

Diversidad genética en dos especies del género *Nothofagus* analizada a través de marcadores microsatélites

Coordinación general: Dra. Paula Marchelli. (pmarchelli@bariloche.inta.gov.ar)

Investigadores participantes: Dr. Leonardo Gallo, Ing. Ftal. María Marta Azpilicueta, Biól. Carolina Soliani

Lugar: Unidad de Genética Forestal. INTA EEA Bariloche, Argentina.

Resumen

Nothofagus nervosa y *Nothofagus obliqua* son componentes de los Bosques Templados del sur de Sudamérica que sufrieron una fuerte explotación, dada la elevada calidad de su madera. En la actualidad, la mayoría de sus bosques se encuentran en áreas protegidas. La información genética es fundamental en programas de conservación y manejo, por lo que este proyecto tuvo como principal objetivo el estudio de la variación genética en estas dos especies. Se recolectaron al menos 30 individuos por población, de un total de 24 poblaciones del área total de distribución argentina de ambas especies. Se genotiparon los individuos para siete loci microsatélites. Se estimaron parámetros genéticos poblacionales y se mapeó la variación genética a nivel geográfico empleando DIVA-GIS. Resultados preliminares sobre 13 poblaciones indican que las especies están muy diferenciadas (AMOVA: 0.346, $p = 0.001$), siendo *N. nervosa* más diversa (14 vs. 7 alelos exclusivos, riqueza alélica: 43.4 vs. 39.8, $H_o = 0.396$ vs. 0.260). Un agrupamiento con métodos bayesianos detectó una máxima probabilidad con 4 grupos, estando todos los individuos de *N. obliqua* en un único grupo. La riqueza alélica se mapeó con DIVA GIS bajo las condiciones climáticas predichas para el año 2050 de acuerdo a las proyecciones de tres modelos climáticos. En este contexto, *N. obliqua* presentó mayores niveles de diversidad genética en las poblaciones más xéricas del este, mientras que *N. nervosa* fue más variable hacia el oeste, en zonas más húmedas. Actualmente se están procesando los datos de las restantes poblaciones.

Métodos

Muestreo

Se recorrieron las poblaciones para caracterizar someramente el sitio, obtener coordenadas geográficas, definir la estrategia de cosecha, etc. En dicha recorrida se caracterizaron las poblaciones según su composición específica en **poblaciones puras** (presencia de una sola de las especies de estudio) o **poblaciones mixtas** (presencia de ambas especies) (Tabla 1). Si bien las poblaciones Quechuquina de Raúl y Quillén de Roble corresponden a bosques mixtos, se consideraron como poblaciones puras ya que sólo una de las especies fue analizada.

Se cosecharon yemas u hojas de 26 – 50 individuos por población (promedio 34.4 ind/pob). En aquellos casos que así lo requirieran, la cosecha se realizó con ayuda de

tijera de podar montada en pértiga. El material se acondicionó en bolsas de papel con silica-gel, tanto para su transporte como para su almacenamiento en el laboratorio.

Los individuos se geo-referenciaron a campo con ayuda de un GPS. Se armó la base de datos para luego incluirla en el análisis con DIVA-GIS.

Poblaciones

Antes del inicio del proyecto se contaba con información de dos poblaciones de Roble y siete de Raulí. La recolección de material se hizo en las poblaciones restantes.

- Roble Pellín: se recolectó material en ocho poblaciones, adicionando 2 a las originalmente propuestas. Se cuenta por lo tanto con 10 poblaciones totales analizadas.
- Raulí: se recolectó material en siete poblaciones para completar a un total de 14 sitios de muestreo, uno más del propuesto originalmente.

Es decir que se informan 3 poblaciones más a las incluidas originalmente en el proyecto MAPFORGEN. Se adjunta un mapa con los sitios de muestreo (Fig 1).

Marcadores microsatélites utilizados

En total se amplificaron siete loci de microsatélites: NnBIO11, NnBIO111; NnBIO37, NgBIO14, Npum9, Npum14; Oak64 (Azpilicueta et al., 2003; Marchelli et al., 2008; Soliani et al., 2010). De esta manera, se adicionaron dos a los cinco originalmente propuestos para lograr mayor poder de discriminación, a través del aumento del nivel de polimorfismo.

Detalle de las actividades de laboratorio desarrolladas:

1- Extracción de ADN a partir de yemas/hojas con el método de Dumolin et al. (1995), (entre 26 y 50 individuos por población por especie, 34.4 promedio)

2- Realización de las PCRs para la amplificación de microsatélites con cada primer. Se hicieron los ajustes de manera de optimizar la reacción en cada caso. Se emplearon primers marcados con fluoróforos específicos para su lectura en secuenciador capilar.

3- Análisis de los fragmentos con secuenciador ABI 3700 (de 16 capilares) en la Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, CNIA, INTA. Los productos de PCR se analizaron en 2 grupos (multiplex) de 4 y 3 loci cada uno.

4- Análisis de los electroferogramas con el software GeneMapper v.4.0. Genotipificación de los individuos.

5- Armado de bases de datos con los resultados obtenidos hasta el momento. Aplicación de programas de Genética Poblacional (e.g. GenAEx, GDA_NT, Structure).

6- Con el análisis de los primeros resultados (13 poblaciones: 8 de Raulí y 5 de Roble) se elaboró un resumen para presentar en formato de poster en el Congreso *Forest*

Ecosystem genomics and adaptation, a celebrarse en Madrid, España, del 9 al 11 de junio de 2010. El trabajo fue aceptado. Se adjunta el resumen al presente Informe.

7- Actualmente, se están realizando las últimas PCRs y análisis en secuenciador para completar el total de muestras recolectadas.

Resultados preliminares

En un estudio preliminar se buscó evaluar la tendencia en el patrón de variación genética de las poblaciones de *N. nervosa* y *N. obliqua* en un área caracterizada por un fuerte gradiente pluviométrico, entre 1200 y 3000 mm por año. La comparación del patrón en relación a las predicciones de cambio climático nos posibilitaría inferir la forma cómo la especie sobreviviría en las condiciones ambientales futuras.

Para el análisis se evaluaron 452 individuos pertenecientes a 13 poblaciones de ambas especies. Los resultados mostraron una alta diferenciación entre especies (AMOVA 0,346 $p= 0,001$), siendo *N. nervosa* la más diversa con 14 alelos privativos en relación a los 7 alelos presentes en *N. obliqua*. A través de un análisis aplicando estadística bayesiana utilizando el programa STRUCTURE se conformaron cuatro grupos ($k=4$) con la mayoría de los individuos de *N. obliqua* incluidos en un mismo grupo (95,2%).

Mientras que *N. nervosa* mostró mayor variación al oeste, donde los valores de precipitación son más elevados, las poblaciones con mayor número de variantes alélicas en *N. obliqua* fueron las poblaciones más xéricas, del este de la distribución.


El mapeo de la riqueza alélica a través de la aplicación del programa DIVA-GIS en relación a las predicciones de cambio climático para el año 2050 permite inferir que si se conservaran los puntos de mayor riqueza en ambas especies, las mismas podrían evolucionar a pesar de los cambios en el ambiente, pero de manera diferencial. Mientras *N. nervosa* podría experimentar una migración altitudinal, *N. obliqua* podría hacerlo de manera longitudinal, dados los requerimientos ecológicos de cada una de ellas.

Tabla 1. Poblaciones de *Nothofagus nervosa* y *Nothofagus oblicua* analizadas: cuenca de origen, nombre, localización geográfica y número de individuos analizados.


Especie	Cuenca	Población	Especies recolectadas	ID	Latitud	Longitud	Altitud (m)	N	
<i>Nothofagus nervosa</i> (Raulí)	Espejo	Espejo chico	Puro	E	40° 34' 48''	71° 43' 12''	1000	30	
		Lácar	Bandurrias	Mixto	L1	40° 09' 00"	71° 21' 00"	980	35
	Yuco		Mixto	L2	40° 09' 07"	71° 30' 39"	930	31	
	Quilanlahue		Puro	L3	40° 08' 18.32''	71° 28' 4.39''	913	30	
	Quechuquina		Mixto	L4	40° 10' 12"	71° 40' 12"	900	26	
	Cerro Malo		Mixto	L5	40° 08' 17.7''	71° 37' 36.8''	1000	44	
	Hua Hum		Mixto	L6	40° 07' 55.2''	71° 40' 2.8''	940	50	
	Quila Quina		Mixto	L7	40° 10' 40"	71° 26' 37"	980	35	
	Lolog	Puerto Arturo	Puro	Lo1	40° 01' 12''	71° 22' 48''	850	34	
		Boquete	Puro	Lo2	40° 01' 12''	71° 35' 24''	720	36	
	Curruhue- Huechulafquen	Curruhue	Puro	C1	39° 51' 00''	71° 29' 26''	970	35	
		Lanin	Puro	C2	39° 42' 16''	71° 34' 15''	970	36	
		Paimún	Puro	C3	39° 45' 00''	71° 37' 48''	970	30	
	Tromen	Tromen	Puro	T1	39° 36' 00''	71° 19' 48''	1100	35	
	<i>Nothofagus oblicua</i> (Roble Pellín)	Lácar	Bandurrias	Mixto	L1	40° 09' 00"	71° 21' 00"	850	35
			Yuco	Mixto	L2	40° 09' 07"	71° 30' 39"	930	36
			Quilanlahue	Mixto	L3	40° 08' 18.32''	71° 28' 4.39''	913	30
Nonthué			Mixto	L5	40° 08' 46"	71° 37' 03"	680	38	
Hua Hum			Mixto	L6	40° 07' 55.2''	71° 40' 2.8''	670	35	
Quila Quina			Mixto	L7	40° 10' 40"	71° 26' 37"	983	34	
Quillén			Corral de Bueyes	Puro	Q1	39° 22' 16"	71° 17' 31"	1140	36
Ñorquinco		Seccional	Puro	Ñ1	39° 09' 11"	71° 15' 03"	1071	35	
Aluminé		Pilolil	Puro	P1	39° 30' 05"	70° 57' 44"	836	31	
Epulafquen		Epulaufquen	Puro	E1	36° 49' 09"	71° 04' 07"	1000	30	

POSTER PRESENTADO EN:


EvoTREE Conference “Forest Ecosystem Genomics and Adaptation”. San Lorenzo de El Escorial, Madrid, 9-11 Junio 2010.




EVOLUTIONARY POTENTIAL TO FACE FUTURE CLIMATIC CHANGE OF TWO ECOLOGICALLY CONTRASTING SOUTHERN BEECHES



Paula Marchelli^{1,2}, María M. Azpilicueta¹, Maarten van Zomveld³ and Leonardo A. Gallo¹
¹Biological Sciences and Forest Tree Breeding Unit, INTA, Argentina, ²CONICET ³Biodiversity International, Cali, Colombia
pmarchelli@inta.inta.gov.ar







Nothofagus nervosa

Introduction

The ability of populations to adapt to climate change depends on their genetic diversity as well as their plasticity. In northern Patagonia of Argentina, aridity is predicted to increase due to a combination of an increase in mean temperatures and a decrease in precipitation. Rauli beech (*Nothofagus nervosa*) and Roble beech (*Nothofagus obliqua*) both occur in this area but occupy different ecological niches: the former is more tolerant to cold and shade while the latter is more resistant to drought and high temperatures. Adaptation to the new environmental conditions will only be possible if sufficient and appropriately distributed genetic diversity is available for an evolutionary response. We aimed to identify the vulnerability of the different populations in order to provide guidelines for conservation and domestication programmes.



Nothofagus obliqua



Hierarchical AMOVA

Among Populations: 24%
 Within Populations: 76%

Fig. 1. Percentage of variation explained by the different levels of a hierarchical AMOVA.

Materials, Methods and Results

We collected a total of 452 individuals belonging to 13 *N. nervosa* and *N. obliqua* populations, distributed along a moisture gradient (1200-3000 mm/year). DNA was extracted according to Dumolin et al. (1995), from buds and leaves tissue. Individuals were genotyped using seven nuclear microsatellites loci (Azpilicueta et al., 2004; Marchelli et al., 2008; Soliani et al., 2010) on an ABI3130XL capillary sequencer, with GeneMapper software.

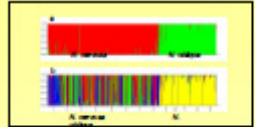
The species were highly differentiated as evidenced by AMOVA and Bayesian clustering (STRUCTURE, Pritchard et al., 2000) (Fig 1, Fig 2a).

Nothofagus nervosa showed more diversity than *N. obliqua* (Table 1). Bayesian clustering detected a maximum likelihood of four groups, with almost all (95.2%) individuals of *N. obliqua* within a single cluster (Fig 2b).

Allelic richness at population level after rarefaction to the lowest sample size was mapped using the point to grid procedure Circular Neighborhood in DIVA GIS (Fig 3).

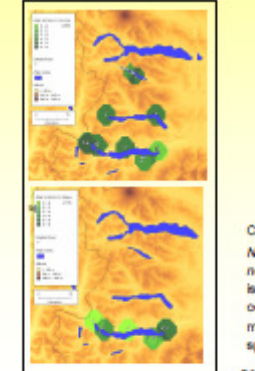
The potential shifts in the distribution of the two species under the expected changes in climate by 2050 were assessed using climate envelope modelling in Maxent. Bioclimatic niches of each species were developed to identify current and future suitable areas, using respectively the Worldclim database and the average future climate projection of three general circulation models (HADCM3, CCCMA2 and CSIRO2) under emission scenario A2 (Fig 4).

	<i>N. nervosa</i>	<i>N. obliqua</i>
Private alleles	14	7
Allelic richness	43.4	30.8
H_o	0.596	0.280



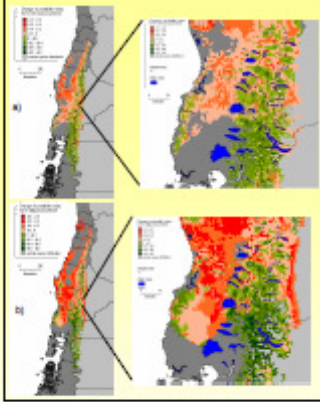
Bayesian clustering analysis

Fig. 2. Bayesian clustering analysis with admixture model at the species level (a) and population level (b).



Allelic richness after rarefaction

Fig. 3. Allelic richness after rarefaction to lowest sample size in *N. nervosa* (a) and *N. obliqua* (b).



Changes in suitability

Fig. 4. Changes in suitability for *N. nervosa* (a) and *N. obliqua* (b) relative occurrence under the climate projection for 2050.

Conclusions

Nothofagus obliqua showed greatest genetic diversity in eastern populations under more xeric conditions, while *N. nervosa* was more variable in western, humid locations. This confirms previous findings using chloroplast and isozyme gene markers. The results also agree with the ecological requirements of both species and suggest that conserving the current hotspots of diversity will sustain the evolutionary potential of both species, since altitudinal migration should be possible in *N. nervosa* and longitudinal migration in *N. obliqua* within the expected shifts in species distribution.

References

Azpilicueta M. et al., 2004. *Forest Genetics* 13: 240-243.
 Dumolin D. et al., 1995. *Forest Genetics* 11: 123-128.
 Marchelli P. et al., 2008. *Forest Genetics* 17: 12-16.
 Pritchard J. et al., 2000. *Genetics* 155: 2161-2169.
 Soliani M. et al., 2010. *Molecular Biology Resources* 10: 424-428.

Forest Ecosystem Genomics and Adaptation
 9-11 Junio, 2010
 San Lorenzo de El Escorial (Madrid), Spain