske (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I Genetics models. *Evolution* 39: 24-40.
- Ledig F.T. (1986) Heterozygosity, heterosis and fitness in outbreeding plants. En: Soule ME (ed): Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity, 77–104. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Lindenmayer, D. B. y Fischer, J. 2006. Abordar la fragmentación del hábitat y el cambio de paisaje. Una síntesis ecológica y de conservación. Washington, prensa de la isla.
- Lindenmayer, D.B. y J. Fischer. 2006. Cambio de paisaje y fragmentación del hábitat. Island Press, Washington, D.C, EEUU.
- Lindenmayer, D.2008. Una lista de verificación para el manejo ecológico de los paisajes para la conservación. *Ecology Letters* 10: 1-14.
- Loiselle B.A., Sork V.L., Nason J. & C. Graham (1995) Estructura espacial genética de un arbusto tropical del sotobosque, *Psychotriaof fi cinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82: 1420–1425.
- Marklund S., Ellegren H., Ericsson S., Sandberg K. & L. Andersson (1994) Parentage testing and linkajjge analysis in the horse using a set of highlu polymorphic microsatellites. *Genetics* 25: 19-23.
- Manos P.S. (1997) Systematics of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on rDNA spacer sequences (ITS) – taxonomic congruence with morphology and plastid sequences. *American Journal of Botany* 84: 1137-1155.
- Mattera M.G., Pastorino M.J. Lantschner M.V., Marchelli P. & C. Soliani (2020) Genetic diversity and population structure in *Nothofagus pumilio*, a foundation species of Patagonian forests: defining priority conservation areas and management. *Scientific Reports*: 1019231.

- Mathiasen P., Venegas-González A., Fresia P. & A.C. Premoli (2020). A relict of the past: current genetic patterns of the palaeoendemic tree *Nothofagus macrocarpa* were shaped by climatic oscillations in central Chile. ***Annals of Botany*** 126: 891-904.
- Megléczy E., Pech N., Gilles A., Dubut V., Hingamp P., Trilles A., Grenier R. & J.F. Martin (2014) QDD version 3.1: A user friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. ***Molecular Ecology Resources*** 14: 1302–1313.
- Millanao A. (2021) Evaluación de la estructura genética espacial en *N. alessandrii* (ruil): Una herramienta para el diseño de estrategias de conservación de Bosques. Tesis para optar al título de Ingeniero en Recursos naturales, Universidad del Bío-Bío, Chillán Chile. 54pp.
- Miller J.M., Cullingham C.I. & R.M. Peery (2020) The influence of a priori grouping on inference of genetic clusters: simulation study and literature review of the DAPC method. ***Heredity*** 125: 269-280.
- Muñoz C. (1973) Chile: plantas en extinción. Santiago, Chile. Universitaria. 248 p.
- Murcia C. (1995) Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. ***Trends in Ecology and Evolution*** 10: 58-62.
- Muñoz F., Muñoz C., Uribe M., Martín A., Martínez J., Machuca M., Álvarez J.B. & L. Martin (2013). Composición, estructura y diversidad de poblaciones de *Nothofagus glauca* ubicadas en la zona mediterránea de Chile. ***Gayana Botánica***. 70: 82-91.
- 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 para optar al grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina. 296pp. 10.13140/RG.2.1.4362.4567.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G, da Fonseca G.A.B & J. Kent (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. ***Nature*** 403: 853-858.
- Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12), 3321–3323.
- Olivares, P., J. San Martín., y R. Santelices. (2005). "ruil" (*Nothofagus alessandrii*): Estado del conocimiento y desafíos para su conservación. *Comisión Nacional del Medioambiente* (CONAMA). Talca, Chile. 55 p.
- Palma K. (2004). Evaluación de la degradación de los fragmentos vegetacionales de *Nothofagus alessandrii*, "ruil", en el período 1991-2003, en la VII Región del Maule. Tesis Ingeniero Forestal. Talca, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Talca. 89 p.
- Patterson, N., Price, A. L., & Reich, D. (2006). Population structure and eigenanalysis. *PLoS genetics*, 2(12),190.
- Peters R. (1990) Effects of global warming on forests. ***Forest Ecology and Management*** 35:13-33.
- Petit E., Aulagnier S., Vaiman D., Bouissou C. & B. Crouau-Roy (1997) Microsatellite variation in an introduced Mouflon population. ***Journal of Heredity*** 88: 517-520.

- Peakall R. & P.E. Smouse (2006) GenAEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6: 288-295.
- Pritchard J.K., Stephens M. & P. Donnelly (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155: 945-959.
- Premoli, A. & Acosta, M., Mathiasen, P. & Z, Claudio. (2011). Variación genética en *Nothofagus* (Subgénero *Nothofagus*). **Bosque** 33: 115-125.
- Pingarroni A., Molina-Garay C., Rosas-Osorio C., Alfonso-Corradó C., Clark-Tapia, R. Monsalvo-Reyes A., & J.E. Campos (2020). Abundancia y diversidad genética de *Quercus mulleri*, especie microendémica amenazada de Oaxaca. **Madera y Bosques** 26: e2611782
- Raymond M. & F. Rousset (1995) GENEPOP (version 1.2): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity** 86:248–249.
- Rodríguez R, Matthei O. & M. Quezada (1983). Flora arbórea de Chile. Concepción, Chile. Universidad de Concepción. 408 p.
- Rodríguez R. & M. Quezada. (2003). Fagaceae. En: Marticorena C. & R. Rodríguez eds. Flora de Chile Vol. 2. Universidad de Concepción, pp. 64-76.
- Rice W. R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** 43: 223–225.
- Shivaji S., Kholkute S.D., Verma S.K., Gaur A., Umapathy G.U., Singh A., Sontakke S., Shailaja A.R., Monika S., Sivaram V., Yostna B.J., Satyare B., Ahmed M.S., Bala A., Chandrashekar B.V.N., Gupta S., Prakash S., Singh L. (2003). Conservation of wild animals by assisted reproduction and molecular marker technology. Indian **Journal of Experimental Biology** 41: 710-723.
- Slatkin M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, 139(1), 457–462.
- San Martín J. & C. Sepúlveda (2002) Diagnóstico del estado actual de los fragmentos de *Nothofagus alessandrii*, "Ruil", Fagaceae (Nothofagaceae), de la Región del Maule, Chile Central.
- San Martín J. & C. Donoso (1996) Estructura florística e impacto antrópico en el bosque maulino de Chile. En: Armesto J.J., Villagrán C. & M.T.K. Arroyo (eds). Ecología de los bosques nativos chilenos. Santiago de Chile: Editorial Universitaria, 153–167.
- Santelices R., Drake F., & R.M. Navarro-Cerrillo (2012). Establishment of a *Nothofagus alessandrii* plantation using different levels of shade and weed control methods in Talca province, central Chile. **Southern Forests** 74: 71-76.
- Santelices R., Espinoza S., & A. Cabrera (2019). Abastecimiento de semillas de *Nothofagus alessandrii* con consideraciones genéticas. **Ciencia e Investigación Forestal INFOR Chile** 25: 39-54.
- Santelices R., Vergara R., Cabrera A., Espinoza S., & P. Silva (2020). Variación intra-específica en *Nothofagus glauca* una especie endémica de los bosques mediterráneos de Chile. **Bosque** 41: 221-231.

- Torres-Díaz C, Ruiz E, González F, Fuentes G, Cavieres LA (2007) Genetic diversity in *Nothofagus alessandrii* (Fagaceae), an endangered endemic tree species of the coastal Maulino forest of central Chile. ***Annals of Botany*** 100: 75–82.
- Torres-Díaz C., Valladares M.A., Molina-Montenegro, M.A. & F. Mora-Poblete (2021) Isolation and characterization of microsatellites for the endangered endemic tree *Nothofagus alessandrii* (Nothofagaceae). ***Molecular Biology Reports*** 48: 3877-3883.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. & S.G. Rozen (2012) Primer3 -new capabilities and interfaces. ***Nucleic Acids Research*** 40: e115.
- Van Stenis C.G. (1972) *Nothofagus*, key genus to plant geography. In: Valentine ed. Taxonomy, phylogeography and evolution, 275-288. New York, USA.
- Vergara R., Gitzendanner M.A., Soltis D.E., & P.S. Soltis (2014). Population genetic structure, genetic diversity, and natural history of the South American species of *Nothofagus* subgenus *Lophozonia* (Nothofagaceae) inferred from nuclear microsatellite data. ***Ecology and Evolution*** 4: 2450-2471.
- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. ***Annals of eugenics***, 15(4), 323–354.

