

TESIS DE GRADO PARA EL TÍTULO DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS - UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
MENDOZA, ARGENTINA – AÑO 2014

**ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL DE
RAMORINOA GIROLAE (CHICA), UNA ESPECIE
ENDÉMICA DE GRAN VULNERABILIDAD**

Tesista: Noelia Rosa Ortiz

Directora: Dra. M. Sc. Rosalía C. Paz

Directora alterna: Dra. Stella M. Giannoni



ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL DE
RAMORINOA GIROLAE (CHICA), UNA ESPECIE
ENDÉMICA DE GRAN VULNERABILIDAD

Noelia Rosa Ortiz

Dirección: El Parral 2440. Piso: 2. Dpto.: 9. CP: 5500. Ciudad de Mendoza

Contacto: 2616 166383. Correo electrónico: nos645@hotmail.com

Directora: Dra. M. Sc. Rosalía C. Paz

Directora alterna: Dra. Stella M. Giannoni

Comité Evaluador:

Dr. Martín Hadad, Dra. Inés María Lorello, Ing. Leandro Mastrantonio

Tesis de grado "*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*" – Ortiz, Noelia

RESUMEN

Ramorinoa girolae Speg. (Fabaceae), comúnmente llamada “chica”, es un árbol o arbusto xerófito y endémico de Argentina, considerado en peligro de extinción por su restringida distribución geográfica, lento crecimiento y poca resistencia al fuego. Para poder llevar a cabo un plan eficiente de manejo, conservación y restauración ecológica de esta especie es necesario evaluar su variabilidad genética y estructura genética espacial.

En este trabajo se estimó la diversidad genética de una población de *R. girolae* ubicada en el Parque Provincial Ischigualasto, San Juan, y la similitud genética entre pares de individuos. Posteriormente se analizó la estructura genética espacial y su relación con variables morfométricas y ambientales. Se recolectaron 21 muestras biológicas de individuos localizados a lo largo de un cauce seco en la zona conocida como Mina de Cuarzo y su localización geográfica fue georreferenciada. Se obtuvo la altitud aproximada a partir de Google Earth. De los individuos muestreados se observaron variables morfológicas (diámetro basal de cada fuste, número de fustes y altura del árbol) y ambientales (distancia a cauces secos, granulometría del suelo y pendiente del terreno). Para el estudio genético se utilizó la técnica de AFLP, la cual permite generar un gran número de marcadores polimórficos.

El análisis estadístico permitió calcular: la correlación entre el diámetro basal y la altura de los árboles, la diversidad genética, la similitud genética entre pares de muestras, las asociaciones entre todas las muestras y los factores que afectan a la estructura genética.

El diámetro basal se correlacionó positivamente con la altura de los árboles ($R^2=0,51$ y $p=0,0002$). No se registró individuos con diámetro basal menor a 10 cm y tampoco menores a 1 m de altura. Se encontró que esta población tiene una alta diversidad genética ya que el Índice de Polimorfismo (P_j) fue del 82,3%, lo cual podría deberse a que dicha población se encuentra en un área protegida sin deforestación. Además, la Diversidad Genética de Nei

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

(H_e) resultó tener un valor medio ($H_e=0,276$) y el Índice de Uniformidad de la población calculado fue muy bajo ($U_j=0,49$).

Los valores de similitud genética entre distintos individuos calculados mediante el coeficiente Dice variaron entre 0,73 y 0,93. Tomando como referencia la similitud genética resultante entre dos muestras obtenidas de los extremos de una misma planta ($SG=0,99$), se puede concluir que no se encontraron clones entre las muestras analizadas.

El análisis clúster permitió identificar 4 grupos diferentes a lo largo del cauce, ordenados espacialmente. El análisis de correlación lineal entre las matrices de distancia genética y las de variables geográficas corroboraron la presencia de estructura genética espacial entre las plantas estudiadas. La incorporación de las variables ecológicas al análisis de correlación no mejoró en mayor medida la explicación de dicha estructura, a excepción de la pendiente, relacionada con la altitud en el tipo de muestreo realizado.

Estos resultados sugieren que hay un importante aporte de variabilidad genética producto de la reproducción sexual en la población estudiada. Cabe remarcar que dicha población es la más numerosa y diversa del Parque Provincial Ischigualasto, lo que enfatiza la importancia de su conservación.

Palabras clave: *Ramorinoa girolae*, especie endémica, estructura genética espacial, AFLP

AGRADECIMIENTOS

A mi casa de estudios, la Facultad de Ciencias Agrarias y la Universidad Nacional de Cuyo, por la excelente formación que me brindaron, tanto de conocimiento como de valores. También por las becas que me otorgaron para viajar y perfeccionarme. Espero poder devolver a la sociedad todos estos beneficios.

Al equipo del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias y al equipo del IBAM, por ayudarme, aconsejarme y prestarme sus instalaciones.

Al grupo INTERBIODES de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNSJ) por sus valiosos aportes, y a los guardaparques del PPI por su cooperación y gentileza.

A la Secretaría de Estado de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Provincia de San Juan y al CONICET por el financiamiento para el desarrollo de esta tesina.

A los miembros del jurado por aceptar gentilmente formar parte de la Comisión Evaluadora y por dedicar su valioso tiempo a la revisión de este trabajo.

A la Dra. Stella Giannoni, por sus revisiones, recomendaciones y excelente disposición.

Al Ingeniero Morábito, por aconsejarme y motivarme tanto en mi desarrollo personal como profesional.

A mi familia, por haberme estimulado, ayudado y apoyado desde siempre para llegar hasta donde estoy ahora, y más lejos todavía.

Finalmente, un especial agradecimiento a la Dra. Rosalía Paz, por haberme enseñado con tanto cariño, paciencia y buen humor las técnicas de la Biología Molecular; por su compromiso, dedicación y ejemplo al superar con fuerza y dignidad los obstáculos del camino.

Tesis de grado “Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad” – Ortiz, Noelia

ÍNDICE

RESUMEN.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE	vi
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis	7
Objetivos.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Biología de <i>Ramorinoa girolae</i> Speg., “chica”.....	9
Área de Estudio: Parque Provincial Ischigualasto	11
Muestreo	14
Marcadores Moleculares AFLP	17
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS	30
Caracterización morfológica de los ejemplares de <i>R. girolae</i> evaluados	30
Análisis genético	31
Estructura Genética Espacial	36
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de <i>R. girolae</i>	4
Figura 2: <i>R. girolae</i> en asociación con otras especies.....	5
Figura 3: Biología de <i>Ramorinoa girolae</i>	10
Figura 4: Parque Provincial Ischigualasto.....	12
Figura 5: Campaña de muestreo de material vegetal..	14
Figura 6: Etapas de la técnica de AFLP..	18
Figura 7: Extracción y Digestión de ADN genómico de genotipos de <i>R. girolae</i>	20
Figura 8: Pre-amplificación y Amplificación de fragmentos digeridos y ligados con los adaptadores.....	23
Figura 9: Resolución de fragmentos de AFLP en gel de poliacrilamida	25
Figura 10: Regresión lineal entre la altura de árboles de <i>R. girolae</i> y el diámetro basal ..	30
Figura 12: Foto de RG 4 y RG 5, muestreadas a un lado y otro de un cauce.....	34
Figura 11: Foto de RG 11 ubicada a escasa distancia de ramas de RG 8.....	34
Figura 13: Estudio de similitud genética entre genotipos de <i>R. girolae</i>	35
Figura 14: Gráficos de correlación lineal entre matrices (Pruebas de Mantel).	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Datos geográficos.....	15
Tabla 2: Datos morfológicos y ecológicos	16
Tabla 3: Datos cualitativos.	16
Tabla 4: Adaptadores y cebadores usados en las etapas de amplificación de la técnica AFLP.	22
Tabla 5: Combinaciones de cebadores elegidas para la Amplificación selectiva	31
Tabla 6: Valores de Similitud Genética (GS) entre las muestras analizadas de <i>R. girolae</i> (RG) mediante marcadores moleculares AFLP, usando el coeficiente Dice.....	32
Tabla 7: Valores de Similitud Genética entre las muestras analizadas de <i>R. girolae</i> (RG) mediante marcadores moleculares AFLP, usando el coeficiente Jaccard.	32
Tabla 8: Resultados de las Pruebas de Mantel	36

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.
- AFLP:** Amplificación de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos
- ARN:** Ácido Ribonucleico
- ARNasa:** enzima Ribonucleasa
- CTAB:** Método de Bromuro de Cetil-trimetil Amonio
- D:** Distancia a cauce
- DAB:** Diámetro basal
- dNTPs:** Desoxirribonucleótidos Trifosfato
- EDTA:** Ácido Etildiaminotetraacético
- EGE:** Estructura Genética Espacial
- EN:** en Peligro de Extinción
- EtBr:** Bromuro de Etidio
- G:** Granulometría del suelo
- GS:** Coeficiente de Similitud Genética de Dice
- H:** Altura del árbol
- H_e:** Índice de Diversidad Genética media a través de los loci
- P:** Pendiente
- PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- P_j:** Índice de Polimorfismo
- PlanEAR:** Plantas Endémicas de la Argentina
- PPI:** Parque Provincial Ischigualasto
- RG n°:** número de muestra de *R. girolae*
- SAyDS:** Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable
- SEAyDS:** Secretaría de Estado de Ambiente y Desarrollo Sustentable
- Speg.:** Spegazzini
- TBE:** Tris, borato y EDTA
- UICN:** Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
- U_j:** Índice de Uniformidad
- UNESCO:** Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
- UPGMA:** Agrupamiento Pareado No Ponderado Utilizando Media Aritmética
- UTM:** Universal Transversal de Mercator
- UV:** Ultravioleta
- WGS84:** Sistema Geodésico Mundial de 1984

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha notado una significativa pérdida de la biodiversidad a nivel mundial como consecuencia del aumento de la población humana y de la demanda de recursos. Entre ellas podemos mencionar: la tala excesiva de plantas leñosas, el sobrepastoreo, los incendios intencionales, las actividades agrícolas, la minería, la introducción de especies exóticas, la caza, entre otros. En el caso particular de la disminución de la superficie de bosques nativos, es crítico el conocimiento de la cantidad de diversidad genética y su distribución espacial. Esto permite un mejor diagnóstico del estado, las amenazas y la viabilidad de las poblaciones remanentes de estos bosques (Escudero et al. 2003 citado en Teich, 2012).

Para llevar a cabo un buen plan de conservación y/o restauración ecológica se hace necesario realizar estudios previos de variabilidad genética, la cual constituye la base de la evolución adaptativa de todos los organismos vivos ante los cambios ambientales. La composición genética afecta de manera importante las formas y funciones ecológicas de los organismos, incluyendo tamaños, procesos fisiológicos, características reproductivas, tolerancia a factores ambientales extremos, dispersión, capacidad de colonización, entre otros. Sin variabilidad genética, una población no puede evolucionar en respuesta a cambios en las variables ambientales y, por lo tanto, se enfrenta a un mayor riesgo de extinción (Falk et al., 2006). Las diferencias heredables entre individuos determinan cómo ellos interaccionan con el medio ambiente y cuál es su función en el ecosistema. En este sentido, muchos de los procesos evolutivos y ecológicos que influyen sobre la variación genética, están mediados por el espacio y por lo tanto es frecuente la presencia de Estructura Genética Espacial en la naturaleza (EGE). El estudio de EGE en árboles, y su asociación con la variabilidad fenotípica y ambiental, permite inferir dichos procesos y así aportar conocimiento para mejorar el manejo y conservación de los bosques (Teich, 2012).

En cuanto a la conservación *in situ*, por ejemplo, estudios sobre la diversidad genética de poblaciones pueden contribuir a realizar una adecuada zonificación en áreas protegidas. Así, se puede priorizar el mantenimiento de las zonas donde se encuentren subpoblaciones de especies clave y/o paraguas con mayor diversidad genética, mediante mayores controles y restricciones a su uso.

Como estrategia adicional a la conservación *in situ*, cuando ésta se ve dificultada o insuficiente, se recurre a la conservación *ex situ*, es decir, al mantenimiento de la diversidad genética fuera de su hábitat natural tanto en bancos de germoplasma como en colecciones de campo y centros de fauna (como zoológicos) o flora (jardines botánicos, viveros).

Muchas veces al realizarse la colecta de semillas para estos bancos se carece de información sobre la variabilidad genética de la población que se quiere conservar. Esto puede resultar en colecciones genéticamente poco representativas que, aunque sean numéricamente muy abundantes, tienen una utilidad muy limitada para la función por la cual fueron recolectadas: reforzamientos o reintroducciones poblacionales. Ambos conceptos constituyen la base de la restauración ecológica (Caujapé & Lamonfort, 2004 citado en Blas Vilches et al., 2004).

En el caso particular de la restauración ecológica, existen varios ejemplos de casos donde los materiales de plantas utilizados para la restauración poblacional presentaba altos niveles de erosión genética (Falk et al., 2006). Esto puede aumentar el riesgo de extinción de una especie en el corto tiempo a través de la depresión por endogamia y, a largo plazo, a través de la reducción de la habilidad de la población para adaptarse a las condiciones ambientales (Barrett & Kohn, 1991 y Teich, 2012).

En Argentina la pérdida de biodiversidad también representa una problemática importante: la superficie de bosques nativos se ha reducido un 66% en los últimos 75 años (Secretaría de Estado de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2005). Esto repercute en la pérdida de los servicios ambientales que estos ecosistemas brindan, tales como: la

Tesis de grado "*Estudio de la estructura genética espacial de *Ramorinoa girolae* (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*" – Ortiz, Noelia

conservación de la biodiversidad, del suelo y de calidad del agua, la fijación de emisiones de gases de efecto invernadero, la diversificación y belleza del paisaje, entre otros. Por ello, en el año 2007 se sancionó la Ley Nacional N° 26.331 de Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental de Bosques Nativos. En el marco de esta ley, en la Provincia de San Juan se lleva a cabo un Plan de Conservación de Bosques Nativos (Res N° 0441-SEAyDS-11 San Juan), siendo la especie de estudio de este trabajo, *Ramorinoa girolae* Speg., una de las especies a conservar¹.

R. girolae, comúnmente conocida como “chica”, es una planta exclusiva de la flora xerófila de la Argentina con gran singularidad taxonómica al ser la única representante del género *Ramorinoa* (especie monotípica, Kiesling, 1994). Tiene un alto grado de endemismo: su distribución está muy restringida a los faldeos serranos de La Rioja, San Luis y San Juan, en la región fitogeográfica del Monte (Demaio et al., 2002) (Figura 1). Posee un estrecho rango de hábitat, limitado a cauces y faldeos serranos, siendo por ello una especie poco abundante con una presencia inferior al 1% en los stands relevados. No obstante, bajo particulares circunstancias de no perturbación (humana y/o ambiental) puede llegar a formar densas comunidades conocidas como chicales (Burkart, 1952; Femenía & Lopez, 2004).

¹ Esta tesis forma parte del proyecto “La chica, el retamo y el algarrobo: especies paraguas para la conservación del Bosque Nativo del Parque Provincial Ischigualasto y zonas aledañas. Interacciones biológicas, efectos de actividades humanas y su mitigación” a cargo de la Dra. Stella Giannoni.

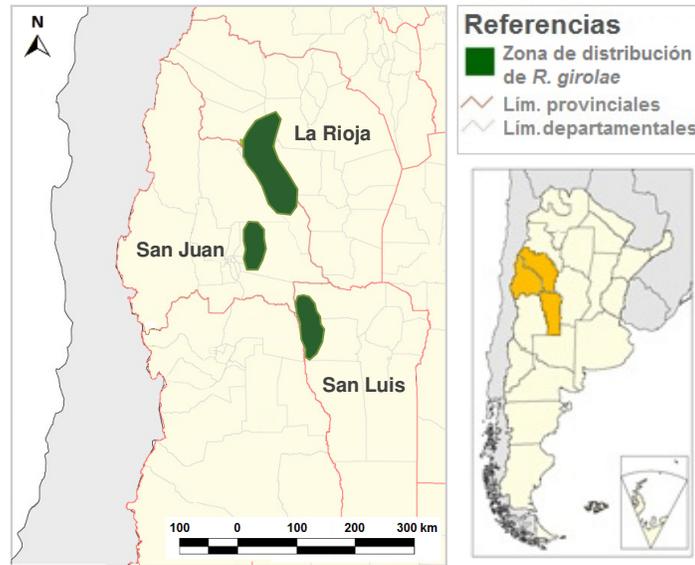


Figura 1: **Distribución de *R. girolae*** en las Provincias de San Juan, La Rioja y San Luis. Fuente: Demaio et al., 2002.

A nivel ambiental, la chica cumple importantes roles. Constituye una primordial fuente de alimentos y refugio (Ver Figura 2, B y D) para gran diversidad de aves, insectos, anfibios, reptiles y mamíferos. Su fruto es muy consumido por el ratón cola de pincel (*Octomys mimax*), una especie de roedor endémico distribuido en el Desierto del Monte, en un área de la transición entre el Desierto del Monte y el Chaco Árido en las provincias de Catamarca, La Rioja y San Juan (Sobrero et al., 2010). Además, *R. girolae* es una de las pocas especies arbóreas del ecosistema árido. La gran extensión y densidad de la copa otorga sombra y protección que facilita el establecimiento de otras especies (Femenía & López, 2004; Hadad et al., 2014). Parece tener una importante interacción con cardones (observación personal) tal como puede verse en la Figura 2, A.



Figura 2: *R. girolae* en asociación con otras especies. (A) Creciendo junto a cardones (*Trichocereus terscheckii*), como se la ha observado numerosas veces en el PPI. (B) Frutos de *R. girolae* consumido por *Anypsiopyla univitella* (superior) y *O. mimax* (inferior). (C) Clavel del aire, epífita *Tillandsia angulosa* (D). Nido de ave establecido sobre las ramas de la chica.

Para los habitantes de las comunidades locales, la chica es de gran importancia debido a los múltiples usos que tiene desde épocas pre-incaicas. Los frutos –llamados “maní de las sierras” - tienen un sabor agradable y alto valor nutritivo (Zapata et al., 2010). La madera se utiliza como combustible, teniendo la ventaja de que produce brasas de gran durabilidad (Kiesling, 1994). Además, debido a su gran dureza posee características que la hacen ideal

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

para la construcción y la confección de artesanías, herramientas y piezas de instrumentos musicales. Por otro lado, la gran adaptación de *R. girolae* a condiciones climáticas extremas, accidentes geográficos, pendientes pronunciadas y sustratos de diferentes características geológicas, son factores que hacen que esta especie sea utilizada para la fijación de cuencas de altura cuando se planifica el ordenamiento territorial y su corrección de torrentes. Asimismo permite la formación de innumerables manantiales de aguas mansas y cristalinas que constituyen un recurso vital para los lugareños dedicados a la crianza del ganado (Femenía & López, 2004).

Por todo lo dicho anteriormente y dada su restringida distribución geográfica, lento crecimiento y poca resistencia al fuego (Demaio et al., 2002; Hadad et al., 2014), la chica posee un alto valor de conservación (Haene & Aparicio, 2007). Es una de las especies vegetales más vulnerables de la flora nativa de la Provincia de San Juan y se la ha clasificado como en peligro de extinción (EN) por la Secretaría de Estado de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Provincia de San Juan (2013). Esta clasificación se realizó a través de un taller en el que participaron expertos locales, usando los criterios establecidos por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) relacionados con: tendencias poblacionales, tamaño y estructura poblacional, distribución geográfica, requerimientos de hábitat y amenazas. Además se encuentra en la categoría IV de la escala de amenaza de PlanEAR (2008): “planta restringida a una sola provincia política, o con áreas reducidas compartidas por dos o más provincias políticas contiguas” (Ver Figura 1). Esta escala posee un valor mínimo de riesgo de 1 y un valor máximo de 5 y se basa en el área de distribución y la relativa abundancia o rareza de la especie considerada (PlanEAR, 2008).

Por todo esto, para poder llevar a cabo un plan eficiente de manejo, conservación y restauración ecológica de poblaciones de *R. girolae*, es necesario evaluar su variabilidad genética (Hadad et al., 2014) y estructura genética espacial. Un primer paso para esto consiste en analizar si las plantas de *R. girolae* próximas entre sí son clones o individuos genéticamente diferentes, producto de la reproducción sexual.

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

Esta información permitirá diseñar muestreos que eviten la recolección de muestras de individuos emparentados e incluso idénticos y así se pueda mantener la independencia entre individuos en estudios poblacionales (Hadad et al., 2014) y tener una mejor estimación de la diversidad genética de estas poblaciones. Además, permitirá realizar colectas de semillas más representativas de la diversidad genética de la especie tanto para su conservación *ex situ* como para reintroducciones, reforzamientos poblacionales o planes de restauración ecológica ante, por ejemplo, eventuales incendios. Estos tipos de estudio son de particular importancia en especies vegetales como ésta; con pequeños tamaños poblacionales expuestos a efectos de endogamia y erosión genética debido al aislamiento y a la exposición a disturbios (Barrett & Kohn, 1991; Frankham, 1995).

En este contexto, la presente tesis pretende hacer una contribución al manejo y conservación de poblaciones de *R. girolae*, aportando información sobre su variabilidad genética y su relación con variables morfológicas y ambientales.

Hipótesis

Dados los conocimientos sobre la ecología reproductiva de *R. girolae*, se formularon las siguientes hipótesis para este trabajo de tesis:

- ✓ Hipótesis 1: La diversidad genética de una población de *Ramorinoa girolae* es baja.

Predicción: Si la forma de reproducción de *R. girolae* es predominantemente asexual, se espera que la población en estudio presente bajos índices de diversidad genética.

- ✓ Hipótesis 2: La población en estudio, al estar en un área protegida no está afectada por disturbios.

Predicción: se espera que la diversidad genética de *R. girolae* esté espacialmente estructurada.

Objetivos

- ✓ Estimar la diversidad genética de una población de *Ramorinoa girolae* del PPI.
- ✓ Estimar la similitud genética entre pares de individuos de la población muestreada.
- ✓ Analizar la estructura genética espacial de *R. girolae*.
- ✓ Relacionar la estructura genética espacial con variables morfométricas y ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Biología de *Ramorinoa girolae* Speg., “chica”

R. girolae se caracteriza por ser una planta áfila, robusta y capaz de desarrollarse bajo condiciones extremas de sequía, amplitud térmica, y fuertes vientos (Haene & Aparicio, 2007). Las poblaciones de *R. girolae* se establecen en las laderas rocosas y de acarreo de las quebradas aluvionales del Parque Provincial Ischigualasto (Márquez et al., 2005). Puede presentar tanto forma erecta como decumbente (Ver Figura 3, A y B); cuando posee baja densidad poblacional, *R. girolae* alcanza un porte postrado con tallos rastreros y tendidos sobre el suelo con copas de 6-7 m; en cambio cuando se desarrolla en poblaciones densas, presenta un porte erecto con alturas que alcanzan los 10 m (Femenía & López, 2004; Márquez et al., 2005). Otros autores (Hadad et al., 2014) observaron que a partir de los 3 m adquiere forma semidecumbente. Es una especie de lento crecimiento y que destina gran parte de los recursos al desarrollo de un sistema radicular pivotante profundo y raíces superficiales exploradoras (Ver Figura 3 E). Este sistema complejo de varios tipos de raíces le permite sobrevivir en momentos de gran estrés hídrico (Femenia & Gimenez de Bolzon, 1992).

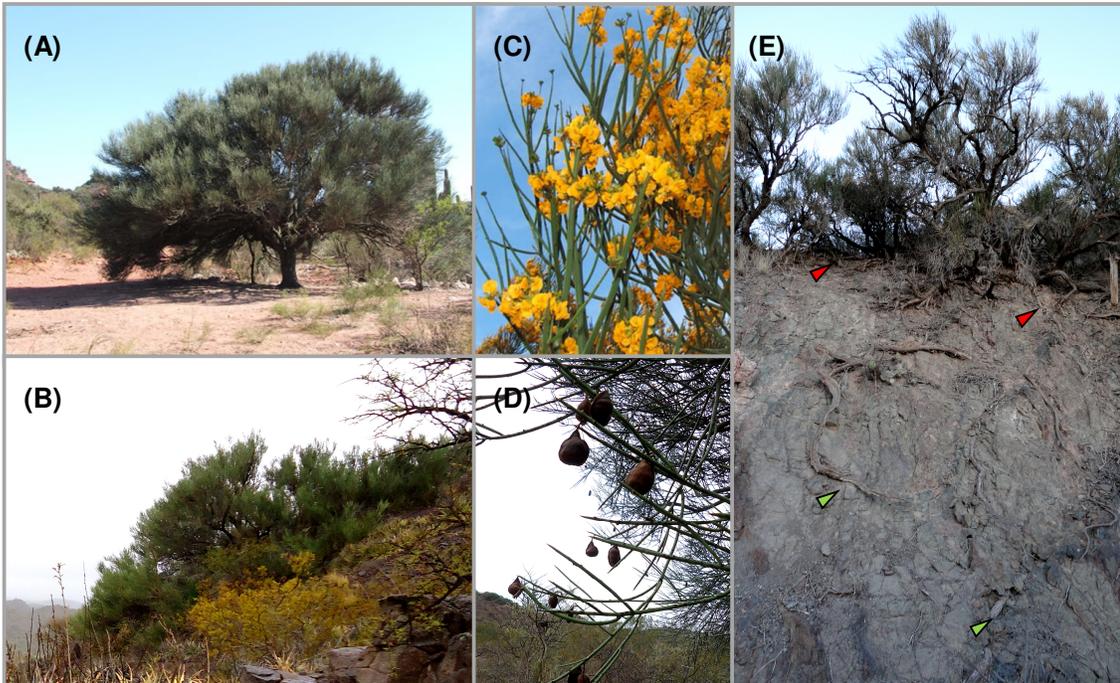


Figura 3: *R. girolae*. (A) con porte erecto (www.vilgo.net). (B) con un porte postrado o decumbente, en una ladera. (C) Flores y tallos áfilos clorofilianos (www.vilgo.net). (D) Frutos. (E) Sistema radical. Se observan el sistema de raíces superficiales (►) y pivotante profundo (►).

En cuanto a la reproducción sexual, *R. girolae* es una especie hermafrodita. La biología reproductiva se desconoce, sin embargo, la mayoría de las especies de la familia Fabaceae (Subfamilia Papilionoideae, Tribu Dalbergiae) es autocompatible (Rodríguez-Riaño et al., 1999). La floración ocurre anualmente desde mediados de octubre hasta fines de noviembre, con flores amarillo anaranjadas (Ver Figura 3, C), papilionoideas, pedunculadas ordenadas en racimos laterales, con 12 a 18 flores por racimo. Cada racimo brinda entre 1 a 3 legumbres secas, indehiscentes, leñosas, fibrosa, obovoide o elíptica de color castaño oscura que maduran entre febrero y marzo (Spegazzini, 1924; O'Donell, 1939; Femenia & Gimenez de Bolzon, 1992). Por su particular estructura, las semillas pueden permanecer en el interior de la legumbre, a salvo de incendios, sequías y depredadores ocasionales. Los posibles polinizadores incluyen diferentes taxones de insectos nativos (himenópteros y dípteros), mientras que la depredación y dispersión de las semillas se atribuye a la acción biótica de roedores (principalmente *O. mimax*, Campos, 2012), loros y también abiótica

Tesis de grado “Estudio de la estructura genética espacial de *Ramorinoa girolae* (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad” – Ortiz, Noelia

como consecuencia de fuertes torrentes, que terminan de liberar sus semillas (Femenia & López, 2005).

Con respecto a la propagación asexual, se ha observado que pueden originarse raíces y brotes independientes de la planta madre a partir de las ramas que tocan el suelo y son enterradas por el material de acarreo de los torrentes (Femenía & López, 2004; Hadad et al., 2014). Mediante este tipo de reproducción agámica, las plantas van avanzando hacia las cumbres de las serranías, estabilizando las pendientes. Sin embargo, estas nuevas plantas poseen el mismo material genético del individuo que las originó, por lo que si este proceso es predominante sobre la reproducción sexual, la diversidad genética de esta especie sería baja y por lo tanto tendría menos posibilidades de éxito adaptativo frente a ambientes cambiantes.

Área de Estudio: Parque Provincial Ischigualasto

El Parque Provincial Ischigualasto (PPI) o Valle de la Luna es un área protegida de 62.916 ha situado en el centro este de la provincia de San Juan, en el Departamento Valle Fértil (Figura 4). Este parque, en forma conjunta con el Parque Nacional Talampaya han sido declarados sitio natural Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO en el año 2000. Se calcula que las formaciones geológicas de este sitio tienen una antigüedad entre 180 y 230 millones de años y uno de los más importantes yacimientos paleontológicos del mundo, ya que es el único lugar donde puede verse totalmente al descubierto y perfectamente diferenciado el periodo triásico en forma completa y ordenada.

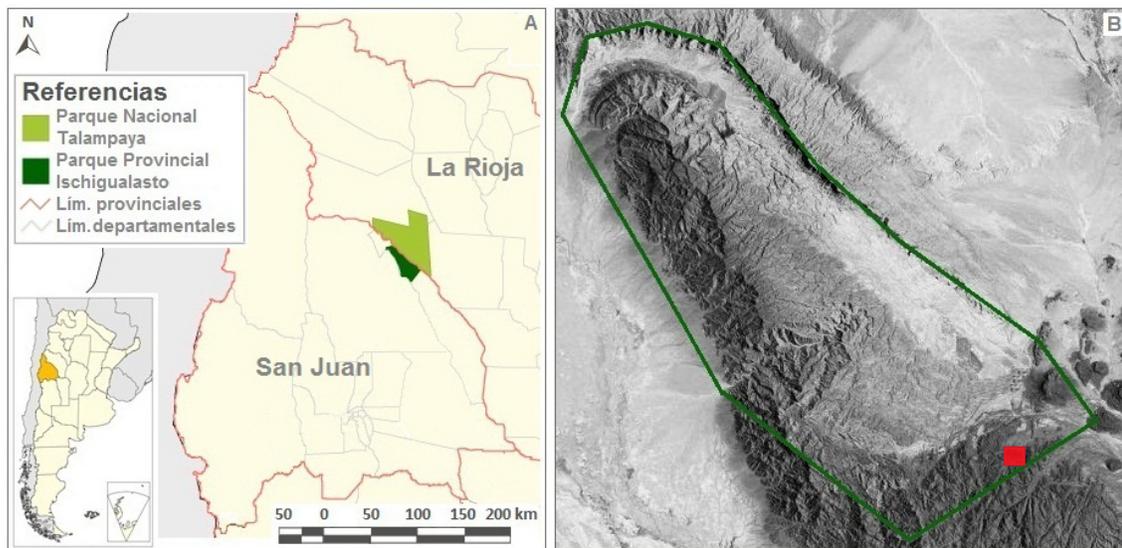


Figura 4: Parque Provincial Ischigualasto. A) Mapa de Ubicación del Parque Provincial Ischigualasto y del Parque Nacional Talampaya. (Fuentes: elaboración propia, con base en COFEMA/SIFAP, APN, SAyDS). B) Imagen Satelital del Parque Provincial Ischigualasto (en verde) y zona de muestreo (en rojo). (Cortez et al., 2005).

Por otro lado, a nivel ecológico conserva una flora y fauna con rasgos naturales de excepcional interés científico, paisajístico, zoogeográfico y fitogeográfico, al estar adaptada a un ambiente árido. Además, abarca un área que todavía no ha sido alterada en forma irreversible por el ser humano. Por esto, el objetivo de esta área protegida es no sólo la conservación del importante registro fósil que alberga, sino también la conservación *in situ* de una parte representativa del bioma natural de la zona.

El clima, definido *sensu* Köppen, es desértico con una temperatura media anual menor de 18°C y una gran amplitud térmica. Las precipitaciones son estivales y torrenciales, con una media anual cercana a los 100 mm (concentradas de noviembre a febrero) presentando algunas variaciones entre años (Márquez et al., 2005)

El relieve de la zona de estudio presenta barrancas que cortan abruptamente, por donde drena el agua durante los períodos de lluvia. En cuanto al suelo, predominan los sustratos duros, fundamentalmente areniscas del Triásico con variable contenido de sal. Además hay zonas de sustratos de textura fina, donde se acumula el agua después de las lluvias, favoreciendo el establecimiento de la vegetación (Márquez et al., 2005).

Tesis de grado “Estudio de la estructura genética espacial de *Ramorinoa girolae* (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad” – Ortiz, Noelia

Debido a la escasez hídrica, a la salinidad y alcalinidad de los suelos, la cobertura vegetal es escasa alcanzando solamente el 15% (Márquez et al. 2005; Acebes et al. 2010). En los sectores en donde se encuentra una pequeña cubierta de material cuaternario, de origen aluvional la cobertura vegetal puede alcanzar el 45-50%. Dadas las condiciones de escasez de lluvia y altas temperaturas que caracterizan el clima desértico de la región, el tipo de vegetación que se desarrolla es de tipo xerófita. El hábitat predominante son los matorrales abiertos (Márquez et al., 2005).

En el PPI se puede reconocer la presencia de las Provincias Fitogeográficas del Chaco, del Monte y de la Prepuna (Cabrera, 1976) expresadas en diferentes magnitudes. Es justamente la confluencia de estas formaciones vegetales la que permite, a pesar de la aridez de la región, una gran riqueza florística (Cortez et al., 2005).

La vegetación existente incluye arbustos como *Larrea cuneifolia*, *Zuccagnia punctata*, *Deuterocohnia longipetala* y entre las cactáceas se destacan *Opuntia sulphurea*, *Denmoza rhodacantha* y *Trichocereus terscheckii*. En las laderas rocosas se encuentra *Echinopsis terscheckii*, un cactus columnar. Además, se encuentra una interesante biodiversidad con especies endémicas adaptadas a ambientes áridos (Márquez et al, 2005). Entre las especies arbóreas de interés especial se encuentran *R. girolae*, *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa* ambas especies de algarrobos y *Bulnesia retama* (retamo). Estos árboles son considerados especies paraguas ya que a través de la protección del bosque nativo se protege a la fauna asociada, al suelo, al agua, al aire y a los ciclos de nutrientes (Stella Giannoni, comunicación personal).

En relación estrecha con las comunidades vegetales, el PPI alberga una fauna muy interesante ya que varias especies son endémicas con distribución restringida, especialista de hábitat y con problemas de conservación como *Rhinella spinulosa* (sapo), *Chelonoidis chilensis* (tortuga terrestre), *Dolichotis patagonum* (mara o liebre patagónica), *O. mimax* (rata

cola de pincel), *Tympanoctomys barrerae* (rata vizcacha colorada), *Lama guanicoe* (guanaco), *Vultur griffus* (cóndor), lo cual incrementa el valor biológico del área protegida.

Muestreo

Se realizó una campaña de muestreo de material vegetal en marzo del 2013 en el extremo sur del PPI (Ver Figura 4), en la zona conocida como Mina de Cuarzo, ya que en ella se encuentra una gran cantidad de ejemplares de *R. girolae*. Se buscó situaciones de plantas de pequeño porte cercanas a plantas de gran porte. En total se recolectaron 21 muestras biológicas de individuos localizados a lo largo de un cauce seco, tal como lo muestra la Figura 5.



Figura 5: Campaña de muestreo de material vegetal. Imagen satelital indicando zonas de muestreo. Extraída de Google Earth. Marzo, 2013.

Cada individuo representa una unidad muestral, y su localización geográfica fue georeferenciada por medio de un GPS Garmin GPSMAP 62, usando el sistema de coordenadas *Universal Transversal de Mercator* (UTM) y el datum *World Geodetic System 84* (WGS84) (Ver Tabla 1). Además, se obtuvo el dato de la altitud en la unidad m snm (metros sobre el nivel del mar).

Tabla 1: Datos geográficos: coordenadas UTM y altitud de las muestras recolectadas en la campaña de muestreo de Marzo, 2013.

RG	Coordenadas UTM		Altitud (m snm)
	Este	Sur	
1	613128.00	6658158.00	1403
2	613125.00	6658160.00	1403
3	613129.00	6658155.00	1403
4	613218.00	6658085.00	1405
5	613224.00	6658081.00	1406
6	613173.00	6657992.00	1407
7	613172.00	6657982.00	1407
8	612970.00	6658015.00	1407
9	612980.00	6658012.00	1408
10a	612969.00	6658028.00	1407
10b	612967.00	6658029.00	1407
11	612977.00	6658014.00	1407
12	612797.00	6658011.00	1407
13	612757.00	6657900.00	1411
14	612755.00	6657901.00	1410
15	612656.00	6657769.00	1414
16	612645.00	6657509.00	1445
17	612605.00	6657545.00	1433
18	612601.00	6657583.00	1425
19	612625.00	6657606.00	1426
20	612615.00	6657652.00	1419

De los individuos muestreados se midieron variables morfológicas y variables de su entorno ambiental, listadas en la Tabla 2. Los datos morfológicos, de tipo cuantitativo, fueron: diámetro basal de cada fuste en cm, número de fustes (para calcular el diámetro basal equivalente: DAB) y altura del árbol en m (H). Se buscó muestrear individuos de pequeño porte junto con ejemplares grandes cercanos.

Para el cálculo del DAB se utilizó la fórmula usada por Álvarez et al (2006):

$$DAB = 2 \sqrt{\left\{ \pi \left(\frac{dab_1}{2} \right)^2 + \pi \left(\frac{dab_2}{2} \right)^2 + \dots + \pi \left(\frac{dab_n}{2} \right)^2 \right\} / \pi}$$

Donde: $dab_1, dab_2, \dots, dab_n$ son los diámetros basales de cada fuste.

Entre las variables ambientales se midió la distancia a cauces secos en m (D) y, en forma cualitativa el tipo de granulometría del suelo (G: fina, arenosa, canto rodado o rocosa, Tabla 3) y la pendiente del terreno (P: suave, media, pronunciada).

Tabla 2: Datos morfológicos y ecológicos muestreados.

Datos morfológicos	Abreviatura	Unidad
Diámetro a la altura de la base	DAB	cm
Altura	H	m

Datos ecológicos	Abreviatura	Unidad
Distancia a cauce	D	m
Pendiente	P	*
Granulometría del suelo	G	*

Tabla 3: Datos cualitativos muestreados. Categorías y criterios de clasificación usados.

* Categorías de datos cualitativos		Criterio
Pendiente	Suave	0° a 5°
	Media	5° a 20°
	Pronunciada	> 20°
Granulometría	Fina	< 0,02 mm
	Arenosa	0,02 a 2 mm
	Grava y canto rodado	2 a 250 mm
	Bloques	>250 mm

Para el estudio genético, se extrajeron muestras de tejidos a partir de ramas jóvenes de cada individuo. Las mismas se conservaron a 4°C hasta el momento de extracción del ADN.

Marcadores Moleculares AFLP

Un marcador molecular se define como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente (Azofeifa, 2006). Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, ya que se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos y permiten detectar un número mucho mayor de polimorfismos que otros marcadores como los morfológicos o los isoenzimáticos (Azofeifa, 2006; Ferrerira & Grattapaglia, 1998). Las técnicas empleadas para ello son muy diversas, y su uso depende de la infraestructura y la cantidad de información genómica que se tenga de la especie.

Para la caracterización genética de las poblaciones de *R. girolae* estudiadas se utilizó la técnica de AFLP (Amplificación de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos, del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*). Este análisis consiste en generar un gran número de fragmentos de ADN a partir de un muestreo amplio y simultáneo en el genoma, lo que permite el análisis de un gran número de marcadores polimórficos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Es una técnica robusta y repetible y presenta un gran poder de detección de variabilidad genética, explorando simultáneamente el polimorfismo de presencia y ausencia de sitios de restricción y la ocurrencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias. Por otro lado, al contrario de otras técnicas de marcadores moleculares, esta metodología no requiere información previa del genoma de la especie estudiada (Vos et al., 1995).

El análisis AFLP consiste esencialmente en cuatro etapas, detallados en la Figura 6. En la primera, la digestión, el ADN genómico total del individuo es cortado con enzimas de restricción (Figura 6-A). En la segunda o ligación, adaptadores específicos son ligados a los terminales (extremos cohesivos) de los fragmentos genómicos generados con el corte (Figura 6-B). En la tercera etapa, llamada amplificación pre-selectiva, una fracción de los

fragmentos generados es amplificada selectivamente vía PCR usando cebadores diseñados específicamente para reconocer las secuencias de los adaptadores (Figura 6-C). En la cuarta y última etapa (amplificación selectiva) la subpoblación de fragmentos amplificados son separados en gel de alta resolución (Figura 6-D) (Vos et al., 1995).

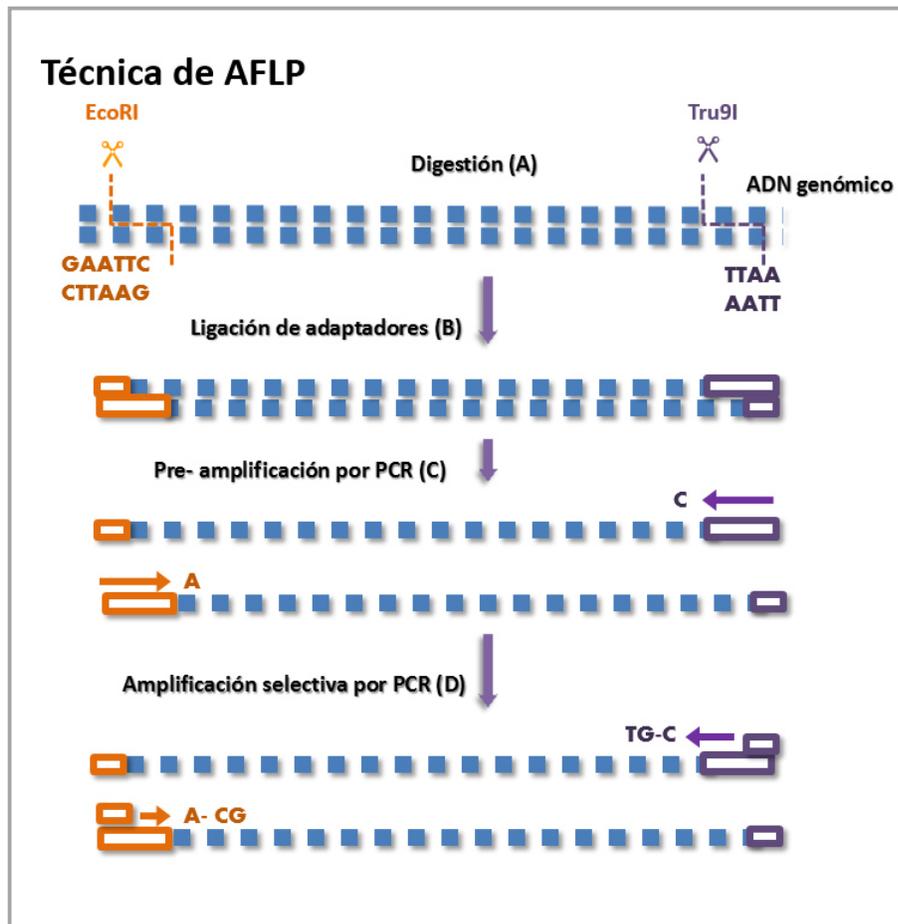


Figura 6: **Etapas de la técnica de AFLP.** (A) El ADN genómico es digerido con dos enzimas de restricción, EcoRI y Tru9I que generan extremos cohesivos en los extremos del ADN. (B) Se ligan adaptadores de secuencia conocida a los extremos cohesivos utilizando la enzima ligasa. (C) Se realiza una primera amplificación no selectiva mediante PCR utilizando cebadores específicos con secuencias complementarias a cada adaptador. (D) Se realiza una amplificación selectiva agregando restricciones al número de fragmentos amplificados por la adición de 3 bases a cada cebador.

Extracción del ADN

El ADN genómico fue extraído por el método de CTAB (Rogers & Bendich, 1985). Las ramas más jóvenes de cada planta muestreada se cortaron en finos trozos con ayuda de un bisturí, y posteriormente se molieron en un mortero con nitrógeno líquido. Se utilizó

Tesis de grado "Estudio de la estructura genética espacial de *Ramorinoa girolae* (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad" – Ortiz, Noelia

aproximadamente 3 g de tejido vegetal fresco para cada extracción. Una parte se conservó a -20°C y de 30 a 40 mg de tejido fresco molido fue transferido a tubos de Eppendorf previamente identificados adicionándole: 600 µl del Buffer CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA y 0,2% β-mercaptoetanol) y se los incubó durante 30 minutos a 65°C. Se centrifugó 5 minutos y se separó el sobrenadante en nuevos tubos, descartando los restos vegetales del fondo. Para la separación del ADN del resto de los componentes celulares se agregó 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (v/v) agitando suavemente durante 10 minutos y se centrifugó durante otros 10 minutos a 8000 rpm (velocidad máxima). Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, descartando el resto, y para la precipitación del ADN se agregó 0,6 V de Isopropanol frío (360 µl) y 0,16 V de Acetato de Sodio 3 M (96 µl). Posteriormente se centrifugó la muestra de 10 a 15 minutos a velocidad máxima y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con aproximadamente 200 µl de etanol al 70%. Para una buena extracción del material a analizar, el precipitado no debe soltarse del fondo del tubo, si esto ocurría se volvía a centrifugar por al menos 3 minutos. Para evitar esta complicación, se agregó el etanol por el borde del tubo. Luego se dejó el tubo invertido en papel-toalla hasta haberse evaporado el etanol. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 30 µl de agua MiliQ estéril y se incubó a 4°C, por media hora o más.

Para eliminar la contaminación con ARN, se adicionó ARNasa a una concentración final de 10 µg/ml (es decir, 1,2 µl por muestra) y se incubó a 37° C por 30 minutos. Luego se inactivó la ARNasa a 60°C durante 1 hora. Finalizado el proceso, las muestras se conservaron a -20°C hasta el momento de la cuantificación y posteriores reacciones.

Cuantificación

Con el fin de verificar la calidad de las extracciones del ADN genómico, se realizó una electroforesis horizontal de las muestras en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en una solución Buffer de TBE 1× (89 mM Tris-Borato y 2 mM EDTA, pH 8.3) a 90 Voltios constantes durante

40 minutos. El revelado se realizó mediante tinción con Bromuro de Etidio 0,5 µg/ml (BrEt) durante 10 minutos y la posterior fotodocumentación en un transiluminador (Figura 7-A).

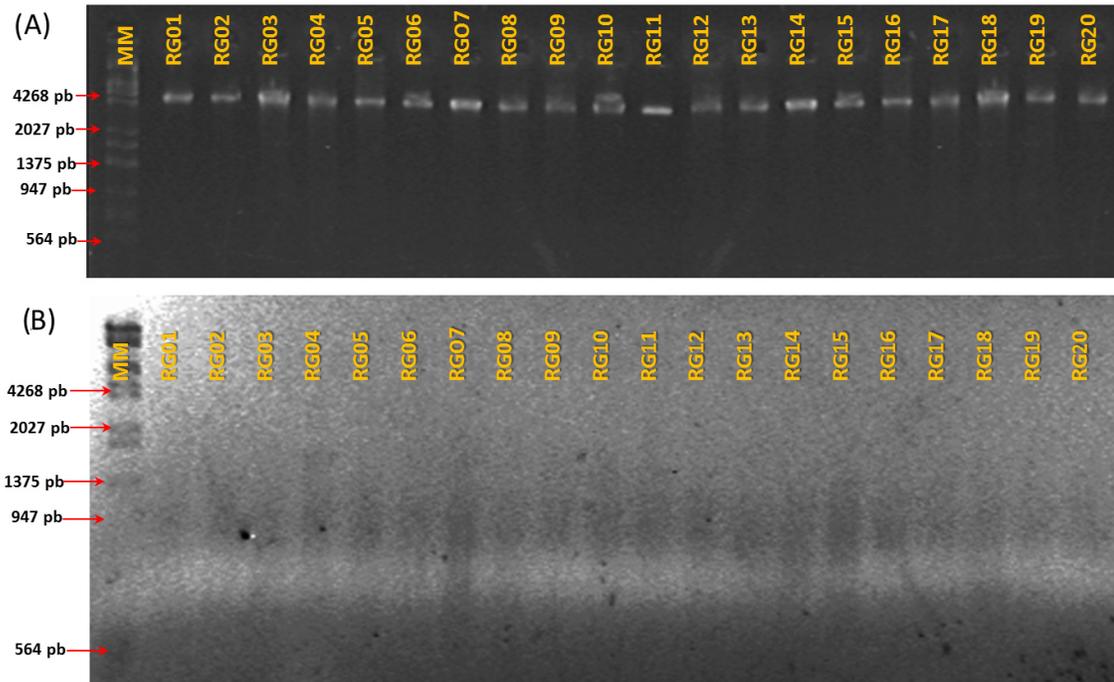


Figura 7: Extracción y Digestión de ADN genómico de genotipos de *R. girolae*. A) Se visualiza la integridad del ADN genómico extraído por el método de CTAB. B) Muestras de ADN genómico digeridas con las enzimas *EcoRI* y *MseI*, donde se ven fragmentos de diferentes tamaños entre 500 y 1300 pb. Gel de agarosa 0,8% teñido con EtBr (0,5 µg/ml). Condiciones de Electroforesis: 90 V durante 40 min. MM, Marcador molecular λ Hind/*EcoRI*.

La concentración del ADN genómico extraído se cuantificó a través de la lectura de absorbancia a 260 nm mediante espectrofotómetro de luz UV (GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech). La pureza del ácido nucleico se estimó a partir de la relación de absorbancias 260/280 nm y por ausencia de absorbancia a 320 nm. La concentración final de las muestras se ajustó a 50 ng/µl.

Digestión

La digestión del ADN se realizó utilizando las enzimas de restricción de corte raro y frecuente *EcoRI* y *Tru9I*, respectivamente. El sitio de corte reconocido por *EcoRI* es G/AATTC, mientras que el de *Tru9I* es T/TAA.

La reacción de restricción contuvo: 2 unidades de *EcoRI* (Roche), 0,5 unidades de *Tru9I*² (Roche), 2 µl de Buffer M 10× (Roche) y 6 µl de ADN con una concentración de 50 ng/µl en un volumen final de 20 µl. Las muestras se incubaron durante 3 horas a 37°C. La calidad de la reacción de digestión fue monitoreada mediante electroforesis sembrando 5 µl de cada muestra en geles de agarosa al 0,8% (p/v) a 90 V durante 40 minutos. El revelado se realizó mediante tinción con EtBr 0,5 µg/ml durante 10 minutos y la posterior fotodocumentación en transiluminador (Figura 7-B).

Ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo con 1,25 µl del adaptador *EcoRI* 20 µM y 1,25 µl del adaptador *MseI* 20µM (Ver Tabla 4), 2 µl del Buffer 10× Ligasa (Roche), 0,4 unidades de T4 Ligasa (Roche de 1 unidad/µl) y 10 µl del ADN digerido en un volumen final de 20 µl. Los adaptadores fueron ligados incubando las reacciones durante 10 horas a 20°C.

Amplificación pre-selectiva

Para la reacción de pre-amplificación mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizaron cebadores específicos para las secuencias adaptadoras de *EcoRI*+1 y *MseI*+1 (Ver Tabla 4). Cada PCR se realizó con: 2 µl del producto de la ligación, 2 µl de Buffer 10× (Roche), 0,6 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,4 µl de dNTPs 5 mM, 0,5 µl de TaqUBA®³ ADN polimerasa 5× (BIONAC, Buenos Aires), 0,2 µl del cebador *EcoRI*+1 a 50 ng/µl y 0,2 µl del cebador *MseI*+1 a 50 ng/µl, en un volumen final de 20 µl.

² La técnica de AFLP original está descrita con la enzima *MseI*. No obstante, por razones de disponibilidad y costos, en este trabajo se utilizó la enzima *Tru9I* que es una isoenzima de *MseI* (poseen el mismo sitio de restricción). Debido a que el producto de restricción es idéntico al producido por *MseI*, se utilizaron los mismos adaptadores y procesos de la técnica original.

³ TaqUBA® corresponde a la ADN polimerasa de *Thermophylus aquaticus* expresada en *Escherichia coli*. Es producida por BIONAC, un proyecto sin fines de lucro del área Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

Tabla 4: **Adaptadores y cebadores** usados en las etapas de amplificación de la técnica AFLP.

Adaptador <i>EcoRI</i>	5'-CTCGTAGACTGCGTACC
	CATCTGACGCATGGTTAA-5'
Cebador <i>EcoRI</i> +1	5'-AGACTGCGTACCAATTCA
Cebador <i>EcoRI</i> +3	E + AGC
	E + ACG
	E + ACA
Adaptador <i>MseI</i>	5'-GACGATGAGTCCTGAG
	TACTCAGGACTCAT-5'
Cebador <i>MseI</i> + 1	5'-GACGATGAGTCCTGAGC
Cebador <i>MseI</i> +3	M + CTG
	M + CTA
	M + CAA
	M + CAT
	M + CTC

Las reacciones se colocaron en un termociclador de forma tal que pasaron por 20 ciclos a: 94°C durante 30 segundos, 56°C durante un minuto y 72°C durante un minuto. La calidad de esta reacción también fue monitoreada mediante electroforesis en geles de agarosa tal como se describió anteriormente (Figura 8, B).

Aires. Para la puesta a punto de esta reacción se hicieron pre-amplificaciones con 4 muestras más un control negativo, usando distintas concentraciones de la enzima Taq ADN polimerasa 5× (TaqUBA®) (0,16 µl - 0,3 µl – 0,5 µl) y un control usando 0,2 µl de la enzima Taq ADN polimerasa 5× (Invitrogen). Estas reacciones se amplificaron como se describe a continuación y finalmente se revelaron en geles de poliacrilamida. No se notó diferencias entre la enzima Invitrogen y la enzima UBA a 0,5 µl, por lo que se decidió usar dicha cantidad en el total de muestras.

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

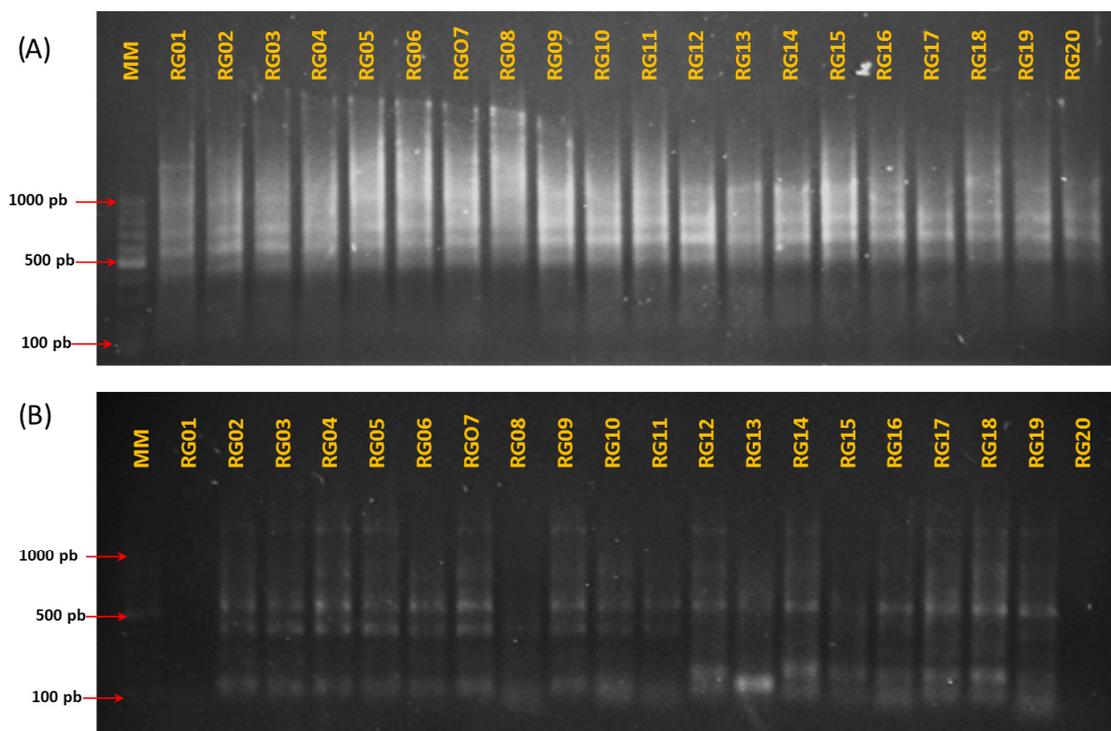


Figura 8: Pre-amplificación y Amplificación de fragmentos digeridos y ligados con los adaptadores. A) Resultados de Pre-amplificación utilizando cebadores no selectivos específicos para secuencias de adaptadores ligados donde se observa que los fragmentos obtenidos poseen tamaños entre los 200 y 1000 pb. B) Amplificación selectiva donde se observa una reducción en el número de fragmentos y se mantienen los tamaños entre 200 y 1000 pb. Gel de agarosa 0,8% teñido con EtBr (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Condiciones de Electroforesis: 90 V durante 40 min. MM, Marcador molecular 100 pb.

Amplificación selectiva

Previo a este paso se realizó una dilución 1/3 del producto de la pre-amplificación. La reacción de PCR se preparó usando 1 μl de dicha dilución, 2 μl de Buffer 10 \times , 0,6 μl de MgCl_2 50 mM, 0,8 μl de dNTPs 5 mM, 0,3 μl de *Taq* ADN polimerasa 5 \times (TaqUBA $^{\text{®}}$), 0,6 μl del cebador *Msel* +3 a 50 ng/ μl y 0,6 μl del cebador *EcoRI* +3 a 50 ng/ μl , en un volumen final de 20 μl .

Las reacciones se colocaron en un termociclador con un ciclado conocido como *touchdown*. El mismo consiste en reducir en cada ciclo de amplificación la temperatura de hibridación de forma tal que a medida que aumenta la población de fragmentos amplificados aumenta también la especificidad de la reacción de amplificación. El programa de ciclado

touchdown comienza con un ciclo a 94 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 30 segundos y 72 °C durante un minuto, disminuyendo la temperatura del templado 0,7 °C por ciclo durante 12 ciclos, y luego se realizan 23 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 56 °C por 30 segundos y 72 °C durante un minuto.

La amplificación selectiva se llevó a cabo utilizando distintos cebadores selectivos *Msel*+3 y *EcoRI*+3, listados en la Tabla 4. En primer lugar se probaron 15 combinaciones de estos cebadores en 3 muestras. Estas reacciones fueron examinadas en geles de poliacrilamida, para determinar las mejores combinaciones, es decir, aquellas que generen un mayor número de fragmentos polimórficos.

En este paso, también se monitoreó la calidad de estas reacciones mediante electroforesis en geles de agarosa como ya fue descrito anteriormente (Figura 8, B). Además se comprobó la eficacia del uso de la enzima Taq UBA usando como patrón la enzima de Invitrogen.

Resolución en geles de poliacrilamida y construcción de matriz binaria

Los productos de PCR de la amplificación selectiva se separaron mediante gel de poliacrilamida al 6% revelado con nitrato de plata (Bassam & Caetano-Anollés, 1993). Con el patrón de fragmentos resultantes se construyeron matrices de datos binarios de presencia (1) y ausencia (0) (Ver Figura 9).

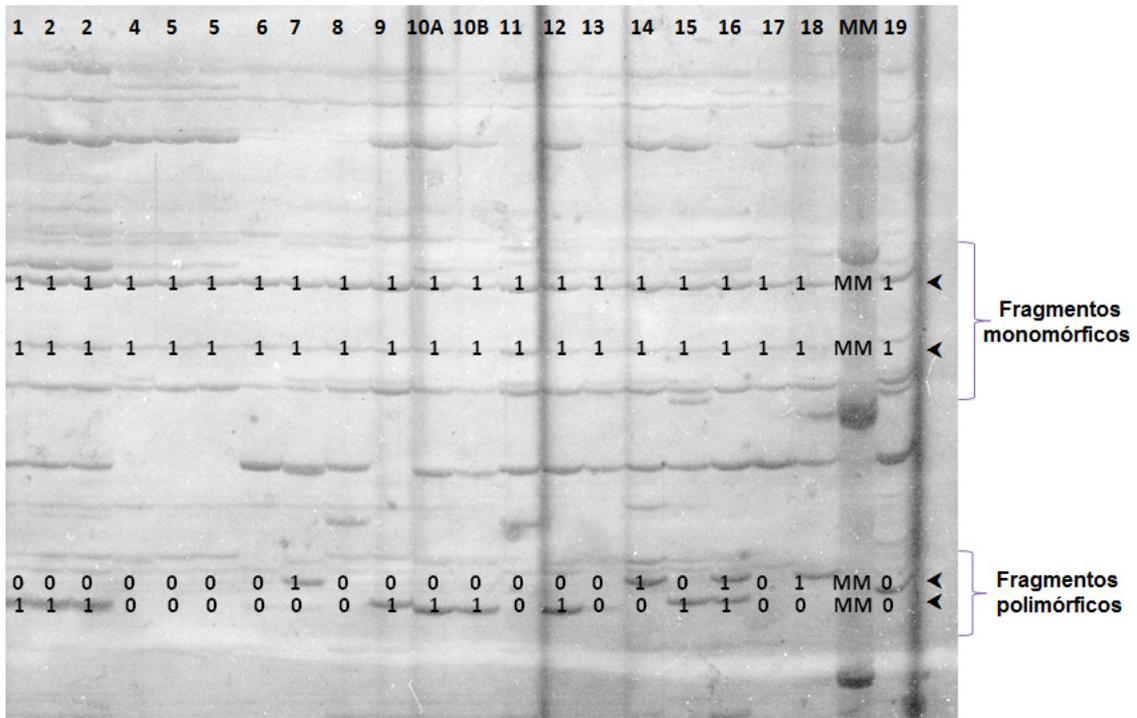


Figura 9: **Resolución de fragmentos de AFLP en gel de poliacrilamida.** En la imagen se observan las muestras (columnas) y dentro de cada muestra los alelos polimórficos de AFLP (líneas). En algunos casos, los alelos están presentes en todas las muestras y no brindan información (fragmentos monomórficos); a diferencia de los alelos con polimorfismo variable (fragmentos polimórficos). A partir de esta información se construye la matriz binaria asignando (1) a la presencia y (0) a la ausencia de fragmentos. La recopilación de los datos se realizó mediante apreciación visual. Se ejemplifica sobre el gel los fragmentos monomórficos y polimórficos. Gel de poliacrilamida al 6% obtenido mediante electroforesis vertical y teñido con nitrato de plata.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los **datos morfológicos** se calculó el valor medio y la desviación estándar del diámetro basal y la altura de los ejemplares muestreados. Además, se realizó un análisis de regresión lineal entre estas dos variables.

En el caso de los **datos genéticos**, a partir de la matriz de datos binaria de presencia y ausencia de fragmentos se analizó:

- a) la diversidad genética,
- b) la similitud genética entre pares de muestras, que derivó en una matriz de similitud (Crisci et al. 1983),

c) las asociaciones entre todas las muestras, mediante el análisis clúster o de conglomerados y

d) los factores que afectan a la estructura genética, mediante comparación de la matriz de distancia genética con las matrices de distancia de las variables espaciales, ecológicas y morfológicas, utilizando el test de Mantel.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InfoStat versión 2013 (Di Rienzo, 2013).

a) Diversidad Genética

Existen diversos índices para estimar la diversidad genética dentro de una población. Estos índices se basan en el uso de un carácter o marcador genético que manifiesta polimorfismo y se hereda de manera mendeliana (Teich, 2012).

La diversidad genética dentro de la población fue estimada a partir de la matriz binaria de datos de marcadores AFLP mediante: el Índice de Polimorfismo (P_j), el Índice de Diversidad Genética media a través de los loci (H_e) y el Índice de Uniformidad (U_j).

El Índice de Polimorfismo es la relación entre el número de loci polimórficos y el número de loci total, expresado en porcentaje. Un locus se consideró polimórfico cuando la presencia de sus alelos menos comunes resultó mayor al 1% (Moreno Vázquez, 2001).

El índice de Diversidad Genética media se determinó a través de los loci (H_e) y su varianza (Nei, 1973 citado en Moreno Vázquez, 2001) mediante la siguiente ecuación:

$$H_e = H_{av} = \frac{\sum_{j=1}^n H_j}{n} = \frac{\sum_{j=1}^n \left(1 - \sum_{i=1}^m P_{ij}^2 \right)}{n}$$

Siendo H_j : la heterocigosidad esperada en un locus j , o índice de diversidad de Nei de un locus j ; P_{ij} : la frecuencia del alelo i del locus j ; m : el número de alelos en el locus j y n : el número de loci considerados.

H_e expresa la heterocigosidad esperada para el locus medio si el apareamiento fuese al azar. Si se asume el equilibrio de Hardy-Weimberg la frecuencia del alelo recesivo puede

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

ser estimada como la raíz cuadrada de la frecuencia de individuos en los que falta el fragmento (frecuencia de los genotipos homocigotos recesivos). La diversidad es máxima cuando la heterocigosidad esperada en un locus j (H_j) (o índice de diversidad de Nei de un locus j) vale 0,5 y es mínima para H_j igual a cero. El máximo valor posible para H_e se obtiene cuando cada individuo presenta para cada locus un genotipo distinto en comparación con los correspondientes locus en otros individuos del grupo estudiado.

El Índice de uniformidad de una población j (U_j) se calculó con la ecuación de Weising et al. (1995, citada en Moreno Vázquez, 2001):

$$U_j = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m P_{ij}$$

Donde P_{ij} es la frecuencia del carácter i (fragmento i) en la población j y m es el número de caracteres (fragmentos) analizado. La uniformidad es máxima cuando U_j es 1 ó 0 y mínima cuando es 0,5.

b) Similitud Genética

Se calculó la similitud genética (GS) de todas las posibles parejas de individuos, según la metodología propuesta por Dice (1945):

$$GS_{xy} = 2a / [2a + b + c]$$

Así como también la metodología propuesta por Jaccard:

$$GS_{xy} = a / [a + b + c]$$

Siendo “ a ”: número de fragmentos en común de las muestras x e y , “ b ”: número de fragmentos presentes sólo en la muestra x , “ c ”: número de fragmentos presentes sólo en la muestra y . Estas ecuaciones no consideran la ausencia de fragmentos en las muestras x e y , por lo que se adecúan a los datos obtenidos mediante AFLP. Con esta técnica, la ausencia de fragmentos podría estar determinada tanto por la ausencia del sitio de corte para las enzimas de restricción utilizadas, como por la presencia de polimorfismo en la

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

secuencia complementaria a los nucleótidos selectivos de los cebadores usados en las reacciones de preamplificación y amplificación (Hidalgo, 2013).

c) Análisis Clúster o de Conglomerados

En base a los valores de GS calculados según la ecuación de Dice, las asociaciones entre individuos fueron revelados por un análisis de conglomerados o análisis de clúster jerárquico con el Método de Varianza Mínima de Ward. Este método en primer lugar aplica un análisis en componentes principales y luego calcula la distancia con los valores de la proyección de los vectores propios de las unidades básicas de caracterización como si fueran las variables originales, recalculando la matriz mediante el método UPGMA (agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética, del inglés: *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging*). Según Núñez y Escobedo (2011) este método es más recomendable cuando el objetivo del trabajo es conocer la variabilidad o diversidad existente en las unidades básicas de caracterización de una especie o género específico.

d) Prueba de Mantel

La estructura genética de las poblaciones de *R. girolae* y los niveles de variación en los fragmentos de AFLP se estudiaron mediante la Prueba de Mantel, que permite estimar la asociación entre matrices de distancias.

La prueba de Mantel es una de las herramientas más utilizadas para evaluar la significancia estadística de la dependencia entre distancias genéticas y geográficas. Evalúa, vía procedimientos de permutación aleatoria, si la relación lineal entre las distancias geográficas y genéticas es significativa, lo cual se considera indicativo de la presencia de EGE global. No se basa en teoría genética y no requiere de supuestos biológicos, siendo esencialmente exploratoria ya que evalúa el nivel de significación de la correlación entre dos matrices de distancias (Mantel, 1967 citado en Teich, 2012). Las distancias de ambos tipos (genéticas y geográficas) se pueden expresar matricialmente ya que corresponden a pares

de individuos o pares de grupos de individuos identificados a priori. El estadístico de la prueba de Mantel es el mismo coeficiente de correlación lineal de Pearson (Teich, 2012).

Para realizar esta prueba se realizó la matriz de distancias genéticas a partir de los valores de GS calculados según la metodología propuesta por Dice, descrita anteriormente. La matriz de distancias geográficas se obtuvo a partir de las coordenadas UTM (bidimensionales) con y sin la variable altitud empleando la distancia euclídea.

Además se realizaron matrices de distancia con los datos morfológicos y ecológicos observados a campo, transformando los datos categóricos a datos numéricos. Dichas matrices se correlacionaron con las matrices de datos genéticos y geográficos, previa estandarización de los datos.

RESULTADOS

Caracterización morfológica de los ejemplares de *R. girolae* evaluados

A partir de los datos morfológicos de la población de plantas muestreadas, se pudo determinar que el diámetro a la altura de la base (DAB) se correlacionó positivamente con la altura de los árboles ($R^2 = 0,51$ y $p = 0,0002$) (Figura 10). El diámetro promedio de los individuos muestreados fue de $55,6 \pm 22,4$ cm. No se registró individuos con un DAB menor a 10 cm. Por su parte, el promedio de altura fue de $4,7 \pm 1,9$ m. En este caso, tampoco se encontró individuos menores a 1 m de altura.

La gran mayoría de las plantas identificadas y muestreadas presentaron gran porte registrándose un bajo número de ejemplares de porte pequeño: los genotipos 11, 14 y 16, que representan el 15% de las plantas relevadas. Pese a los intentos de muestrear plantas jóvenes para el análisis genético, sólo fue posible identificar 3 ejemplares pequeños: los genotipos 11, 14 y 16 (15% de las plantas relevadas).

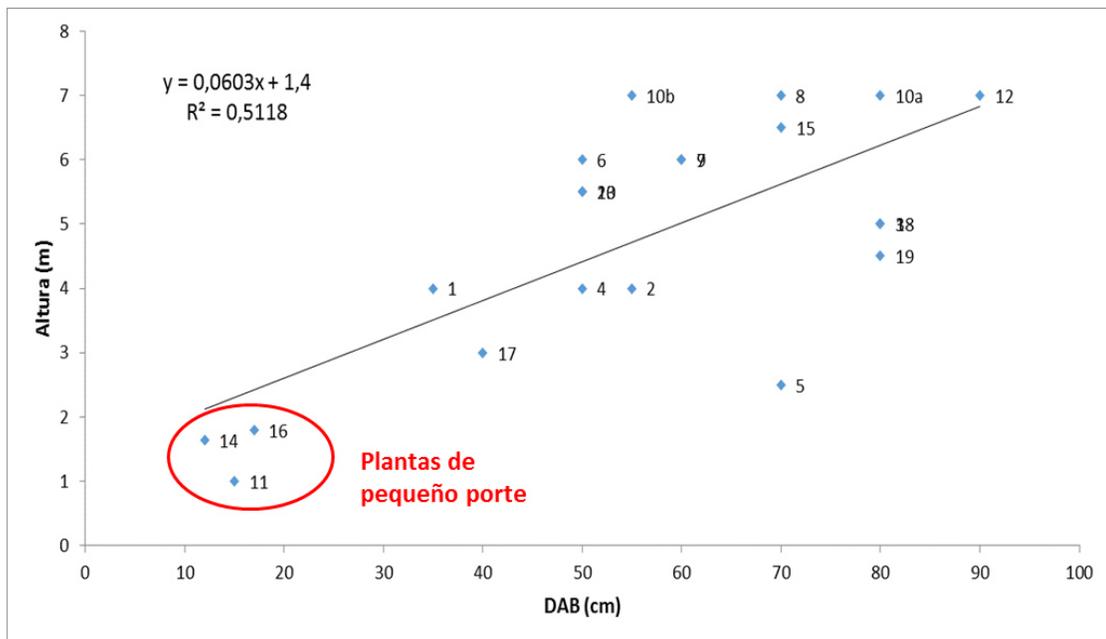


Figura 10: **Regresión lineal entre la altura de los árboles de *R. girolae* y el diámetro basal.** Las plantas 11, 14 y 16 fueron las más pequeñas que se encontraron para realizar el muestreo.

Análisis genético

Técnica de AFLP para *Ramorinoa girolae*

Para Amplificación selectiva (tercera etapa de la técnica de AFLP), se usó las cuatro combinaciones de cebadores que amplificaron un mayor número de fragmentos, resultando en total 164 marcadores, de los cuales el 82,3% fueron polimórficos y el 17,7% monomórficos (Tabla 5). La muestra número 3 no pudo ser analizada genéticamente por extravío.

Tabla 5: Combinaciones de cebadores elegidas para la Amplificación selectiva. Se indica además el tipo y el número de fragmentos generados en geles de poliacrilamida.

Tipo y n° de fragmentos (alelos)	Combinación de cebadores (EcoRI/Msel)				Total de alelos	%
	ACG/CTG	ACA/CTA	ACA/CAA	ACA/CAT		
Monomórficos	2	4	1	22	29	17,7
Polimórficos	40	35	31	29	135	82,3
Totales	42	39	32	51	164	100

Diversidad Genética

El Índice de Polimorfismo (P_j) fue del 82,3% para las muestras analizadas (Tabla 5), mientras que la Diversidad Genética Media de los loci (H_e) o diversidad genética de Nei resultó igual a 0,276, con una varianza de 0,035. El Índice de uniformidad de la población (U_j) fue igual a 0,49 (la uniformidad es máxima cuando U_j es 1 ó 0 y mínima cuando es 0,5).

Similitud Genética

Se construyó la matriz de similitud genética utilizando los coeficientes Dice (Tabla 6) y Jaccard (Tabla 7). Con el coeficiente Dice, los menores valores de similitud genética (GS) fueron de 0,73 entre las muestras 11-13 (lo cual implica que son similares en un 73%); y de 0,74 entre los siguientes pares de muestras: 11-5, 11-14, 11-18 y 18-2. Los mayores valores de similitud fueron de 0,99 (99% de similitud) para los pares de muestras 10a-10b, correspondiendo a muestras de dos extremos de una misma planta de gran porte (presentaron diferencias del 1,8% en el número de fragmentos amplificados); y de 0,93 entre

las muestras 19-20. Con el coeficiente Jaccard el menor valor de similitud genética fue de 0,58 entre los pares de muestras 11-13, y 11-5, siendo el mayor valor igual a 0,97 entre las muestras 10a-10b, seguido de 0,87 entre las muestras 19-20.

Tabla 6: Valores de Similitud Genética (GS) entre las muestras analizadas de *R. girolae* (RG) mediante marcadores moleculares AFLP, usando el coeficiente Dice.

RG	1	10a	10b	11	12	13	14	15	16	17	18	19	2	20	4	5	6	7	8	9
1	1																			
10a	0.87	1																		
10b	0.85	0.99	1																	
11	0.77	0.77	0.75	1																
12	0.84	0.87	0.86	0.8	1															
13	0.82	0.86	0.85	0.73	0.89	1														
14	0.84	0.91	0.92	0.74	0.86	0.91	1													
15	0.89	0.91	0.90	0.82	0.86	0.87	0.89	1												
16	0.76	0.79	0.78	0.78	0.79	0.79	0.79	0.87	1											
17	0.76	0.78	0.76	0.78	0.82	0.79	0.78	0.85	0.85	1										
18	0.76	0.76	0.75	0.74	0.81	0.81	0.82	0.86	0.86	0.86	1									
19	0.83	0.85	0.85	0.77	0.81	0.83	0.84	0.91	0.85	0.82	0.86	1								
2	0.88	0.80	0.80	0.78	0.83	0.79	0.81	0.85	0.81	0.75	0.74	0.76	1							
20	0.84	0.85	0.85	0.77	0.86	0.87	0.88	0.92	0.84	0.83	0.85	0.93	0.79	1						
4	0.82	0.81	0.80	0.79	0.84	0.83	0.83	0.87	0.81	0.77	0.79	0.78	0.88	0.82	1					
5	0.84	0.83	0.82	0.74	0.86	0.86	0.85	0.84	0.79	0.77	0.78	0.79	0.84	0.83	0.87	1				
6	0.80	0.82	0.80	0.80	0.82	0.81	0.81	0.87	0.78	0.80	0.80	0.82	0.78	0.83	0.81	0.88	1			
7	0.78	0.78	0.78	0.79	0.82	0.84	0.82	0.87	0.81	0.82	0.85	0.79	0.80	0.82	0.84	0.82	0.86	1		
8	0.81	0.83	0.81	0.90	0.87	0.85	0.83	0.84	0.79	0.83	0.84	0.80	0.83	0.81	0.80	0.81	0.85	0.85	1	
9	0.85	0.89	0.89	0.80	0.87	0.86	0.90	0.88	0.80	0.80	0.80	0.84	0.83	0.83	0.87	0.84	0.85	0.82	0.87	1

Tabla 7: Valores de Similitud Genética entre las muestras analizadas de *R. girolae* (RG) mediante marcadores moleculares AFLP, usando el coeficiente Jaccard.

RG	1	10a	10b	11	12	13	14	15	16	17	18	19	2	20	4	5	6	7	8	9
1	1																			
10a	0.77	1																		
10b	0.75	0.97	1																	
11	0.63	0.63	0.6	1																
12	0.72	0.76	0.75	0.66	1															
13	0.7	0.75	0.74	0.58	0.8	1														
14	0.72	0.84	0.85	0.59	0.76	0.83	1													
15	0.8	0.84	0.82	0.69	0.76	0.77	0.81	1												
16	0.61	0.65	0.64	0.64	0.66	0.65	0.65	0.77	1											
17	0.62	0.64	0.62	0.64	0.69	0.65	0.64	0.74	0.73	1										
18	0.62	0.61	0.59	0.59	0.68	0.68	0.69	0.75	0.75	0.76	1									
19	0.71	0.73	0.74	0.62	0.67	0.71	0.73	0.84	0.73	0.69	0.75	1								
2	0.78	0.67	0.66	0.64	0.71	0.66	0.68	0.74	0.68	0.61	0.59	0.62	1							
20	0.72	0.74	0.75	0.63	0.75	0.78	0.78	0.86	0.73	0.71	0.74	0.87	0.65	1						
4	0.69	0.68	0.66	0.66	0.73	0.71	0.71	0.76	0.68	0.62	0.65	0.64	0.79	0.69	1					
5	0.72	0.72	0.69	0.58	0.76	0.75	0.74	0.72	0.65	0.62	0.64	0.66	0.73	0.71	0.77	1				
6	0.67	0.69	0.67	0.66	0.7	0.68	0.69	0.77	0.63	0.66	0.66	0.69	0.64	0.71	0.68	0.79	1			
7	0.63	0.64	0.63	0.65	0.69	0.72	0.69	0.77	0.69	0.69	0.74	0.65	0.67	0.7	0.73	0.69	0.76	1		
8	0.68	0.71	0.68	0.82	0.77	0.74	0.71	0.73	0.66	0.7	0.72	0.66	0.71	0.68	0.67	0.69	0.74	0.75	1	
9	0.74	0.81	0.8	0.66	0.76	0.75	0.82	0.78	0.66	0.67	0.67	0.72	0.71	0.71	0.76	0.72	0.73	0.70	0.77	1

Se encontró el mismo patrón de similitud con los dos coeficientes empleados. Asimismo, el coeficiente de correlación cofenética fue similar para ambos índices: 0,658 según la ecuación de Dice y 0,653 según Jaccard, por lo que los análisis se realizaron en función del coeficiente de Dice.

Vale resaltar algunos valores de GS entre plantas cercanas. La muestra 11, extraída de una planta de pequeño porte ubicada a escasa distancia de una rama de la planta 8, un ejemplar de gran porte (Ver Figura 11). Estas muestras presentaron un $GS=0,90$. Un caso similar fue el de las muestras 13 y 14; RG 14 es una planta de pequeño porte ubicada a 2,2 m de RG 13, una planta adulta de 5,5 m de altura. El valor de GS para estas dos muestras fue de 0,91. Asimismo, vale remarcar que plantas ubicadas a un lado y otro de un cauce (Figura 12), a 7,2 m de distancia (RG 4 y 5) presentaron un valor de $GS=0,87$.

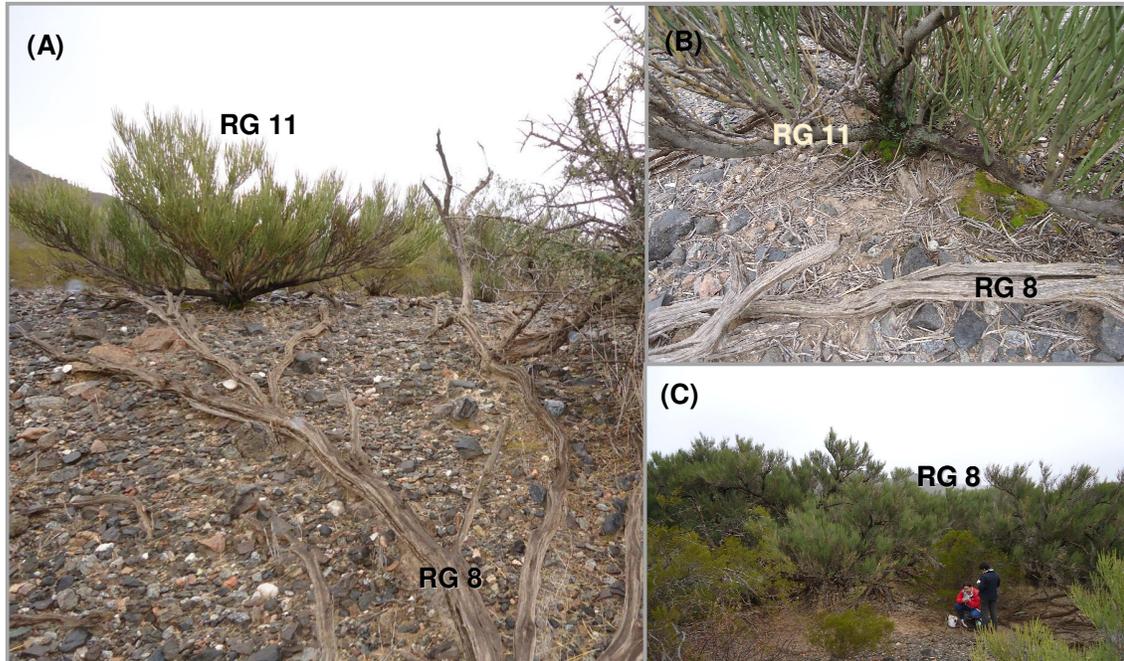


Figura 11: (A) Planta pequeña de *R. girolae* (RG 11) ubicada a escasa distancia de ramas de RG 8. (B) Mayor detalle de la base del ejemplar de pequeño porte. (C) RG 8 es un gran ejemplar de más de 20 m de diámetro de copa.



Figura 12: Foto de RG 4 y RG 5, muestreadas a un lado y otro de un cauce.

Análisis de Conglomerados

A partir de la matriz binaria construida con los datos genéticos, se realizó un Análisis Clúster o de Conglomerados entre los individuos, el cual permitió identificar 4 grupos diferentes a lo largo del cauce. Este análisis reveló que las plantas cercanas entre sí están más relacionadas genéticamente que aquellas distantes geográficamente (Figura 13).

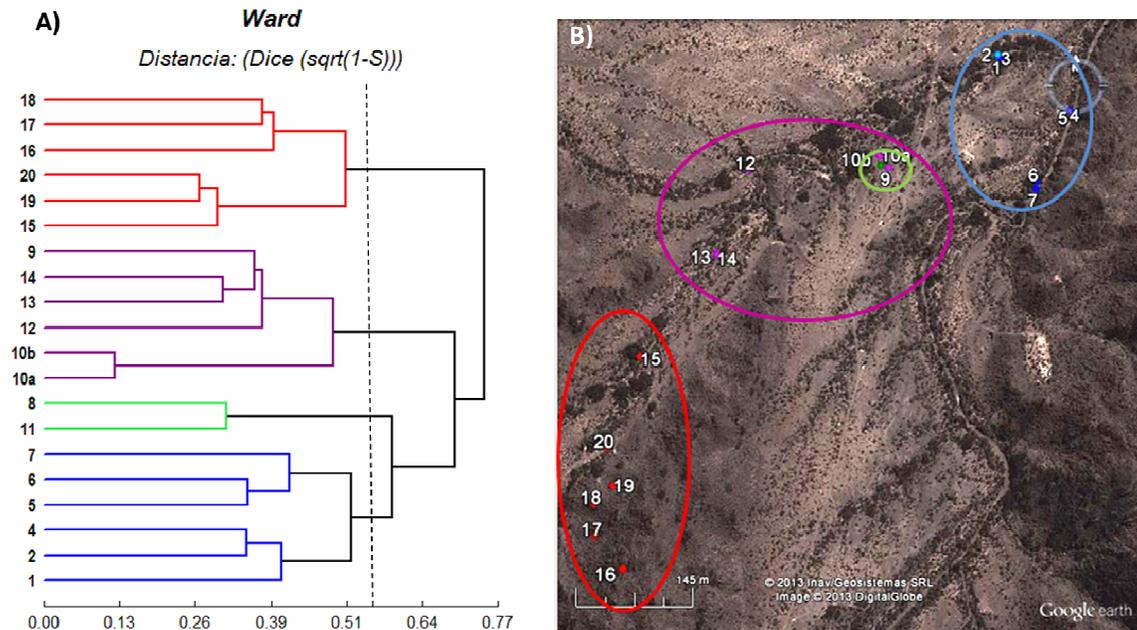


Figura 13: Estudio de similitud genética (grado de parentesco) entre genotipos de *Ramorinoa girolae*. (A) Dendrograma obtenido a partir del Análisis Clúster empleando el coeficiente Dice, el método de Ward y marcadores de AFLP. La longitud de las ramas es proporcional a la disimilitud genética entre las muestras analizadas. (B) Imagen satelital de la zona de muestreo. Los individuos de *R. girolae* (indicados con puntos) fueron colectados mayoritariamente a lo largo del cauce de la izquierda, y algunos ejemplares fueron colectados en la zona de confluencia con el cauce de la derecha.

El primer grupo o conglomerado (Figura 13, azul) incluye a los genotipos muestreados en la confluencia de dos cauces secos. Dentro de este grupo se puede observar que RG 4 posee mayor GS con RG 2 (GS=0,88), que con plantas más cercanas como RG 5 (GS=0,87). El segundo grupo (verde) incluye sólo a los genotipos 8 y 11 (Figura 11). Las plantas más cercanas a ellas se clasificaron en el tercer conglomerado (fucsia). El cuarto grupo formado (rojo) asoció a muestras recolectadas más alejadas del cauce, subiendo por una ladera hasta RG 6, localizado en la cima de un cerro (Figura 13-B).

Estructura Genética Espacial

Las pruebas de Mantel o análisis de correlación lineal entre las matrices de distancia genética y las de variables geográficas (coordenadas UTM y Altitud) revelaron que existe EGE entre las plantas estudiadas (Tabla 8 y Figura 14). Dicha estructura está definida mayoritariamente por las coordenadas espaciales, más que por la altitud. La incorporación de las variables ecológicas al análisis de correlación no mejoró en mayor medida la explicación de EGE. La única variable ecológica que presentó inferencia sobre la EGE fue la pendiente (P), relacionada con la Altitud en el muestreo realizado. Los coeficientes de correlación lineal entre matrices pueden verse en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados de las Pruebas de Mantel entre la matriz de distancias genéticas (Dice (sqrt(1-S))) y distintas matrices de distancias euclídeas realizadas a partir de variables geográficas y/o ecológicas, usando datos estandarizados. D: distancia a cauce, P: pendiente, G: granulometría del suelo.

	Matriz de distancias genéticas (Dice (sqrt(1-S)))
Matriz de distancias (euclídeas)	Coef. de correlación lineal
Geográfica (coordenadas UTM y Altitud)	0,44 (p=0,001)
Geográfica (coordenadas UTM)	0,45 (p<0,0001)
Geográfica (Altitud)	0,36 (p=0,004)
Geográficas y ecológicas (UTM, Altitud, D, P y G)	0,40 (p=0,006)
Ecológica (P)	0,35 (p=0,001)
Ecológicas (P, D y G)	0,30 (p=0,18)

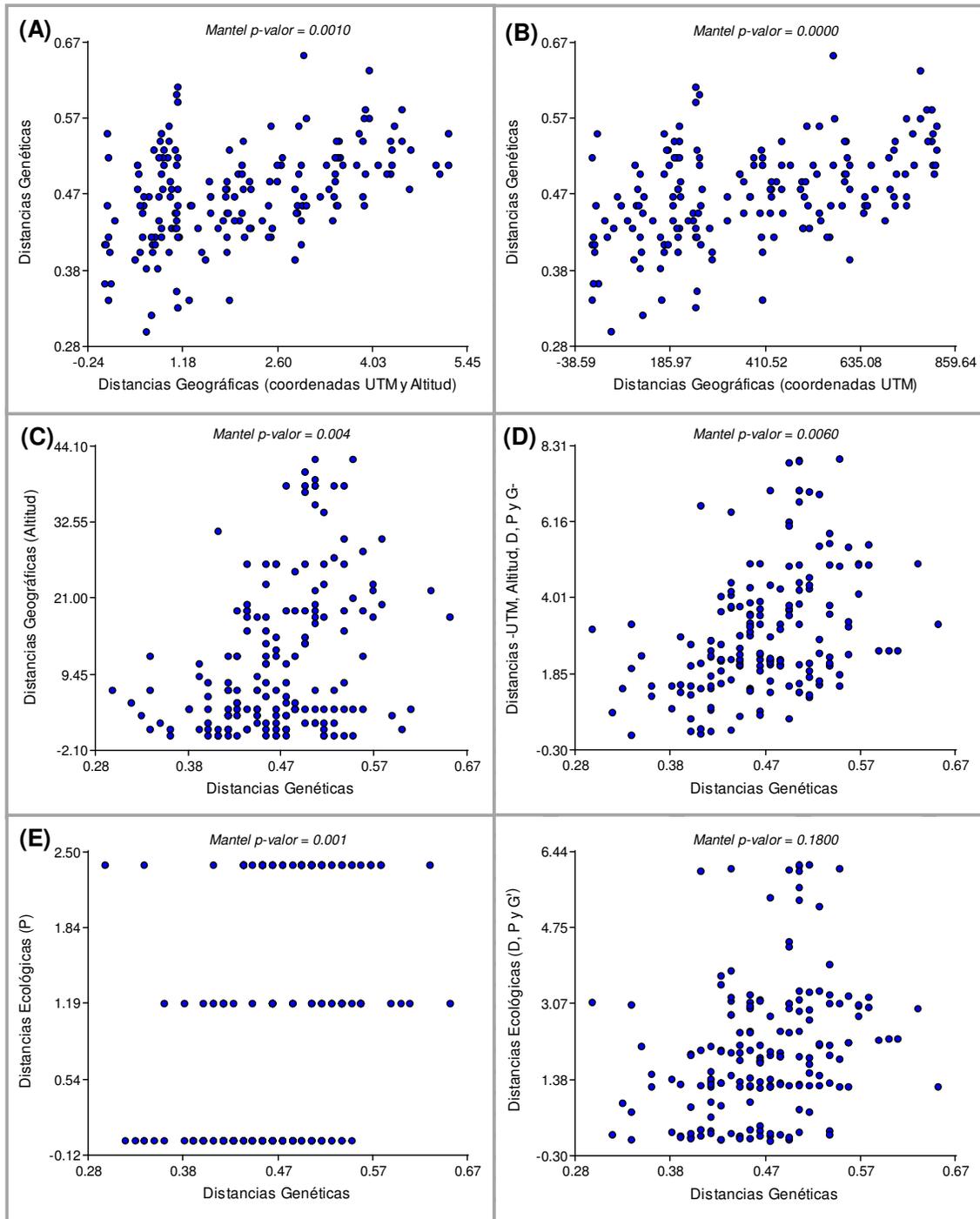


Figura 14: Gráficos de correlación lineal entre matrices (Pruebas de Mantel). Matriz de distancias genéticas vs. matriz de distancias (A) geográfica (coordenadas UTM y Altitud), (B) geográfica (coordenadas UTM), (C) geográfica (Altitud), (D) geográficas y ecológicas (UTM, Altitud, D, P y G), (E) ecológica (P) y (F) ecológicas (P, D y G).

DISCUSIÓN

Ramorinoa girolae es una especie críticamente amenazada, encontrada en un rango ambiental muy restringido. Según la clasificación de las comunidades florísticas realizada por Márquez et al. (2005), pertenece a la comunidad *Puya spathacea-Ramorinoa girolae*, que en el PPI se encuentra restringida a las laderas rocosas de umbría. En dicha comunidad, más de la mitad del espectro biológico es dominado por arbustos y matorrales y la cobertura vegetal puede alcanzar hasta el 50-60%, representando la zona más vegetada de la región. En este sentido, las plantas como *R. girolae* de consistencia leñosa y con yemas por encima de los 50 cm del suelo representan alrededor del 10% de esta comunidad, estando entre las comunidades vegetales del parque con mayor proporción de árboles. En asociación con esta especie se encuentran epífitas, suculentas y un gran número de especies de mamíferos, aves e insectos. Por ejemplo, *Octomys mimax*, un roedor octodontido endémico, solamente distribuido en las provincias de San Juan, La Rioja, San Luis y Catamarca (Sobrero et al. 2010), parece tener una fuerte interacción de depredación y probablemente dispersión de los frutos de *R. girolae* ya que se encuentra una gran cantidad de frutos cosechados en las cuevas de esta especie. Además en un estudio sobre selección de hábitat de este roedor, Campos y Giannoni (2013) encontraron que tanto en la estación seca como en la húmeda selecciona la comunidad del chical (Acebes et al. 2010). De esta manera, se remarca la importancia de la conservación de esta especie.

Con el fin de estudiar el grado de diversidad genética y conocer el grado de similitud genética entre plantas de *R. girolae* cercanas entre sí, se realizó un muestreo a lo largo de dos cauces convergentes en la zona conocida como “Mina de Cuarzo” del PPI. En esta especie, pese a innumerables intentos de expertos, la datación utilizando el método del conteo de los anillos de los troncos ha resultado inaplicable (Martín Hadad, comunicación personal). De esta manera, los individuos recolectados se agruparon en función del diámetro de su tronco y la altura (Figura 10). Pese a que la metodología de este estudio no apuntaba

a identificar la estructura del bosque de chica, la información obtenida fue comparada con un estudio sobre dicha estructura realizado sobre una población de *R. girolae* localizada en el cerro Pie de Palo en la localidad de Vallecitos, del departamento Cauce (31° 42' 15,5" S; 68° 00' 47,8" W), a 60 km al este de la Capital de San Juan (Hadad et al., 2014). En esta comparación, se observa que los ejemplares caracterizados en nuestro estudio poseen en promedio mayor porte (DAB = 55,6±22,4 cm; H = 4,7±1,4 m) que los individuos caracterizados en el estudio anteriormente mencionado (DAB = 35,89±19,15 cm; H = 4,05±1,4 m). Estas diferencias podrían deberse a varios factores, tales como las características climáticas atribuibles a la diferencia de altitud (la Sierra de Pie de Palo está localizada a 130 km al sur del PPI); a que ambos bosques poseen distintas edades; a un efecto del tipo de muestreo o a un mayor efecto de acción humana sobre dicha sierra.

Con respecto a la edad del bosque, Hadad et al. (2014) describen solamente 3 ejemplares (3% de las plantas muestreadas) con diámetros inferiores a los 10 cm. En este estudio, los menores diámetros registrados se ubicaron en el rango 10-20 cm, no habiendo encontrado ninguna planta con un diámetro inferior a los 10 cm. Debido a la falta de registros históricos y estudios sobre esta especie, se desconoce si las bajas proporciones de renovales son normales en la estructura poblacional y los ciclos biológicos de *R. girolae* o si efectivamente la escasez de renovales da indicios de que, debido a factores de perturbación, el bosque no se ha estado regenerando en las últimas décadas. Hadad et al. (2014), sugieren que son consecuencia del cambio climático. No obstante, a partir de observaciones a campo, se pudo observar en la zona de muestreo la escasa presencia de frutos con semillas y la alta depredación que sufren las mismas por parte de mamíferos como *O. mimax* (observación de la autora), lepidópteros como *Anypsiopyla univitella* Dyar (Papú, 2014), entre otros.

Especies con una distribución geográfica restringida generalmente presentan menores niveles de diversidad genética que especies con amplia distribución (Hamrik and Godt, 1989 en Ribeiro et al., 2005). En el caso de *R. girolae* con un estrecho rango de distribución y

Tesis de grado “Estudio de la estructura genética espacial de *Ramorinoa girolae* (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad” – Ortiz, Noelia

considerada en peligro de extinción, la población analizada presentó valores de variación genética medios ($H_e=0,276$) pero levemente superiores a los valores obtenidos en estudios que analizan los niveles de diversidad genética entre especies de estrecho rango ($H_e=0,215$) y amplio rango de distribución ($H_e=0,267$) (Hamrick and Goldt, 1989 en Ribeiro et al., 2005). No obstante, también se han registrado valores altos de variación genética en especies de árboles amenazadas de extinción, tales como: *Dalbergia nigra* (Papilionoideae; Ribeiro et al., 2005) y *Caesalpinia echinata* (Caesalpinioideae, Cardoso et al., 1998), así como también para especies con endemismo restringido pertenecientes a otras familias de plantas: *Seseli farrenyi* (Apiaceae, López-Pujol et al., 2002), *Cochlearia bavarica* (Brassicaceae, Paschke et al., 2002), *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae, Finger et al., 2012) y *Antirhea aromatica* (Rubiaceae, González-Astorga & Castillo-Campos, 2004).

El nivel de polimorfismo genético detectado por marcadores AFLP en la población natural de *R. girolae* analizada fue de 82,3%, siendo el primer estudio genético reportado para esta especie. Al ser una especie monotípica, no es posible comparar la diversidad genética con otras especies evolutivamente emparentadas. No obstante, vale mencionar resultados de estudios de polimorfismo genético en otras especies de leguminosas arbóreas tales como: *Butea monosperma* ($P_j=84,2$, 77,2 y 91,9% analizado por marcadores RAPD, ISSR y SRAP respectivamente; Vashishtha et al., 2013), *Plathymenia reticulata* ($P_j=70,8\%$ analizado por marcadores RAPD, Lacerda et al., 2001), *Albizzia* sp. ($P_j=95,05$ y 96,2% analizado por marcadores RAPD y ISSR; Aparajita et al., 2008). Por otro lado, el polimorfismo genético encontrado en *R. girolae* es considerablemente superior del identificado en otras especies de leguminosas arbóreas y herbáceas tales como *Acacia* sp. ($P_j=19,1\%$ analizado por el marcador RAPD; Casiva et al., 2002), *Prosopis* sp. ($P_j=29,3\%$ analizado con el marcador RAPD; Juárez-Muñoz et al., 2002), *Dalbergia nigra* ($P_j=39\%$ analizado con el marcador RAPD; Juchum et al., 2007), *Inga thibaudiana* ($P_j=43,3\%$ analizado con el marcador RAPD; Schierenbeck et al., 1997). En este sentido, un estudio realizado en *Parapiptadenia rigida* asocia la disminución de la diversidad genética de esta especie al alto grado de

deforestación de su ambiente natural ($P_j=60,45$ analizado con AFLP; Bérnago de Souza et al., 2013). Los altos niveles de polimorfismo genético encontrados en la población de *R. girolae* analizada podrían deberse a que dicha población se encuentra en un área protegida sin deforestación.

Además, el elevado nivel de variabilidad genética representado por el alto porcentaje de loci polimórficos está en concordancia con el amplio rango de distancia genética de Nei (He), independiente del marcador molecular utilizado. Desafortunadamente, la mayoría de los estudios realizados en leguminosas arbóreas y herbáceas se realizan utilizando diferentes mediciones de diversidad, y por ello es bastante difícil comparar los resultados entre sí.

Por otra parte, el análisis de agrupamientos de *R. girolae* empleando el método de Ward llevó a agrupar los ejemplares a lo largo del cauce en 4 grupos diferentes que presentaban relación con su distribución geográfica (Figura 13). En general, las poblaciones colectadas a partir de distancias geográficas cercanas exhiben mayores valores de similitud genética y se agrupan en dendrogramas. Por otro lado, la Prueba de Mantel reveló una correlación significativa entre las distancias genéticas y las geográficas (Tabla 8), sugiriendo la existencia de estructura genética espacial. Esta estructura se explica en mejor medida por su ubicación en el espacio y por la pendiente. Hadad et al. (2014) sugieren que en las laderas hay mayor proporción de plantas establecidas de *R. girolae* que en las cimas o las cercanía a cauces. Este tipo de correlación con la distribución espacial ha sido encontrada en otras especies de leguminosas tales como: *B. monosperma* (Vashishtha et al., 2013) y *Caesalpinia echinata* (Cardoso et al., 1998). Por otra parte, en poblaciones naturales con alto grado de deforestación como en *P. rigida* no se pudo identificar correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética (Bérnago de Souza, 2013). Es necesario realizar más estudios genéticos sobre poblaciones de *R. girolae* localizadas en otras zonas de endemismo y fuera de áreas protegidas sometidas a diferentes disturbios para concluir el estado de esta especie. No obstante, los estudios obtenidos a partir de esta población

Tesis de grado “Estudio de la estructura genética espacial de *Ramorinoa girolae* (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad” – Ortiz, Noelia

particular destacan la importancia de la conservación de esta población como reservorio genético de la especie.

Finalmente, y con el fin de profundizar acerca del grado de diversidad genética y el tipo de relación genética existente entre plantas cercanas entre sí, se compararon los índices de similitud genética. En forma contraria a lo que se esperaba, los índices de GS calculados entre todos los pares de muestras de *R. girolae* analizados (que variaron entre 0,73 y 0,99) son altos, lo cual puede deberse a la sobreestimación que puede llegar a producir la técnica de AFLP por ser un marcador de carácter dominante y/o a que la planta podría autofecundarse en el caso de que sea hermafrodita y autocompatible como es esperable para los miembros de la Familia Fabaceae. Esto se condice con los resultados de los estudios realizados por otros autores en especies autógamas, cuyos valores de GS calculados con marcadores AFLP y el coeficiente Dice varían entre: 0,737 y 0,980 (en *Oryza sativa*: Aggarwal et al., 2002); 0,66 y 1 (en *Solanum kurtzianum*: Hidalgo, 2013). En este sentido, ninguno de los individuos recolectados a distancias inferiores a los 20 m resultaron producto de la multiplicación clonal. El análisis particular de los tres ejemplares de pequeño porte analizado sugiere que están relacionados genéticamente con los ejemplares adultos cercanos pero no son idénticos, lo que indica que probablemente sean productos de la reproducción sexual. Para señalar ésto se tomó como referencia las muestras 10a y 10b, recolectadas de distintas ramas de una misma planta de gran tamaño. Dichas muestras presentaron diferencias del 1,8% en el número de fragmentos amplificados, lo que se tradujo en un valor de GS=0,99 según el coeficiente Dice. Estudios de diversidad genética utilizando AFLP sobre clones de *Dalbergia sissoo* Roxb. revelaron que el polimorfismo entre clones podía variar entre el 11 y el 15% (Kumar et al., 2012). Si consideramos que *R. girolae* es una especie longeva, es posible asociar este polimorfismo a mutaciones puntuales entre las diferentes ramas de la planta provocadas por el efecto del tiempo.

Estos resultados, aunque preliminares, sugieren que hay un importante aporte de variabilidad genética producto de la reproducción sexual en la población estudiada. Cabe

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

remarcar que dicha población es la más numerosa y diversa en el PPI, lo que enfatiza la importancia de su conservación. No obstante, para validar estos resultados, sería necesario realizar el mismo tipo de análisis sobre otras poblaciones naturales con diferentes grados de disturbios. Esto permitirá determinar con mayor precisión la EGE de esta especie y relacionar variables ambientales de perturbación que afectan su distribución y reproducción.

CONCLUSIONES

La diversidad genética la población de *R. girolae* estudiada del PPI resultó ser alta, contrariamente a lo que se esperaba. Los índices calculados sugieren que hay un importante aporte de variabilidad genética producto de la reproducción sexual. Si bien las plantas cercanas están muy relacionadas, no son idénticas genéticamente. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que *R. girolae* se reproduzca asexualmente. Para ello se recomienda realizar más estudios genéticos de plantas que parezcan haberse desarrollado a partir de ramas de plantas adultas.

Por otro lado, la Prueba de Mantel reveló una correlación significativa entre las distancias genéticas y las geográficas, sugiriendo la existencia de EGE (lo cual también se pudo observar con la marcación de los conglomerados formados mediante el Análisis Clúster en un mapa). Esta estructura se explica en mejor medida por su ubicación en el espacio y por la pendiente.

Finalmente, vale destacar que el ajuste de la metodología empleada en este trabajo constituye un gran aporte para realizar estudios similares en otras poblaciones de *R. girolae* cuya información genómica se desconoce completamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acebes P, Traba J, Malo JE, Borghi CE & Giannoni SM (2010) Primeras estimas de densidad y selección de hábitat del guanaco en el Sitio Patrimonio de la Humanidad de Ischigualasto-Talampaya. Actas del IV Congreso Mundial de Camélidos. Santa María, Catamarca, Argentina.

Aggarwal R, Shenoy V, Ramadevi J, Rajkumar R & Singh L (2002) Molecular characterization of some Indian *Basmati* and other elite rice genotypes using fluorescent-AFLP. Theor Appl Genet. 105:680–690. DOI: 10.1007/s00122-002-0973-6

Aparajita S, Senapati SK, Rout GR (2008) Identification and genetic relationships among nine *Albizia* species based on morphological and molecular markers. Plant Biosyst 142:30–39

Azofeifa A (2006) Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17(2): 221-242. ISSN: 1021-7444.

Barrett SCH & Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. Falk DA, Holsinger KE Ed. Genetic and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York. 3-30.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G (1993) Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Applied Biochemistry and Biotechnology 42(2-3):181-188.

Bérgamo de Souza L, Ruas E, Rodrigues L, Ruas C & Ruas P (2013) AFLP marker analysis revealing genetic structure of the tree *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in the southern Brazilian Tropical Rainforest. Genetics and Molecular Biology, 36, 4, 533-539. Sociedade Brasileira de Genética. Brazil.

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

Cabrera A (1976) Regiones Fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia de Agricultura y Jardinería. Tomo II. Editorial ACME. Buenos Aires, Argentina.

Campos V (2012) Uso y selección de hábitat de *Octomys mimax* (Rodentia: Octodontidae) en el Monte árido de San Juan. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Campos V y Giannoni S (2013) Habitat selection by the viscacha rat (*Octomys mimax*, Rodentia: Octodontidae) in a spatially heterogeneous landscape. *Mammalia*. 000-000. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG. ISSN (printed): 0025-1461.

Cardoso MA, Provan J, Powell W, Ferreira PCG, de Oliveira DE. (1998). High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae–Caesalpinioideae). *Molecular Ecology* 7: 601–608.

Casiva PV, Saidman BO, Vilardi JC, Cialdella AM (2002) First comparative phenetic studies of Argentinean species of *Acacia* (Fabaceae), using morphometric, isozymal, and RAPD approaches. *Am J Bot* 89:843–853

Cortez E, Giannoni S, Borghi C et al (2005) [en línea] Plan de Manejo Del Parque Provincial Ischigualasto. Fase I. Período 2005-2010. Disponible en: <<http://uepi.turismo.gov.ar/wp-content/uploads/2013/07/03-PLAN-DE-MANEJO.pdf>> [Consulta: 09/08/2014]

Demaió P, Kanlin U, Medina M (2002) Árboles Nativos del Centro de Argentina. Editorial Colin Sharp. Primera Edición. ISBN 950-9725-51-X.

Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C (2013) InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297–307.

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

Falk D, Richards C, Montalvo A & Knapp E (2006) Population and Ecological Genetics in Restoration Ecology. En: Society for Ecological Restoration International. Foundations of Restoration Ecology. Ed. Island Press. Washington D.C., USA. ISBN 1-59726-016-9

Femenia J & Gimenez de Bolzon A (1992) *Ramorinoa girolae*: una especie leñosa xerofítica. Actas I Jornadas de Ciencia y Técnica del NOA.

Femenía J & López T (2004) [en línea] Chicales de Prepuna del Valle Vilgo-Paganzo, La Rioja, Argentina. Disponible en: <www.revistaciencias.com/publicaciones> [Consulta: 24/05/2013]

Ferreira G & Grattapaglia D (1998) Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Ministerio da Agricultura e do Abastecimento (MA). Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAMPA). Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnología (CENARGEN). Brasilia, DF.

Finger A, Kettle C, Kaiser-Bunbury C, Valentin T, Mougul J & Ghazoul J (2012) Forest Fragmentation genetics in a formerly widespread island endemic tree: *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae). *Molecular Ecology* 21: 2369–2382

González-Astorga J, Castillo-Campos G. 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos & Lorence (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany* 93: 521–528.

Hadad M, Almiron M & Scaglia J (2014) Estructura de un bosque de *Ramorinoa girolae* (*Fabaceae*), en la Sierra de Pie de Palo, San Juan (Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 49 (2): 283-292. ISSN: 0373-580 X

Haene E & Aparicio G (2007) 100 Árboles Argentinos. Ediciones Albatrós. 128p.

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

Hidalgo, V (2013) Conservación *in situ* de germoplasma silvestre de papa en la reserva natural Villavicencio. Tesis de grado de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

Juarez-Munoz J, Carrillo-Castañeda G, Arreguín R, Rubluo A (2002) Inter and intragenetic variation of four wild populations of *Prosopis* using RAPD-PCR fingerprints. *Biodivers Conserv* 11:921–930

Juchum FS, Leal JB, Santos LM, Almeida MP, Ahnert D, Corrêa RX (2007) Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) using RAPD markers. *Genet Mol Res* 6:543–553

Kiesling R (1994) Flora de San Juan, República Argentina. Buenos Aires: Vázquez Mazzini. 6ª Ed. ISBN 950-99063-8-7.

Kumar A, Dobhal S & Sharma S (2011) Assessment of genetic diversity in different clones of *Dalbergia sissoo* Roxb. by RAPD markers. *African Journal of Biotechnology* 10(35): 6686-6694, DOI: 10.5897/AJB10.2697

Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP, Lovato MB (2001) Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathyeni reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Mol Ecol* 10:1143–1152

López-Pujol J, Bosch M, Simon J, Blanché C. 2002. Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 93: 323–332.

Márquez J, Martínez Carretero E, Dalmasso A, Pastrán G & Ortiz F (2005) Las áreas protegidas de la provincia de San Juan (Argentina) II. La vegetación del parque provincial Ischigualasto. *Multequina* 14:1-27.

Tesis de grado “Estudio de la estructura genética espacial de *Ramorinoa girolae* (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad” – Ortiz, Noelia

Moreno Vázquez S (2001) Conservación y caracterización de recursos filogenéticos: análisis de resultados en la caracterización molecular. Valladolid, España: Ed. Publicaciones INEA. ISBN 84-607-1922-7: 253-265.

O'Donnell C (1939) La anatomía de una interesante planta áfila cuyana - *Ramorinoa girolae*. *Physis* 15(47):311-321.

Papú, Sofía (2014) Caracterización general y depredación predispersiva en poblaciones de chica (*Ramorinoa girolae*) del Parque Provincial Ischigualasto (San Juan, Argentina). Tesis de grado de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

Paschke M, Abs C, Schmid B. 2002. Relationship between population size, allozyme variation, and plant performance in the narrow endemic *Cochlearia bavarica*. *Conservation Genetics* 3: 131–144.

PlanEAR (2008) [en línea] Plantas Endémicas de la Argentina. Disponible en: <www.lista-planear.org> [Consulta: 25/05/2013]

Ribeiro R, Simoes A, Pires J & Bernadete M (2005) Genetic Variation in Remnant Populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an Endangered Tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany* 95: 1171–1177. DOI:10.1093/aob/mci128

Rodríguez-Riaño T, Ortega-Olivencia A & Devesa JA (1999) *Biología Floral en Fabaceae*. 1^{era} Ed Ed. CSIN 176 p. ISBN: 978-84-00-07823-2

Rogers SO & Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5:69-76.

Schierenbeck KA, Skupski M, Lieberman D, Lieberman M (1997) Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Mol Ecol* 6:137–144

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia

Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (2005) [en línea] Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos. Informe Nacional. Disponible en: <http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/UMSEF/File/PINBN/informe_nacional_pinbn.pdf> [Consulta: 10/08/2014]

Secretaría de Estado de Ambiente y Desarrollo Sustentable (2013) [en línea] San Juan es la primera provincia argentina en categorizar plantas endémicas. Disponible en: <http://ambiente.sanjuan.gov.ar/noticia_ampliada.php?id=396> [Consulta: 03/07/2014]

Sobrero R, Campos V, Giannoni SM and Ebensperger LA (2010). *Octomys mimax* (Rodentia: Octodontidae). Mamm. Species 42:49 – 57

Spegazzini C (1924) Un nuevo género de leguminosa (*Ramorinoa*). Physis 7(21):62-267. Bs.As.

Teich I (2012) [en línea] Análisis de la estructura genética espacial de especies arbóreas y su asociación con la variabilidad fenotípica y ambiental. Tesis Doctoral. Biblioteca Digital de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Disponible en: <http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5074_Teich.pdf> [Consulta: 14/02/2014]

Vashishtha A, Jehan T & Lakhanpaul S (2013) Genetic diversity and population structure of *Butea monosperma* (Lam.) Taub.- a potential medicinal legume tree. Physiol Mol Biol Plants 19(3):389–397. DOI 10.1007/s12298-013-0170-x

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M & Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 11, 4407–4414.

Zapata R, Quiroga P & Grosso N (2010) Valoración química de las semillas de *Ramorinoa girolae* Speg. “chica” para la alimentación humana. Congreso Eco Productos Forestales No Madereros. Esquel.

Tesis de grado “*Estudio de la estructura genética espacial de Ramorinoa girolae (chica), una especie endémica de gran vulnerabilidad*” – Ortiz, Noelia