

Recibido 01 de julio de 2019 // Aceptado 24 de julio de 2020 // Publicado onlin 23 de junio de 2021

Identificación del origen genético de un rodal semillero implantado de *Nothofagus obliqua* a través del análisis de dos regiones intergénicas de ADN de cloroplasto

AZPILICUETA, M.M.¹; MARCHELLI, P.¹; APARICIO, A.G.¹; PASTORINO, M.J.¹

RESUMEN

En planes de forestación, tanto con fines productivos como de conservación, la correcta elección de la fuente de semilla para utilizar es un factor clave. El área productora de semilla (APS) "Trevelin" de *Nothofagus obliqua* fue instalada en el año 1997 en la Estación Agroforestal de INTA Trevelin, provincia de Chubut. Esta APS está conformada por individuos de origen cuenca Lácar (procedencia Hua Hum), mientras que el resto de los individuos se produjo a partir de semilla de un rodal (procedencia EAFT) cuyo origen se desconoce. En el presente trabajo se buscó identificar el origen del material que conforma el APS "Trevelin", analizando para ello el ADN de cloroplasto (cpADN) de los individuos madre utilizados para su producción (procedencia EAFT). Por ser el cpADN una molécula de herencia clonal y uniparental, representa una herramienta de gran utilidad en la definición de grandes grupos de poblaciones con un acervo genético en común. En la mayoría de las angiospermas, este marcador posibilita la identificación de linajes por herencia materna. La comparación de los resultados del presente trabajo con información generada previamente en estudios de genética poblacional para la especie posibilitó identificar su origen. Para ello, se secuenciaron dos regiones intergénicas del cpADN, *trn-D* y *trn-T* y *ath-H* y *atp-I*, de 12 individuos de la procedencia EAFT. Las muestras problema analizadas presentaron el haplotipo I, que corresponde a las poblaciones de linaje sur de la especie en Argentina, cuyos bosques se distribuyen en la cuenca Lácar. De esta manera es posible prescribir el uso de la semilla de este rodal, no solo en acciones de plantación comercial fuera del área de distribución de la especie, sino también en actividades de restauración de bosques de *N. obliqua* dentro de la cuenca Lácar. Asimismo, se pudieron establecer asociaciones directas entre los haplotipos hallados por la técnica de *PCR-RFLP* (utilizada en estudios previos) y la secuenciación (utilizada en el presente estudio) para ambas regiones intergénicas del ADN de cloroplasto analizadas, lo que permitirá continuar usando el método de secuenciación en futuros análisis sin perder la homología con la información obtenida por medio del método más antiguo.

Palabras clave: haplotipo, secuencia, fuente de semilla, bosques andino-patagónicos.

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Bariloche, Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Bariloche (IFAB) (INTA-CONICET), Grupo de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal. Modesta Victoria 4450, (8400) San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina. Correo electrónico: azpilicueta.maria@inta.gov.ar; pastorino.mario@inta.gov.ar; aparicio.alejandro@inta.gov.ar; marchelli.paula@inta.gov.ar

ABSTRACT

In afforestation programs, both for productive and conservation purposes, the use of the correct seed source is a key factor. The *Nothofagus obliqua* 'Trevelin' seed production area (SPA) was installed during 1997 at INTA Agroforestry Station, Chubut province. 'Trevelin' SPA has two different origins. While some individuals were produced with seeds belonging to Lácar forests in Argentina (Hua Hum provenance), the rest of the seedlings were produced with seeds collected from a stand (EAFT provenance) with unknown origin. In the present work, we tried to identify the origin of the individuals at the 'Trevelin' SPA, analysing the chloroplast DNA (cpDNA) of the mother trees used for their production (EAFT provenance). Based on the clonal and uniparental inheritance of cpDNA, it represents a useful tool in the definition of large groups of populations with a common gene pool. In most angiosperms, this marker enables the identification of lineages of maternal inheritance. The comparison of the results with previous genetic population information allowed the origin identification. For this purpose, we sequenced two inter-genic regions of the chloroplast DNA, *trn-D* and *trn-T* and *ath-H* and *atp-I*, in 12 mother trees. The analysed samples showed haplotype I, which corresponds to the southern lineage populations of the species in Argentina, with forests distributed in the Lácar basin. Therefore, it is possible to prescribe the use of the seed of this stand, not only in actions of commercial plantation outside the natural distribution area of the species, but also, in restoration activities of *N. obliqua* forests within Lácar basin. Even more, direct associations could be established between the haplotypes found by the PCR-RFLP technique (used in previous studies) and the sequencing (used in the present study) for both inter-genic regions of the analysed chloroplast DNA. This will allow using the method of sequencing in future analyses without losing the homology with the information obtained by the oldest method.

Keywords: haplotype, sequence, seed source, patagonian andean forests.

INTRODUCCIÓN

En planes de forestación, tanto con fines productivos como de conservación, la correcta elección de la fuente de semilla para utilizar es un factor clave. La semilla no solo debe presentar un alto potencial de adaptación al sitio de implantación, sino también garantizar el menor impacto de cambio sobre la diversidad genética de las poblaciones naturales locales o adyacentes. A los fines de desarrollar una silvicultura sustentable, muchos países han comenzado a reconocer la importancia del origen del material de propagación, tanto para acciones de plantación productiva o de restauración como también de control comercial. Para ello se han creado regulaciones que implementan procesos de trazabilidad, donde los análisis a partir de marcadores moleculares cobran cada vez mayor relevancia. Por ejemplo, Alemania implementó dos sistemas para dar trazabilidad al material de propagación en especies forestales, que incluyen la determinación del origen con base en análisis moleculares, en distintas etapas del proceso desde la colecta de la semilla hasta la producción de plantines en vivero (Finkeldey *et al.*, 2010).

En restauración ecosistémica se promueve desde la literatura el uso de la fuente local de semilla (ej. Mc Kay *et al.*, 2005), ya que en general esa estrategia ha presentado mejores resultados (Vander Mijnsbrugge *et al.*, 2009). La demanda de adaptación del material vegetal a nuevas condiciones del sitio que impone el cambio climático abre interrogantes en relación con este paradigma. Broadhurst *et al.* (2008) proponen la inclusión de procedencias adicionales a la local, con el fin de aumentar la variación genética

del germoplasma y así maximizar el potencial de adaptación de la población implantada. En esta línea, y sobre todo cuando no es posible cosechar semilla local como material para realizar la intervención, el concepto de "zona genética" (ZG) adquiere relevancia.

Una ZG se define por contener un acervo genético homogéneo y por lo tanto, cada una de las poblaciones que la conforman resultan fuentes de semilla apropiadas para intervenir dentro de la propia ZG. Para su definición se utiliza información genética obtenida con distintos marcadores moleculares, como regiones del ADN de cloroplasto (cpADN) (ej. Bucci y Vendramin, 2000), regiones microsátélites (ej. Honjo *et al.*, 2009), isoenzimas (ej. Pastorino y Gallo, 2009), así como combinaciones entre dichos marcadores (ej. González Martínez *et al.*, 2004; Azpilicueta *et al.*, 2013; Soliani *et al.*, 2017). Por ser el cpADN una molécula de herencia clonal y uniparental (ej. se transmite de una generación a la siguiente sin mediar la recombinación de genes), representa una herramienta de gran utilidad en la definición de grandes grupos de poblaciones con un acervo genético en común. En la mayoría de las angiospermas, este marcador posibilita la identificación de linajes (ej. Marchelli *et al.*, 1998; Marchelli y Gallo, 2006; Soliani *et al.*, 2012) por herencia materna (Harris y Ingram, 1991).

El conocimiento del patrón de diversidad genética natural de una especie, más aún si incluye inferencias filogeográficas, es clave para identificar el origen de un material vegetal. Este conocimiento posibilita comparar la genética de un material de origen desconocido con la de grupos de poblaciones con un patrón genético modelado por la his-

toria evolutiva de la especie, incluyendo procesos de flujo génico y deriva génica, así como también efectos antrópicos, entre otros. Las finalidades de identificar el origen desconocido de un material vegetal (vivo o no) pueden ser diferentes. Así, Lowe *et al.* (2004) identifican el origen autóctono o introducido de los bosques de roble en Gran Bretaña, con base en un estudio previo de reconstrucción de historia glaciaria en esa región basado en el análisis de su cpADN (Cottrell *et al.*, 2002). Asimismo, Deguilloux *et al.* (2004) demuestran la posibilidad de determinar el origen de la madera usada para la fabricación de toneles de vino en bodegas francesas, a partir de un extenso estudio de variación genética a nivel del cpADN de las poblaciones de distribución europea de roble (Petit *et al.*, 2002).

El roble pellín, *Nothofagus obliqua* Mirb. (Oerst.), es una especie decidua, anemófila y anemocórica de los bosques templados andino patagónicos de Argentina. Sus poblaciones se extienden desde los 36° 40' S en las Lagunas de Epulauquen hasta los 40° 11' S en la costa sur del lago Lácar, en el Parque Nacional Lanín (Sabatier *et al.*, 2011). Es una especie de importancia ecológica y económica dada la calidad de su madera. Si bien su cultivo aún es muy incipiente, los conocimientos generados para su domesticación (Donoso *et al.*, 2004, 2006; Azpilicueta *et al.*, 2010) alientan a posicionarla como una opción productiva forestal en la diversificación de la actividad en la región, mayormente enfocada en la producción de especies de rápido crecimiento como el pino ponderosa (*Pinus ponderosa*) y el pino oregón (*Pseudotsuga menziesii*).

El cpADN de *N. obliqua* fue secuenciado y descrito por El Mujtar *et al.* (2014), y además se estudió su variación a nivel poblacional (Azpilicueta *et al.*, 2009). La identificación de dos linajes maternos principales en los bosques argentinos de *N. obliqua* posibilitó la definición de dos grandes áreas latitudinales con una identidad genética distintiva (Azpilicueta *et al.*, 2009). Mediante el análisis de cpADN los bosques argentinos de *N. obliqua* fueron ordenados genéticamente según dos grandes linajes maternos, separados latitudinalmente al norte y sur del volcán Lanín (39° 40' S), conformados respectivamente por dos y tres haplotipos de cpADN en diferentes frecuencias. A su vez, la información generada con marcadores nucleares polimórficos permitió la distinción de tres Zonas Genéticas dentro de estas grandes áreas (tabla 1) (Azpilicueta *et al.* 2009, Azpilicueta *et al.*, 2013, Azpilicueta *et al.*, 2017).

Con el fin de contar con rodales proveedores de semilla de *N. obliqua* en Argentina existen áreas productoras de semilla (APS) inscritas en el Instituto Nacional de Semillas en Argentina (INASE) para los dos grandes linajes definidos en la especie. Por una parte, el APS "Lagunas de Epulauquen" (código de inscripción 18Q7334KNo) fue inscrita en 2010 por la Dirección Provincial de Áreas Naturales Protegidas de Neuquén y conforma una fuente de semilla adecuada para acciones de restauración y enriquecimiento de la ZG 1 (linaje norte). Por otra parte, el APS "Yuco Alto", en el Parque Nacional Lanín fue inscrita en 2008 por el INTA (código 11Q5513KNo) y conforma una fuente de semilla segura para acciones de plantación en los bos-

ques de la ZG 3 (linaje sur). Recientemente (2017) se ha realizado una incorporación como APS de un rodal de *N. obliqua* plantado en 1997 en dependencias del INTA, en la Estación Agroforestal Trevelin (EAFT). Esta APS "Trevelin" de 2,35 ha (y de aproximadamente 1200 individuos), inscrita en el INASE por la Asociación Cooperadora de INTA Esquel (código de inscripción 26U7519JL) está conformada por plantas cuyo origen correspondió a una mezcla de proporciones desconocidas de dos fuentes:

1) Origen y procedencia bosque natural del paraje Hua Hum, Parque Nacional Lanín correspondiente a la ZG 3, dentro del linaje sur (haplotipo I en tabla 1).

2) Procedencia EAFT, de origen desconocido. En este caso se trata de un rodal de menos de 0,10 ha implantado en el año 1956 en el vivero de la EAFT, que a los 50 años tenía una altura media de 31,9 m. Este rodal ha sido raleado fuertemente y hoy se mantienen en pie unos 20 árboles, que actúan como cortina cortavientos.

La falta de identificación del origen de una proporción de los individuos que conforman esta APS genera dudas respecto del alcance de la utilización de su semilla. Para plantaciones fuera del área de distribución de la especie, su utilización está prescrita, asumiendo que exista una buena adaptación de este germoplasma al ambiente de cultivo. Pero para acciones de restauración o enriquecimiento de bosques dentro del rango natural de distribución de *N. obliqua*, no se podría promover su utilización. Este trabajo tiene el objetivo de avanzar en la identificación del origen de los árboles de esta APS. Esto posibilitaría ampliar la prescripción sobre el uso y aplicación de esta APS. Como el presente estudio se basó en análisis de secuencias, la homologación entre resultados de esta técnica y la usada anteriormente para establecer los haplotipos de referencia (técnica PCR-RFLP) se constituyó en un objetivo secundario en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se cosecharon yemas de invierno de 12 individuos que conforman una cortina de 20 individuos en pie de *N. obliqua* (procedencia EAFT). De estas se extrajo ADN según el protocolo descrito en Dumolin *et al.* (1995), con modificaciones según Marchelli y Gallo (2006). En el caso de los controles se recurrió a muestras de ADN conservadas a -80 °C en el Laboratorio de Genética Molecular del INTA Bariloche. El ADN se chequeó en gel de agarosa al 0,8% para cuantificarlo y conocer su calidad.

Se analizaron dos regiones intergénicas de cloroplasto: *trn-D* y *trn-T* (Demesure *et al.*, 1995) y *ath-H* y *atp-I* (Grivet *et al.*, 2001). El análisis de estas dos regiones es suficiente para identificar todos los haplotipos hallados en Argentina (Azpilicueta *et al.*, 2009). Existe una excepción en el caso del haplotipo exclusivo XIII hallado en baja frecuencia (y junto al haplotipo mayoritario I) en una población de la cuenca Lácar identificada como linaje sur, pero que conforma la misma zona genética (ZG 3) que el resto de las poblaciones de la cuenca. La distinción entre ambos haploti-

Linaje	ZG	Haplotipo	Fragmento de restricción <i>trn-D trn-T</i>	Poblaciones control	Fragmento de restricción <i>atp-H atp-I</i>	Poblaciones control
Norte	1	II	3	Ñorquinco, Lácar, Argentina (2), Victoria, Chile (1)	2	Bandurrias, Nonthué y Hua Hum, Lácar (3), Pilolil, Aluminé (1) y Ñorquinco (1), Argentina
		IV	3	Ñorquinco, Lácar, Argentina (2), Victoria, Chile (1)	1	Cordillera de la Costa (2), Valle Longitudinal (3) y Cordillera de los Andes (1), Chile
Sur	2 y 3	I, XIII	2	Bandurrias y Yuco, Lácar (3), Argentina	2	Bandurrias, Nonthué y Hua Hum, Lácar (3), Pilolil, Aluminé (1) y Ñorquinco (1), Argentina
		XIV	1	Llancacura, Cord. de la Costa, Chile (3)	2	Bandurrias, Nonthué y Hua Hum, Lácar (3), Pilolil, Aluminé (1) y Ñorquinco (1), Argentina

Tabla 1. Linajes maternos identificados para las regiones intergénicas de ADN de cloroplasto *trn-D trn-T* y *atp-H atp-I* en la distribución argentina de *Nothofagus obliqua*; zonas genéticas (ZG) definidas y haplotipos que los conforman según la técnica de PCR-RFLP en análisis previos (Azpilicueta *et al.*, 2009, 2013). Entre paréntesis se indica el número de individuos controles utilizados.

Referencias: ZG: zona genética; la codificación de los fragmentos de restricción se realizó según su peso molecular (Azpilicueta *et al.*, 2009).

pos se basa en el análisis de la región intergénica *trnF-trnV* de 3000 pb, que no fue analizada en el presente estudio por no considerarlo necesario según el objetivo planteado. Como controles se tomaron individuos que representan los haplotipos previamente hallados en la distribución de la especie (Azpilicueta *et al.*, 2009) como se muestra en la tabla 1. La amplificación de los fragmentos se realizó con los protocolos descritos en Azpilicueta *et al.* (2009) para cada primer. El producto de amplificación purificado con método de precipitación en acetato de sodio e isopropanol se chequeó y cuantificó en gel de agarosa al 1,2%. La secuenciación de los fragmentos se realizó en un equipo ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación y Genotipado del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNI A, INTA).

Para la edición y el alineamiento de las secuencias se utilizaron los programas Bioedit v.7.0.5.3 y Aliview (Lars-

son, 2014). El programa Network (www.fluxus-engineering.com) se utilizó para la construcción de la red de haplotipos a partir de un algoritmo de median joining. La definición de cada haplotipo se basa en la combinación de los polimorfismos obtenidos en cada región del ADN de cloroplasto analizada. Se homologaron los resultados de la técnica anterior (PCR-RFLP) con los datos de la secuenciación actual analizando cada fragmento por separado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la región inter-génica *trn-D/trn-T*

La longitud del fragmento *trn-D/trn-T* secuenciado es de 960 pb, similar al tamaño reportado para la especie en aproximadamente 1000 pb (Azpilicueta *et al.*, 2009). Tomando los controles analizados se detectaron tres secuen-

	<i>trn-D/trn-T</i>					<i>atp-H/atp-I</i>															
haplotipo I/XIII	A	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
haplotipo II	A	A	A	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
haplotipo IV	A	A	A	A	C	G	T	T	C	T	T	C	C	A	T	T	T	C	T	T	T
haplotipo XIV	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EAF T (1-12)	A	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Figura 1. Polimorfismos detectados en cada una de las regiones intergénicas de ADN de cloroplasto analizadas (*trn-D/trn-T* y *atp-H/atp-I*). Se muestran los controles (haplotipos I/XIII, II, IV, XIV) e individuos de la procedencia EAF T (que corresponden a las secuencias de los individuos 1 al 12) analizados. Referencias: A: adenina, T: timina, C: citosina, G: guanina, -: deleción.

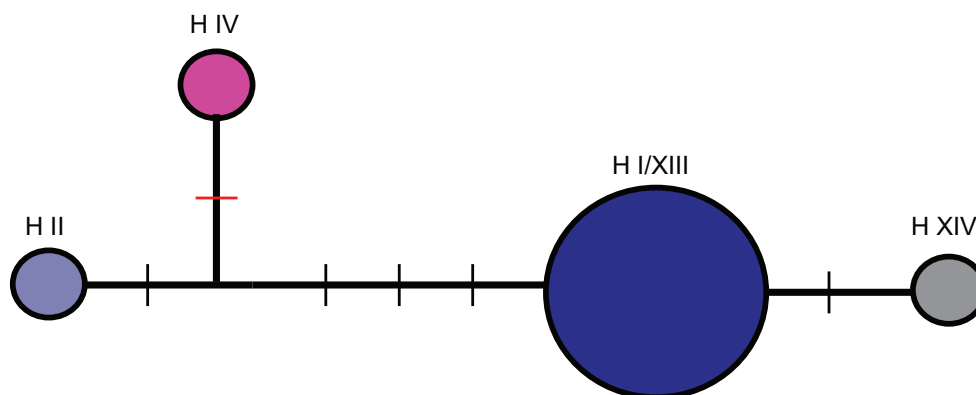


Figura 2. Red de haplotipos construida a partir del análisis conjunto de las dos regiones intergénicas de ADN de cloroplasto *trn-D/trn-T* y *atp-H/atp-I*. El diámetro de los círculos es proporcional a la cantidad de individuos que presentaron ese haplotipo. Los haplotipos control se representaron con un único individuo, mientras que se incluyeron en el análisis los 12 individuos problema. Se muestran los pasos mutacionales entre los distintos haplotipos hallados; el indel de 16 pb se resalta con rojo.

cias diferentes que se correspondieron con las variantes halladas en los haplotipos I/XIII, II-IV para este fragmento (Azpilicueta *et al.*, 2009). Las 12 muestras problema (procedencia EAFT) mostraron una misma y única secuencia, coincidente con la hallada para el haplotipo I/XIII (figura 1).

Análisis de la región inter-génica *atp-H/atp-I*

El tamaño del fragmento secuenciado de la región inter-génica *atp-H/atp-I* fue de 823 pb, similar al estimado para el producto de amplificación en la técnica PCR-RFLP en 800 pb (Azpilicueta *et al.*, 2009). Los controles de los haplotipos I, II y XIV mostraron una única variante como era esperable según análisis previos. Mientras que los controles del haplotipo IV mostraron una inserción de 16 pb en relación con la otra variante hallada (para el resto de los haplotipos). Los 12 individuos problema (EAFT) mostraron la misma secuencia de los controles de la variante de los haplotipos I/XIII, II y XIV (figura 1). A partir del análisis de esta región se descarta al haplotipo IV (Lagunas de Epulauquen) como origen del rodal con procedencia EAFT.

Análisis a nivel de haplotipo (combinación de las regiones intergénicas *trn-D/trn-T* y *atp-H/atp-I*)

A partir del análisis combinado de las dos regiones intergénicas estudiadas en el presente trabajo, con una longitud de fragmento de 1783 pb, se construyó la red de haplotipos. Las 12 muestras problema (procedencia EAFT) mostraron el haplotipo I/XIII (linaje sur). La relación entre los haplotipos según la cantidad de pasos mutacionales se muestra en la figura 2. Los cuatro haplotipos control se representaron con un solo (1) individuo, respectivamente.

CONCLUSIONES

El haplotipo I/XIII hallado en las muestras problemas (procedencia EAFT) permite inferir al linaje sur (cuenca Lácar) de *N. obliqua* en Argentina como su origen. Como a su vez la fracción de árboles de origen conocido de la APS "Trevelin" también corresponde al linaje sur (población Hua Hum, cuenca Lácar), la semilla producida por el APS podría ser utilizada en acciones de restauración dentro de la cuenca Lácar.

Es probable que los plantines utilizados para establecer la procedencia EAFT, implantada en 1956, hayan sido provistos por el vivero ubicado en la Estación Forestal en Puerto Anchorena, Isla Victoria, ya que en aquella época era un centro de provisión de plantines de especies leñosas a escala utilizados en la región. Lamentablemente no se consigna en esos registros el origen utilizado (fuente consultada Boletín Forestal, Estación Forestal Puerto Anchorena, isla Victoria, 1942), lo que nos habría permitido contar con un mejor indicio del probable origen de la procedencia EAFT. Sin embargo, consideramos altamente probable que en aquella época se utilizara semilla proveniente del Parque Nacional Lanín, creado en 1937, dada la fácil disponibilidad de estas en diversos bosques, como por ejemplo en los alrededores de San Martín de los Andes.

Adicionalmente a este resultado, se pudieron establecer asociaciones directas entre los haplotipos hallados por la técnica de PCR-RFLP (utilizada en estudios previos) y la secuenciación (utilizada en el presente estudio) para ambas regiones intergénicas del ADN de cloroplasto analizadas, lo que permitirá continuar usando el método de secuenciación en futuros análisis sin perder la homología con la información obtenida por medio del método más antiguo.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado con fondos del proyecto PNFOR1104063 “Mejoramiento Genético de Especies Forestales Nativas para Usos de Alto Valor” (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Queremos agradecer a Ana Delia Torres quien ayudó gentilmente en la recolección de las muestras en la EAFT INTA Esquel, y a Teresa Schinelli, Lidia Lugano, Santiago Quiroga y Adolfo Moretti por su apoyo en la búsqueda de información sobre el origen de la cortina de robles en la EAFT, INTA Esquel.

BIBLIOGRAFÍA

- AZPILICUETA, M.M.; MARCHELLI, P.; GALLO, L.A. 2009. The effects of quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genetics and Genomes* 5, 561-571.
- AZPILICUETA, M.M., VARELA, S.; MARTÍNEZ, A.; GALLO, L.A. 2010. Manual de viverización, cultivo y plantación de Roble Pellín en el norte de la región andino-patagónica. Ediciones INTA, Bariloche, Argentina. 72 p.
- AZPILICUETA, M.M.; GALLO, L.A.; 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. *Forest Ecology and Management* 302, 414-424. DOI: 10.1016/j.foreco.2013.03.037
- AZPILICUETA, M.M.; MARCHELLI, P.; GALLO, L.A.; UMAÑA, F.; THOMAS, E.; VAN ZONNEVELD, M.; APARICIO, A.G.; PASTORINO, M.J.; BARBERO, F.; MARTÍNEZ, A.H.M.; GONZÁLEZ PEÑALBA, M.; LOZANO, L. 2017. Manual de Zonas Genéticas de Raulí y Roble Pellín en Argentina. En: AZPILICUETA, M.M.; MARCHELLI, P. (Eds.). *Herramientas para la conservación y el manejo de la diversidad genética*. Ediciones INTA, Bariloche, Argentina. 50 p.
- BROADHURST, L.M.; LOWE, A.; COATES, D.J.; CUNNINGHAM, S.A.; MC DONALD, M.; VESK, P.A.; YATES, C. 2008. Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications*. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2008.00045.x
- BUCCI, G.; VENDRAMIN, G.G. 2000. Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Molecular Ecology* 9, 923-934.
- COTTRELL, J.; MUNRO, R.C.; TABBENER, H.; GILLIES, A.C.M.; DEANS, D.; LOWE, A.J. 2002. Distribution of chloroplast DNA variation in British oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*): the influence of postglacial colonization and human management. *Forest Ecology and Management* 156, 181-196.
- DEGUILLLOUX, M.F.; PEMONGE, M.H.; PETIT, R.J. 2004. DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. *Ann. For. Sci.* 61, 97-104.
- DEMASURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4, 129-131.
- DONOSO, C.; GALLO, L.A.; DONOSO, P.; AZPILICUETA, M.M. 2004. Variación en *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. En: DONOSO, C.; PREMOLI, A.; GALLO, L.A.; IPINZA, R. (Eds.). *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Editorial Universitaria, Chile. 79-113 pp.
- DONOSO, P.; DONOSO, C.; GALLO, L.; AZPILICUETA, M.M.; BLADINI, A.; ESCOBAR, B. 2006. *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. Roble, Pellín, Hualle. En: DONOSO ZEGERS, C. (Ed.). *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Autoecología.. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia, Chile. 471-485 pp.
- DUMOLIN, S.; DEMASURE, B.; PETIT, R.J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theor Appl Genet* 91, 1253-1256.
- EL MUJTAR, V.A.; GALLO, L.A.; LANG, T.; GARNIER-G, E.R. 2014. Development of genomic resources for *Nothofagus* species using next-generation sequencing data. *Molecular Ecology Resources* DOI: 10.1111/1755-0998.12276.
- FINKELDEY, R.; LEINEMNN, L.; GAILLING, O. 2010. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. *Appl Microbiol Biotechnol* 83, 1251-1258.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; MARIETTE, S.; RIBEIRO, M.M.; BURBAN, C.; RAFFIN, A.; CHAMBEL, M.R.; RIBEIRO, C.A.M.; AGUIAR, A.; PLOMION, C.; ALÍA, R.; GIL, L.; VENDRAMIN, G.G.; KREMER, A. 2004. Genetic resources in maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton): molecular and quantitative measures of genetic variation and differentiation among maternal lineages. *Forest Ecology and Management* 197, 103-115.
- GRIVET, D.; HEINZE, B.; VENDRAMIN, G.G.; PETIT, R.J. 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Mol. Ecol. Notes* 1, 345-349.
- HARRIS, S.A.; INGRAM, R. 1991. Chloroplast DNA and bio-systematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 14, 393-412.
- HONJO, M.; KITAMOTO, N.; UENO, S.; TSUMURA, Y.; WASHITANI, I.; OHSAWA, R. 2009. Management units of the endangered herb *Primula sieboldii* based on microsatellite variation among and within populations throughout Japan. *Conservation Genetics* 10, 257-267.
- LARSSON, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30, 3276-3278.
- LOWE, A.; MUNRO, R.; SAMUEL, S.; COTTRELL, J. 2004. The utility and limitations of chloroplast DNA analysis for identifying native British oak stands and for guiding replanting strategy. *Forestry* 77, 335-347.
- MARCHELLI, P.; GALLO, L.A.; SCHOLZ, F.; ZIEGENHAGEN, B. 1998. Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 642-646.
- MARCHELLI, P.; GALLO, L.A. 2006. Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics* 7, 591-603.
- MACKAY, J.K.; CHRISTIAN, C.E.; HARRISON, S.; RICE, K.J. 2005. How local is local? – A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology* 3, 432-440.
- PASTORINO, M.J.; GALLO, L.A. 2009. Preliminary operational genetic management units of a highly fragmented forest tree species of southern South America. *Forest Ecology and Management* 257, 2350-2358.
- PETIT, R.J.; CSAIKL, U.M.; BORDACS, S.; BURG, K.; COART, E.; COTTRELL, J.; VAN DAM, B.; DEANS, J.D.; DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; FINESCHI, S.; FINKELDEY, R.; GILLIES, A.; GLAZ, I.; GOICOECHEA, P.G.; JENSEN, J.S.; KÖNIG, A.O.; LOWE, A.J.; MADSEN, S.F.; MATYAS, G.; MUNRO, R.C.; OLALDE, M.; PEMONGE, M.H.; POPESCU, F.; SLADE,

D.; TABBENER, H.; TAURCHINI, D.; DE VRIES, S.G.M.; ZIEGENHAGEN, B.; KREMER, A. 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest. Ecology and Management*. 156: 5-26.

SABATIER, Y.; AZPILICUETA, M.M.; MARCHELLI, P.; GONZÁLEZ-PEÑALBA, M.; LOZANO, L.; GARCÍA, L.; MARTINEZ, A.; GALLO, L.A.; UMAÑA, F.; BRAN, D.; PASTORINO, M.J. 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. Argent. Bot.* 46, 131-138.

SOLIANI, C.; GALLO, L.; MARCHELLI, P. 2012. Phylogeography of two hybridizing southern beeches (*Nothofagus* spp.) with different adaptive abilities. *Tree Genetics & Genomes* 8, 659-673.

SOLIANI, C.; UMAÑA, F.; MONDINO, V.; THOMAS, E.; PASTORINO, M.J.; GALLO, L.; MARCHELLI, P. 2017. Zonas genéticas de lenga y ñire en Argentina y su aplicación en la conservación y manejo de los recursos forestales. Ediciones INTA, Bariloche, Argentina. 55 p.

VANDER MIJNSBRUGGE, K.; BISCHOFF, A.; SMITH, B. 2009. A question of origin: Where and how to collect seed for ecological restoration. *Basic and Applied Ecology* DOI: 10.1016/j.baae.2009.09.002