

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Estudio de la diversidad genética de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera*) en Oceanía Remota para inferir posibles rutas de poblamiento de esta región

Tesis presentada en la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

GABRIELA CECILIA OLIVARES SILVA

Directoras de tesis: Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch
 Dra. Ximena Moncada Rodríguez

SANTIAGO – CHILE

NOVIEMBRE 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

GABRIELA CECILIA OLIVARES SILVA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Directora de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch _____

Directora de Tesis:

Dra. Ximena Moncada Rodríguez _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay _____

Dr. Carlos Santiviago Cid _____

Dr. Mauricio Moraga Vergara _____

“La flor que florece en la adversidad es la más rara y hermosa de todas.”

Emperador, *Mulán* (1998).

AGRADECIMIENTOS

Parece casi un sueño que esté escribiendo esta sección de la tesis. Lo digo en serio... Ha sido uno de los procesos más largos de toda mi vida. Ansiaba el momento de que llegara este día desde hace varios años (incluso antes de inscribir la tesis).

En primer lugar, le agradezco a todas las instituciones que de alguna forma u otra me han ayudado a desarrollar esta tesis: A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por ser mi segundo hogar, a CONICYT por otorgarme la beca de magíster, a la Virrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile por otorgarme la beca de estadía en el extranjero y a la Universidad Nacional de Taiwán por abrirme sus puertas para trabajar durante dos meses.

En cuanto a las innumerables personas que me han acompañado en este viaje, quiero agradecer a mis dos grandes guías: Muchas gracias a la profesora Daniela y a Ximena por abrirme las puertas del laboratorio y aceptarme como tesista (o debería decir, por aceptarme como la tesista autodenominada). He tenido el placer de conocerlas en el ámbito académico y personal, y me siento muy feliz de haber tenido como mentoras a dos grandes mujeres. Son personas atentas y preocupadas en su trabajo, lo cual también se refleja en la relación que entablamos durante este último tiempo. Muchas gracias por acoger mis frustraciones y dudas, aconsejarme en los momentos confusos y alegrarse hasta por los logros más pequeños de mi vida académica o de la personal.

Asimismo, quiero agradecer a Andrea, jefa del proyecto, por su riqueza cultural y personal. Su excelente disposición a entregar la mirada antropológica a los resultados de esta tesis ha sido sorprendente y estoy sumamente agradecida del tiempo que le ha dedicado a revisar y analizar las mil versiones previas de este escrito. Además, le agradezco al Dr. Kuo-Fang Chung por recibirme en su laboratorio en la Universidad Nacional de Taiwán y ser uno de los grandes responsables de uno de los viajes más sorprendentes y exóticos de mi vida. Estar en Asia me abrió el apetito de viajar a tierras lejanas y de volver a encontrarme con aquella cultura.

Por supuesto que no puedo dejar de mencionar a las personas del laboratorio de Biología Molecular: el profesor Sergio, Claudia, Bárbara, Gerardo, Leslie, Johany y Josué. No han estado todos en el mismo espacio-temporal, pero fueron figuras muy importantes en todos los años que estuve en el laboratorio. Muchas gracias siempre por la buena onda que caracterizó el laboratorio. Quiero referirme especialmente a Claudia, Bárbara y Gerardo, ya que fueron los que tuvieron que aguantarme el último año y medio, viéndome casi todos los días y presenciar todo el estrés que causa la tesis. Gracias por las largas y enriquecedoras conversaciones, y por soportar mis gustos de DJ. Estoy segura que se acordarán de mí cada vez que escuchen las canciones de Disney, Supernova, Backstreet Boys, Britney Spears y K-Pop.

De forma aún más especial, quiero agradecerle a Claudia por ser la segunda madre de esta tesis. No podría haberla terminado sin tu ayuda. Muchas gracias por compartir tus conocimientos y amplia experiencia para “simplificar” cada momento de este proceso, y por sobretodo, por convertirte en una amiga. Mis días en el laboratorio no habrían sido lo mismo sin tu presencia. ¡Gracias, tía Claudia! (¿De verdad creíste que no te habías ganado un párrafo en esta tesis?).

Por otra parte, quiero agradecer a las personas que puedo llamar “amiga/os”, ya que han sido una gran fuente de alegría, cariño, distracción y apoyo. Tengo que hacer una mención especial a mis amigos de la universidad: Mauro, Coral, Perso, Aran, Maquita, Claudia y Leslie. Por esas cosas de la vida eligieron estudiar la misma carrera y se convirtieron en las personas que alegraron cada día que estuve en la facultad. Gracias por compartir sus alegrías, chistes (cuestionable en el caso de Perso), tristezas, miedos y su vida

conmigo. Gracias por entender que deben advertirme que me contarán una confidencia para que mi estúpida mente entienda que tiene que guardar un secreto, gracias por reírse y recogerme todas las veces que caigo al suelo (lo cual ocurre a menudo, vivo en el piso), gracias aceptar que veo el mundo con unos lentes Disney y que cada detalle puede ser extrapolado a una película de princesas. Muchas gracias por ser tan buenas personas. Están llenas de alegría, potencial y amor... Y, como diría Burbuja de “Las Chicas Superpoderosas”, el amor hace al mundo girar.

Finalmente, quiero agradecer a las personas más importantes de este logro: mi familia. Papá, mamá y Francisco, ustedes han sido un pilar fundamental en mi vida. Sin ustedes no sería la persona que soy hoy, puesto que me han entregado las herramientas necesarias para construir mi presente y futuro. Gracias por su constante apoyo y por respetar mis decisiones, aún si no estaban siempre de acuerdo. Muchas gracias por su cariño, preocupación y amor. El cierre de esta etapa no sólo es algo de valor personal, sino que también lo es para ustedes. Es la finalización de un importante ciclo familiar (especialmente para el papá, que era el más ansioso por tener el cartón en sus manos) que empezó hace mucho tiempo, desde que puse un pie en el jardín infantil. Estoy muy feliz de terminar esta etapa educacional con ustedes a mi lado (con Donatello incluido). ¡Los quiero mucho!

¡Aún no puedo creer que esté escribiendo los “Agradecimientos”! De verdad se acabó. Por fin se ha finalizado una larga etapa de mi vida, y sólo puedo terminar con la más referencia a Disney perfecta para esta ocasión: *¡Libre soy! ¡Libre soy!*

LUGAR DE REALIZACIÓN

Laboratorio de Biología Molecular

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

Santiago, Chile

Laboratorio de Biología Molecular

Escuela de Ciencias Forestales

Universidad Nacional de Taiwán (NTU)

Taipéi, Taiwán

FINANCIAMIENTO

- Proyecto FONDECYT 1120175.
- Beca CONICYT para Estudios de Magíster en Chile, años académicos 2014 – 2015 (Folio N° 22140158).
- Ayuda de Estadías Cortas de Investigación en el Extranjero, año académico 2015. Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile.

A la fecha, este trabajo ha dado origen a las siguientes comunicaciones:

- **Olivares G.**, Peñailillo J., Payacán C., Moncada X., Chung K.F., Seelenfreund D., Seelenfreund A. “Estudio de la diversidad genética de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L.) L’Herit. Ex. Vent.) de Oceanía Remota Oeste mediante diversos marcadores moleculares”. Competencia de panelistas. XXXIII Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 01 al 05 de Agosto de 2016.
- **Olivares G.**, Peñailillo J., Payacán C., Moncada X., Chung K.F., Seelenfreund D., Seelenfreund A. “Diversidad genética de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L.) L’Herit. Ex. Vent.) en Oceanía Remota, una planta de propagación clonal” Panel presentado en el XVI Congreso Latinoamericano de Genética. Montevideo, Uruguay. 09 al 12 de Octubre de 2016.

A la fecha, este trabajo ha dado origen a la siguiente publicación:

- Peñailillo J., **Olivares G.**, Moncada X., Payacán C., Chang C.S., Chung K.F., Matthews P.J., Seelenfreund A., Seelenfreund D. (2016). Sex distribution of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) in the Pacific. *PLoS ONE*, 11(8): e0161148.

ÍNDICE GENERAL

Índice General.....	i
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tablas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xiii
1. Introducción.....	1
1.1 Poblamiento humano de Oceanía.....	2
1.2 Uso de marcadores moleculares para comprender las rutas migratorias de Oceanía.....	5
1.3 Estudio de especies estrechamente asociadas al humano.....	6
1.4 <i>Broussonetia papyrifera</i>	7
1.5 Análisis genéticos de <i>B. papyrifera</i> mediante marcadores moleculares.....	8
2. Hipótesis.....	15
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivo General.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. Materiales y Métodos.....	16
4.1 Materiales.....	16
4.1.1 Reactivos e insumos generales.....	16
4.1.2 Soluciones y amortiguadores.....	16
4.1.3 Equipos.....	17
4.1.4 Material biológico.....	17
4.1.4.1 Muestras de Oceanía Remota Oeste.....	17
4.1.4.2 Muestras totales en la comparación e integración de datos de Asia y Oceanía Remota.....	17
4.1.4.3 Muestras seleccionadas de Asia y Oceanía Remota analizadas con la región de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>	19
4.2 Métodos.....	20
4.2.1 Extracción de ADN.....	20
4.2.1.1 Extracción de ADN mediante el método manual de Lodhi y cols. (2004) modificado.....	20

4.2.1.1 Extracción de ADN mediante el método manual de Moncada y cols. (2013) modificado.....	20
4.2.2 Evaluación de la integridad del ADN extraído.....	22
4.2.2.1 Evaluación de la integridad del ADN extraído mediante el método manual de Lodhi y cols. (2004) modificado.....	22
4.2.2.2 Evaluación de la integridad del ADN extraído mediante el método manual de Moncada y cols. (2013) modificado.....	22
4.2.3 Análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido.....	22
4.2.3.1 Medición de concentración de ADN mediante espectrofotometría.....	22
4.2.3.2 Medición de concentración de ADN mediante fluorescencia.....	22
4.2.4 Purificación de las extracciones de ADN genómico.....	23
4.2.5 Amplificación del banco genómico de muestras de Oceanía Remota Oeste con cuatro tipos de marcadores moleculares.....	23
4.2.5.1 Preparación de las diluciones de ADN para reacciones de PCR.....	23
4.2.5.2 Amplificación de la región ribosomal ITS-1.....	24
4.2.5.3 Amplificación del marcador de sexo.....	24
4.2.5.4 Amplificación de los marcadores SSR.....	25
4.2.5.5 Amplificación de la región de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>	26
4.2.6 Análisis de datos.....	26
4.2.6.1 Análisis de la región ITS-1.....	26
4.2.6.2 Análisis del marcador de sexo.....	27
4.2.6.3 Análisis de los marcadores SSR.....	27
4.2.6.3 Análisis del marcador de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>	28
5. Resultados.....	30
5.1 Extracción de ADN genómico de individuos de <i>B. papyrifera</i>.....	30
5.1.1 Extracción de ADN genómico de los 120 individuos provenientes de Oceanía Remota Oeste.....	30
5.1.1.1 Análisis de integridad.....	30
5.1.1.2 Mediciones de concentración y pureza de ADN.....	31
5.1.2 Extracción de ADN genómico de 41 individuos seleccionados de Oceanía Remota.....	32
5.1.2.1 Análisis de integridad.....	32

5.1.2.2 Mediciones de concentración y pureza de ADN.....	33
5.2 Análisis de la diversidad genética de individuos de <i>B. papyrifera</i> de Asia y Oceanía Remota mediante los marcadores moleculares ITS-1, marcador de sexo y SSR.....	33
5.2.1 Análisis de la diversidad genética de individuos de <i>B. papyrifera</i> mediante la región ITS-1.....	33
5.2.1.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste.....	33
5.2.1.1.1 Amplificación de la región ITS-1.....	33
5.2.1.1.2 Análisis de las secuencias de ITS-1.....	34
5.2.1.1.3 Alineamiento de las secuencias de ITS-1.....	35
5.2.1.2 Integración del análisis de la diversidad genética identificada mediante la región ITS-1 en Oceanía Remota Oeste con estudios previos en Asia y Oceanía Remota Este.....	36
5.2.1.2.1 Alineamiento de las secuencias de ITS-1 de individuos de Asia y Oceanía Remota.....	36
5.2.1.2.2 Análisis de la región ITS-1 de individuos asiáticos y masculinos de Hawái.....	37
5.2.1.2.3 Dendrograma del agrupamiento de las secuencias de ITS-1 de individuos de Asia y Oceanía Remota.....	40
5.2.2 Análisis de la diversidad genética de individuos de <i>B. papyrifera</i> mediante el marcador de sexo.....	41
5.2.2.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste.....	41
5.2.2.1.1 Amplificación del marcador de sexo.....	41
5.2.2.2 Integración del análisis de la diversidad genética identificada mediante el marcador de sexo en Oceanía Remota Oeste con estudios previos en Asia y Oceanía Remota Este.....	42
5.2.2.2.1 Distribución del sexo de individuos de <i>B. papyrifera</i> en Asia y Oceanía Remota.....	42
5.2.3 Análisis de la diversidad genética de individuos de <i>B. papyrifera</i> mediante 10 marcadores de microsatélites (SSR).....	44
5.2.3.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste.....	44
5.2.3.1.1 Amplificación de 10 marcadores SSR.....	44
5.2.3.1.2 Análisis de alelos y genotipos obtenidos mediante 10 SSR.....	46
5.2.3.2 Integración del análisis de la diversidad genética identificada mediante 10 SSR en	

Oceanía Remota Oeste con estudios previos en Asia y Oceanía Remota Este.....	49
5.2.3.2.1 Comparación del número de alelos encontrados en Asia y Oceanía Remota.....	49
5.2.3.2.2 Comparación del número de alelos encontrados en Oceanía Remota Oeste y Este.....	50
5.2.3.2.3 Identificación de genotipos en Asia, Oceanía Remota Oeste y Este.....	51
5.2.3.2.4 Test de Wilcoxon para determinar la existencia de cuellos de botella.....	52
5.2.3.2.5 Análisis bayesiano de estructura de poblaciones.....	53
5.2.3.2.6 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA).....	55
5.2.3.2.4 Red de genotipos identificados en Oceanía Remota.....	56
5.2.4 Caracterización de la diversidad genética de individuos de <i>B. papyrifera</i> mediante la región de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>.....	60
5.2.4.1 Amplificación de la región de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>	60
5.2.4.2 Alineamiento de las secuencias de la región de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>	61
5.2.4.3 Red de haplotipos de la región <i>ndhF-rpl32</i> de individuos de Asia y Oceanía Remota.....	62
6. Discusión.....	64
6.1. Extracciones de ADN genómico.....	64
6.1.1 Extracción de ADN genómico de 120 individuos provenientes de Oceanía Remota Oeste.....	64
6.1.2 Extracción de ADN genómico de 41 individuos seleccionados de Oceanía Remota.....	64
6.2 Caracterización de la diversidad genética de los individuos de <i>B. papyrifera</i> provenientes de Oceanía Remota Oeste con los marcadores moleculares ITS-1, marcador de sexo y SSR.....	65
6.2.1 Análisis de la diversidad genética de <i>B. papyrifera</i> mediante la región ITS-1.....	65
6.2.1.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste.....	65
6.2.1.2 Integración con los análisis previos de la diversidad genética en Asia y Oceanía Remota.....	65
6.2.2 Análisis de la diversidad genética de <i>B. papyrifera</i> mediante el marcador de sexo.....	67
6.2.2.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste.....	67
6.2.2.2 Integración con los análisis previos de la diversidad genética en Asia y Oceanía Remota.....	68
6.2.3 Análisis de la diversidad genética de <i>B. papyrifera</i> mediante marcadores SSR.....	70
6.2.3.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste.....	70
6.2.3.2 Integración con los análisis previos de la diversidad genética en Asia y Oceanía Remota.....	71
6.3 Análisis de la diversidad genética de individuos seleccionados de Oceanía Remota mediante la región de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>.....	77

6.4 Propuesta de rutas de dispersión de la morera de papel en Oceanía Remota.....	79
7. Conclusiones.....	83
8. Referencias.....	85
9. Anexos.....	92
ANEXO I: Materiales y Métodos.....	92
ANEXO II: Extracciones de ADN genómico.....	98
ANEXO III: Región ITS-1.....	99
ANEXO IV: Marcador de sexo.....	101
ANEXO V: Microsatélites.....	102
ANEXO VI: Marcador <i>ndhF-rpl32</i>	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa del Pacífico.....	1
Figura 2: Mapa de poblamiento de Oceanía.....	3
Figura 3: Imágenes de flores y del fruto de <i>B. papyrifera</i>	8
Figura 4: Perfil electroforético de ADN genómico de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota Oeste.....	30
Figura 5: Perfil electroforético de ADN genómico de 13 muestras almacenadas en sílica-gel y 11 muestras congeladas de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota.....	32
Figura 6: Amplificación de la región ITS-1 de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota Oeste.....	34
Figura 7: Alineamiento de secuencias de ITS-1 de 13 muestras de Oceanía Remota Oeste con un individuo de Oceanía Remota Este, dos individuos asiáticos y un control externo de especie en la posición relativa 203.....	35
Figura 8: Alineamiento de secuencias de ITS-1 de muestras de Oceanía Remota Oeste con individuos de Oceanía Remota Este, y dos individuos asiáticos de morera de papel y un control externo de especie.....	37
Figura 9: Comparación de SNP en la posición relativa 99 de las secuencias de ITS-1 de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Hawái, China, Japón, y Fiji.....	39
Figura 10: Dendrograma generado a partir del agrupamiento de las secuencias de ITS-1 de individuos de Asia y Oceanía Remota mediante UPGMA.....	40
Figura 11: Amplificación de la región <i>Male Marker</i> de 14 muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota Oeste.....	42
Figura 12: Mapa de la distribución de sexo de individuos contemporáneos de <i>B. papyrifera</i> en Asia y Oceanía Remota.....	44
Figura 13: Amplificación de 18 muestras con el marcador Bropap_25444.....	45
Figura 14: Amplificación de las muestras problemáticas del marcador Bropap_25444 con BSA en el mix de reacción de PCR.....	45
Figura 15: Electroferogramas del marcador Bro 08 en muestras seleccionadas de Oceanía Remota Oeste.....	47
Figura 16: Análisis bayesiano de estructura de poblaciones.....	54
Figura 17: Análisis de Coordenadas Principales de 67 genotipos de <i>B. papyrifera</i> de Asia y Oceanía Remota.....	56

Figura 18: Red de genotipos de <i>B. papyrifera</i> identificados en Oceanía Remota mediante el análisis de 10 SSR.....	59
Figura 19: Amplificación de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota con el marcador de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>	60
Figura 20: Alineamiento de secuencias del marcador de ADNcp <i>ndhF-rpl32</i> de cinco muestras de Oceanía Remota con secuencias de los haplotipos cp17, cp16 y cp01.....	61
Figura 21: Red de haplotipos de la región <i>ndhF-rpl32</i> de individuos de <i>B. papyrifera</i> de Asia y Oceanía Remota.....	63
Figura 22: Modelo de poblamiento de Oceanía Remota a partir de estudios genéticos de humanos, rata polinésica y morera de papel.....	81
Figura A: Esquema de amplificación de microsatélites utilizando marcación con cola M13 unida a fluoróforo.....	97
Figura B: Curva de calibración utilizada en la cuantificación de ADN con Picogreen.....	98
Figura C: Amplificación de los controles negativos de extracción con el marcador ITS-1.....	99
Figura D: Dendrograma generado a partir del agrupamiento de las secuencias de ITS-1 de individuos de Asia y Oceanía Remota mediante <i>Neighbor-Joining</i>	100
Figura E: Amplificación de los controles negativos de extracción con el marcador de sexo.....	101
Figura F: Amplificación de los controles negativos de extracción con el marcador de SSR Bro 13.....	102
Figura G: Análisis de Coordenadas Principales en tres dimensiones de los 32 genotipos de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota.....	111
Figura H: Red de los 67 genotipos de <i>B. papyrifera</i> identificados en Asia y Oceanía Remota mediante 10 SSR.....	112
Figura I: Esquema de las parejas de partidores para amplificar el marcador de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Muestras de hojas de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota Oeste.....	18
Tabla 2: Número total de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Asia y Oceanía Remota analizadas mediante los marcadores ITS-1 y de sexo.....	18
Tabla 3: Número total de muestras contemporáneas de <i>B. papyrifera</i> de Asia y Oceanía Remota analizadas mediante marcadores SSR.....	19
Tabla 4: Muestras seleccionadas de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota analizadas mediante el marcador de cloroplasto <i>ndhF-rpl32</i>	20
Tabla 5: Resumen de las características de los 10 partidores de SSR seleccionados.....	25
Tabla 6: Secuencias M13 y fluorocromos utilizados para cada tipo de marcador.....	25
Tabla 7: Distribución de sexo de individuos de <i>B. papyrifera</i> en Oceanía Remota y Asia.....	43
Tabla 8: Tabla de 13 genotipos encontrados en las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste con 10 SSR.....	48
Tabla 9: Alelos identificados en individuos de <i>B. papyrifera</i> de Asia y Oceanía Remota mediante 10 marcadores SSR.....	49
Tabla 10: Alelos identificados en individuos de morera de papel de Oceanía Remota Oeste y Oceanía Remota Este mediante el análisis de 10 marcadores SSR.....	50
Tabla 11: Alelos identificados en individuos de morera de papel de Oceanía Remota Oeste y Este (sin individuos masculinos hawaianos) mediante el análisis de 10 marcadores SSR.....	51
Tabla 12: Número total de genotipos de morera de papel identificados en Asia y Oceanía Remota.....	52
Tabla 13: Significancias del análisis de cuellos de botella de acuerdo a los modelos IAM y SMM.....	53
Tabla I: Nombre de cada muestra, origen, detalle de la extracción, pureza y concentración de las 120 muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota Oeste.....	92
Tabla II: Nombre muestra, origen, forma de almacenamiento de la hoja de la muestra, detalle de la extracción, pureza, y concentración de las muestras seleccionadas de individuos de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota para analizar en el laboratorio del Dr. Chung en Taiwán.....	96
Tabla III: Detalle de los alelos encontrados en la genotipificación de 120 individuos de Oceanía Remota Oeste con 10 marcadores SSR.....	103
Tabla IV: Detalle de los 67 genotipos encontrados en 314 individuos de morera de papel de Asia y Oceanía Remota mediante 10 SSR.....	108

ABREVIATURAS

° C:	Grados Celsius
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNcp:	Ácido Desoxirribonucleico de cloroplasto
ADNr:	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
AFLP:	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ARN:	Ácido ribonucleico
AP:	Antes del presente
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool.</i>
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino)
BP:	<i>Before Present</i> (Antes del presente)
CTAB:	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dsDNA:	Ácido Desoxirribonucleico de doble hebra (<i>double strand</i>)
dNTP:	Desoxirribonucleótidos
EDTA:	Ácido etildiaminotetraacético
ISSR:	<i>Inter-Simple Sequence Repeat.</i>
ITS:	<i>Internal Transcribed Spacer.</i>
MgCl ₂ :	Cloruro de magnesio
min:	Minutos
NaCl:	Cloruro de sodio
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS:	<i>Next-Generation Sequencing</i>
pb:	Pares de bases
PCoA:	<i>Principal Coordinate Analysis</i> (Análisis de Coordenadas Principales)
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PVP:	Polivinilpirrolidona
s:	Segundos
SCAR:	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>
SNP:	<i>Single Nucleotide Polymorphism.</i>
SSR:	<i>Simple Sequence Repeat</i> , microsátélites
TBE:	Tris/Borato/EDTA
UPGMA:	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Averages</i>

RESUMEN

El poblamiento humano de las islas del Pacífico (Oceanía Remota) corresponde a la colonización de los últimos territorios inhabitados del planeta, ocurrido hace 4.000 a 1.000 años AP. Éste fue un proceso complejo, debido a la extensión y condiciones del territorio. La reconstrucción de este proceso es un tema actualmente en estudio, dentro del cual se enmarca este trabajo.

El poblamiento de Oceanía Remota se ha analizado mediante estudios arqueológicos, lingüísticos y genéticos. Los estudios genéticos en humanos presentan inconvenientes, ya que las poblaciones actuales no son necesariamente descendientes directos de los pobladores originales. Por este motivo, se han estudiado especies estrechamente relacionadas al humano para comprender el poblamiento de Oceanía Remota. Entre estas especies se encuentra la morera de papel o *Broussonetia papyrifera*, una especie vegetal de importancia cultural en Oceanía Remota por su uso para la fabricación de textiles. Esta planta dioica originaria de Asia es una de las pocas especies no comestibles transportadas por los pre-polinésicos hacia el Pacífico. Por lo tanto, *B. papyrifera* es un modelo que podría entregar una mirada diferente del poblamiento humano en Oceanía Remota.

Estudios previos de *B. papyrifera* con marcadores de microsatélites (SSR) en un número limitado de muestras sugieren que las poblaciones de Oceanía Remota Oeste y Oceanía Remota Este son distintas genéticamente. Por este motivo, un análisis focalizado de la diversidad genética de esta especie en la región de Oceanía Remota Oeste ayudaría a la comprensión de su dispersión en Oceanía Remota y a inferir los procesos globales de poblamiento humano en el Pacífico.

A partir de lo anteriormente expuesto, la hipótesis propuesta es: **“Existe una mayor diversidad genética de *B. papyrifera* en Oceanía Remota Oeste que en Oceanía Remota Este, que es detectable mediante el uso de distintos marcadores moleculares, la cual permite determinar los patrones de dispersión de esta especie en el Pacífico e inferir posibles rutas de poblamiento humano de los colonizadores pre-polinésicos de Oceanía Remota”**.

El objetivo general es: “Caracterizar la diversidad genética de *B. papyrifera* a partir de individuos provenientes de Oceanía Remota Oeste y Este mediante el análisis de distintos marcadores moleculares, para determinar los patrones de dispersión de esta especie en el Pacífico e inferir posibles rutas de migración de los colonizadores pre-polinésicos de Oceanía Remota”.

Los objetivos específicos son: “1. Caracterizar la diversidad genética de los individuos de *B. papyrifera* provenientes de Oceanía Remota Oeste mediante el análisis de diferentes marcadores moleculares y 2. Comparar la relación entre diversidad genética y localización geográfica de los individuos de *B. papyrifera* provenientes de Oceanía Remota Oeste, en relación a Oceanía Remota Este y Asia, para

determinar patrones de dispersión de esta especie vegetal en las islas del Pacífico; e integrar los resultados con otros modelos de estudio para inferir posibles rutas de poblamiento de Oceanía Remota”.

En este trabajo se analizaron 120 muestras de *B. papyrifera* provenientes de cuatro islas o archipiélagos de Oceanía Remota Oeste (Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga) mediante tres marcadores moleculares: región ITS-1, marcador de sexo y 10 marcadores de SSR. Adicionalmente, se analizaron 41 muestras seleccionadas de Oceanía Remota (19 de Oceanía Remota Oeste y 22 Oceanía Remota Este) mediante el marcador de cloroplasto *ndhF-rpl32*.

Los análisis de la región ITS-1 y el marcador de sexo muestran que todos los individuos analizados de Oceanía Remota Oeste son idénticos genéticamente, mientras que mediante SSR se identificaron 13 genotipos diferentes en las cuatro localidades estudiadas de dicha región.

Al integrar la información con análisis previos de *B. papyrifera* provenientes de Asia y Oceanía Remota, los marcadores ITS-1 y de sexo muestran que los individuos de Oceanía Remota son homogéneos, lo cual concuerda con la introducción de sólo algunos ejemplares en esta región. La excepción sería Hawái, donde se observan dos grupos de individuos: uno genéticamente similar al resto de Oceanía Remota y otro más cercano a los individuos asiáticos. El último grupo se explicaría debido a una segunda introducción de *B. papyrifera* posterior al poblamiento de las islas del Pacífico.

Por otra parte, el análisis integrado de SSR permitió diferenciar 32 genotipos en Oceanía Remota, agrupándose en 3 grupos o poblaciones. Hay genotipos diferentes en las distintas regiones geográficas, observándose llamativamente que los genotipos de Oceanía Remota Oeste se encuentran en todas las regiones de Oceanía Remota. De este modo, los resultados sugieren que hubo una red de interacción que conectaba las diversas islas de Oceanía Remota Oeste y la parte central y los extremos de Oceanía Remota Este entre sí. Hay que destacar que muchas de estas interacciones son nuevos aportes a las rutas planteadas por otros modelos de estudio.

Por otro lado, el análisis de 41 individuos seleccionados de Oceanía Remota mediante *ndhF-rpl32* identificó solamente uno en Oceanía Remota Oeste y cinco haplotipos en Oceanía Remota Este. De los cinco haplotipos observados en Oceanía Remota Este, tres corresponden a nuevos haplotipos no descritos previamente en Oceanía Remota. Este resultado sugiere que Oceanía Remota no es una región homogénea, puesto que la diversidad genética entre Oceanía Remota Oeste y Este es diferente. Por lo tanto, sería interesante ampliar el análisis de este marcador a un mayor número de muestras de Oceanía Remota y así complementar los resultados obtenidos mediante este marcador con los análisis de SSR.

En resumen, existe diversidad genética de la morera de papel en Oceanía Remota y ésta es diferente entre Oceanía Remota Oeste y Este. A partir de este estudio, es posible establecer rutas de intercambio entre las distintas islas del Pacífico, que apoyan lo observado mediante arqueología y análisis genéticos en otros

modelos de estudio. La caracterización genética de *B. papyrifera* es un aporte a la reconstrucción de las rutas migratorias desde Asia a Oceanía Remota Oeste y luego a Oceanía Remota Este, para contribuir a la comprensión del poblamiento humano de las islas del Pacífico.

ABSTRACT

“Study of the genetic diversity of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) in West Remote Oceania to infer human migration and colonization routes”

The peopling of the Pacific Islands (Remote Oceania), took place about 4000-1000 years BP and corresponds to the last colonization of uninhabited territories of our planet. This was a complex process due to the extent and conditions of the territory.

The settlement of Remote Oceania has been analyzed by archaeological, linguistic, and genetic studies. Genetic studies in humans present some weaknesses, as the current populations are not necessarily direct descendants or representative of the original voyagers. For this reason, other species closely associated to humans have been studied in order to understand the peopling of Remote Oceania. One such species is paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*), a plant of high cultural value, because of its use for manufacturing textiles. This dioecious plant is native to Asia and is one of the few non-edible species transported by pre-Polynesians into the Pacific. Therefore, *B. papyrifera* is used as a model that could give a different perspective to other species studied so far in order to reconstruct the settlement of Remote Oceania.

Previous studies of *B. papyrifera* with microsatellite markers (SSR) using a limited number of samples suggested that populations of West and East Remote Oceania are genetically distinct. For this reason, a deeper analysis of the genetic diversity of this species focused on West Remote Oceania was expected to increase our understanding of its dispersal in Remote Oceania and the global processes of the settlement of the Pacific.

Based on the above, we pose the following hypothesis for this work: **“*B. papyrifera* presents a greater genetic diversity in West Remote Oceania than in East Remote Oceania, which can be detected by different molecular markers, that allows to determine dispersal patterns of this species in the Pacific and infer possible human migration routes of pre-Polynesian settlers in Remote Oceania”**.

The aim of this work is “to characterize the genetic diversity of *B. papyrifera* from West and East Remote Oceania, using different molecular markers, for establishing dispersal patterns of this species in the Pacific to infer possible human migrations routes of pre-Polynesian settlers in Remote Oceania”.

The specific aims of this work are: “1. To characterize the genetic diversity of *B. papyrifera* from West Remote Oceania de *B. papyrifera* by different molecular markers and 2. To compare the genetic diversity and geographic localization of the *B. papyrifera* individuals from West Remote Oceania, with those from East Remote Oceania and Asia, for establishing dispersal patterns of this species in the Pacific and infer possible human migrations routes in Remote Oceania”.

For this work 120 samples were analysed from four different islands or archipelagos of West Remote Oceania (three from New Caledonia, 71 from Fiji, 13 from Wallis, and 33 from Tonga) using three kinds of molecular markers: the ribosomal ITS-1 region, a sex marker and 10 SSR markers. Further, 41 selected samples from Remote Oceania (19 from West Remote Oceania and 22 from East Remote Oceania) were analysed using the *ndhF-rpl32* chloroplast region.

The analysis of the ITS-1 region and sex marker showed that the 120 individuals are genetically identical, while the analysis of 10 SSR markers identified 13 different genotypes in the four Western Remote Oceanian islands or island groups.

Integration of data from this thesis with previous work from our laboratory on *B. papyrifera* specimens from Asia and Remote Oceania, showed that the ITS-1 region, the sex marker and the *ndhF-rpl32* region presented greater diversity in Asia than in the Pacific. Using these markers, paper mulberry from Remote Oceania behaves as a homogeneous population, which is consistent with the introduction of only a few specimens into this region. The major exception is Hawaii, where two groups are observed: one that is genetically similar to Remote Oceania and another that is closer to Asian individuals. The origin of the latter group of plants can be explained by a second, relatively recent introduction of *B. papyrifera* to this archipelago that is independent of the peopling of the Pacific Islands.

In addition, using the SSR markers we were able to distinguish 32 genotypes in Remote Oceania, grouped into three clusters or populations. There are different genotypes in the different geographic regions; however, the genotypes from West Remote Oceania are present throughout Remote Oceania. Therefore, these results suggest an extensive interaction network, connecting the various islands of West Remote Oceania to Central and the most distant regions of East Remote Oceania. It is important to point out that several of these interactions had not been observed previously using other model species, such as the Polynesian rat, or through the genetic analysis of contemporary human populations of the Pacific.

The analysis of the *ndhF-rpl32* chloroplast region in the 41 selected individuals from Remote Oceania identified five haplotypes in East Remote Oceania and only one in West Remote Oceania. Of the five haplotypes detected in East Remote Oceania, three are new haplotypes that have not been described previously (Chang *et al.*, 2015). This result suggests that Remote Oceania is not a homogeneous region, since the genetic diversity between West and East Remote Oceania is different. Therefore, it would be interesting to analyse a greater number of samples from Remote Oceania, in order to characterize the genetic diversity in West and East Remote Oceania and, thus, complement the results of this chloroplast region with the SSR markers analysis.

In summary, we detect genetic diversity of paper mulberry in Remote Oceania, and we also detect differences between the western and eastern regions of Remote Oceania. From this work, it is possible to

suggest possible interaction or even trade routes between the various islands of the Pacific, supported by the genetic analysis and in conjunction with the archeological evidence. The genetic characterization of *B. papyrifera* contributes to the reconstruction of the migration routes from Asia to West and East Remote Oceania, and to the understanding of the peopling of the Pacific Islands.

1. INTRODUCCIÓN

La región de Oceanía en el Océano Pacífico se divide biogeográficamente en dos grandes subregiones, que corresponden a las denominadas Oceanía Cercana y Oceanía Remota (ver **Figura 1**). Oceanía Cercana corresponde a todo el espacio abarcado desde el continente de Asia hasta las islas Salomón, lo que incluye Nueva Guinea, el Archipiélago Bismarck y las islas Salomón. Oceanía Remota agrupa todas las islas del extenso Océano Pacífico desde el Sur del archipiélago de las islas Salomón, entre ellas Nueva Caledonia, Fiji, Nueva Zelanda, Isla de Pascua, Hawái y hacia el Norte, las islas de la Micronesia. La historia del poblamiento humano de esta región tiene gran interés ya que corresponde al último gran movimiento de expansión prehistórico de nuestra especie a territorios deshabitados. La comprensión del proceso de poblamiento humano en Oceanía se ha estudiado mediante un enfoque holístico que integra tres disciplinas: lingüística, arqueología y genética. Este enfoque integrado permite estimar los tiempos y las rutas de migración humana en las islas del Pacífico, para entender el proceso de colonización de Oceanía Remota (Kirch, 2010), que fue un proceso complejo debido a la extensión y condiciones del territorio (Kirch, 2010; Matisoo-Smith, 2015).

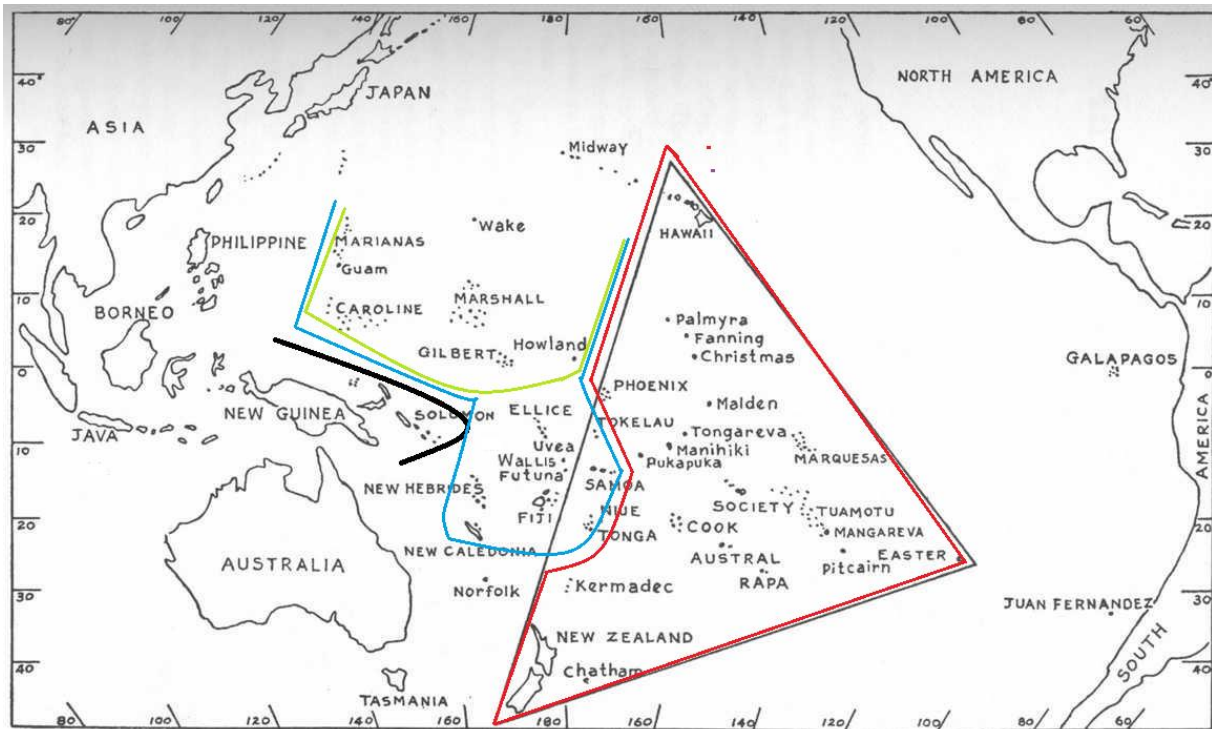


Figura 1: Mapa del Océano Pacífico y sus islas. La línea negra gruesa divide Oceanía Cercana y Oceanía Remota. Oceanía Remota se subdivide en Oceanía Remota Oeste (color celeste) y Oceanía Remota Este (color rojo). El sector de Micronesia se delimita con una línea verde. La línea negra fina delimita el denominado triángulo polinésico. (Adaptada de Bell, 1946).

Para efectos de esta tesis y análisis de resultados se dividirá adicionalmente la gran región de Oceanía Remota en dos grandes subregiones: (i) Oceanía Remota Oeste (ORO), que abarca toda la Micronesia, Nueva Caledonia, Fiji, Wallis, Samoa y Tonga, y (ii) Oceanía Remota Este (ORE), que incluye todas las islas hacia el este de Tonga: Islas de la Sociedad, Islas Marquesas, Islas Cook e Islas Australes (parte central de Oceanía Remota Este) y Hawái, Nueva Zelanda e Isla de Pascua (parte extrema de Oceanía Remota Este) (Wilmhurst y cols., 2011).

1.1 Poblamiento humano de Oceanía

La historia del poblamiento humano de Oceanía de acuerdo a los registros arqueológicos abarca dos grandes procesos: (i) la primera expansión de los humanos modernos desde África hacia Asia y luego hasta el supercontinente Sahul que incluye Nueva Guinea y Australia (50.000 – 40.000 años AP); Después, a fines del Pleistoceno (11.000 AP) los niveles del mar subieron (Ericson y cols., 1968) y este continente (Sahul) se separó en lo que en la actualidad son las tierras de Australia y Nueva Guinea (Wollstein y cols., 2010; Kayser, 2010), aislando las poblaciones humanas; y (ii) posteriormente (5.000-4.500 AP) nuevas oleadas migratorias salieron desde Taiwan y se asentaron en Filipinas, Borneo y las islas deshabitadas frente a Nueva Guinea, en Oceanía Cercana. Aproximadamente 1.000 años después aparecen en los registros arqueológicos de Oceanía Cercana una nueva cultura conocida con el nombre de “Lapita”. Esta cultura se expande hacia Oceanía Remota, colonizando Nueva Caledonia, Fiji, Tonga y Samoa. Finalmente, a partir de estas poblaciones asentadas en Tonga y Samoa, se desarrolla la cultura conocida como protopolinésica que colonizará todas las islas hacia el Este, comprendidas en un triángulo imaginario entre Hawái, Isla de Pascua y Nueva Zelanda (Polinesia). Este proceso ocurre tan sólo hace 1.000 años atrás y corresponde a la colonización de los últimos territorios inhabitados del planeta, las islas del Pacífico (Matisoo-Smith, 2015; Kayser, 2010; Kirch, 2010). Este segundo pulso migratorio relativamente reciente culminó con el poblamiento de prácticamente todas las islas de Oceanía Remota en el Pacífico.

El poblamiento humano de Oceanía Remota está asociado a la aparición de la “Cultura Lapita”, complejo cultural caracterizado por su cerámica, identidad lingüística y avances en la tecnología de la navegación por su construcción de canoas (Kirch, 2010; Rutherford y cols., 2012). La mayor evidencia que apoya esta afirmación es la extensión y antigüedad de la cerámica Lapita, que se encuentra desde el Archipiélago Bismarck hasta Fiji y Samoa (Diamond, 1988; Kirch, 2010). Por otra parte, las lenguas nativas de las Islas del Pacífico corresponden a las lenguas austronesias, que se distribuyen desde el sudeste asiático hasta Oceanía Remota, lo que sugiere también a la Cultura Lapita como la colonizadora de ésta última (Kirch, 2010). Esta cultura se habría originado 5.500 AP con la salida de una población de

habla austronésica desde el sudeste asiático, principalmente Taiwán y Filipinas. Este pulso migratorio habría continuado a diversas islas del sudeste asiático, entre ellas las pertenecientes a la región de Wallacea de Indonesia, y llegado a Oceanía Cercana (Kirch, 2010; Wollstein y cols., 2010). En esta área se habría desarrollado la Cultura Lapita, que habría continuado expandiéndose hacia el este, entrando a Oceanía Remota alrededor de 3.000 AP y culminando con la colonización de toda la región de Oceanía Remota alrededor de 1.000 AP (Wollstein y cols., 2010) (**Figura 2**).

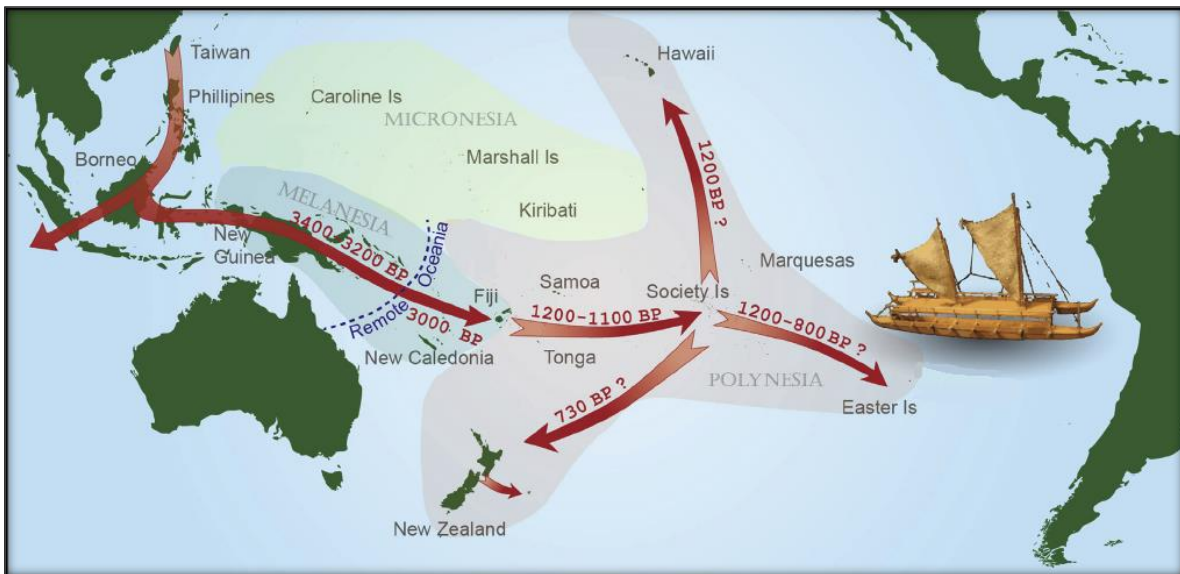


Figura 2: Mapa de poblamiento de Oceanía. Se muestran las principales rutas y años estimados de migración en Oceanía. (Adaptada de Matisoo-Smith, 2015).

El origen de la Cultura Lapita en Oceanía representa una de las mayores interrogantes respecto a la colonización de Oceanía Remota (Diamond, 1988). Esto se debe a que existe un fuerte debate respecto si los Lapita representaban una población que transitó por la región de Nueva Guinea y el Archipiélago de Bismarck con mínima interacción, o si se desarrollaron a partir del contacto entre humanos provenientes del sudeste asiático y los habitantes de aquella región (Kirch, 2010). A partir de ambos escenarios, se han propuesto diversos modelos para describir el proceso de migración desde Asia hacia Oceanía, siendo el más aceptado en la actualidad el modelo complejo de avance lento denominado Triple I (*Voyaging Corridor Triple I/Entangled bank*). Éste sugiere que la población de habla austronésica (“población austronésica” de aquí en adelante) habría interactuado de manera compleja con los habitantes de Oceanía Cercana. Los elementos que compondrían a la Cultura Lapita serían el resultado de la intrusión y contacto de la población austronésica con los habitantes de Oceanía Cercana. Posteriormente, esta cultura habría proseguido hacia el este para poblar Oceanía Remota (Terrell, 1988; Matisoo-Smith y cols., 2004). Además, se ha postulado que existiría una segunda ola migratoria más tardía

(aproximadamente 800 AP). Esta ola se inició en Wallacea y viajó a través de Micronesia para llegar a Oceanía Remota Oeste (Matisoo-Smith y cols., 2007).

Los estudios arqueológicos, lingüísticos y genéticos en conjunto apoyarían el modelo de poblamiento complejo de Oceanía. A este respecto, es importante destacar la importancia de la mirada holística para estudiar procesos y rutas migratorias, ya que los resultados de los estudios arqueológicos y/o lingüísticos por sí solos entregarían resultados poco concluyentes (Gray y cols., 2009; Kirch, 2010). Los análisis lingüísticos muestran que las lenguas de las islas de Oceanía Remota pertenecerían a la familia de lenguas austronésicas originarias de Taiwán; mientras que en Nueva Guinea y el Archipiélago Bismarck la familia de lenguas es exclusivamente Papuan, asociada a los nativos de Oceanía Cercana (Diamond, 2000; Gray y cols., 2009; Kirch, 2010). La parcelación de las lenguas sugeriría que la población austronésica habría viajado rápidamente en Oceanía Cercana para llegar a Oceanía Remota, sin tener un intercambio importante entre la cultura austronésica y los habitantes de habla Papuan (papuanes) (Kirch, 2010). Sin embargo, los análisis arqueológicos muestran la existencia de sitios Lapita con una antigüedad de 3.200 a 2.000 AP en Oceanía Cercana, de 1.200 AP en Oceanía Remota Oeste y de alrededor de 1.000 AP en Oceanía Remota Este (Green, 1996). Esto sugeriría que el movimiento de los pre-polinésicos en Oceanía tuvo pausas. Los Lapita habrían estado un largo tiempo en Oceanía Cercana antes de migrar hacia las islas inhabitadas de Oceanía Remota, donde se asentaron principalmente en Fiji antes de continuar expandiéndose hacia Samoa y Tonga, en Oceanía Remota Oeste (Kirch, 2010). Desde estas islas habrían migrado posteriormente hacia las Islas Marquesas, en la parte central de Oceanía Remota Este (**Figura 2**). Se postula que los vértices del triángulo polinésico correspondientes a Hawái, Isla de Pascua y Nueva Zelanda, y finalmente las islas Chatham, fueron los últimos territorios colonizados (Matisoo-Smith, 2015).

Existen diversas hipótesis y teorías respecto a cómo se poblaron los vértices del triángulo polinésico. Algunos plantean que se colonizaron a partir de olas migratorias provenientes directamente de Islas Marquesas a Hawái (Rolett, 1993; Matisoo-Smith y cols., 1998). En cambio, otros proponen que las olas migratorias de Islas Marquesas tuvieron pausas en otras islas (e.g., Marquesas-Mangareva-Isla de Pascua) (Green y Weisler, 2002; Kirch, 2010).

Los estudios genéticos se han convertido en una herramienta esencial para resolver las discrepancias observadas en los estudios de lingüística y arqueología, entregando una visión complementaria para la reconstrucción de procesos de poblamiento y migración (Kirch, 2010; Stoneking y cols., 2011; Sacks y cols., 2013). Una herramienta importante de la genética es el uso de marcadores moleculares que, al complementarse con los estudios de lingüística y arqueología, permite obtener

conclusiones de manera integrada sobre el movimiento poblacional en Oceanía (Kirch, 2010; Stoneking y cols., 2011; Matisoo-Smith, 2015).

1.2 Uso de marcadores moleculares para comprender las rutas migratorias de Oceanía

Los marcadores moleculares son regiones del ADN con dos o más variantes alélicas. Entre los principales requisitos que un marcador molecular debe cumplir se encuentran: ser altamente polimórfico, presentar una ocurrencia frecuente en el genoma, tener alta reproducibilidad y permitir ensayos fáciles y rápidos para la detección de diversidad genética (Joshi y cols., 1999).

Los procesos de migración y dispersión de poblaciones dejan marcas en el genoma que persisten en el tiempo y dichas marcas son detectables a través del uso de marcadores moleculares. Estos marcadores permiten caracterizar estas marcas en los genomas de una población y definir las variantes genéticas de la misma, para inferir el origen, rutas y tiempos de migración (Underhill y cols., 2007; Stoneking y cols., 2011).

En el estudio del poblamiento de Oceanía, las primeras aproximaciones genéticas se realizaron estudiando material genético humano de ADN mitocondrial (ADNmt) y cromosoma Y (Kirch, 2010; Kayser y cols., 2010). Los estudios de ADNmt indican que la población de Oceanía Remota posee haplotipos mitocondriales que convergen en un linaje principalmente asiático (Kayser y cols., 2006), mientras que los marcadores de cromosoma Y señalan principalmente un origen papuano (Kayser y cols., 2000). El origen dual de la población de Oceanía Remota sugiere la existencia de interacción entre la población austronésica con los aborígenes de Oceanía Cercana (Kayser y cols., 2006; Kayser y cols., 2010). Posteriormente, parte de la población producto de esta interacción, el Complejo Lapita, migró a Oceanía Remota (Kirch, 2010; Kayser y cols., 2010). Asimismo, se han continuado los estudios de ADN humano analizando la información entregada por marcadores nucleares, los que no sólo confirman el origen dual de Oceanía Remota, sino que señalarían a Fiji (parte de Oceanía Remota Oeste) como una de las islas donde existiría una diversidad genética diferente a la de Oceanía Remota Este. Esto se podría explicar según los datos arqueológicos que muestran la existencia de una pausa migratoria de aproximadamente 1.500 años en esta región por parte de los Lapita (Wollstein y cols., 2010). Por otra parte, cabe señalar que los estudios genéticos de humanos reportan una baja diversidad genética en Oceanía Remota Este (Matisoo-Smith, 2015).

Uno de los problemas que presentan los estudios de ADN humano en Oceanía es que la mayor parte de la población actual de Oceanía Remota es el resultado del mestizaje entre polinésicos, europeos y asiáticos, quienes llegaron a dicha región durante los siglos XVIII y XIX (Matisoo-Smith y cols., 1994), así como al traslado forzado de polinésicos entre las islas (Kayser, 2010). Por este motivo, las poblaciones

actuales de Oceanía Remota no son necesariamente descendientes de los polinésicos originales de cada isla (Matisoo-Smith y cols., 1998). Esto dificulta la obtención de muestras representativas y adecuadas de cada isla o archipiélago (Matisoo-Smith y cols., 1998; Wollstein y cols., 2010). Hay que mencionar, además, que la obtención de ADN humano antiguo es compleja debido a restricciones culturales y logísticas (Matisoo-Smith, 1994). Los estudios genéticos en humanos hasta la fecha no han entregado nueva información respecto a las rutas de migración en Oceanía Remota de lo que ya se sabe gracias a la arqueología (Matisoo-Smith, 2015).

A partir de estas dificultades, existe la necesidad de buscar otras estrategias para el estudio de poblamiento de Oceanía, específicamente de Oceanía Remota. Se sabe que la cultura pre-polinésica transportó intencionalmente especies vegetales y animales fundamentales para su sobrevivencia y la reproducción de su cultura. Entendiendo que la dispersión de toda población deja marcas en el genoma, sería posible también estudiar las marcas en el genoma de estas especies transportadas por los antiguos colonizadores polinésicos. El análisis de las especies estrechamente asociadas al humano presentaría una aproximación complementaria, aportando información valiosa para integrar con los estudios realizados en humanos (Matisoo-Smith, 1994; Kirch, 2010).

1.3 Estudio de especies estrechamente asociadas al humano

El transporte de especies animales y vegetales consideradas fundamentales para asegurar la sobrevivencia y reproducción de la cultura pre-polinésica es una estrategia migratoria que se denomina “transporte de paisajes” (Matthews, 1996; Kirch, 2000). Los pre-polinésicos habrían utilizado dicha estrategia a medida que avanzaban hacia el este, ya que las islas del Pacífico poseen recursos terrestres naturales cada vez más limitados. Estas especies estrechamente asociadas no se podrían haber dispersado sin el transporte de los humanos y se encuentran distribuidas desde Asia hasta Oceanía Remota (Matisoo-Smith, 1994).

Entre las especies animales transportadas por los pre-polinésicos se encuentran la rata polinésica (Matisoo-Smith y cols., 1998; Matisoo-Smith y cols., 2004), el pollo (Storey y cols., 2012), el perro (Savolainen y cols., 2004), la lagartija (Austin, 1999) y el cerdo (Larson y cols., 2007), entre otras; mientras que entre las especies vegetales se puede mencionar la calabaza (Clarke y cols., 2006), el taro (Caillon y cols., 2006), el plátano (Kennedy, 2008) y el árbol del pan (Zerega y cols., 2004), entre otras. Los estudios de cada especie entregan una mirada particular respecto a las rutas de migración en Oceanía, debido también a que las diferentes especies provienen de regiones (nativas) distintas. Entre los aportes del estudio de especies estrechamente asociadas se puede mencionar lo siguiente:

- (i) El sudeste asiático sería el origen de la cultura pre-polinésica: Las investigaciones en perro y cerdo muestran un linaje de ADNmt perteneciente a un haplotipo perteneciente al sudeste asiático, específicamente Vietnam (Savolainen y cols., 2004; Larson y cols., 2007).
- (ii) Existiría una ruta paralela de migración: Se ha propuesto que existiría una ruta de dispersión paralela al segundo pulso migratorio, en el que un grupo de pre-polinésicos hace 3.500 AP habría salido desde la región de Wallacea hacia Micronesia, llegando finalmente a Fiji. Esta ruta estaría apoyada por los estudios de ADNmt de la rata polinésica (Matisoo-Smith y cols., 2004) y cerdo (Larson y cols., 2007).
- (iii) Evidencia de contacto pre-colombino entre Oceanía Remota y América: Los polinésicos habrían llegado a América del Sur, interactuando con las poblaciones amerindias. Esta interacción daría como resultado la introducción del pollo en América (Storey y cols., 2012) y la introducción del camote en Oceanía Remota (Roullier y cols., 2012).

Una especie vegetal que podría aportar una mirada diferente para el estudio de las migraciones en Oceanía Remota y que se ha propuesto como modelo es la morera de papel (*Broussonetia papyrifera*). Esta planta tiene un origen exclusivamente asiático (Sudeste y Este Asiático) y corresponde a una de las pocas especies no comestibles transportadas por los pre-polinésicos a toda Oceanía (Seelenfreund y cols., 2010). Su uso para fabricar fibra textil podría entregar una historia diferente a la comprensión del movimiento humano en Oceanía Remota.

1.4 *Broussonetia papyrifera*

B. papyrifera (L.) L'Herit. Ex Vent. o morera de papel es una especie perteneciente a la familia de las Moráceas; es dioica y presenta un cariotipo diploide ($2n = 26$) (Matthews y cols., 1996). Su clasificación taxonómica actual (Barker, 2002) es:

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Rosales
- Familia: Moraceae
- Género: *Broussonetia*
- Especie: *B. papyrifera*

A la fecha, el genoma de *B. papyrifera* no se ha secuenciado, pero se estima mediante estudios de citometría de flujo que posee un tamaño aproximado de 500 Mpb (Yamanouchi y cols., 2010).

Al ser una planta dioica, la morera de papel posee flores masculinas y femeninas en individuos diferentes (Bawa, 1980). En la **Figura 3** se muestran las flores masculinas y femeninas junto con el fruto de *B. papyrifera*. Se puede observar que la flor masculina (**A**) y la flor femenina (**B**) poseen una morfología diferente: la flor masculina tiene una inflorescencia racimosa (amento), mientras que la flor femenina es de forma globosa, densa, vellosa y presenta un perigonio tubular. El fruto (**C**) es una drupa compuesta (*druplet*) y carnosa (Matthews, 1996; Macaya, 2005).



Figura 3. Imágenes de flores y del fruto de *B. papyrifera*. A: Inflorescencia masculina. **B:** Inflorescencia femenina. **C:** Fruto.

En Asia, su hábitat nativo, la morera de papel se utiliza para diversos fines. La corteza de esta planta sirve para la elaboración de papel de alta calidad, cuerda, forraje y leña (Wang y cols., 2012). Por otro lado, *B. papyrifera* tiene propiedades medicinales que se utilizan actualmente en la medicina tradicional oriental. La corteza, hojas, tallo, raíces y frutos se usan en el tratamiento de dolor de estómago y como astringentes, diuréticos y laxantes, entre otros (Wang y cols., 2012). A partir de la morera de papel se han aislado diversos compuestos bioactivos correspondientes a coumarinas, polifenoles, alcaloides, glucósidos, lignanos, diterpenos y flavonoides (Wang y cols., 2012). La efectividad farmacológica de estos compuestos se ha estudiado recientemente y se han validado sus propiedades anti-inflamatorias (Wu, 2012), antioxidantes (Sun y cols., 2012), anti-tumorales e hipoglicemiantes. Se ha descrito que las coumarinas y flavonoides de *B. papyrifera* son inhibidores de la aromatasasa, lo cual explicaría la propiedad anti-tumoral de esta planta (Lee y cols., 2001; Guo y cols., 2013). Por otra parte, se ha relacionado sus propiedades hipoglicemiantes con los flavonoides, ya que se ha observado que éstos inhiben la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTB1B) (Chen y cols., 2012), entre otras.

En Oceanía Remota, su rango introducido, no se ha reportado el uso de *B. papyrifera* como planta medicinal. En esta región se utiliza la corteza para la fabricación de textiles conocidos como *tapa* (también llamados *kapa* en Hawái o *mahute* en Isla de Pascua). En la antigüedad estos textiles servían para la confección de vestimentas, pero su uso para estos fines ha disminuido considerablemente debido a la introducción de algodón y otras fibras por parte de los europeos. En la actualidad, la morera de papel aún se cultiva en distintas islas para fabricar textiles con propósitos ceremoniales (Seelenfreund y cols., 2010).

Su cultivo en el Pacífico se realiza de forma vegetativa (reproducción asexual), mediante la multiplicación por estacas y brotes de raíces (Matthews, 1996). Se considera que los pre-polinésicos seleccionaban especies vegetales que pudieran reproducirse vegetativamente para asegurar el mantenimiento de los cultivos en las nuevas tierras, de manera independiente de la polinización y la producción de semillas (Lebot y cols., 1997). La mayoría de las plantas introducidas por acción antrópica a Oceanía Remota son de propagación vegetativa. Se estima que, de las aproximadamente 70 especies vegetales introducidas, alrededor de 20 llegaron a Isla de Pascua y solamente 6 llegaron a Nueva Zelanda. Algunas de estas especies se siguen cultivando en la actualidad, siendo una de ellas *B. papyrifera* (Matthews, 1996; Lebot y cols., 1997).

Al ser una especie multifuncional y tener una gran importancia cultural, *B. papyrifera* se encuentra ampliamente distribuida en Asia y en el Pacífico (Matthews, 1996; Whistler y cols., 2009).

1.5 Análisis genéticos de *B. papyrifera* con marcadores moleculares

Hasta la fecha se han utilizado algunos marcadores moleculares para realizar estudios genéticos de *B. papyrifera* tanto en su rango nativo (Zhao y cols., 2006; Shabit y cols., 2010) como en su rango introducido. A continuación, se presentan los marcadores utilizados y la información que se ha obtenido a partir de ellos en el contexto del estudio de su introducción en Oceanía Remota:

1. *Internal Transcribed Spacer (ITS)*: Es una región espaciadora de los genes precursores de ARN ribosomal (ARNr) de las subunidades mayor y menor del ribosoma. Es una región altamente polimórfica, lo que permite la diferenciación a distintos niveles taxonómicos y en algunos casos a nivel intra-especie (Lafontaine y cols., 2001). En eucariontes, la región ITS se compone de las regiones ITS-1 e ITS-2, las cuales se encuentran separadas por el gen 5,8S de ADNr (Baldwin, 1996). Por otro lado, la región de ITS-1 es un marcador útil para confirmar la correcta asignación de especie para una muestra dada de *B. papyrifera*.

Los análisis de individuos asiáticos y de Oceanía de *B. papyrifera* muestran que la región ITS-1 es polimórfica, mientras que ITS-2 es conservada. Los individuos asiáticos presentan un nucleótido G en la posición 203 de ITS-1, mientras que en los individuos de Oceanía Remota se observa un nucleótido T en dicha posición (Seelenfreund y cols., 2011). También se ha visto que muestras antiguas de herbario de morera de papel pertenecientes a Oceanía Cercana (Nueva Guinea e Islas Solomon) presentan la variante G (Payacán, 2015), lo que sugiere que la transversión G a T podría haber ocurrido en alguna región geográfica entre Oceanía Cercana y Oceanía Remota. Una posible isla candidata es Fiji, debido a que en estas islas los viajeros austronésicos hicieron una pausa de miles de años antes de proseguir hacia el este del Pacífico. Por otra parte, en estudios usando marcadores de ADNmt en humanos, se ha detectado que

en Fiji, y en general en Oceanía Remota Oeste, existe una mayor diversidad genética que en las islas de Oceanía Remota Este (Wollstein y cols., 2010). Hasta la fecha, se han analizado sólo dos individuos de *B. papyrifera* pertenecientes a Fiji con este marcador (Seelenfreund y cols., 2011; González-Lorca y cols., 2015), por lo que se hace necesario ampliar el estudio de ITS-1 en morera de papel en esta región e incluir a otras islas de Oceanía Remota Oeste.

La región de ITS-1 se ha analizado previamente en algunos individuos de Samoa y Tonga (Oceanía Remota Oeste), observándose hasta la fecha la presencia de la variante T en todos los especímenes, confirmando el genotipo común para Oceanía Remota (Seelenfreund y cols., 2011; González-Lorca y cols., 2015).

Hasta la fecha, los análisis con este marcador sólo han permitido distinguir entre un genotipo del rango introducido (Oceanía Remota) de uno del rango nativo (Asia) (Seelenfreund y cols., 2011), sin diferenciar entre las diversas islas del Pacífico. Por lo tanto, es necesario utilizar otros marcadores moleculares adicionales para estudiar la diversidad genética de *B. papyrifera* en Oceanía Remota.

2. Marcador de sexo (*Male Marker*): Es un marcador de tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), que corresponde a un *locus* único que se amplifica utilizando partidores específicos para una secuencia conocida previamente (Kiran y cols., 2010). Este marcador fue desarrollado a partir de AFLP (Wang y cols., 2012) y su ubicación genómica es desconocida hasta la fecha. Su secuencia presenta polimorfismos que permiten diferenciar individuos masculinos y femeninos en esta especie dioica (Peñailillo y cols., 2016).

Con este marcador, se ha detectado la presencia de *B. papyrifera* de ambos sexos en Asia en proporciones cercanas al 50%, su hábitat nativo. En Oceanía Remota en cambio, sólo se ha encontrado la presencia de individuos femeninos, con excepción de Hawái (Peñailillo y cols., 2016). Es importante mencionar que estos análisis han incluido un número reducido de muestras de la región de Oceanía Remota Oeste. La presencia de individuos femeninos en Oceanía Remota sugiere un proceso de selección de plantas femeninas o bien la introducción de un clon único por parte de los pre-polinésicos y evidencia que este cultivo fue propagado (principalmente) en forma vegetativa en la región.

Por otra parte, en Hawái se ha detectado una distribución cercana al 50% de cada sexo, de forma similar a la encontrada en el hábitat nativo (Peñailillo y cols., 2016). La presencia de individuos masculinos y femeninos en Hawái sugiere una diversidad diferente de *B. papyrifera* que en el resto de Oceanía Remota, lo cual concuerda con lo observado por el marcador ITS-1 (Seelenfreund y cols., 2011).

Es de interés usar este marcador para establecer de manera más exhaustiva la distribución de individuos masculinos y femeninos de *B. papyrifera* en Oceanía Remota Oeste. En caso de encontrar individuos de ambos sexos en esta región, se evidenciaría un transporte de individuos femeninos y

masculinos desde Asia hacia Oceanía Remota Oeste, y un proceso posterior de selección de individuos femeninos para ser transportados hacia Oceanía Remota Este. Por el contrario, si se encontraran sólo individuos femeninos en Oceanía Remota Oeste, esto indicaría que la selección de individuos femeninos de *B. papyrifera* ocurrió en una región geográfica previa a la llegada a Oceanía Remota Oeste.

Este marcador de sexo permite estudiar la distribución geográfica de sexos de la morera de papel, por lo que entrega información valiosa en el estudio genético de *B. papyrifera*. Sin embargo, su uso está limitado a la detección del sexo de los individuos, por lo que se requiere su uso conjunto con otros marcadores moleculares para estudiar la diversidad genética de la morera de papel en Oceanía Remota.

3. Marcador *ndhF-rpl32* de cloroplasto: Es una región intergénica hipervariable no codificante de cloroplasto (ADNcp) cuyo tamaño varía desde 729 a 1254 pb, dependiendo de la especie (Shaw y cols., 2007). Se ha descrito que esta región es altamente polimórfica, por lo que su uso como marcador permite diferenciar individuos a niveles inter-especie y en algunos casos a nivel intra-especie (Timme y cols., 2007; Shaw y cols., 2007).

Con el marcador de ADNcp *ndhF-rpl32* se ha observado que *B. papyrifera* presenta más de 40 haplotipos diferentes en Asia y Oceanía, encontrándose la mayoría en Asia. El haplotipo cp17, que se encuentra en el rango nativo, se presenta sólo en el sur de Taiwán, mientras que en Oceanía Remota es el haplotipo dominante, con excepción de Hawái. En Hawái, *B. papyrifera* presenta el haplotipo cp17 y otros dos haplotipos que también se observan en Asia. Este resultado sugiere que los individuos de *B. papyrifera* de Hawái tienen una diversidad genética mayor respecto a la reportada para Oceanía Remota (Chang y cols., 2015). La mayor diversidad genética de individuos de *B. papyrifera* provenientes de Hawái también se ha detectado con el marcador *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR) (González-Lorca y cols., 2015) y se podría explicar debido a una o más introducciones recientes de *B. papyrifera* a Hawái desde Asia, de acuerdo a antecedentes históricos (González-Lorca y cols., 2015; Chang y cols., 2015).

La presencia mayoritaria en Oceanía Remota de un haplotipo encontrado sólo en el sur de Taiwán sugiere que los individuos de *B. papyrifera* en las islas del Pacífico tendrían un origen exclusivo taiwanés. Esto concuerda con los estudios lingüísticos y con el modelo complejo de poblamiento de Oceanía (Triple D), que propone que el segundo pulso migratorio que llegó a Oceanía Remota provendría desde Taiwán. Sin embargo, es importante señalar que en Oceanía Cercana (Nueva Guinea) se encontró el haplotipo cp17 y otro haplotipo de origen indochino. La diversidad de haplotipos en Nueva Guinea indicaría interacciones complejas entre la población papuana y los colonizadores austronésicos del continente asiático (Chang y cols., 2015), donde podrían haber convergido ambos grupos en esa región, uno proveniente de Taiwán y otro del sudeste asiático (Chang y cols., 2015). Esto es coherente con estudios

en otros modelos, como ADNmt de perro y cerdo en los que se ha propuesto que la expansión prepolinésica tuvo un origen en el sudeste asiático (Savolainen y cols., 2004; Larson y cols., 2007).

Por lo tanto, es de gran importancia analizar los haplotipos de ADNcp de Oceanía Remota Oeste, para lo que se requiere utilizar un mayor número de muestras de morera de papel y ampliar el rango geográfico, dado que en Oceanía Remota Este el único haplotipo reportado en la actualidad, exceptuando Hawái, es cp17 (Chang y cols., 2015). Un análisis exhaustivo de la morera de papel en esta región podría evidenciar la presencia de dos escenarios: Si en Oceanía Remota Oeste se encuentran tanto haplotipos originarios de Taiwán como del sudeste asiático, sería posible sugerir que la población de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste tiene un origen diverso y complejo. Una mayor diversidad de haplotipos en Oceanía Remota Oeste sugeriría que diferentes poblaciones de morera de papel llegaron a esta región y que existió una selección de individuos de esta especie, ya que en Oceanía Remota Este sólo se encuentran individuos con haplotipo cp17. Por otra parte, si se encuentra únicamente la presencia del haplotipo cp17 en Oceanía Remota Oeste, esto indicaría que en toda la región de las islas del Pacífico los individuos de *B. papyrifera* tendrían un origen exclusivamente taiwanés.

Es importante señalar que *ndhF-rpl32* es un marcador útil para discriminar individuos de *B. papyrifera* provenientes de Asia y Oceanía Remota. Además, permite diferenciar los individuos de Hawái del resto de las islas del Pacífico. Esto también se ha confirmado mediante estudios de ITS-1 (González-Lorca y cols., 2015). Sin embargo, hasta la fecha este marcador no discrimina entre individuos pertenecientes a Oceanía Remota, para lo que se necesita de marcadores moleculares adicionales para estudiar la diversidad genética de la morera de papel en el Pacífico.

4. Microsatélites o Simple Sequence Repeats (SSR): Los SSR son motivos simples repetidos en tándem de 1 a 6 nucleótidos. Se encuentran dispersos en el genoma, pudiendo ser parte de regiones codificantes o no codificantes. Son marcadores codominantes, altamente polimórficos y permiten discriminar individuos a nivel intra-especie (Joshi y cols. 1999; Kalia y cols., 2011).

La genotipificación de individuos de morera de papel contemporánea de Asia y Oceanía Remota con 14 marcadores de SSR permitió detectar mayor diversidad genética en el hábitat nativo que en el introducido (Peñailillo, 2014). Es importante resaltar que con SSR se detectaron 31 genotipos distintos en muestras del Pacífico, aunque con una alta similitud genética, lo cual sugiere un origen clonal relevante. A partir de la diversidad genética observada con los marcadores de SSR, es posible diferenciar individuos provenientes de Asia y Oceanía Remota y además discriminar individuos pertenecientes a Oceanía Remota Oeste y Este. En el caso de la última, también es posible detectar genotipos pertenecientes a islas específicas (Peñailillo, 2014).

El análisis de los alelos de muestras de *B. papyrifera* provenientes de las islas del Pacífico sugieren la existencia de cuellos de botella genéticos en todas las poblaciones, a excepción de Tonga (Peñailillo, 2014). Es importante destacar que la diferencia de Tonga podría explicarse por la llegada de diferentes individuos de esta especie, que aportaron una mayor diversidad genética en esta isla (Peñailillo, 2014), una de las primeras localidades de Oceanía Remota Oeste en ser colonizadas.

También es de interés notar que los individuos de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste presentan cercanía genética con las muestras femeninas de Hawái. Estos resultados indican una relación entre Hawái y Oceanía Remota Oeste, que daría cuenta de movimientos migratorios o rutas de intercambio entre ellas. Por otra parte, los análisis estadísticos muestran que los individuos de *B. papyrifera* provenientes de Samoa poseen una menor distancia genética con las muestras de Taiwán que el resto de los individuos del Pacífico. Para tener un mayor conocimiento de la diversidad genética de esta especie en las islas de Oceanía Remota Oeste, es necesario hacer un análisis enfocado ampliando el número de muestras en esta región.

Los marcadores SSR, además de discriminar entre individuos de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota, diferencian poblaciones de islas del Pacífico. Los resultados con estos marcadores son de gran importancia, ya que señalan que existe diversidad de *B. papyrifera* en el Pacífico, lo cual no se había podido detectar con otros marcadores utilizados para esta especie. Es importante señalar que estudios genéticos realizados en otras especies (humanos, rata) tampoco han observado diversidad genética en Oceanía Remota (Matisoo-Smith, 2015). Por ejemplo, los análisis genéticos en humanos muestran que un reducido *pool* genético llegó a cada isla del Pacífico y se considera a Oceanía Remota como una región homogénea (Kayser, 2010).

Los marcadores SSR entregan información clave respecto a la dispersión de *B. papyrifera* en las islas del Pacífico. Hay que destacar que los resultados obtenidos hasta la fecha señalan al sector Oeste de Oceanía Remota como una región de interés, ya que posiblemente exista mayor diversidad genética en esta zona que en el resto de Oceanía Remota. De ser cierto, la diversidad genética de *B. papyrifera* en Oceanía Remota Este correspondería a un subconjunto de la diversidad genética total presente en Oceanía Remota Oeste. Esto sugeriría que sólo un grupo seleccionado de plantas fueron transportadas hacia las islas del Este del Pacífico.

Resumiendo, los resultados de los estudios genéticos en *B. papyrifera* con distintos marcadores moleculares se correlacionan con las evidencias aportadas por la arqueología, la lingüística y los estudios genéticos en otros modelos, señalando que la colonización de Oceanía fue un proceso complejo (modelo Triple I). Los antecedentes arqueológicos indican que los navegantes pre-polinésicos hicieron una pausa de miles de años en Oceanía Remota Oeste antes de avanzar hacia Oceanía Remota Este. Los resultados

obtenidos hasta la fecha con marcadores moleculares en morera de papel sugieren que las poblaciones de Oceanía Remota Oeste y Este son distintas. Sin embargo, estos indicios están basados en un número muy limitado de muestras de individuos y de sólo dos islas de Oceanía Remota Oeste. Por este motivo es clave realizar un estudio enfocado en individuos de las islas de Oceanía Remota Oeste, abarcando un mayor número de muestras y un rango geográfico ampliado, para así realizar una comparación más completa de la diversidad genética entre Oceanía Remota Oeste y Este. Se espera encontrar mayor diversidad genética de *B. papyrifera* en esta región y que sólo parte de la diversidad genética de los individuos fue trasladada a las islas de Oceanía Remota Este durante el poblamiento de las islas del este del Pacífico.

2. HIPÓTESIS

Existe una mayor diversidad genética de *Broussonetia papyrifera* en Oceanía Remota Oeste que en Oceanía Remota Este, la cual permite determinar los patrones de dispersión de esta especie en el Pacífico e inferir posibles rutas de migración humana de los colonizadores pre-polinésicos de Oceanía Remota.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la diversidad genética de *B. papyrifera* a partir de individuos provenientes de Oceanía Remota Oeste y Este mediante el análisis de distintos marcadores moleculares, para determinar los patrones de dispersión de esta especie en el Pacífico e inferir posibles rutas de migración de los colonizadores pre-polinésicos de Oceanía Remota.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Caracterizar la diversidad genética de los individuos de *B. papyrifera* provenientes de Oceanía Remota Oeste mediante el análisis de diferentes marcadores moleculares.
2. Comparar la relación entre diversidad genética y localización geográfica de los individuos de *B. papyrifera* provenientes de Oceanía Remota Oeste, en relación a Oceanía Remota Este y Asia, para determinar patrones de dispersión de esta especie vegetal en las islas del Pacífico; e integrar los resultados con otros modelos de estudio para inferir posibles rutas de poblamiento de Oceanía Remota.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos e insumos generales

Ampliqon (Odense, Dinamarca): 2X, 1.5 mM MgCl₂ Taq DNA Polymerase Master Mix Red (Cat. #A180303).

Bioman (Taipéi, Taiwán): 100 pb DNA Ladder DM100.

Biotium Inc. (Hayward, California, E.E.U.U.): GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10.000X (Cat. #41002).

Clean Ice S.A. (Santiago, Chile): Nitrógeno líquido (N₂).

Fermelo Biotec (Santiago, Chile): Agarosa Lafken p.a. (Cat. #FER/00A200).

Life Technologies (Carlsband, California, E.E.U.U.): Sistema comerciales de cuantificación de ADN Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Cat. #P7589).

NEB® (Ipswich, Massachusets, E.E.U.U.): Sistema comercial de purificación de productos de PCR Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) (Cat. # T1030L).

Merck (Darmstadt, Alemania): Cloroformo p.a., Etanol p.a., Alcohol isoamílico p.a., Extrán® MA 01 alcalino.

Promega® (Madison, Wisconsin, E.E.U.U.): ADN polimerasa GoTaq® G2 (Cat. #M7401), dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Cat. #U1330), estándar de peso molecular de ADN λ/*Hind* III (Cat. #G171A).

Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, E.E.U.U.): CTAB p.a., BSA (Cat. #A4503).

USBiological (Swampscott, Massachusets, E.E.U.U.): Tris-base (Grado USP), EDTA (Grado Biología Molecular), ácido bórico (Grado Biología Molecular), enzima Ribonucleasa A (RNase A) (Cat. #R2011-15).

Thermo Scientific (Pittsburgh, Pensilvania, E.E.U.U.): Amortiguador de carga 6X (Cat. #R0611), estándar de peso molecular de ADN 1 Kb Plus (Cat. #SM1331), placas negras de poliestireno Nunc™ F96 MicroWell™ (Cat. #237108), sistema comercial de cuantificación de ADN Qubit dsDNA HS Assay Kit (Cat. #Q32854).

Vetec Analytical Reagents: Cloruro de sodio p.a.

4.1.2 Soluciones y amortiguadores

Acetato de sodio 3 M.

Cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1 v/v.

Cloruro de sodio (NaCl) 5 M.

Etanol 70% y 76%.

Amortiguador de extracción método modificado de Lodhi utilizado en Chile (CTAB 2% p/v, Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8 y β -mercaptoetanol 1%).

Amortiguador de extracción método modificado de Lodhi utilizado en Taiwán (CTAB 2% p/v, β -mercaptoetanol 1% y 10 μ g/ μ L de enzima ARNasa).

Amortiguador TE 1X.

Amortiguador TBE 5X (Tris base 445 mM, ácido bórico 445 mM y EDTA 10 mM pH 8). Solución de trabajo: dilución 0,5X.

Solución stock de BSA a 5 mg/mL, preparada en NaCl 100 mM.

4.1.3 Equipos

Baño termoregulado Haake® modelo K15 DC1.

Centrífuga Hettich®-Zentrifugen Mikro 22R, rotor 1153.

Concentrador Speedvac Savant ISS110 Integrated SpeedVac System.

Espectrofotómetro UV-Visible NanoDrop™ 2000.

Fluorímetro Qubit® 3.0.

Lector Multi-Modal Sinergy MX, BioTek.

Termociclador GeneAmp® PCR System 2700.

Termociclador Genemate T960.

Termociclador Thermo® Hybaid Px2.

Transiluminador MD-20 UV, Wealtec.

4.1.4 Material biológico

4.1.4.1 Muestras de Oceanía Remota Oeste

Para la realización de esta tesis se dispuso de 120 muestras de hojas contemporáneas de Oceanía Remota Oeste. Estas muestras provienen de cuatro islas o archipiélagos de esta región, siendo 3 de Nueva Caledonia, 71 de Fiji, 13 de Wallis y 33 de Tonga (**Tabla 1**). El detalle de cada muestra se encuentra disponible en el **Anexo I, Tabla I**. Todas estas muestras se utilizaron para los análisis mediante los marcadores ITS-1, de sexo y 10 SSR.

Tabla 1: Muestras de hojas de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste

Origen	Isla	N° de muestras	
Nueva Caledonia	Grande Terre	3	3
Fiji	Taveuni Island	21	71
	Vanua Levu	26	
	Vatulele Island	19	
	Viti Levu Island	5	
Wallis	Wallis	13	13
Tonga	Tongatapu	17	33
	Vava'u	6	
	Eua	10	
Total		120	

4.1.4.2 Muestras totales en la comparación e integración de datos de Asia y Oceanía Remota

En nuestro laboratorio se han analizado previamente 204 individuos contemporáneos de morera de papel, pertenecientes mayoritariamente a Oceanía Remota Este y Asia con la región ITS-1, marcador de sexo y 14 marcadores SSR, de los cuales 10 SSR fueron informativos en Oceanía Remota (Peñailillo, 2014).

4.1.4.2.1 Muestras de Asia y Oceanía Remota analizadas con la región ITS-1 y el marcador de sexo

Tabla 2: Número total de muestras de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota analizadas mediante los marcadores ITS-1 y de sexo

		Localidad	N° muestras previas	N° muestras de esta tesis	N° muestras totales
Asia (n = 33)		China	4	0	4
		Japón	5	0	5
		Taiwán	19	0	19
		Vietnam	5	0	5
Oceanía Remota (n = 290)	Oeste (n = 162)	Nueva Caledonia	0	3	3
		Fiji	4	71	75
		Wallis	0	13	13
		Tonga	19	33	52
		Samoa	19	0	19
	Este (n = 128)	Tahití	6	0	6
		Raiatea	1	0	1
		Marquesas	13	0	13
		Rapa	2	0	2
		Pitcairn	6	0	6
		Isla de Pascua (Rapa Nui)	62	0	62
		Hawái	38 (20F y 18M)	0	38
	Total			203	120

Se destacan en color verde las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste analizadas en este trabajo.

Los resultados obtenidos del análisis de las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste con la región ITS-1 y el marcador de sexo, se integraron con los resultados previos del análisis de muestras de Asia y Oceanía

Remota (González-Lorca y cols., 2015; Peñailillo y cols., 2016), obteniéndose un total de 323 individuos, de los cuales 33 corresponden a individuos asiáticos y 290 son de Oceanía Remota. De estos individuos, 162 provienen de Oceanía Remota Oeste y 128 de Oceanía Remota Este. La **Tabla 2** presenta el detalle del número de muestras de cada localidad.

4.1.4.2.2 Muestras de Asia y Oceanía Remota analizadas con los marcadores de SSR

Los resultados obtenidos del análisis de las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste con diez marcadores de SSR, se integraron con los resultados previos del análisis de muestras de Asia y Oceanía Remota (Peñailillo, 2014), obteniéndose un total de 314 individuos. De ellos, 33 individuos corresponden a muestras del rango nativo, 158 a muestras de Oceanía Remota Oeste y 123 a muestras de Oceanía Remota. La **Tabla 3** presenta el detalle del número de muestras de cada localidad.

Tabla 3: Número total de muestras contemporáneas de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota analizadas mediante marcadores SSR

		Localidad	N° muestras previas	N° muestras de esta tesis	N° muestras totales	
Asia (n = 33)		China	4	0	4	
		Japón	5	0	5	
		Taiwán	19	0	19	
		Vietnam	5	0	5	
Oceanía Remota (n = 281)	Oeste (n = 158)	Nueva Caledonia	0	3	3	
		Fiji	3	71	74	
		Wallis	0	13	13	
		Tonga	18	33	51	
		Samoa	17	0	17	
	Este (n = 123)	Rapa	2	0	2	
		Tahití	6	0	6	
		Marquesas	12	0	12	
		Raiatea	1	0	1	
		Pitcairn	5	0	5	
		Isla de Pascua (Rapa Nui)	60	0	60	
		Hawái	37	0	37	
	Total			194	120	314

Se destacan en color verde las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste analizadas en este trabajo.

4.1.4.3 Muestras seleccionadas de Asia y Oceanía Remota analizadas con la región de cloroplasto *ndhF-rpl32*

Se seleccionaron 41 muestras de hojas contemporáneas de Oceanía Remota, siendo 19 de Oceanía Remota Oeste y 22 de Oceanía Remota Este (**Tabla 4**). El detalle de cada muestra se encuentra disponible en el **Anexo I, Tabla II**. Hay que destacar que, del total de 41 muestras, 21 se encuentran almacenadas en sílica-gel y 20 están congeladas a -20°C , lo que se indica en el **Anexo I, Tabla II**.

Tabla 4: Muestras seleccionadas de *B. papyrifera* de Oceanía Remota analizadas mediante el marcador de cloroplasto *ndhF-rpl32*

Origen		N° de muestras
Oceanía Remota Oeste	Nueva Caledonia	1
	Fiji	6
	Wallis	1
	Tonga	7
	Samoa	4
Oceanía Remota Este	Raiatea	1
	Rapa	1
	Tahití	2
	Marquesas	3
	Isla de Pascua	7
	Hawái	8
Total		41

Las localidades en verde corresponden al análisis focalizado y ampliado de Oceanía Remota Oeste en esta tesis.

Las secuencias obtenidas de los 41 individuos de Oceanía Remota se integraron con las secuencias de 101 individuos de Asia, Oceanía Cercana y Remota analizados previamente (Chang y cols., 2015). El conjunto de las 142 secuencias representan 24 lugares geográficos, siendo éstos China, Taiwán, Japón, Vietnam, Filipinas, Indonesia, Camboya, Tailandia, Nueva Guinea, Islas Solomon, Nueva Caledonia, Fiji, Wallis, Tonga, Samoa, Niue, Islas Australes (Rapa y Rurutu), Islas de la Sociedad (Raiatea), Tahití, Marquesas, Pitcairn, Isla de Pascua y Hawái.

4.2 Métodos

4.2.1 Extracción de ADN

4.2.1.1 Extracción de ADN mediante el método manual de Lodhi y cols. (2004) modificado

En la Universidad de Chile se extrajo ADN genómico de las 120 muestras de la sección 4.1.4.1 y de las 20 muestras congeladas (ver sección 4.1.4.2), mediante el método modificado de Lodhi y cols. (2004), con las modificaciones que se indican. Antes de iniciar y luego de terminar cada ronda de extracción, las superficies de trabajo se limpiaron con una solución de etanol 70%. El tejido vegetal se fragmentó en mortero previamente autoclavado hasta obtener un polvo, utilizando nitrógeno líquido. Luego se agregaron 800 µL de tampón de extracción, se homogeneizó y la suspensión se transfirió a un tubo de 1,5 mL. La mezcla se incubó a 60° C durante 25 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una extracción con 600 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 para separar proteínas e impurezas. La mezcla se agitó suavemente por inversión y se centrifugó a 6.000 rpm en centrífuga Hettich

Mikro 22R, rotor 1153, durante 15 minutos. Se recuperaron 450 μL desde la fase acuosa y se transfirieron a un nuevo tubo de 1,5 mL, al que se añadieron 225 μL de NaCl 5 M. El ADN se precipitó con 900 μL de etanol absoluto a -20°C y se dejó a 4°C durante toda la noche. El ADN precipitado se separó mediante dos centrifugaciones consecutivas de 3 minutos cada una, a 3.000 rpm y 6.000 rpm en microcentrífuga. El precipitado se lavó con 500 μL de etanol 76% mantenido a 4°C , y se centrifugó finalmente a 6.000 rpm durante 5 minutos. El etanol residual se evaporó a $50-55^{\circ}\text{C}$ mediante centrifugación al vacío. El ADN obtenido se suspendió en 100 μL de agua MilliQ autoclavada y 2 μL de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de enzima ARNasa. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 40 minutos. Las soluciones de ADN se almacenaron a -20°C . En todas las rondas de extracción de ADN se incluyeron controles negativos en duplicado para verificar la ausencia de ADN en las soluciones de trabajo.

4.2.1.1 Extracción de ADN mediante el método manual de Moncada y cols. (2013) modificado

Las extracciones realizadas en la Universidad Nacional de Taiwán corresponden a las 21 muestras almacenadas en sílica-gel (ver sección 4.1.4.2). Este método corresponde a otra variante del protocolo descrito por Moncada y cols. (2013). En primer lugar, se pulverizó el tejido vegetal mediante el uso de bolitas metálicas en un equipo sonicador. A cada tubo de tejido pulverizado se le añadió 800 μL de la solución amortiguadora de extracción. Luego de homogeneizar esta mezcla, se incubó durante 60 minutos a 65°C , mezclando por inversión los tubos cada 15 minutos. Posteriormente, se realizaron dos extracciones consecutivas, cada una con 800 μL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 para separar proteínas e impurezas. La mezcla se agitó suavemente por inversión y se centrifugó durante 10 minutos a 16.500 g. Se recuperaron 500 μL desde la fase acuosa en la segunda extracción, y se transfirieron a un nuevo tubo de 1,5 mL, al que se añadieron 3 M de acetato de sodio en volumen 1:10. El ADN se precipitó con isopropanol frío (-20°C) en una proporción 1:2 v/v y se dejó a -20°C durante toda la noche. El ADN precipitado se separó mediante una centrifugación durante 10 minutos a 16.500 g. El precipitado se lavó con 800 μL de etanol 70% (4°C) y se centrifugó durante 3 minutos a 16.500 g. El etanol se descartó y se volvió a repetir el lavado y posterior centrifugación, pero con 800 μL de etanol absoluto (-20°C). El etanol residual se evaporó a temperatura ambiente durante 2 horas. El ADN obtenido se suspendió en 35 μL de solución amortiguadora TE 1X y se almacenó a -20°C .

4.2.2 Evaluación de la integridad del ADN extraído

4.2.2.1 Evaluación de la integridad del ADN extraído mediante el método manual de Lodhi y cols. (2004) modificado

La integridad del ADN genómico obtenido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en amortiguador TBE 0,5X. Las muestras se cargaron utilizando 5 μL de ADN genómico, 1 μL de amortiguador de carga 6X y 1 μL de GelRed™ 1:100. En todos los geles se incluyó 1,5 μL del estándar de peso molecular fago λ /Hind III con 1 μL de GelRed™ 1:100 y 1,5 μL del estándar de peso molecular 1 Kb Plus con 1 μL de GelRed™ 1:100. La visualización de los geles de agarosa se realizó en un transiluminador UV.

4.2.2.2 Evaluación de la integridad del ADN extraído mediante el método manual de Moncada y cols. (2013) modificado

La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,0% en solución TBE 1X. El gel de agarosa se preparó con una solución GelRed™ en TE 1X 1:100. Las muestras se cargaron utilizando 1 μL de ADN genómico y 1 μL de amortiguador de carga 6X. En todos los geles se incluyó 1 μL del estándar de peso molecular 100 pb DNA Ladder DM100 con 1 μL de amortiguador de carga 6X. La visualización de los geles de agarosa se realizó en un transiluminador UV.

4.2.3 Análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido

4.2.3.1 Medición de concentración de ADN mediante espectrofotometría

Se evaluó la concentración y pureza del ADN obtenido mediante absorbancia a 260 nm y la razón A_{260}/A_{280} , respectivamente. Las mediciones se realizaron en un equipo Nanodrop™ 2000 utilizando 1 μL de ADN genómico.

4.2.3.2 Medición de concentración de ADN mediante fluorescencia

4.2.3.2.1 Sistema comercial Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit

Las mediciones mediante este sistema se realizaron en el equipo Synergy Mx a una longitud de excitación de 485 nm y una longitud de emisión de 538 nm. Las mediciones se realizaron en placas Nunc negras de 96 pocillos con fondo plano. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se preparó una solución de trabajo 1:200 diluyendo 1 μL de Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent en 199 μL de amortiguador

TE 1X provisto por el fabricante. A cada pocillo se agregaron 100 μL de solución de trabajo, 199 μL de amortiguador TE 1X y 1 μL de ADN genómico. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos y se midió la concentración de ADN. Para obtener el valor de concentración de ADN en $\text{ng}/\mu\text{L}$, se restó el valor del blanco a cada valor de fluorescencia de las muestras, el cual se interpoló en la curva de calibración obtenida para cada conjunto de lecturas. Finalmente, el valor de concentración obtenido se multiplicó por el factor de dilución empleado (200x).

La curva de calibración se obtuvo con 6 puntos, diluyendo el estándar de genoma de fago λ provisto por el fabricante (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en tampón TE 1X. Además, a cada pocillo de la curva se le agregaron 100 μL de solución de trabajo. Los puntos de la curva correspondían a 0 ng/mL , 1 ng/mL , 10 ng/mL , 100 ng/mL , 500 ng/mL y 750 ng/mL .

4.2.3.2 Sistema comercial Qubit® dsDNA HS Assay

Las mediciones mediante este sistema se realizaron en la Universidad Nacional de Taiwán. Para cada muestra, se mezclaron 2 μL de ADN genómico con 198 μL de solución de reactivos del sistema comercial preparados según las indicaciones del fabricante. El sistema comercial incluye dos estándares internos de concentración conocida. Cada tubo se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos y se midió la concentración de ADN en el equipo Qubit® Fluorometer 3.0. Para obtener la concentración real de ADN en ng/mL , cada valor se multiplicó por el factor de dilución empleado.

4.2.4 Purificación de las extracciones de ADN genómico

Las extracciones de ADN en la Universidad Nacional de Taiwán se purificaron utilizando el sistema comercial Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit, el cual se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las purificaciones se eluyeron en 50 μL de solución TE 1X.

4.2.5 Amplificación de la colección de muestras de Oceanía Remota Oeste con cuatro tipos de marcadores moleculares

4.2.5.1 Preparación de las diluciones de ADN para reacciones de PCR

Las diluciones de trabajo que se utilizaron en la Universidad de Chile se prepararon a 0,6 $\text{ng}/\mu\text{L}$ a partir de los resultados de la concentración de ADN genómico obtenidos mediante el sistema comercial Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit. Las diluciones de ADN se almacenaron a 4° C. Por otra parte, las extracciones en la Universidad Nacional de Taiwán se usaron sin diluir.

4.2.5.2 Amplificación de la región ribosomal ITS-1

La amplificación de esta secuencia se realizó con las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste (ítem 4.1.4.1). Para amplificar esta región, se utilizaron los siguientes partidores: sentido ITS-A (5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3') y antisentido ITS-C (5'-GCAATTCACACCAAGTATCGC-3'). El medio de reacción consistió en 1,2 ng de ADN, 1x de amortiguador Green GoTaq® Flexi Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,625 mM de dNTPs, 0,25 μM de cada partidor y 0,2 U/mL de ADN polimerasa GoTaq® G2 en un volumen final de 20 μL. Como control negativo de amplificación se utilizó agua milliQ estéril. El programa de PCR constó de una desnaturación inicial a 94° C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94° C durante 1 min, 60° C durante 1 min y 72° C durante 1 min y una extensión final a 72° C durante 7 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X y se visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en un transiluminador UV (Seelenfreund y cols., 2011).

4.2.5.3 Amplificación del marcador de sexo

La amplificación de este marcador se realizó con las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste (sección 4.1.4.1). Los partidores que se utilizaron son el partidor sentido MMF (5'-AGCCCTTTGGATCGCGACTTAGAA-3') y el partidor antisentido MMRS (5'-TGTC AACGTCATCATCGTCGTCGT-3') que generan un amplicón de 271 pb cuando el individuo es de sexo masculino. Como control interno de amplificación se utilizó el mismo partidor sentido y el partidor antisentido MMRL (5'-CTGGACAAGACCAACTTTGAATCCG-3') generando un amplicón de 425 pb en todos los individuos de *B. papyrifera*. Estos partidores se desarrollaron en nuestro laboratorio (Peñailillo y cols., 2016). Como controles se utilizaron una muestra femenina y una muestra masculina sexadas en terreno por inspección visual de sus flores. El medio de reacción consistió en 1,2 ng de ADN, 1X de amortiguador Green GoTaq® Flexi Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,625 mM de dNTPs, 0,275 μM de partidor sentido, 0,2 μM de partidor antisentido MMRS18, 0,075 μM de partidor antisentido MMRL y 0,05 U/mL de ADN polimerasa GoTaq® G2 en un volumen final de 20 μL. Como control negativo de amplificación se usó agua milliQ estéril. El programa de PCR constó de una desnaturación inicial a 94° C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94° C durante 1 min, 55° C durante 1 min y 72° C durante 45 s, seguido por una extensión final de 72° C durante 7 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X y se visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en un transiluminador UV (Peñailillo y cols., 2016).

4.2.5.4 Amplificación de los marcadores SSR

La amplificación de estos marcadores se realizó con las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste (ítem 4.1.4.1). Se dispone de 49 parejas de partidores en el laboratorio, desarrollados específicamente para *B. papyrifera*. De este total, 36 parejas fueron desarrolladas por la Empresa suiza Ecogenics (partidores denominados “Bropap”) y 13 parejas fueron enviadas gentilmente por el Dr. Kuo-Fang Chung, Universidad Nacional de Taiwán (partidores denominados “Bro”). A partir de este conjunto, se seleccionaron 10 parejas de partidores (**Tabla 5**) por su facilidad de amplificación y la información entregada en análisis previos en muestras mayoritariamente de Oceanía Remota Este (Peñailillo, 2014).

Tabla 5: Resumen de las características de los 10 partidores de SSR seleccionados

Marcador	Motivo repetido	RDT (pb)	Ta (° C)	Secuencia de partidores (5' a 3')
Bro07	(TC) ₂₂	224-287	55	PS: GCTTTCTGTACCCCAAATG PA: TTCTTTAGCTCGAGGGCGTA
Bro08	(TC) ₁₇	205-243	55	PS: TAGACCCACCTCCCAAACAG PA: ATTCGGAGGCATCTGAGAGA
Bro13	(GA) ₉	239-246	55	PS: AGAGAGGGACAACATCAACGA PA: TGGTCTGTGACCCATTCTTC
Bro15	(CAAA) ₁₀	158-191	55	PS: CCGTAGCGATCTTCCAGAAA PA: AAAGAAATGGCGGAAATGTG
Bropap_02214	(GA) ₁₉	221-256	55	PS:CGGAAGAGAGAGATTACAAACTAGC PA: ACTTGACCATTCTAAGCAAGACC
Bropap_02801	(AC) ₁₁	146-171	56	PS:GACATCTCATAAAATGTTTAAATCCAG PA: AATTGCCCTGTAGCATTCCG
Bropap_20558	(TAT) ₇	218-224	55	PS: TCCACCATCCAACGATGAAG PA: GGGCTAAACTACCTTGTCG
Bropap_25444	(GA) ₁₄	170-226	55	PS: TCACACTTACACACGGAGGG PA: GGTACGTAATTCCCACCACC
Bropap_26985	(TG) ₁₂	178-191	56	PS: AGAATCACCCTCTCCCTTGG PA: TGGTTTGCTTCATTCAAAAAGTG
Bropap_30248	(GA) ₁₄	84-157	56	PS: AGAGCAGGGCAAGCAATATC PA: GGTCATCCATTGTCTGAACCTC

RDT: Rango de tamaño, Ta: Temperatura de apareamiento, PS: Partidor sentido, PA: Partidor antisentido.

Las reacciones de PCR se realizaron usando un partidor sentido en cuyo extremo 5' se incorporó una región conservada de 18 pb del fago M13 (denominada cola M13), a la que se une por complementariedad un partidor universal de M13 marcado con un fluoróforo, de acuerdo a Schuelke (2000). Esto permite analizar el producto de PCR generado mediante electroforesis capilar. En la **Tabla 6** se detallan las secuencias de las colas M13 para el grupo de marcadores Bropap y Bro. En el **Anexo I, Figura A** se presenta un esquema de la metodología de marcación por fluoróforos.

Tabla 6: Secuencias M13 y fluorocromos utilizados para cada tipo de marcador

Marcadores	Secuencia M13	Fluorocromo
Bropap	5'- TGTAACGACGGCCAGT -3'	NED
Bro	5'- CACGACGTTGTAACGAC -3'	6-FAM

El medio de reacción consistió en 1,2 ng de ADN, 1X de amortiguador Green GoTaq® Flexi Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,04 μM de partidor sentido, 0,16 μM de partidor antisentido, 0,16 μM de partidor sentido M13 y 0,05 U/mL de ADN polimerasa GoTaq® G2 en un volumen final de 20 μL. Como control negativo de amplificación se usó agua milliQ estéril. El programa de PCR constó de dos etapas, primero una desnaturalización inicial a 95° C durante 15 min, seguido de 30 ciclos de 95° C durante 30 s, una etapa de apareamiento de temperatura variable, dependiente de la pareja de partidores a amplificar durante 45 s (ver **Tabla 5**) y 72° C durante 45 s. La segunda etapa consistió en 8 ciclos de 95° C durante 30 s, 53° C durante 45 s, 72° C durante 45 s seguido por una extensión final de 72° C durante 30 min. En el caso de templados difíciles de amplificar, se añadió BSA a la mezcla de reacción a una concentración final de 1 mg/mL. Para verificar la presencia de amplificación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X y se visualizaron los amplicones en un transiluminador UV luego de una tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain.

4.2.5.5 Amplificación de la región de cloroplasto *ndhF-rpl32*

La amplificación de este marcador se realizó con las 41 muestras seleccionadas de Oceanía Remota (ítem 4.1.4.2) en la Universidad Nacional de Taiwán. Los partidores para amplificar la región intergénica *ndhF-rpl32* corresponden al partidor sentido *ndhF* (5'-GAAAGGTATKATCCAYGMATATT-3') y el partidor antisentido *rpl32R* (5'-CCAATATCCCTTYT TTTTCCAA-3') (Shaw y cols., 2007). El medio de reacción de PCR consistió en 1 μL de ADN genómico, 2X de solución Master Mix (Ampliqon), 10 μM de partidor sentido y 10 μM de partidor antisentido, en un volumen final de 10 μL. El programa de PCR constó de una desnaturalización inicial a 80° C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 95° C durante 1 min, 50-65° C durante 1 min con un gradiente de 0,3° C/s, 65° C durante 4 minutos y una extensión final de 65° C durante 5 min. Los amplicones fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,0% en solución GelRed™ y TE 1X 1:100, en un transiluminador UV (Chang y cols., 2015).

4.2.6 Análisis de datos

4.2.6.1 Análisis de la región ITS-1

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias se analizaron y editaron con el programa SeqMan Pro (DNASTAR Lasergene 11). Posteriormente, se alinearon utilizando el método Clustal W (Thompson y cols., 1994) con el programa MEGA 7.0.14 (Kumar y cols., 2016).

La construcción de dendrogramas se realizó mediante el programa MEGA 7.0.14 (Kumar y cols., 2016), usando los métodos de *Neighbor Joining* (Saitou y Nei, 1987) y UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Averages*) (Sneath y Sokal, 1973). Las distancias evolutivas se calcularon usando el método *Maximum Composite Likelihood* (Tamura y cols., 2004). Con el fin de revisar la confianza estadística de cada nodo de los dendrogramas, se realizaron análisis de *bootstrapping* con 10.000 replicados utilizando el programa MEGA 7.0.14 (Kumar y cols., 2016).

4.2.6.2 Análisis del marcador de sexo

La tipificación de sexo de los 120 individuos se realizó mediante inspección visual. Las bandas obtenidas por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% se fotografiaron bajo luz UV. Los individuos femeninos presentan una única banda de 425 pb, mientras que los individuos masculinos presentan bandas de 425 pb y 271 pb, respectivamente (Peñailillo y cols., 2016).

4.2.6.3 Análisis de los marcadores SSR

Los amplicones obtenidos se enviaron a análisis de electroforesis capilar al Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los electroferogramas se visualizaron con el programa Peak Scanner™ v1.0 (Applied Biosystems) y el tamaño de los alelos se registró en tablas Excel.

4.2.6.3.1 Análisis de la diversidad genética

Los análisis de diversidad genética se realizaron con el programa GenAlEx 6.501 (Peakall y Smouse, 2012). Este programa se utilizó para realizar el análisis de coincidencias *multilocus* para datos codominantes.

4.2.6.3.2 Test de Wilcoxon para detección de cuellos de botella genéticos

Los potenciales cuellos de botella para las poblaciones estudiadas fueron evaluados con el programa Bottleneck aplicando el test de Wilcoxon (Cornuet y Luikartt, 1996; Piry y cols., 1999), según los modelos mutacionales IAM (modelo mutacional de alelos infinitos o *Infinite Allele Model*) y SMM (modelo mutacional por pasos o *Stepwise Mutation Model*).

4.2.6.3.3 Análisis bayesiano de estructura de poblaciones

Se utilizó el programa Structure 2.3.4 (Pritchard y cols., 2000) para analizar la estructura genética del grupo estudiado. Los posibles conglomerados genéticos (K) presentes en el grupo de estudio se calcularon utilizando un modelo bayesiano de mezclas.

La primera aproximación al número real estimado de posibles conglomerados genéticos se realizó entre un rango de simulaciones de 1 – 15, utilizando el programa con un número de iteraciones para MCMC y burnin de 50.000 y 5.000, respectivamente. Cada valor K se calculó a partir de 10 corridas independientes.

El valor K real estimado se calculó a partir de los valores de ΔK (Evanno y cols., 2005), que corresponden a la razón de cambio del valor del logaritmo de la probabilidad de los datos [$\ln \Pr(X/K)$]. El valor K real estimado obtenido fue comprobado en una segunda corrida, esta vez utilizando un rango de simulaciones entre 1 – 8, corriendo el programa con un número de iteraciones para MCMC y burnin de 750.000 y 500.000, respectivamente. Cada valor K se calculó a partir de 20 corridas independientes.

4.2.6.3.4 Análisis de coordenadas principales (PCoA)

El análisis de coordenadas principales (Abdi y cols., 2012) se realizó utilizando el programa GenAlEx 6.501 (Peakall y Smouse, 2012). La matriz genética calculada se basó en un coeficiente de distancia genética genotípico-codominante, agrupando los datos por poblaciones. En el caso del análisis PCoA en tres dimensiones, se introdujeron los valores entregados por la matriz de GeneAlEx 6.501 en el programa SigmaPlot v.12 (SYSTAT Software).

4.2.6.3.5 Construcción de dendrogramas

En base a los datos obtenidos, se generaron matrices binarias de presencia (1) o ausencia (0) de alelos. Posteriormente, los datos se ingresaron al programa NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 1997) para el cálculo de similitudes genéticas utilizando el coeficiente de similitud de Dice. Este coeficiente se basa en la proporción de los alelos compartidos entre dos genotipos sobre el total de genotipos (Dice, 1945). Las matrices de distancias genéticas obtenidas se utilizaron para la construcción de dendrogramas usando el método de agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). Con el fin de revisar la confianza estadística de cada nodo de los dendrogramas, se realizaron análisis de *bootstrapping* con 1.000 replicados utilizando el programa FreeTree versión 0.9.1.50 (Pavliček y cols., 1999) y TreeView versión 1.6.6 (Page, 1996).

4.2.6.3.6 Construcción de redes de genotipos

La construcción de las redes de genotipos se realizó mediante el análisis *Minimum Spanning Tree* del programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths).

4.2.6.4 Análisis del marcador de cloroplasto *ndhF-rpl32*

Los amplicones se enviaron a secuenciar a la empresa Gene Dragon Genomics (Taipéi, Taiwán). Posteriormente, las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el programa SeqMan Pro (DNASTAR

Lasergene 11) y se alinearon con 101 secuencias correspondientes a los 48 haplotipos de *ndhF-rpl32* previamente descritos por el Dr. Chung (Chang y cols., 2015) mediante el método Clustal W (Thompson y cols., 1994) con el programa MEGA 7.0.14 (Tamura y cols., 2013). A partir del alineamiento se construyó una red de haplotipos mediante el programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths).

5. RESULTADOS

5.1 Extracción de ADN genómico de individuos de *B. papyrifera*

5.1.1 Extracción de ADN genómico de los 120 individuos provenientes de Oceanía Remota Oeste

Se extrajo ADN genómico de una colección de 120 muestras contemporáneas de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste, específicamente de Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga. Todas las muestras se ingresaron en una base de datos de ADN genómico, donde se les asignó un código de identificación, la información de su procedencia, y los resultados de las mediciones de integridad, pureza y concentración, como se indica en el **Anexo I, Tabla I**.

5.1.1.1 Análisis de integridad

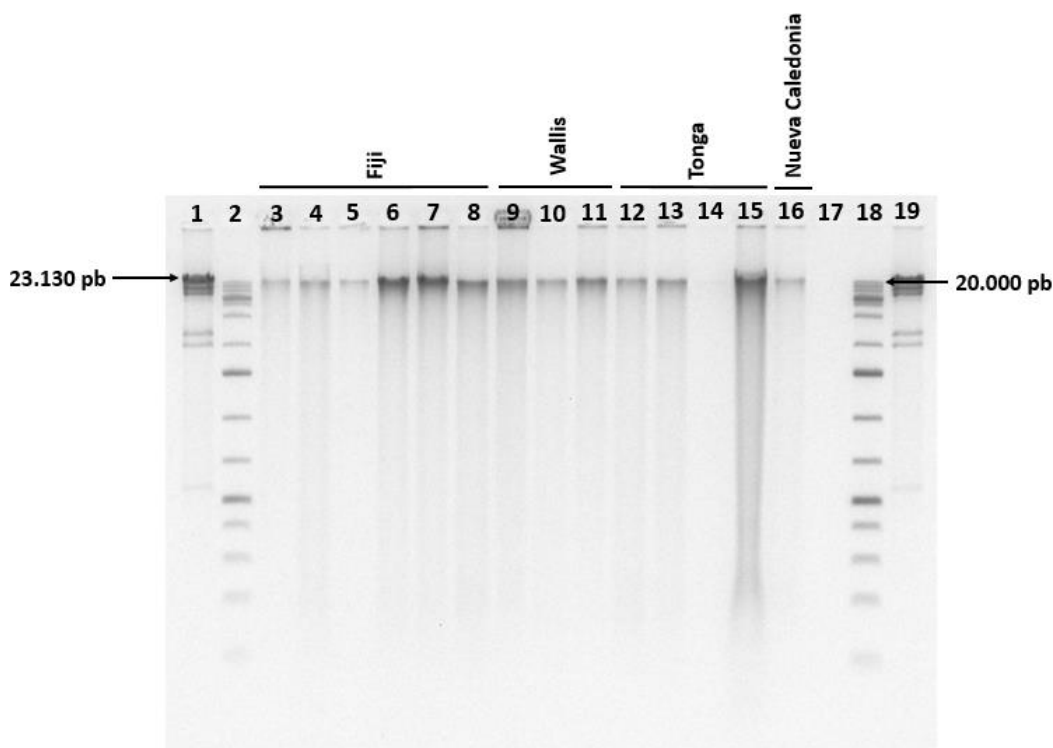


Figura 4: Perfil electroforético de ADN genómico de muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. El orden de carga es el siguiente: carril 1: Ladder Fago λ *HindIII*, carril 2: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 3: BQUCH0248 (Fiji), carril 4: BQUCH0265 (Fiji), carril 5: BQUCH0277 (Fiji), carril 6: BQUCH0297 (Fiji), carril 7: BQUCH0304 (Fiji), carril 8: BQUCH0312 (Fiji), carril 9: BQUCH0269 (Wallis), carril 10: BQUCH0275 (Wallis), carril 11: BQUCH0329 (Wallis), carril 12: BQUCH0341 (Tonga), carril 13: BQUCH0342 (Tonga), carril 14: BQUCH0353 (Tonga), carril 15: BQUCH0358 (Tonga), carril 16: BQUCH0443 (Nueva Caledonia), carril 17: control negativo de extracción, carril 18: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 19: Ladder Fago λ *HindIII*.

A modo de ejemplo, en la **Figura 4** se presentan perfiles genómicos de 14 de las 120 muestras extraídas. Se observa una banda discreta de alto peso molecular en las 14 muestras, que corresponde a la presencia de ADN genómico. La intensidad de las bandas es variable, tal como se observa al comparar las bandas intensas de las muestras BQUCH00297, BQUCH00304, BQUCH0312 (Fiji) y BQUCH0443 (Tonga) (carriles 6, 7, 8 y 15 respectivamente), con la banda muy débil de la muestra BQUCH0353 (Tonga), del carril 14. Se observa además que todas las muestras poseen distintos grados de degradación. Por otra parte, no se detectan bandas de bajo peso molecular, dando cuenta que no hay presencia de ARN en las extracciones de ADN. En el **Anexo I, Tabla I** se detalla el estado de integridad de cada una de las extracciones. Es importante notar que en el carril del control negativo de extracción (carril 17) no se observa la presencia de ADN. Por lo tanto, el análisis mediante electroforesis en geles de agarosa (**Figura 4**) permitió confirmar la presencia de ADN en las 14 muestras extraídas, con distinto grado de integridad. Esto es representativo de las 120 muestras de morera de papel de Oceanía Remota Oeste.

5.1.1.2 Mediciones de concentración y pureza de ADN

La cuantificación del ADN extraído se determinó mediante dos maneras: (i) medición de la absorbancia a 260 nm en el equipo NanodropTM 2000 y (ii) el sistema comercial Quant-iTTM Picogreen® dsDNA Assay Kit. En el **Anexo II, Figura B** se presenta la curva de calibración del reactivo Picogreen, con la cual se calculó la concentración de ADN para las muestras.

En el **Anexo I, Tabla I** se muestran los valores de concentración obtenidos mediante ambos métodos para cada una de las extracciones. Se observa que los valores obtenidos mediante espectrofotometría varían desde 73,1 ng/μL (BQUCH0278 de Fiji) a 2.325,4 ng/μL (BQUCH0309 de Fiji), mientras que mediante el uso del reactivo Picogreen se obtuvo valores de concentración entre 1,5 ng/μL (BQUCH0330 de Wallis) y 42,9 ng/μL (BQUCH0370 de Tonga). Al comparar los valores obtenidos por ambos métodos, se observa que la cuantificación mediante la medición de absorbancia a 260 nm entrega valores entre 28 a 313 veces mayores que la cuantificación mediante el reactivo Picogreen.

Por otra parte, la pureza del ADN extraído se determinó mediante la razón 260 nm/280 nm ($A_{260/280}$) con el equipo NanodropTM 2000 (ver **Anexo I, Tabla I**). Los valores obtenidos varían desde 1,4 (BQUCH0351 de Tonga) a 2,0 (BQUCH0307 de Fiji, entre otras). Del total de 120 muestras extraídas, sólo una muestra presenta valores de $A_{260/280}$ menores a 1,6; 24 poseen valores entre $1,7 \geq A_{260/280} > 1,8$; y 95 presentan valores entre 1,8 y 2,0 de $A_{260/280}$, que se considera como ADN “puro”.

5.1.2 Extracción de ADN genómico de 41 individuos seleccionados de Oceanía Remota

Se extrajo ADN de las 41 muestras contemporáneas seleccionadas de *B. papyrifera* de Oceanía Remota. Se utilizaron dos métodos de extracción distintos, dependiendo del método de preservación del tejido foliar (sílica gel o almacenamiento a -20°C), como se detalla en la sección 4.2.1 de Materiales y Métodos.

5.1.2.1 Análisis de integridad

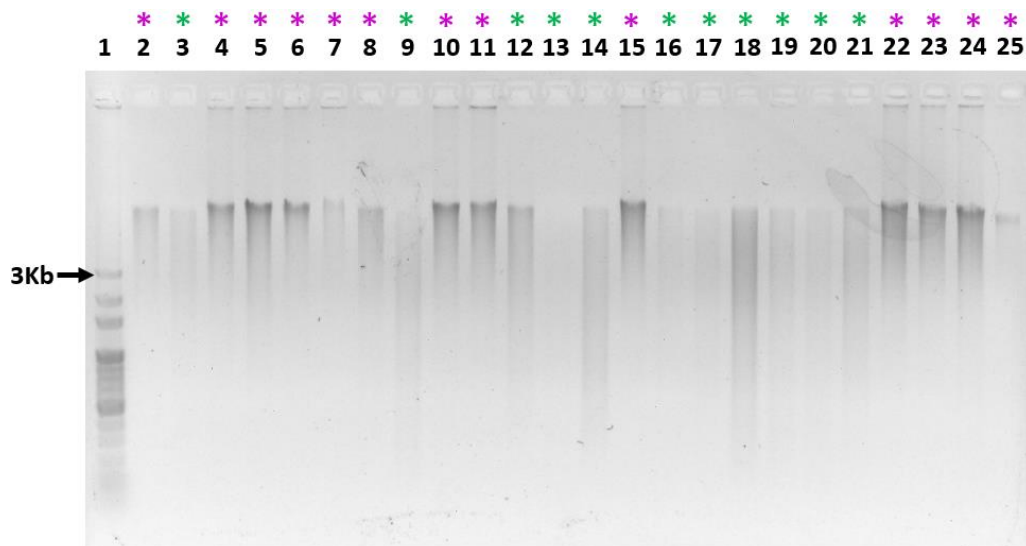


Figura 5: Perfil electroforético de ADN genómico de 13 muestras almacenadas en sílica-gel y 11 muestras congeladas de *B. papyrifera* de Oceanía Remota. Electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. El orden de carga es el siguiente: carril 1: DNA Ladder DM100 100pb (Biomán), carril 2: BQUCH00221 (Isla de Pascua), carril 3: BQUCH0003 (Isla de Pascua), carril 4: BQUCH0285 (Fiji), carril 5: BQUCH0195 (Hawái), carril 6: BQUCH0439 (Rapa), carril 7: BQUCH0213 (Isla de Pascua), carril 8: BQUCH0280 (Fiji), carril 9: BQUCH0116 (Fiji), carril 10: BQUCH0164 (Hawái), carril 11: BQUCH0177 (Hawái), carril 12: BQUCH0108 (Tonga), carril 13: BQUCH0107 (Tonga), carril 14: BQUCH0084 (Samoa), carril 15: BQUCH0179 (Hawái), carril 16: BQUCH0051 (Marquesas), carril 17: BQUCH0099 (Tonga), carril 18: BQUCH0037 (Isla de Pascua), carril 19: BQUCH059 (Hawái), carril 20: BQUCH0075 (Samoa), carril 21: BQUCH0110 (Tonga), carril 22: BQUCH172 (Hawái), carril 23: BQUCH0433 (Tahití), carril 24: BQUCH0292 (Fiji), y carril 25: BQUCH0435 (Tahití).

Las muestras extraídas a partir de material congelado se indican con un asterisco de color verde arriba del número de sus carriles, mientras que las muestras extraídas a partir de material almacenado en sílica-gel tienen un asterisco de color morado.

La **Figura 5** muestra un ejemplo de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de algunas de las muestras congeladas (asterisco verde) y algunas de las muestras en sílica-gel (asterisco morado). Se observa que la mayoría de las muestras poseen una banda de alto peso molecular. Las extracciones que tienen bandas débiles o no observables corresponden a muestras congeladas (ver, por ejemplo, carriles 9 y 13). En el caso

de las extracciones de muestras almacenadas en sílica-gel, se observa que todas poseen bandas intensas. Esto daría cuenta que las extracciones a partir de material vegetal almacenado en sílica-gel tienen más ADN que las realizadas a partir de material congelado. Por otra parte, si bien todos los carriles presentan degradación, con excepción de BQUCH0107 (carril 13), se observa que las hojas almacenadas en sílica-gel poseen una banda de ADN genómico de alto peso molecular más intensa que la sombra de degradación (ver carriles 6, 15, 24, y 25, por ejemplo). Los carriles correspondientes a las hojas congeladas, en cambio, poseen una sombra de degradación de igual intensidad que la banda de ADN genómico o, en su mayoría, mayor intensidad de sombra de degradación que banda de ADN genómico de alto peso molecular (ver carriles 3, 12 y 16, por ejemplo). Por lo tanto, las extracciones de hojas almacenadas en sílica-gel poseen ADN de mayor peso tamaño (más íntegro) que las extracciones de material congelado.

5.1.2.2 Mediciones de concentración y pureza de ADN

Se determinó la pureza de las preparaciones de ADN mediante la razón de absorbancia $A_{260/280}$ y se cuantificó la concentración de ADN obtenido mediante el sistema comercial Qubit dsDNA HS Assay Kit. Los valores de estas mediciones se encuentran en el **Anexo I, Tabla II**. Del total de 41 hojas extraídas, 23 muestras obtuvieron valores de $A_{260/280}$ entre 1,8 y 2,0, los cuales se consideran como valores aceptables de pureza de ADN. Por otro lado, la concentración de las extracciones varía desde 0,59 ng/ μ L (BQUCH0098 de Tonga) a 52,6 ng/ μ L (BQUCH0179 de Hawái). Es importante notar que no existe una correlación entre los valores obtenidos de las razones de absorbancia y concentración de ADN, con la forma de almacenamiento de la hoja, o el método de extracción utilizado.

5.2 Análisis de la diversidad genética de individuos de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota mediante los marcadores moleculares ITS-1, marcador de sexo y SSR

5.2.1 Análisis de la diversidad genética de individuos de *B. papyrifera* mediante la región ITS-1

5.2.1.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste

5.2.1.1.1 Amplificación de la región ITS-1

Se amplificaron las 120 muestras con el marcador ITS-1. En la **Figura 6** se presenta una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para algunas de las muestras analizadas. En este ejemplo se observa que todas las muestras amplificaron, presentando un amplicón de aproximadamente 400 pb. Las 120 muestras

amplificaron exitosamente y sus amplicones se enviaron a secuenciar, obteniendo secuencias legibles para todas ellas.

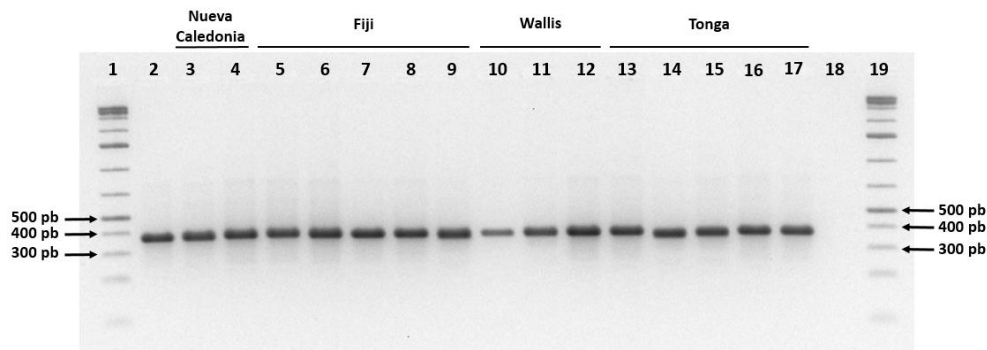


Figura 6: Amplificación de la región ITS-1 de muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X. El orden de carga es el siguiente: carril 1: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 2: control positivo de amplificación (BQUCH0012 de Isla de Pascua), carril 3: BQUCH0442 (Nueva Caledonia), carril 4: BQUCH0444 (Nueva Caledonia), carril 5: BQUCH0246 (Fiji), carril 6: BQUCH0265 (Fiji), carril 7: BQUCH0277 (Fiji), carril 8: BQUCH0315 (Fiji), carril 9: BQUCH0326 (Fiji), carril 10: BQUCH0268 (Wallis), carril 11: BQUCH0271 (Wallis), carril 12: BQUCH0332 (Wallis), carril 13: BQUCH0338 (Tonga), carril 14: BQUCH0344 (Tonga), carril 15: BQUCH0360 (Tonga), carril 16: BQUCH0363 (Tonga), carril 17: BQUCH0370 (Tonga), carril 18: control negativo de amplificación, carril 19: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific).

Adicionalmente, los controles negativos de extracción se amplificaron utilizando tres diluciones (1/8, 1/4 y directo de la extracción). Ninguno de los controles negativos de extracción amplificó, por lo que las soluciones de extracción de ADN se encuentran libres de ADN (ver **Anexo III, Figura C**).

5.2.1.1.2 Análisis de las secuencias de ITS-1

Las 120 secuencias obtenidas se analizaron con el programa SeqMan Pro (DNASTAR Lasergene 11) para obtener una secuencia consenso de ITS-1 y se compararon con tres secuencias nucleotídicas de ITS-1 de *B. papyrifera* que se encuentran depositadas en la base de datos de NCBI (Números de acceso: HM623778.1, AB604292.1 y AY345156.1). Este análisis se realizó con el fin de corroborar si las muestras analizadas correspondían a la especie de interés. Todas las secuencias se identificaron como pertenecientes a la especie *B. papyrifera*.

(archipiélagos) o políticas analizadas. Se observa que los 13 individuos poseen la variante polinésica T, lo cual resultó ser representativo para las 120 muestras analizadas provenientes de Oceanía Remota Oeste.

5.2.1.2 Integración del análisis de la diversidad genética identificada mediante la región ITS-1 en Oceanía Remota Oeste con estudios previos en Asia y Oceanía Remota Este

De los 120 individuos de Oceanía Remota Oeste analizados con este marcador, se seleccionaron 13 para realizar un análisis comparativo con cinco individuos de Asia, 12 de Oceanía Remota Oeste y 26 individuos de Oceanía Remota Este, los cuales previamente se analizaron en nuestro laboratorio. Hay que destacar que los estudios previos de ITS-1 en un número reducido de muestras de Oceanía Remota Oeste incluyen a individuos de Samoa, una localidad que no se caracterizó genéticamente mediante este marcador en esta tesis.

El criterio de elección de los 13 individuos de Oceanía Remota Oeste analizados en este trabajo se basó en que cada uno representa una localidad de cada archipiélago, mientras que la elección de los individuos analizados previamente de Asia y Oceanía Remota corresponde a que cada uno representa un genotipo de marcadores SSR identificados previamente por Peñailillo, 2014.

5.2.1.2.1 Alineamiento de las secuencias de ITS-1 de individuos de Asia y Oceanía Remota

Las secuencias de ITS-1 de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota, se alinearon con un individuo de la especie *Broussonetia kazinoki* de grupo externo (*outgroup*), mediante el método Clustal W con el programa MEGA 7.0.14.

En la **Figura 8** se muestra, a modo de ejemplo, el alineamiento parcial de 16 muestras analizadas mediante el marcador ITS-1, representativas de cada isla del Pacífico, junto a tres muestras asiáticas y el grupo externo. Para Hawái, se incluyeron las secuencias de un individuo femenino y otro masculino, los cuales se indican al final del nombre de cada muestra con la letra “F” o “M”, respectivamente. En este alineamiento se destacan las posiciones polimórficas identificadas. Las flechas verdes y azules indican el polimorfismo G>C y la transversión G a T previamente descritos por Seelenfreund y cols. (2011), y la flecha naranja da cuenta de un nuevo polimorfismo detectado solamente en plantas masculinas de Hawái.

Por un lado, en esta figura se observa que las muestras de Oceanía Remota, con excepción del individuo masculino hawaiano, tienen el nucleótido T en la posición relativa 203. Esto es representativo para todas las muestras de las islas de Oceanía Remota y congruente con lo descrito para los individuos de esta región (Seelenfreund y cols., 2011, Peñailillo y cols., 2016).

La muestra masculina de Hawái (BQUCH0166) presenta el nucleótido G en la posición relativa 203, al igual que las cinco muestras asiáticas. Es importante destacar que la variante asiática se encontró en las

5 muestras masculinas hawaianas y es representativa de los 18 individuos masculinos de Hawái analizados previamente en nuestro laboratorio (Peñailillo y cols., 2016). Además, se observa otro sitio polimórfico no descrito anteriormente, en la posición relativa 99 de la secuencia de ITS-1 (**Figura 8**, ver flecha de color naranja). En esta posición, la muestra masculina BQUCH0166 de Hawái posee el nucleótido T, mientras que tanto las 11 muestras polinésicas como cuatro de las cinco muestras asiáticas presentan el nucleótido C. La excepción de Asia corresponde a la muestra BQUCH0428 de China, la cual posee el nucleótido T. Asimismo, al analizar el total de las muestras, se observó que de 289 muestras provenientes de Oceanía Remota, 271 tienen el nucleótido C y sólo 18 poseen el nucleótido T, que corresponden a los individuos masculinos de Hawái. Hay que recordar que con otros marcadores también se ha observado que los individuos masculinos de *B. papyrifera* de Hawái son genéticamente más similares a Asia que al resto de individuos de Hawái y del Pacífico.

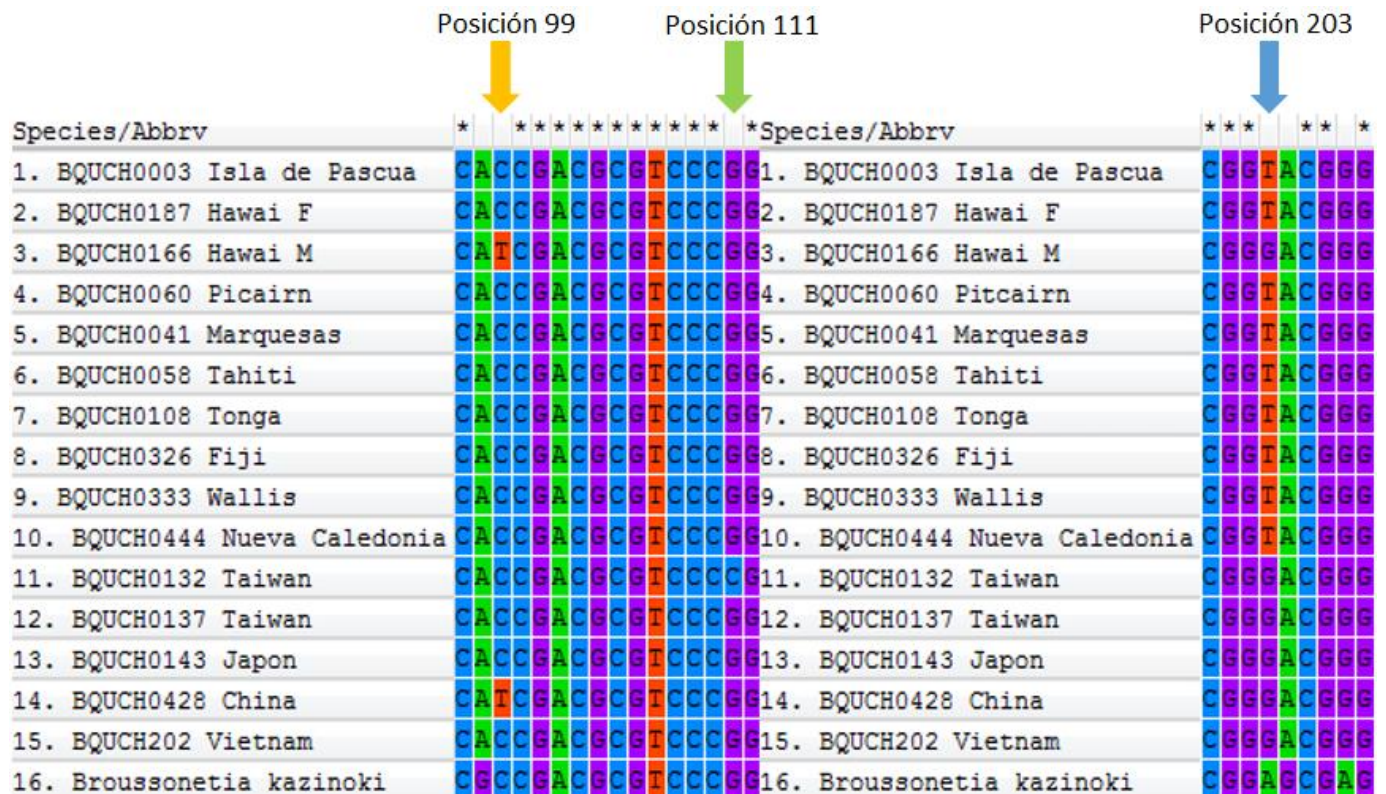


Figura 8: Alineamiento de secuencias de ITS-1 de muestras de Oceanía Remota Oeste con individuos de Oceanía Remota Este, y dos individuos asiáticos de morera de papel, y un control externo de especie. (Mega 7.0.14). Las flechas indican posiciones polimórficas en las secuencias de *B. papyrifera*. La flecha naranja indica una transversión de C a T, la verde indica un polimorfismo G>C y la azul indica una transversión de G a T.

5.2.1.2.2 Análisis de la región ITS-1 de individuos asiáticos y masculinos de Hawái

A partir del nuevo SNP detectado en la posición relativa 99 de la secuencia de ITS-1, se hizo un análisis focalizado en todos los individuos de Hawái y Asia para identificar si el nucleótido T encontrado

en las 18 muestras masculinas de Hawái también se encuentra en las 33 muestras de Asia (19 de Taiwán, 5 de Japón, 5 de Vietnam y 4 de China).

Se buscó el nuevo sitio polimórfico en los electroferogramas de las secuencias entregadas por ITS-A (partidor sentido del marcador ITS-1) e ITS-C (partidor antisentido del marcador ITS-1) para las 33 muestras asiáticas, las que se analizaron mediante el programa SeqMan Pro (DNASTAR Lasergene 11).

En la **Figura 9** se muestra la comparación de dos individuos de Hawái (la muestra masculina BQUCH0166 y muestra femenina BQUCH0190), dos individuos de China (la muestra femenina, BQUCH0428 y la muestra masculina BQUCH0431), un individuo de Japón (la muestra femenina BQUCH0145) y un individuo de Oceanía Remota como control del nucleótido C en la posición de interés (la muestra femenina BQUCH0116).

En primer lugar, en la **Figura 9** se observa que las secuencias ITS-A e ITS-C del individuo femenino de Hawái poseen el nucleótido C, mientras que las secuencias ITS-A e ITS-C del individuo masculino presentan el nucleótido T. Sin embargo, en este individuo se observan dos señales que se superponen en la posición polimórfica: la señal del nucleótido T (roja) y del nucleótido C (azul), sugiriendo una heterocigosis en esa posición. En la secuencia de ITS-A se observa que la señal del nucleótido T se ve un poco más alta que la señal del nucleótido C, y en la secuencia ITS-C las señales T y C se encuentran completamente superpuestas. Esto es representativo de lo que ocurre en las 20 muestras femeninas y 18 muestras masculinas de Hawái, donde las secuencias de ITS-A e ITS-C de las plantas femeninas presentan una señal de nucleótido C única, mientras que las secuencias de las plantas masculinas muestran señales de la misma altura de ambos nucleótidos.

Por otra parte, la muestra femenina china BQUCH0428 de la **Figura 9** posee el mismo perfil de heterocigoto T/C en la posición relativa 99 que el individuo masculino de Hawái. Esto es equivalente para otro de los 4 individuos de China (el individuo masculino BQUCH0430). En contraste, la muestra masculina china BQUCH431 tiene señales únicas del nucleótido C en la posición relativa 99, similar al otro individuo de esta región (muestra femenina BQUCH0429). Por lo tanto, independiente del sexo del individuo, en China existen individuos heterocigoto T/C, y homocigoto C en la posición relativa 99.

La **Figura 9** también indica que la muestra japonesa BQUCH0145 (femenina) posee una señal única del nucleótido C en la posición relativa 99 de las secuencias ITS-A e ITS-C. Esto es representativo de lo observado, independiente de su sexo, en el total de las cinco muestras de Japón, cinco muestras de Vietnam y 19 muestras de Taiwán.

Finalmente, la muestra BQUCH0116 de Oceanía Remota (planta femenina de Fiji) de la **Figura 9** tiene una señal única del nucleótido C en las secuencias ITS-A e ITS-C. Este resultado es representativo de las demás muestras de las islas del Pacífico, con excepción de Hawái.

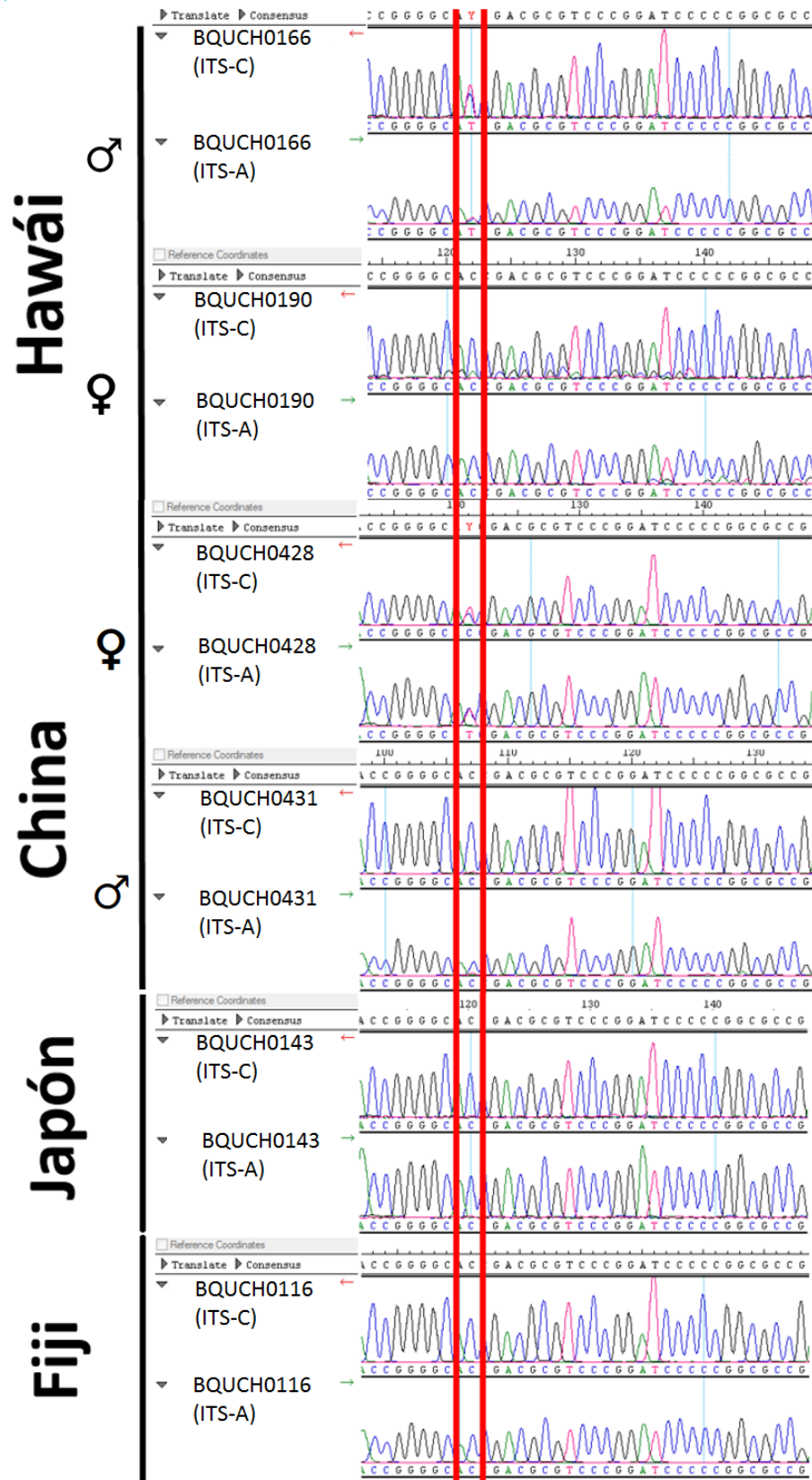


Figura 9: Comparación de SNP en la posición relativa 99 de las secuencias de ITS-1 de muestras de *B. papyrifera* de Hawái, China, Japón, y Fiji. Se comparan las secuencias de ITS-A e ITS-C de dos muestras de Hawái (BQUCH0166 ♂ y BQUCH0190 ♀), dos de China (BQUCH0428 ♀ y BQUCH0431 ♂), una muestra de Japón (BQUCH0145 ♀), y una muestra de Oceanía Remota Este, correspondiente a un individuo de Fiji (BQUCH0116 ♀). En el rectángulo rojo se señala el sitio polimórfico de interés.

5.2.1.2.3 Dendrograma del agrupamiento de las secuencias de ITS-1 de individuos de Asia y Oceanía Remota

Se construyeron dos dendrogramas integrando 8 muestras representativas de Asia y Oceanía Remota mediante los algoritmos UPGMA (**Figura 10**) y *Neighbor-Joining* (**Anexo III, Figura D**) del programa Mega 7.0.14. A continuación se muestra un ejemplo del dendrograma construido mediante el algoritmo UPGMA con tres individuos de Oceanía Remota y cinco individuos asiáticos:

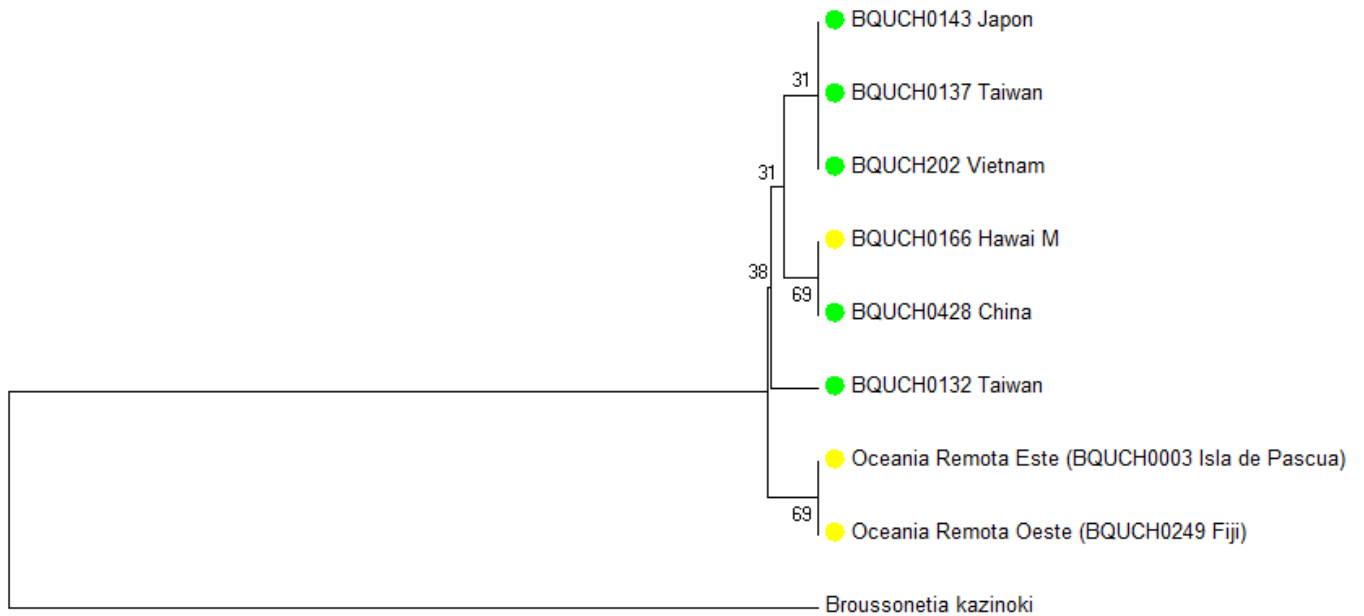


Figura 10: Dendrograma generado a partir del agrupamiento de las secuencias de ITS-1 de individuos de Asia y Oceanía Remota mediante UPGMA. En el análisis se incluyeron secuencias de ITS-1 de cinco muestras de Asia, una muestra de Oceanía Remota Oeste (perteneciente a Fiji), dos de Oceanía Remota Este (una perteneciente a Isla de Pascua y otra corresponde a una masculina de Hawái) y un individuo de *B. kazinoki* control externo. La muestra de Fiji es representativa de las 162 muestras de Oceanía Remota Oeste y la muestra de Isla de Pascua es representativa de los 110 individuos de Oceanía Remota Este. En cada nodo se adjunta el valor de *bootstrapping* correspondiente a 10.000 permutaciones. Los puntos verdes corresponden a las muestras de Asia y los puntos amarillos a las muestras de Oceanía Remota.

Se observa en el dendrograma de la **Figura 10** que 2 de las 3 muestras de morera de papel de Oceanía Remota (*bootstrapping* de 69%) agrupan en una rama distinta que las cinco muestras asiáticas y la muestra masculina proveniente de Hawái. Las muestras de Oceanía Remota presentan la variante polinésica T en la posición 203, mientras que las muestras asiáticas y la muestra masculina de Hawái tienen la variante G en la posición descrita. Además, este grupo asiático tiene tres subramas: una compuesta por la muestra BQUCH0132 de Taiwán (*bootstrapping* de 38%), otra conformada la muestra masculina de Hawái y BQUCH0428 de China (*bootstrapping* de 31%) y la última está compuesta por las muestras BQUCH0143 de Japón, BQUCH0202 de Vietnam y BQUCH0137 de Taiwán (*bootstrapping* de 31%). La muestra BQUCH0132 presenta la variante C en la posición relativa 111, mientras que el resto de las muestras poseen

la variante G en aquella misma posición, tal como han descrito Seelenfreund y cols. (2011). A continuación, se observa que las secuencias de ITS-1 de la muestra masculina de Hawái agrupa con la muestra china en una subrama distinta de las muestras de Taiwán, Vietnam y Japón. Esto se debe a que, como se describió anteriormente, al comparar los electroferogramas de la **Figura 10**, se observó que los individuos masculinos de Hawái y el individuo de China son heterocigotos en la posición relativa 99 de la secuencia de ITS-1, mientras que los individuos de Japón, Vietnam, Taiwán y Oceanía Remota presentan la variante C de este polimorfismo.

5.2.2 Análisis de la diversidad genética de individuos de *B. papyrifera* mediante el marcador de sexo

5.2.2.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste

5.2.2.1.1 Amplificación del marcador de sexo

Se caracterizó el sexo de las 120 muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste mediante un marcador molecular de sexo. Los amplicones obtenidos a partir del PCR dúplex *Male Marker* se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. En cada ensayo se incluyeron como controles una muestra masculina, la que presenta bandas de 425 pb y 271 pb, y una muestra femenina, que presenta una sola banda de 425 pb.

La **Figura 11** presenta a modo de ejemplo el perfil de electroforesis con el resultado de la tipificación de sexo de 14 individuos de cuatro islas de Oceanía Remota Oeste. Se aprecia que el control masculino presenta dos bandas, una de alrededor de 500 pb y otra de alrededor de 300 pb, mientras que el control femenino presenta sólo una banda de alrededor de 500 pb. En las 14 muestras provenientes de Oceanía Remota Oeste se observa la presencia de una banda de aproximadamente 500 pb, tal como en el control femenino. Este resultado es representativo para las 106 muestras restantes de Oceanía Remota Oeste. Por lo tanto, las 120 muestras de Oceanía Remota son de sexo femenino.

En la **Figura 11** además se observa que la intensidad de amplificación fue variable. La muestra BQUCH0442 (carril 4, Nueva Caledonia) presenta una banda de aproximadamente 500 pb muy débil en comparación con las bandas del mismo tamaño de las muestras BQUCH0277 (carril 8, Fiji) y BQUCH0268 (carril 12, Wallis). Este no fue el caso para las muestras que correspondieron a los controles de sexo, las que siempre presentaron bandas intensas. A pesar de la intensidad variable de las muestras, la visualización de los amplicones de las 120 muestras de esta tesis no se vio afectada, debido a que los amplicones eran visibles y comparables con los controles de sexo. Hay que destacar que este análisis se hizo en duplicado, obteniendo siempre el mismo resultado.

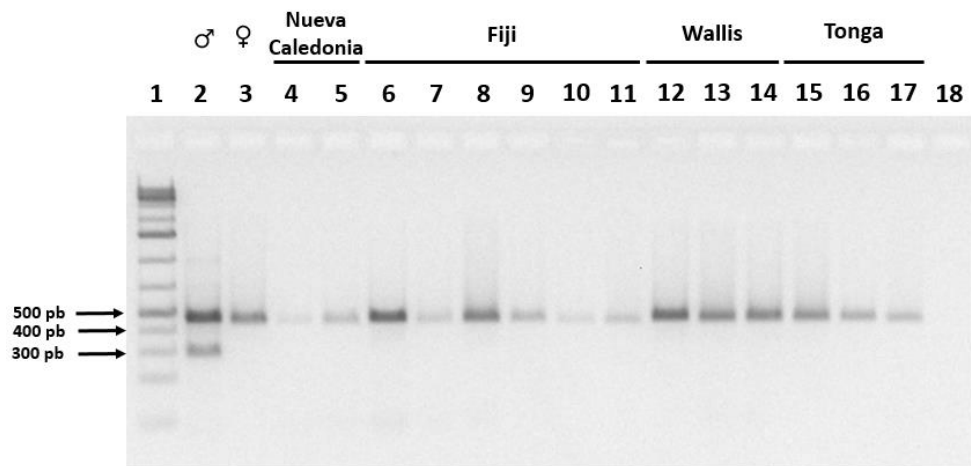


Figura 11: Amplificación de la región *Male Marker* de 14 muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X. El orden de carga es el siguiente: carril 1: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 2: control masculino (BQUCH00137 de Taiwán), carril 3: control femenino (BQUCH0139 de Taiwán), carril 4: BQUCH0442 (Nueva Caledonia), carril 5: BQUCH0444 (Nueva Caledonia), carril 6: BQUCH0246 (Fiji), carril 7: BQUCH0265 (Fiji), carril 8: BQUCH0277 (Fiji), carril 9: BQUCH0315 (Fiji), carril 10: BQUCH0320 (Fiji), carril 11: BQUCH0326 (Fiji), carril 12: BQUCH0268 (Wallis), carril 13: BQUCH0271 (Wallis), carril 14: BQUCH0332 (Wallis), carril 15: BQUCH0360 (Tonga), carril 16: BQUCH0363 (Tonga), carril 17: BQUCH0370 (Tonga), carril 18: control negativo de amplificación.

Adicionalmente, los controles negativos de extracción se amplificaron utilizando tres diluciones (1/8, 1/4 y directo de la extracción). Ninguno de los controles negativos de extracción amplificó, por lo que las soluciones de extracción de ADN se encuentran libres de ADN que pudiese alterar la interpretación del resultado de la electroforesis en geles de agarosa (ver **Anexo IV, Figura E**).

5.2.2.2 Integración del análisis de la diversidad genética identificada mediante el marcador de sexo en Oceanía Remota Oeste con estudios previos en Asia y Oceanía Remota Este

5.2.2.2.1 Distribución del sexo de individuos de *B. papyrifera* en Asia y Oceanía Remota

En la **Tabla 7** se muestra los resultados del análisis con el marcador de sexo de las 323 muestras contemporáneas de morera de papel de Asia y Oceanía Remota. En las 33 muestras del rango nativo se observa la presencia de ambos sexos. Cabe destacar que la relación del número de individuos masculinos y femeninos en Asia es similar en todas las localidades muestreadas. Por otra parte, en el rango introducido (Oceanía Remota), 272 muestras son exclusivamente de sexo femenino, representativas de diversas islas de Oceanía Remota, a excepción de Hawái. En el caso de Hawái, del total de 38 muestras analizadas, 20 plantas son femeninas y 18 masculinas (Peñailillo y cols., 2016). Los resultados del análisis de las 120

muestras de esta tesis confirman lo observado previamente en Oceanía Remota Oeste con un número más reducido de individuos (Peñailillo y cols., 2016).

Tabla 7: Distribución de sexo de individuos de *B. papyrifera* en Oceanía Remota y Asia

	Localidad	N° ♀	N° ♂	Total
Asia (Rango nativo)	China	2	2	4
	Japón	3	2	5
	Taiwán	8	11	19
	Vietnam	2	3	5
Oceanía Remota (Rango introducido)	Nueva Caledonia	3	0	3
	Fiji	75	0	75
	Wallis	13	0	13
	Tonga	52	0	52
	Samoa	19	0	19
	Tahití	6	0	6
	Raitea	1	0	1
	Marquesas	13	0	13
	Rapa	2	0	2
	Pitcairn	6	0	6
	Isla de Pascua	62	0	62
	Hawái	20	18	38

El mapa de la **Figura 12** presenta la distribución del sexo de las 323 plantas de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota en relación a su ubicación geográfica. Se observa la presencia de ambos sexos en el rango nativo y la presencia exclusiva de individuos femeninos en Oceanía Remota, a excepción de Hawái, donde se encuentran individuos femeninos y masculinos.

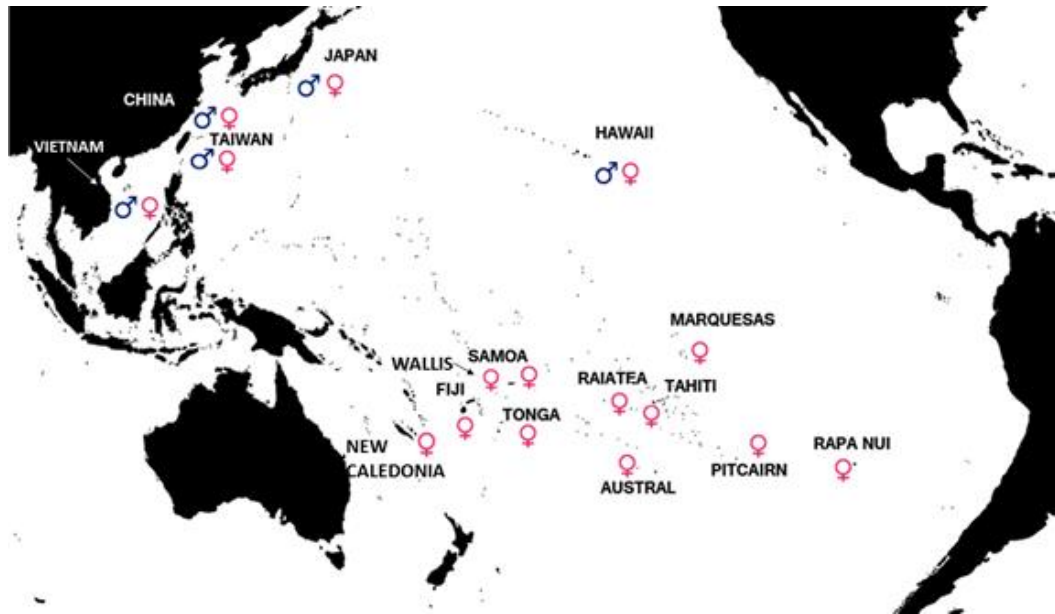


Figura 12: Mapa de la distribución de sexo de individuos contemporáneos de *B. papyrifera* en Asia y Oceanía Remota. Las plantas masculinas se representan con el signo del sexo masculino en color azul y las plantas femeninas con el signo femenino en color rosado.

5.2.3 Análisis de la diversidad genética de individuos de *B. papyrifera* mediante 10 marcadores de microsatélites (SSR)

5.2.3.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste

5.2.3.1.1 Amplificación de 10 marcadores de SSR

Se analizaron las 120 muestras de *B. papyrifera* provenientes de Oceanía Remota Oeste mediante la amplificación de 10 SSR de los 49 SSR para *B. papyrifera* disponibles en nuestro laboratorio. Los SSR seleccionados fueron Bro 07, Bro 08, Bro 13, Bro 15, Bropap_02214, Bropap_02801, Bropap_20558, Bropap_25444, Bropap_26985 y Bropap_30248. Estos marcadores se eligieron debido a que se encuentran estandarizados, amplifican fácilmente y se ha reportado que son los SSR más informativos en análisis previos de 123 individuos de morera de papel de Oceanía Remota Este y en un número reducido de individuos de Oceanía Remota Oeste (Peñailillo, 2014).

En todas las reacciones de PCR se incluyó al menos una muestra previamente analizada de Oceanía Remota Este como control positivo de amplificación y control para la asignación de alelos de SSR.

A modo de ejemplo, en la **Figura 13** se muestra un gel de agarosa al 1,5% con 18 reacciones de PCR de Bropap_25444. De ellas, 15 reacciones corresponden a amplificaciones de ADN de individuos de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste, un control positivo (BQUCH0126) y dos controles negativos de amplificación. Se observa que las muestras BQUCH0292 (carril 12, Fiji) y BQUCH0293 (carril 13, Fiji) no

amplificaron. En el caso del marcador Bropap_25444, un total de 21 muestras no amplificaron o tenían bandas muy débiles en el gel de agarosa al 1,5%. Estas muestras se denominaron muestras problemáticas.

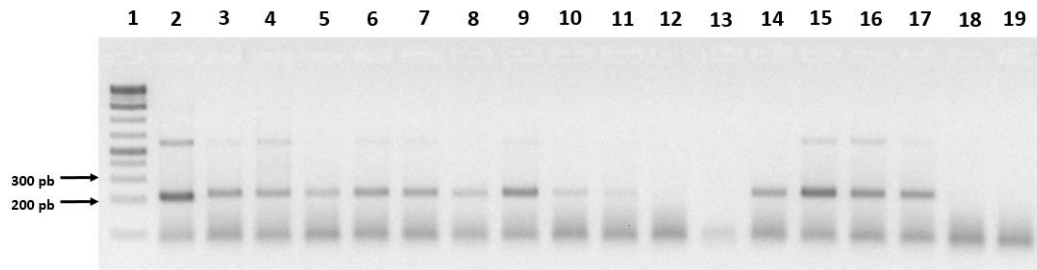


Figura 13: Amplificación de 18 muestras con el marcador Bropap_25444. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X. El orden de carga es el siguiente: carril 1: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 2: control positivo (BQUCH0012 de Isla de Pascua), carril 3: BQUCH0283 (Fiji), carril 4: BQUCH0284 (Fiji), carril 5: BQUCH0285 (Fiji), carril 6: BQUCH0286 (Fiji), carril 7: BQUCH0287 (Fiji), carril 8: BQUCH0288 (Fiji), carril 9: BQUCH0289, carril 10: BQUCH0290 (Fiji), carril 11: BQUCH0291 (Fiji), carril 12: BQUCH0292 (Fiji), carril 13: BQUCH0293 (Fiji), carril 14: BQUCH0294 (Fiji), carril 15: BQUCH0296 (Fiji), carril 17: BQUCH0297 (Fiji), carril 18: control negativo de amplificación N°1 y carril 19: control negativo de amplificación N°2. Esta electroforesis corresponde a una PCR de una placa de 96 reacciones, por lo que para el análisis de las 120 muestras se hicieron dos mezclas de reacción de PCR y cada una tiene su control negativo de amplificación correspondiente.

Se repitió la reacción de PCR de las muestras problemáticas, añadiendo BSA a la mezcla de reacción. Esto se repitió para todas las muestras que no amplificaron o amplificaron débilmente con los marcadores restantes (**Figura 14**).

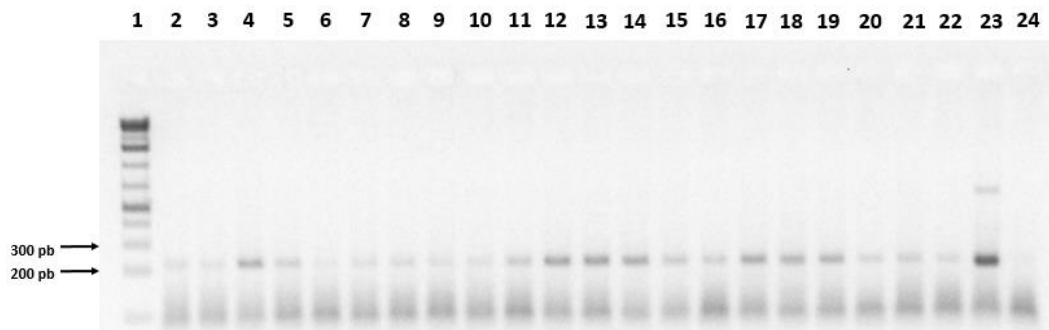


Figura 14: Amplificación de las muestras problemáticas del marcador Bropap_25444 con BSA en el mix de reacción de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X. El orden de carga es el siguiente: carril 1: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 2: BQUCH0274 (Wallis), carril 3: BQUCH0291 (Fiji), carril 4: BQUCH0292 (Fiji), carril 5: BQUCH0315 (Fiji), carril 6: BQUCH0323 (Fiji), carril 7: BQUCH0324 (Fiji), carril 8: BQUCH0326 (Fiji), carril 9: BQUCH0327 (Fiji), carril 10: BQUCH0328 (Wallis), carril 11: BQUCH0330 (Wallis), carril 12: BQUCH0340 (Tonga), carril 13: BQUCH0345 (Tonga), carril 14: BQUCH0351 (Tonga), carril 15: BQUCH0352 (Tonga), carril 16: BQUCH0353 (Tonga), carril 17: BQUCH0364 (Tonga), carril 18: BQUCH0365 (Tonga), carril 19: BQUCH0366 (Tonga), carril 20: BQUCH0368 (Tonga), carril 21: BQUCH0433 (muestra de Tahití, Oceanía Remota Este, que no se utilizó en el Objetivo 1 de este trabajo), carril 22: BQUCH0444 (Nueva Caledonia), carril 23: control positivo (BQUCH0012 de Isla de Pascua) y carril 24: control negativo de amplificación.

En la **Figura 14** se observa que la repetición de la reacción de PCR del mismo marcador Bropap_25444 con BSA fue exitosa para todas las muestras problemáticas. Hay que destacar que la incorporación de BSA en el ensayo permitió la amplificación exitosa de la totalidad de las muestras problemáticas de cada marcador, por lo que finalmente las 120 muestras de morera de papel de Oceanía Remota Oeste amplificaron con los diez marcadores seleccionados.

Por otra parte, es importante señalar que los controles negativos de extracción se amplificaron utilizando tres diluciones (1/8, 1/4 y directo de la extracción). Ninguno de los controles negativos de extracción amplificó, por lo que las soluciones de extracción de ADN se encuentran libres de ADN foráneo (en el **Anexo V, Figura F** se muestra la amplificación de los controles negativos de extracción con el SSR Bro 13).

5.2.3.1.2 Análisis de alelos y genotipos obtenidos mediante 10 SSR

El análisis de los electroferogramas y detección de los alelos obtenidos de la electroforesis capilar se realizó utilizando el programa Peak Scanner v1.0. En la **Figura 15** se presenta a modo de ejemplo la visualización y asignación de los alelos en los electroferogramas.

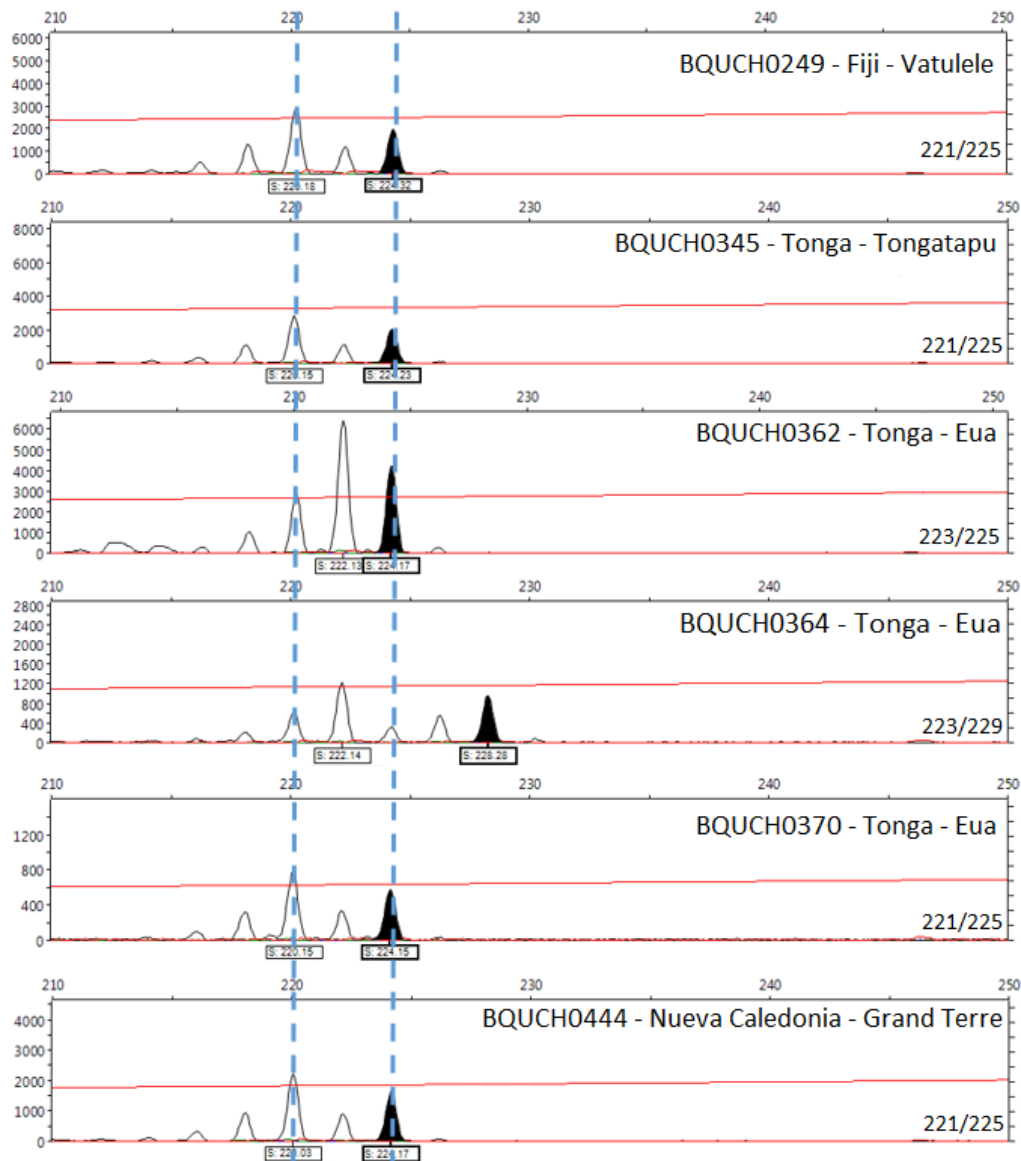


Figura 15: Electroferogramas del marcador Bro 08 en muestras seleccionadas de Oceanía Remota Oeste. Imágenes adaptadas de electroferogramas obtenidos mediante el programa Peak Scanner v1.0. Los seis electroferogramas muestran los alelos identificados en seis muestras de esta tesis. Se señala el código identificador, localidad de origen y genotipo identificado de cada muestra en el electroferograma correspondiente. Las señales identificadas como alelos poseen un recuadro que señala sus tamaños y la señal en negro corresponde al alelo de mayor tamaño.

La **Figura 15** presenta los electroferogramas obtenidos con la amplificación del marcador Bro 08 para las muestras BQUCH0249 (isla Vatulele de Fiji), BQUCH0345 (Tongatapu de Tonga), BQUCH0370 (Eua de Tonga), BQUCH0362 (Eua de Tonga) y BQUCH0444 (Grand Terre de Nueva Caledonia). Se utilizaron los valores de alelos y la migración de los controles positivos de amplificación (muestras previamente analizadas de Oceanía Remota Este) para identificar las señales correspondientes a alelos. Las líneas azules muestran la posición de los alelos más comunes en Oceanía Remota para este marcador, de acuerdo a análisis previos en Oceanía Remota Este, siendo éstos los alelos 221 y 225. Se observa que las muestras

BQUCH0249, BQUCH0345, BQUCH0370 y BQUCH0444 poseen los alelos mayoritarios para este marcador.

Se observa además en la **Figura 15** que dos muestras de la isla Eua de Tonga poseen señales con una migración distinta. La muestra BQUCH0364 presenta los alelos 223 y 229, mientras que la muestra BQUCH0362 posee los alelos 223 y 225. El genotipo 223/229 sólo se observó en la muestra BQUCH0364, mientras que el genotipo 223/225 se encontró en ocho muestras de Eua. Las señales de estos alelos poseen la misma forma y patrón de migración que los alelos comunes, por lo que se consideran como verídicos los nuevos alelos identificados en las nueve muestras de Eua.

Los genotipos identificados con los 10 SSR para las 120 muestras de *B. papyrifera* de Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga se encuentran disponibles en el **Anexo V, Tabla III**. Al realizar un análisis de coincidencias *multilocus* para datos codominantes con GeneA1Ex 6.501 en las 120 muestras se identifican 30 alelos en total y 13 combinaciones diferentes de alelos por marcador (“genotipos”).

Tabla 8: Tabla de 13 genotipos encontrados en las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste con 10 SSR

Localidad	G	N	Bro 07	Bro 08	Bro 13	Bro 15	Bropap 02214	Bropap 02801	Bropap 20558	Bropap 25444	Bropap 26985	Bropap 30248	
N. Caledonia	G1	1	248/248	221/225	245/245	229/233	262/268	168/199	236/240	203/205	196/201	112/112	
N. Caledonia	G2	2	248/248	221/225	245/245	229/233	262/268	168/199	236/240	205/207	196/201	112/112	
Fiji, Tonga	G3	87	64 (Fj)	248/248	221/225	245/245	229/233	262/268	168/191	236/240	203/205	196/201	112/112
			23 (Tg)										
Fiji	G4	1	248/250	221/225	245/245	229/233	262/270	168/191	236/243	203/205	196/201	112/112	
Fiji	G5	1	248/248	221/225	245/245	229/233	262/268	168/189	236/240	203/205	196/201	112/112	
Fiji	G6	1	248/248	221/225	245/245	229/233	260/272	168/189	236/240	203/205	196/201	112/112	
Fiji	G7	1	248/248	221/225	245/245	229/233	266/270	168/189	236/240	195/205	196/201	112/112	
Fiji	G8	2	248/248	221/225	245/245	229/233	266/270	168/189	236/243	195/205	196/201	112/112	
Fiji	G9	1	248/250	221/225	245/245	229/233	262/268	168/191	236/240	203/205	196/201	112/112	
Wallis	G10	13	248/248	221/225	245/245	229/233	262/268	168/191	236/240	203/205	196/199	112/112	
Tonga	G11	8	248/248	223/225	245/245	229/233	262/268	168/191	236/240	203/205	196/201	112/112	
Tonga	G12	1	248/248	223/229	245/245	229/233	262/268	168/191	236/240	203/205	196/201	112/112	
Tonga	G13	1	248/248	221/225	245/245	229/240	262/268	168/189	236/240	203/205	196/201	112/112	
N° total	13	120	2	3	1	2	4	3	2	3	2	1	

G: Genotipos, N: Número de individuos. Los genotipos de cada marcador que varían respecto al genotipo mayoritario en Oceanía Remota Oeste, se encuentran destacados en negrita.

En la **Tabla 8** se observa que Fiji es la isla con más genotipos de *B. papyrifera* de los cuatro grupos de islas analizadas, de los cuales seis son exclusivos de este archipiélago y uno es compartido con Tonga. El genotipo compartido corresponde a los genotipos mayoritarios tanto de Fiji como de Tonga. Es importante señalar que el genotipo mayoritario se encuentra presente en todas las islas de Fiji, mientras que el resto de los genotipos se observaron en un número reducido de muestras pertenecientes a Taveuni, Vanua Levu y Viti Levu. En la isla de Vatulele sólo se encontró el genotipo mayoritario.

Finalmente, los 13 individuos de Wallis poseen un único genotipo que es particular de esta isla. Los tres individuos de Nueva Caledonia poseen dos genotipos que también son particulares de este lugar.

La **Tabla 8** presenta además el número de genotipos totales identificados con cada marcador. El marcador Bropap_02214 es el más informativo, ya que entregó cuatro genotipos diferentes en los 120

individuos analizados. El genotipo mayoritario es 262/268, el cual corresponde al genotipo mayoritario de Fiji y está presente en todos los individuos de Nueva Caledonia, Wallis y Tonga. Los tres genotipos restantes identificados con este marcador se encuentran en muestras de Fiji, de las islas Vanua Levu (tres muestras) y Taveuni (dos muestras).

Por otra parte, de los cuatro genotipos de Tonga, tres son exclusivos de los archipiélagos analizados de este país. El genotipo mayoritario (G3) se encuentra en dos de las tres islas muestreadas (Tongatapu y Vava'u). Sorprendentemente, los genotipos G4, G5 y G4 se identificaron exclusivamente en las muestras pertenecientes a la isla de Eua, una isla pequeña vecina de la isla principal de Tonga, Tongatapu. Hay que destacar que estas muestras presentan además genotipos exclusivos de esta región con los marcadores Bro 08 y Bro 15, como se observa en la **Tabla 8**.

Se muestra también que los marcadores Bro 13 y Bropap_30248 son monomórficos en los 120 individuos analizados. Estos marcadores se podrían considerar como los marcadores menos informativos para *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste. De este modo, ocho SSR son suficientes para identificar los 13 genotipos de la morera de papel encontrados en Oceanía Remota Oeste.

5.2.3.2 Integración del análisis de la diversidad genética identificada mediante 10 SSR en Oceanía Remota Oeste con estudios previos en Asia y Oceanía Remota Este

5.2.3.2.1 Comparación del número de alelos encontrados en Asia y Oceanía Remota

Tabla 9: Alelos identificados en individuos de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota mediante el análisis de 10 marcadores SSR

Marcador	Rango de tamaño alélico (pb)	N° de alelos observados				
		Total	Asia	Oceanía Remota	Compartidos	AEOR
Bro 07	200 - 295	22	21	4	3	1
Bro 08	205 - 239	17	17	6	6	0
Bro 13	239 - 250	9	9	3	3	0
Bro 15	166 - 240	10	8	3	1	2
Bropap_02214	239 - 274	17	16	9	8	1
Bropap_02801	158 - 199	11	8	7	4	3
Bropap_20558	236 - 243	6	5	4	3	1
Bropap_25444	176 - 274	24	22	7	5	2
Bropap_26985	194 - 244	6	6	4	3	1
Bropap_30248	102 - 175	25	24	5	4	1
Total		147	136	52	40	12

AEOR: Alelos Exclusivos de Oceanía Remota.

Los resultados obtenidos del análisis focalizado de las 120 muestras de Oceanía Remota mediante 10 SSR se integraron con los resultados anteriores de 33 individuos asiáticos, 38 de Oceanía Remota Oeste y 123 de Oceanía Remota Este (Peñailillo, 2014). Se calculó el número de alelos de los 314 individuos,

mediante el programa GeneA1Ex 6.501. Mediante este análisis, se identificaron un total de 147 alelos, presentados en la **Tabla 9**. De ellos, 136 alelos se identificaron en las 33 muestras asiáticas analizadas, mientras que en Oceanía Remota se encontraron 52 alelos diferentes en un total de 281 individuos. De estos alelos, 40 son compartidos con Asia y sólo 12 fueron exclusivos de la población de Oceanía Remota.

5.2.3.2.2 Comparación del número de alelos encontrados en Oceanía Remota Oeste y Este

Posteriormente, se comparó el número de alelos de Oceanía Remota Oeste y Este. En la **Tabla 10** se presentan los alelos encontrados para cada región junto al número de alelos compartidos. Entre los 158 individuos de Oceanía Remota Oeste se identificaron en total 34 alelos, mientras que entre los 123 individuos de Oceanía Remota Este se identificó un total de 48 alelos. Al comparar los alelos exclusivos de cada región, se observa que 28 alelos son compartidos, 6 alelos son exclusivos de Oceanía Remota Oeste y 20 son exclusivos de Oceanía Remota Este.

Tabla 10: Alelos identificados en individuos de morera de papel de Oceanía Remota Oeste y Oceanía Remota Este mediante el análisis de 10 marcadores SSR

Marcador	Rango de tamaño alélico (pb)	N° de alelos observados					
		Total	Parte Oeste	Parte Este	Compartidos	AEORO	AEORE
Bro 07	246 – 279	4	3	4	3	0	1
Bro 08	217 – 229	6	5	5	4	1	1
Bro 13	239 – 245	3	1	3	1	0	2
Bro 15	229 – 240	5	3	5	3	0	2
Bropap_02214	250 – 272	9	6	9	6	0	3
Bropap_02801	158 – 199	7	4	6	3	1	3
Bropap_20558	236 – 243	4	3	3	2	1	1
Bropap_25444	190 – 272	7	4	5	2	2	3
Bropap_26985	190 – 217	4	3	4	3	0	1
Bropap_30248	108 – 144	5	2	4	1	1	3
Total		54	34	48	28	6	20

AEORO: Alelos Exclusivos de Oceanía Remota Oeste, AEORE: Alelos Exclusivos de la Oceanía Remota Este.

Hay que recordar que en Hawái existe una historia reciente distinta de *B. papyrifera* que incide en la diversidad genética encontrada. Mediante el análisis de los marcadores ITS-1 y de sexo, se observó previamente que en Hawái existen dos poblaciones genéticamente distintas de morera de papel: los individuos femeninos poseen un perfil genético de Oceanía Remota y los individuos masculinos presentan un perfil genético asiático. Los análisis previos con SSR en Hawái además confirmaron que la población de individuos masculinos hawaianos es genéticamente más similar a los individuos asiáticos que a los de las islas del Pacífico (Peñailillo, 2014). Al considerar estos antecedentes, el número de alelos encontrados en Oceanía Remota Este se encuentra sobreestimado con respecto a los de Oceanía Remota Oeste, debido a los alelos proporcionados por los individuos masculinos de Hawái.

En consecuencia, se repitió el análisis de número de alelos totales, eliminando los 18 individuos masculinos de Hawái. El resultado de este análisis se presenta en la **Tabla 11**. Se identificaron 39 alelos en total para los 158 individuos de Oceanía Remota Oeste y los 105 de Oceanía Remota Este, sin considerar los individuos masculinos de Hawái. De estos alelos, 27 son compartidos y seis son exclusivos de cada región. Adicionalmente, se observa que el número total de alelos exclusivos de Oceanía Remota Este al eliminar los 18 individuos masculinos de Hawái, disminuye de 48 a seis alelos totales.

Tabla 11: Alelos identificados en individuos de morera de papel de Oceanía Remota Oeste y Este (sin individuos masculinos hawaianos) mediante el análisis de 10 marcadores SSR

Marcador	Rango de tamaño alélico (pb)	N° de alelos observados					
		Total	OR Oeste	OR Este	Compartidos	AEORO	AEORE
Bro 07	246- 250	3	2	3	2	0	1
Bro 08	217 – 229	6	5	5	4	1	1
Bro 13	245	1	1	1	1	0	0
Bro 15	229 – 240	4	3	4	3	0	1
Bropap_02214	260 – 272	6	6	6	6	0	0
Bropap_02801	168 – 199	5	4	4	3	1	1
Bropap_20558	236 – 243	3	3	2	2	1	0
Bropap_25444	195 – 209	5	4	3	2	2	1
Bropap_26985	194 – 201	4	3	4	3	0	1
Bropap_30248	112 - 114	2	2	1	1	1	0
Total		39	33	33	27	6	6

AEORO: Alelos Exclusivos de Oceanía Remota Oeste, AEORE: Alelos Exclusivos de Oceanía Remota Este.

5.2.3.2.3 Identificación de genotipos en Asia, Oceanía Remota Oeste y Este

Al analizar el número de genotipos identificados en las 314 muestras de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota con los 10 SSR, se encontró un total de 67 genotipos diferentes. En la región asiática se diferenciaron 32 genotipos para los 33 individuos estudiados, con dos muestras de Taiwán que presentaron genotipos idénticos. Por otra parte, se identificaron en total 35 genotipos diferentes en las 281 muestras analizadas de las 15 localidades de Oceanía Remota. El detalle del número de muestras y los alelos que presentan cada genotipo identificado en Asia y Oceanía Remota se encuentra disponible en el **Anexo V, Tabla IV**.

A continuación, la **Tabla 12** presenta un resumen del número de genotipos identificados en Asia y Oceanía Remota, detallando el número y los genotipos exclusivos y compartidos entre las localidades.

Tabla 12: Número total de genotipos de morera de papel identificados en Asia y Oceanía Remota

		Localidad		N° de Genotipos				
				Total	Exclusivos	Compartidos		Diferentes*
Asia	China		4	4	0		32	
	Japón		5	5	0			
	Taiwán		18	18	0			
	Vietnam		5	5	0			
Oceanía Remota	Oeste	Nueva Caledonia		2	2	0		21
		Fiji		7	5	2	G1 con Tonga y G13 con Pitcairn	
		Wallis		1	0	1	G5 con Samoa	
		Tonga		7	3	4	G1 con Fiji, G3 con Hawái, G14 con Hawái y Marquesas y G23 con Hawái	
		Samoa		4	3	1	G5 con Wallis	
	Este	Rapa		1	1	0		17
		Tahití		3	2	1	G33 con Marquesas	
		Marquesas		3	0	3	G14 con Hawái y Tonga, G18 con Isla de Pascua y G33 con Tahití	
		Raiatea		1	1	0		
		Pitcairn		1	0	1	G13 con Fiji	
		Isla de Pascua		6	5	1	G18 con Marquesas	
		Hawái	♀	8	5	2	3	
♂	3		3		0			

* = Número de genotipos diferentes en cada región, considerando como un solo genotipo a los genotipos compartidos entre localidades de la misma región.

Respecto a los genotipos identificados en Oceanía Remota, se observa en la **Tabla 12** que se encontraron 21 genotipos diferentes en Oceanía Remota Oeste y 17 genotipos diferentes en Oceanía Remota Este (sin contar los genotipos de los individuos masculinos de Hawái). Es importante señalar que la suma de los genotipos diferentes en cada una de estas dos regiones no suman el total de 32 genotipos identificados en el Pacífico (sin contar los tres genotipos de los individuos masculinos de Hawái), puesto que hay genotipos que se encuentran tanto en islas de Oceanía Remota Oeste como de Oceanía Remota Este.

Las localidades de Oceanía Remota Oeste con mayor número de genotipos exclusivos corresponden a Tonga y Fiji (cinco genotipos cada una), mientras que la isla con mayor número de genotipos exclusivos en Oceanía Remota Este es Isla de Pascua (cinco genotipos). Por otra parte, es importante destacar que la localidad con un mayor número de genotipos compartidos es Tonga (cuatro genotipos), la cual comparte tres genotipos con Hawái.

5.2.3.2.4 Test de Wilcoxon para determinar la existencia de cuellos de botella

Posteriormente, se analizó la probabilidad de encontrar cuellos de botella genéticos en las poblaciones de *B. papyrifera*, mediante el test de Wilcoxon para los modelos mutacionales IAM (modelo mutacional de

alelos infinitos) y SMM (modelo mutacional por pasos) (Cournet y Luikartt, 1996; Piry y cols., 1999). Este análisis no se realizó en las poblaciones de Rapa y Raiatea debido al bajo número de muestras.

Tabla 13: Significancias del análisis de cuellos de botella de acuerdo a los modelos IAM y SMM

Población	Test de Wilcoxon	
	IAM	SMM
China	0,37500	0,67578
Japón	0,93750	0,46875
Taiwán	0,49219	0,62500
Vietnam	0,92188	0,27539
N. Caledonia	0,00781	0,00781
Fiji	0,03906	0,74219
Wallis	0,00781	0,00781
Tonga	0,01172	0,25000
Samoa	0,00781	0,01953
Tahití	0,00781	0,01562
Marquesas	0,00781	0,00781
Isla de Pascua	0,00781	0,03906
Hawái	0,00010	0,01367

Valores de IAM y SMM corresponden al p (valor de significancia) de cada modelo. El valor $p \geq 0,05$ no es significativo. En negrita se identifican las poblaciones en las cuales no se identificaron cuellos de botella genéticos.

En la **Tabla 13** se presentan los valores p obtenidos en la comparación de la distribución de la heterocigosidad esperada mediante los modelos de IAM y SMM con la distribución de heterocigosidad real de los individuos de las 13 localidades analizadas. El test de Wilcoxon considera como hipótesis basal que las poblaciones analizadas no poseen cuellos de botella detectables, por lo que considera que toda desviación de la distribución de heterocigosidad analizada mediante ambos modelos mutacionales con la distribución real, no es significativa ($p \geq 0,05$) y, por ende, la población no presentaría cuello de botella. Se observa en la **Tabla 13** que los valores $p \geq 0,05$ en las localidades de la región asiática indican ausencia de cuellos de botella. Por otra parte, la presencia de cuellos de botella fue estadísticamente significativa para todas las islas del Pacífico de acuerdo a los modelos de AIM y SMM. No obstante, el análisis en Fiji y Tonga sólo fue estadísticamente significativo de acuerdo al modelo IAM. Esto indicaría la ausencia de cuellos de botella en estas islas mediante el modelo SMM (**Tabla 13**).

5.2.3.2.5 Análisis bayesiano de estructura de poblaciones

Se calculó el número real estimado de conglomerados genéticos (K) en las 314 muestras de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota analizadas, mediante un análisis bayesiano según el modelo de mezclas del programa Structure 2.3.4. Este modelo simula que los individuos tienen múltiples orígenes

poblacionales, calculando su proporción de pertenencia a cada conglomerado genético. Se identificaron dos conglomerados genéticos con este análisis (**Figura 16A**).

Al comparar la distribución de los conglomerados genéticos (*cluster*) en las poblaciones de cada localidad (**Figura 16B**), se observa la repartición de un conglomerado genético mayormente en la región asiática (color verde) y otro conglomerado presente mayoritariamente en Oceanía Remota (color rojo). Es de interés resaltar que sólo Taiwán (población 2) y Hawái (población 16) presentan la coexistencia de ambos conglomerados genéticos. Estos resultados sugieren que la morera de papel de Taiwán sería la población asiática con mayor similitud genética a la de Oceanía Remota, ya que esos individuos poseen una mezcla de ambos conglomerados genéticos. Por otro lado, la población de *B. papyrifera* de Hawái presenta individuos de ambos conglomerados genéticos. No obstante, no existe una mezcla significativa de los conglomerados dentro de un mismo individuo. Los individuos con el conglomerado de color rojo corresponden exclusivamente a los femeninos y con el conglomerado verde sólo incluye a los individuos masculinos de Hawái, revelando una estructura genética muy diferente en la población de *B. papyrifera* que en Taiwán.

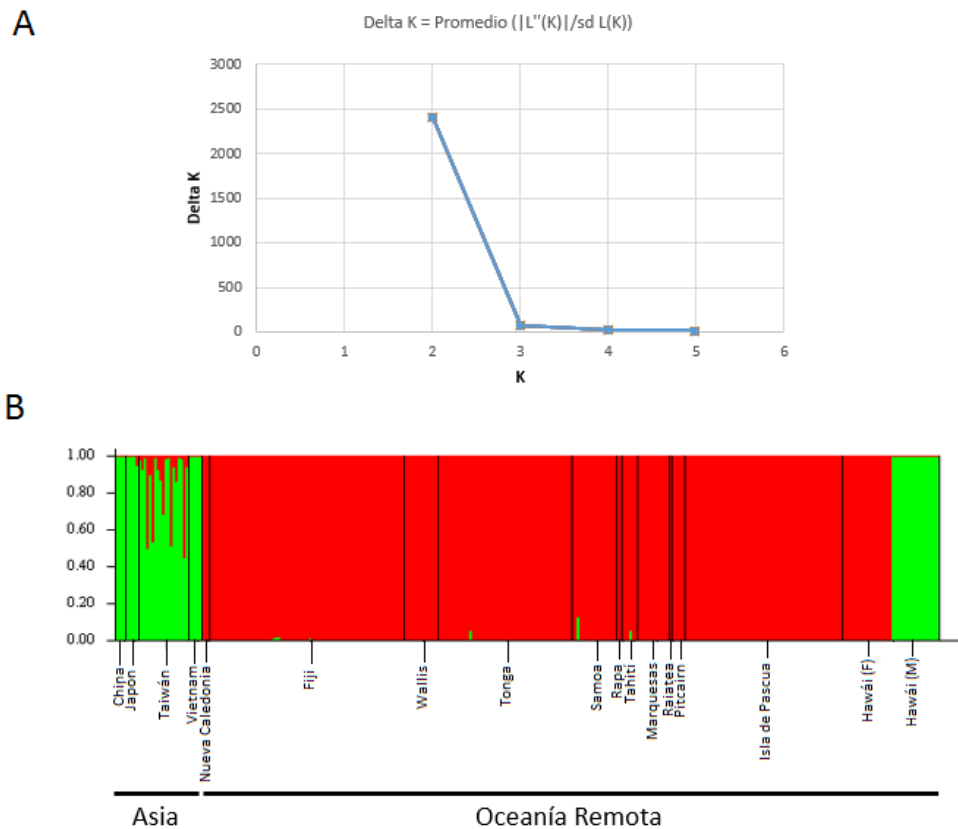


Figura 16: Análisis bayesiano de estructura de poblaciones.

A. Estimación del valor K real estimado sobre 20 replicaciones para cada valor K evaluado.

B. Gráfico de barras de las distribuciones de los conglomerados genéticos identificados en cada localidad.

5.2.3.2.6 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

Posteriormente, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para examinar espacialmente las variaciones entre los 67 genotipos de morera de papel de Asia y Oceanía Remota. Este análisis mostró que los genotipos polinésicos se sitúan de manera aglomerada al lado izquierdo, mientras que los genotipos asiáticos junto con los tres genotipos de las muestras masculinas de Hawái poseen una gran distribución espacial al lado derecho (**Figura 17A**).

Se realizó un segundo análisis de PCoA (**Figura 17B**) con los 32 genotipos identificados de Oceanía Remota, excluyendo los tres genotipos de los individuos masculinos hawaianos. En éste se observa la distribución de los genotipos de Oceanía Remota en tres grupos: el Grupo 1 (señalado con color verde) se ubica en el lado derecho de la matriz, conformado principalmente por 10 genotipos de Oceanía Remota Oeste, dos genotipos de Hawái y el genotipo mayoritario de Tahití. Por otra parte, el Grupo 2 (señalado con color azul) se sitúa entre los ejes de la matriz, correspondiendo al genotipo 1 de Marquesas, los genotipos únicos de Pitcairn y Rapa, dos de Fiji, y uno de Tonga. Finalmente, el Grupo 3 (señalado en color rojo) se sitúa en el lado izquierdo de la matriz, conformado principalmente por genotipos de Oceanía Remota Este (los seis que se encuentran en Isla de Pascua, genotipos 2 y 3 de Marquesas, 2 de Tahití, y el único genotipo de Raiatea), tres genotipos de Fiji y dos de Nueva Caledonia.

En el **Anexo V, Figura G** se encuentra disponible un análisis de PCoA en tres dimensiones, donde se observa que los genotipos se dividen en dos grupos, siendo éstos fundamentalmente uno similar a Grupo 1 (Oceanía Remota Este) y Grupo 3 (los extremos de Oceanía Remota Este) de los que se muestran en la **Figura 17B**.

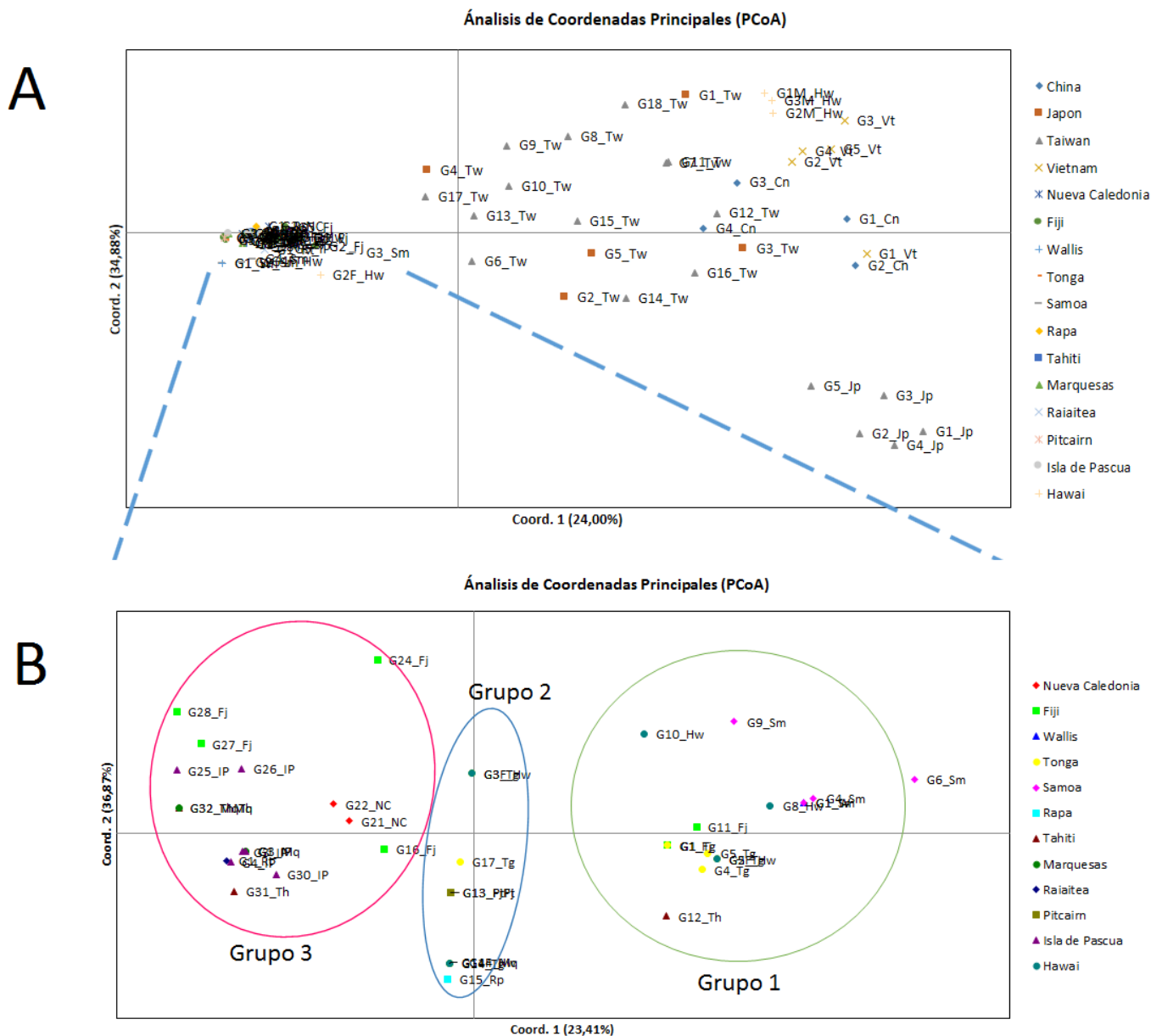


Figura 17: Análisis de Coordenadas Principales de 67 genotipos de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota
A. Análisis de coordenadas principales con todos los genotipos identificados en Asia y Oceanía Remota.
B. Análisis de coordenadas principales con los 32 genotipos identificados en Oceanía Remota, excluyendo los tres genotipos de individuos masculinos de Hawái. Genotipos predominantes: Grupo 1: Genotipos de Oceanía Remota Oeste, Grupo 2: Genotipos de Oceanía Remota Oeste y la parte central de Oceanía Remota Este y Grupo 3: Genotipos de la parte central y los extremos de Oceanía Remota Este.

5.2.3.2.4 Red de genotipos identificados en Oceanía Remota

Finalmente, se construyó una red de genotipos con los 67 genotipos de morera de papel de Asia y Oceanía Remota identificados, mediante el programa BioNumerics 7.6, la cual se presenta en el **Anexo V, Figura H**. Esta red muestra que los genotipos de Oceanía Remota derivan de los genotipos asiáticos a una distancia muy lejana y que los genotipos polinésicos se relacionan entre ellos a una distancia muy cercana, observándose de forma aglomerada. Además, se obtiene que los tres genotipos de los individuos masculinos de Hawái se posicionen de una forma similar que los genotipos asiáticos.

Con el fin de resolver la aglomeración de genotipos de Oceanía Remota, se construyó la red solamente con los 35 genotipos del Pacífico, incluyendo los tres de los individuos masculinos de Hawái y el genotipo del individuo BQUCH0137 asiático más cercano a Oceanía Remota (G17). Los resultados se presentan en la **Figura 18**. Cada lugar geográfico tiene un color distintivo que se muestra en la simbología de la figura. Se observa en la **Figura 18A** que el genotipo G17 de Taiwán es más cercano a los genotipos de Oceanía Remota que los genotipos de los individuos masculinos de Hawái (GM1, GM2 y GM3), lo cual es congruente con los resultados obtenidos a partir de nuestros análisis con los marcadores ITS-1 y *ndhF-rpl32*. Por otra parte, los genotipos polinésicos se ven de forma aglomerada, confirmando nuevamente la cercanía genética entre los individuos de esta región.

En la **Figura 18B** se presenta una red de genotipos construida a partir de 32 genotipos de Oceanía Remota, excluyendo a los tres genotipos de los ejemplares masculinos de Hawái. La red muestra que los genotipos del Pacífico se organizan en torno a tres genotipos centrales conectados entre ellos, de los cuales deriva el resto de genotipos. A partir de ellos, es posible dividir la red en tres grupos de genotipos: GG1 (encerrado con color verde), GG2 (encerrado con color azul) y GG3 (encerrado con color rojo). Hay que destacar que la agrupación de los genotipos es concordante con lo observado mediante el PCoA, ya que el GG1 corresponde al grupo G1, el más cercano a los genotipos asiáticos; GG2 es G2 y GG3 corresponde a G3.

El GG1 corresponde mayoritariamente a genotipos de Oceanía Remota Oeste. El genotipo central corresponde al genotipo mayoritario y compartido entre Fiji y Tonga, y a partir de éste derivan cinco genotipos. Tres de ellos corresponden a genotipos de Tahití, Fiji y Tonga y dos de ellos son genotipos compartidos entre muestras de Samoa - Wallis y Hawái -Tonga. A partir del genotipo compartido de Samoa y Wallis derivan tres genotipos de Samoa y uno de Hawái. Además, otro genotipo de Hawái se conecta a partir de uno de estos tres genotipos de Samoa. Por otra parte, a partir del genotipo compartido entre Tonga y Hawái deriva un genotipo adicional de Tonga.

El centro del GG1 se conecta con GG2 mediante un genotipo compartido entre Fiji y Pitcairn. Este segundo grupo se compone principalmente por genotipos de Oceanía Remota Oeste y la parte central de Oceanía Remota Este. A partir del genotipo central se derivan dos genotipos, siendo uno identificado en Fiji y otro un genotipo compartido entre Marquesas, Tonga y Hawái. El genotipo de Rapa se deriva a partir de este último.

Finalmente, el tercer grupo, GG3 se relaciona con el genotipo central de GG2 mediante un genotipo compartido entre Isla de Pascua y Marquesas. Ocho genotipos derivan a partir de este centro, correspondiendo a tres genotipos de Isla de Pascua, uno de Raiatea, uno compartido entre Marquesas y Tahití, otro compartido entre Hawái y Tonga, y uno de Nueva Caledonia. Además, se observan cuatro

genotipos de Oceanía Remota Oeste derivados de este grupo. Llama mucho la atención la presencia de seis genotipos de Oceanía Remota Oeste, nuestra región de interés, en ese sector de la red, ya que el genotipo central de GG3 no se ha encontrado en los individuos de Fiji, Tonga o Nueva Caledonia.

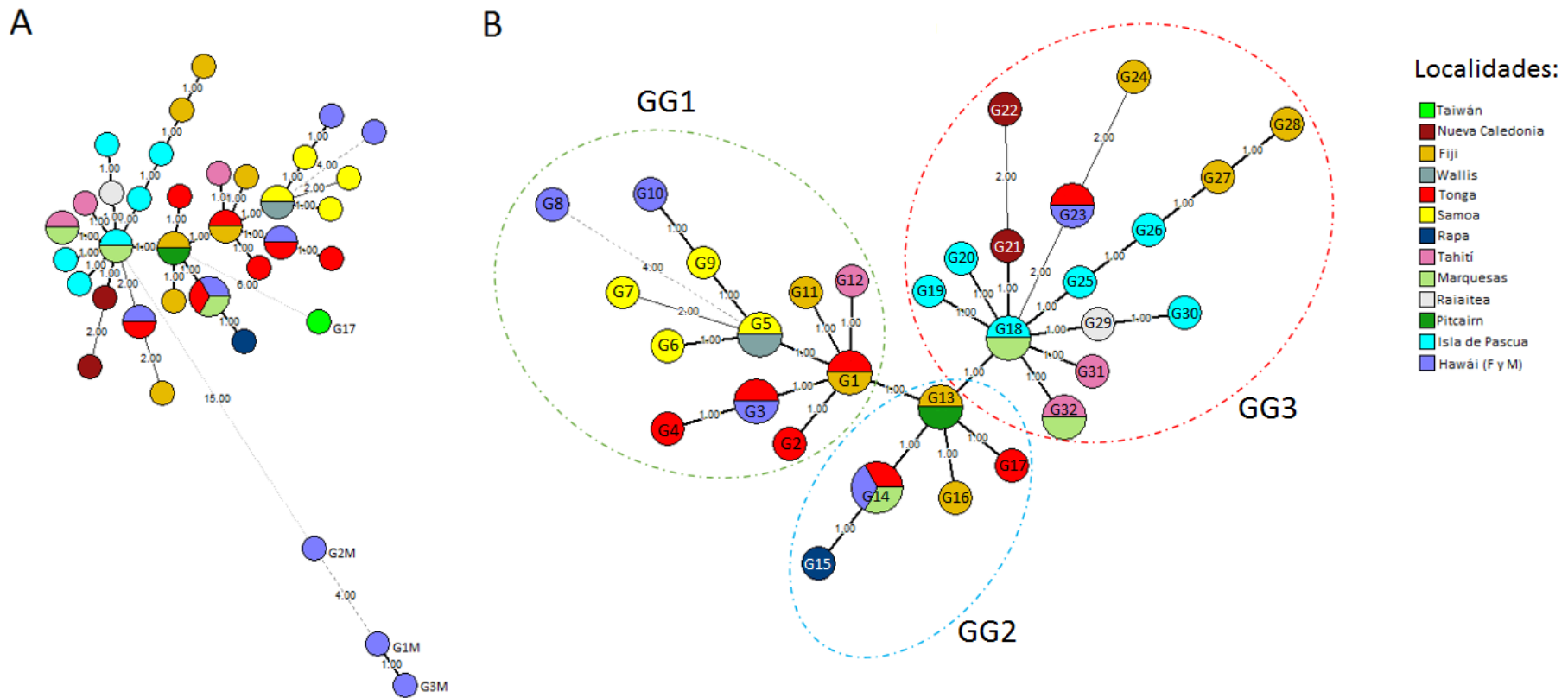


Figura 18: Red de genotipos de *B. papyrifera* identificados en Oceanía Remota mediante el análisis de 10 SSR. Esta red se construyó mediante el programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths). La localidad se señala mediante un código de colores y el número de genotipo se especifica en cada uno. En el caso de Hawái, la letra “F” se refiere a los genotipos encontrados en individuos femeninos, mientras que la letra “M” se refiere a los genotipos encontrados en individuos masculinos. **A.** Red con los 35 genotipos de Oceanía Remota y el genotipo 17 de Taiwán. **B.** Red con 32 genotipos del Pacífico, excluyendo los tres genotipos de los individuos masculinos de Hawái y el genotipo taiwanés. Se observa que los genotipos de Oceanía Remota se organizan en tres grupos. Grupos de Genotipos (GG): GG1: Genotipos de Oceanía Remota Oeste, GG2: Genotipos de Oceanía Remota Oeste y la parte central de Oceanía Remota Este y GG3: Genotipos de la parte central y de los extremos de Oceanía Remota Este.

5.2.4 Caracterización de la diversidad genética de individuos de *B. papyrifera* mediante la región de cloroplasto *ndhF-rpl32*

Este análisis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Taiwán (NTU), en Taipéi, Taiwán, bajo la tutoría del profesor Dr. Kuo-Fang Chung.

5.2.4.1 Amplificación de la región de cloroplasto *ndhF-rpl32*

Se seleccionaron 41 muestras de Oceanía Remota con el fin de revisar el potencial del marcador *ndhF-rpl32* para detectar diversidad en Oceanía Remota. La **Figura 19** muestra un ejemplo de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con algunos resultados de esta amplificación.

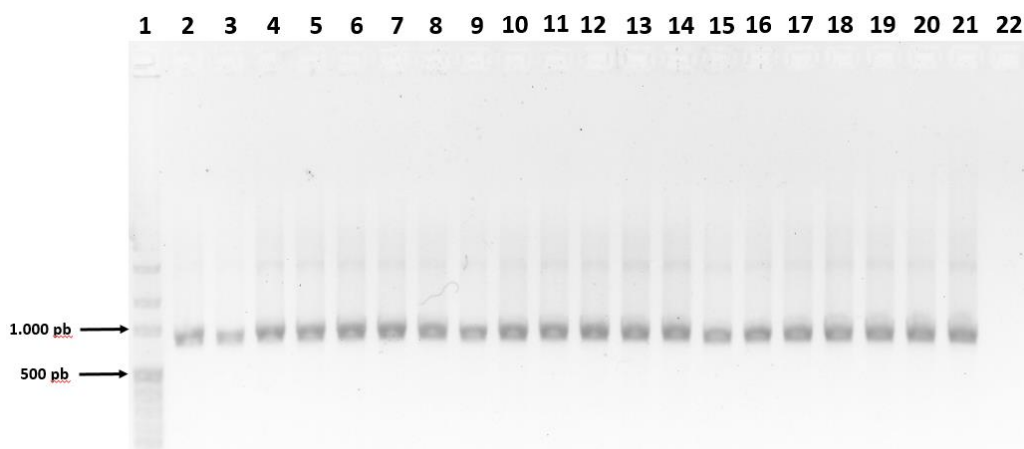


Figura 19: Amplificación de muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota con el marcador de cloroplasto *ndhF-rpl32*. Electroforesis en gel de agarosa al 1,0% en amortiguador TBE 0,5X. El orden de carga es el siguiente: carril 1: DNA Ladder DM100 100pb (Bioman), carril 2: BQUCH00213 (Isla de Pascua), carril 3: BQUCH0280 (Fiji), carril 4: BQUCH0179 (Hawái), carril 5: BQUCH0166 (Hawái), carril 6: BQUCH0296 (Fiji), carril 7: BQUCH0443 (Nueva Caledonia), carril 8: BQUCH0292 (Fiji), carril 9: BQUCH0164 (Hawái), carril 10: BQUCH0172 (Hawái), carril 11: BQUCH0433 (Tahití), carril 12: BQUCH00075 (Samoa), carril 13: BQUCH00221 (Isla de Pascua), carril 14: BQUCH0435 (Tahití), carril 15: BQUCH0177 (Hawái), carril 16: BQUCH0226 (Isla de Pascua), carril 17: BQUCH0195 (Hawái), carril 18: BQUCH0190 (Hawái), carril 19: BQUCH0333 (Wallis), carril 20: BQUCH0326 (Fiji), carril 21: BQUCH439 (Rapa) y carril 22: control negativo de amplificación.

En la **Figura 19** se observa que la amplificación de la región de cloroplasto *ndhF-rpl32* generó amplicones intensos de aproximadamente 900 pb. Esto es representativo para todas las muestras. Los 41 amplicones se enviaron a secuenciar a la empresa Gene Dragon Genomics, Taipéi, Taiwán. Es importante señalar que, además de secuenciar utilizando los partidores sentido y antisentido de la reacción de PCR de *ndhF-rpl32*, se usó la pareja adicional 3f y 3r de partidores internos a la región de cloroplasto (ver **Anexo**

De este modo, la diversidad genética de este marcador en Oceanía Remota es mayor a la previamente identificada por Chang y cols., 2015, quienes analizaron un número reducido de muestras de esta región.

5.2.4.3 Red de haplotipos de la región *ndhF-rpl32* de individuos de Asia y Oceanía Remota

Posteriormente, a partir del alineamiento de las 41 secuencias de Oceanía Remota y 101 secuencias analizadas previamente por Chang y cols. (2015), se construyó una red de haplotipos con el programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths). De las 101 secuencias analizadas previamente, 37 pertenecen a individuos de China, 29 de Taiwán, 15 de Oceanía Remota, ocho de Vietnam, tres de Filipinas, tres de Japón, dos de Nueva Guinea, una de Tailandia, una de Camboya, una de Indonesia y una de Islas Solomon.

En la **Figura 21** se presenta la red de haplotipos generada a partir del alineamiento de 142 secuencias de *ndhF-rpl32* de *B. papyrifera*. Las muestras de cada lugar geográfico tienen un color distintivo que se muestra en la simbología de la figura. La red de haplotipos muestra que existen 51 haplotipos de *ndhF-rpl32*, donde 48 corresponden al total de haplotipos identificados anteriormente en Asia y Oceanía Remota (Chang y cols., 2015), y tres son nuevos haplotipos para Oceanía Remota identificados en esta investigación.

La **Figura 21** muestra que 33 de las 41 muestras seleccionadas de Oceanía Remota agrupan con las 13 muestras de Oceanía Remota previamente analizadas. Estas muestras poseen el haplotipo cp17, el cual corresponde al nodo de mayor tamaño en la **Figura 21** (esquina superior derecha). El haplotipo cp17 se encuentra además presente en Taiwán, particularmente en el sur de esta isla. Este haplotipo deriva del haplotipo cp16, que también se encuentra exclusivamente en el sur de Taiwán. Por otra parte, las cuatro muestras masculinas de Hawái analizadas en este trabajo agrupan con dos muestras hawaianas analizadas previamente por Chang y cols. (2015). Éstas presentan el haplotipo exclusivo de Hawái cp41, que deriva del haplotipo cp28 de China. Por otro lado, tres nuevos haplotipos derivados de cp_17 corresponden a cuatro muestras de Oceanía Remota Este. Estas muestras son de los individuos que presentaron polimorfismos con respecto a la secuencia del haplotipo cp17, tal como se presentó en el alineamiento de secuencias de la **Figura 22**. Los individuos BQUCH0003 y BQUCH0221 de Isla de Pascua poseen el haplotipo que se ha denominado cp49, el individuo BQUCH0045 de Marquesas presenta el haplotipo cp50 y el individuo BQUCH0036 de Isla de Pascua tiene el haplotipo cp51.

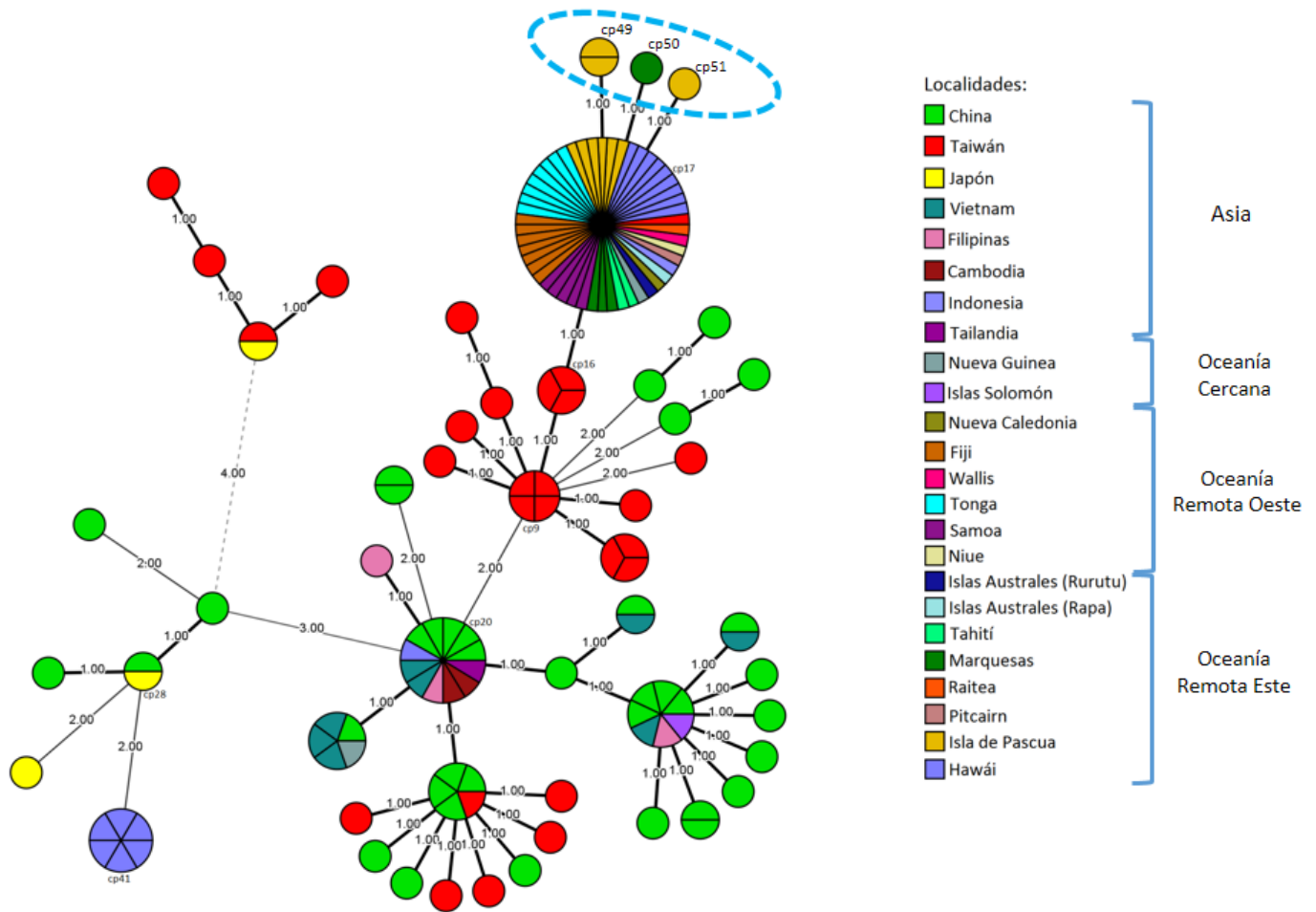


Figura 21: Red de haplotipos de la región *ndhF-rpl32* de individuos de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota. Se utilizaron 142 secuencias del marcador de ADNcp *ndhF-rpl32* de muestras del rango nativo e introducido para generar una red de haplotipos, construida mediante el programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths). El tamaño de cada nodo es representativo del número de muestras que presentan un haplotipo determinado. Las 142 secuencias representan 24 lugares geográficos, siendo estos China, Taiwán, Japón, Vietnam, Filipinas, Indonesia, Camboya, Tailandia, Nueva Guinea, Islas Solomon, Nueva Caledonia, Fiji, Wallis, Tonga, Samoa, Niue, Islas Australes (Rapa y Rurutu), Islas de la Sociedad (Raiatea), Tahití, Marquesas, Pitcairn, Isla de Pascua, y Hawái. Se obtuvieron 51 haplotipos en total. Las muestras de Asia poseen 47 haplotipos distintos, mientras que las de Oceanía Remota presentan 5 haplotipos distintos, siendo uno compartido con Taiwán (cp17), uno perteneciente a las muestras masculinas de Hawái (cp41), y tres correspondientes a nuevos haplotipos para Oceanía Remota, los cuales se encuentran encerrados en color celeste.

6. DISCUSIÓN

6.1. Extracciones de ADN genómico

6.1.1 Extracción de ADN genómico de 120 individuos provenientes de Oceanía Remota Oeste

Se extrajo ADN genómico de individuos de morera de papel provenientes de Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga. En las 120 extracciones se observa la presencia de ADN, con distintos grados de intensidad e integridad. Esto se podría explicar por diferencias en la cantidad y calidad de la hoja utilizada para cada muestra, y por el método de extracción manual, respectivamente.

Respecto a los valores de pureza ($A_{260/280}$) de las extracciones, se observa que 81 de 120 muestras poseen un valor entre 1,8 y 2,0 que se considerada como ADN puro, mientras que el resto de muestras poseen valores menores a 1,8. La existencia de razones de $A_{260/280}$ con valores menores al rango aceptado se explica por el método de extracción manual modificado de Lodhi, con el cual es posible co-extraer polisacáridos y otros metabolitos secundarios de la hoja, como polifenoles. Una de las formas de solucionar este problema sería añadiendo polivinilpirrolidona (PVP), una molécula que atrapa los compuestos fenólicos de la extracción de ADN vegetal, ya que forma puentes de hidrógeno con estos compuestos.

Por otra parte, al comparar los valores de concentración de ADN obtenidos mediante espectrofotometría y el uso del reactivo Picogreen, se observa que la absorbancia a 260 nm entrega concentraciones superiores a Picogreen. Se concluye que los valores entregados por espectrofotometría se encuentran sobreestimados respecto a los obtenidos mediante Picogreen, ya que la absorbancia a 260 nm mide todas las moléculas que absorben a esta longitud de onda, incluyendo los ácidos nucleicos. Además, no discrimina entre ADN de hebra simple y doble hebra. En contraste, las metodologías que usan agentes intercalantes (como Picogreen) miden específicamente ADN de doble hebra, eliminando sobreestimaciones por presencia de ADN de hebra simple, ARN, sales y otros interferentes. La concentración entregada por el uso del reactivo Picogreen representa la concentración real de ADN funcional para el posterior análisis con marcadores moleculares.

6.1.2 Extracción de ADN genómico de 41 individuos seleccionados de Oceanía Remota

Con respecto a los resultados de las extracciones de las 41 muestras seleccionadas de Oceanía Remota, hay que destacar que los perfiles de electroforesis en geles de agarosa de las extracciones obtenidas muestran que la integridad del ADN es distinta, dependiendo principalmente del sistema de almacenamiento y posiblemente, en menor medida, del método de extracción usado. Las diferencias de la integridad del ADN extraído en Chile y Taiwán se explican debido a la forma de almacenamiento de la hoja, ya que las muestras

extraídas en Chile se encontraban congeladas, mientras que las extraídas en Taiwán estaban almacenadas en sílica-gel.

6.2 Caracterización de la diversidad genética de los individuos provenientes de Oceanía Remota Oeste con los marcadores moleculares ITS-1, de sexo y SSR

6.2.1 Análisis de la diversidad genética mediante la región ITS-1

6.2.1.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste

Los análisis previos de nuestro laboratorio de la secuencia ITS-1 reportan que los individuos de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota poseen un polimorfismo en la posición relativa 203. Los individuos asiáticos poseen el nucleótido G y los polinésicos, con excepción de algunas muestras de Hawái, tienen el nucleótido T. Las muestras contemporáneas de Oceanía Remota utilizadas previamente en el laboratorio corresponden en su mayoría a individuos de Oceanía Remota Este (Seelenfreund y cols., 2011, González-Lorca y cols., 2015, y Peñailillo y cols., 2016). Por otra parte, el análisis de ITS-1 de una muestra de herbario de morera de papel proveniente de Nueva Guinea (Oceanía Cercana) ha mostrado que este individuo presenta la variante G (Payacán, 2015). Por lo tanto, estos resultados sugerían que la transversión de T a G podría haber ocurrido en Oceanía Cercana u Oceanía Remota Oeste.

Los 120 individuos de morera de papel provenientes de Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga se analizaron exitosamente con el marcador ITS-1. Todos estos individuos poseen la variante T, correspondiente a la transversión común para todas las muestras de Oceanía Remota. Además, estas muestras agrupan en la misma rama con la muestra de Oceanía Remota Este (Isla de Pascua), sin mostrar agrupaciones diferenciales entre éstas. Estos resultados indican que los individuos de Oceanía Remota Oeste comparten el mismo polimorfismo de ITS-1, sin que este marcador los pueda diferenciar y que serían genéticamente similares a los individuos de Oceanía Remota Este.

6.2.1.2 Integración con los análisis previos de la diversidad genética en Asia y Oceanía Remota

Al integrar los resultados obtenidos con la región ITS-1 en 120 muestras de *B. papyrifera* pertenecientes a Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga, con los datos obtenidos anteriormente de 33 muestras de Asia, 146 de Oceanía Remota Este y 23 de Oceanía Remota Oeste, se observa que todas las muestras de Oceanía Remota, con excepción de Hawái, tienen el nucleótido T en la posición relativa 203. Además, el alineamiento de las secuencias de ITS-1 de estos individuos muestra que la secuencia es altamente conservada en los demás sitios de este marcador. Esto concuerda con lo observado en los dendrogramas construidos a partir del alineamiento de las secuencias de 45 muestras de Oceanía Remota (excluyendo cinco individuos masculinos de Hawái), donde todas estas muestras agrupan en una misma

rama que no tiene subdivisiones (**Figura 9**). Por lo tanto, los individuos de Oceanía Remota, exceptuando un grupo de individuos de Hawái, poseen la variante polinésica del sitio polimórfico y tienen el mismo genotipo de ITS-1. Hay que destacar que esta baja diversidad genética de las plantas de morera de papel de las islas del Pacífico concuerda con lo observado con el marcador de sexo en esta tesis.

En el caso de Hawái, se observa que existe un grupo de individuos de *B. papyrifera* con la variante polinésica T y otros con la variante asiática G. Previamente, se había descrito con los marcadores ISSR (González-Lorca y cols., 2015) y *ndhF-rpl32* (Chang y cols., 2015) que Hawái tiene dos grupos de individuos genéticamente distintos: un grupo posee un perfil genético similar al resto de muestras de Oceanía Remota, mientras que otros son genéticamente cercanos a los individuos de Asia. Por lo tanto, la presencia de ambos nucleótidos en la población hawaiana era esperada, debido a que ITS-1 puede diferenciar plantas de morera de papel del rango nativo y el rango introducido. Al complementar los resultados de las secuencias de ITS-1 de las 38 plantas de Hawái con lo analizado mediante el marcador de sexo, se obtiene que las muestras que presentan la variante polinésica corresponden a plantas femeninas y que las muestras que poseen la variante asiática son plantas masculinas (Peñailillo y cols., 2016). Esto también es representativo de lo observado en los individuos de Hawái con la región de cloroplasto *ndhF-rpl32*, donde los individuos femeninos poseen el haplotipo cp17, el cual es común para Oceanía Remota, y los individuos masculinos poseen un haplotipo derivado de cp-40, perteneciente a China (Chang y cols., 2015). Por lo tanto, los resultados obtenidos con ITS-1 sugieren que la diversidad genética encontrada en Hawái, en comparación al resto de Oceanía Remota, es concordante con los otros marcadores mencionados.

Por otra parte, resultó una sorpresa que las muestras de Hawái de morera de papel y una muestra China agruparan en una subrama diferente del resto de los individuos asiáticos (**Figura 10**). Los análisis previos en nuestro laboratorio no habían utilizado muestras masculinas de Hawái (Seelenfreund y cols., 2011) o sólo habían reportado el nucleótido presente en la posición de la transversión de G a T (González-Lorca y cols., 2015; Peñailillo y cols., 2016). Por lo tanto, el alineamiento y posterior construcción de dendrogramas de todas las muestras analizadas de *B. papyrifera* con este marcador se realizó por primera vez en esta tesis.

La presencia de los nucleótidos T y C en la misma posición de las muestras masculinas de Hawái y de China podría explicarse debido a la existencia de un SNP heterocigoto en la región ITS-1. La morera de papel es una planta diploide, por lo que tendría dos secuencias de este marcador de ADN nuclear en su genoma (Brumfield y cols., 2003). Los individuos de Taiwán, Vietnam, Japón y Ocenía Remota serían homocigotos en la posición relativa 99 de ITS-1, mientras que algunos individuos chinos y las muestras masculinas de Hawái son heterocigotos para esta posición (**Figura 9**). Este resultado sugiere una relación entre ambas poblaciones. Hay que recordar que a finales del siglo XIX hubo migraciones de trabajadores desde China y Japón a las plantaciones en Hawái y sería esperable que una planta de uso medicinal como

morera de papel fuera transportada desde el hábitat nativo hasta este archipiélago. Los resultados obtenidos con ITS-1 sugieren que estos ejemplares de morera de papel provienen probablemente desde China, apoyando los resultados obtenidos mediante *ndhF-rpl32* (Chang y cols., 2015). Esto demuestra que el poder resolutivo de este marcador en Oceanía Remota es mayor del que se había descrito anteriormente, ya que no sólo separa a los individuos de Hawái, sino que detecta un polimorfismo heterocigoto que relaciona a individuos de China con los individuos masculinos de Hawái.

A partir de los resultados globales de ITS-1, se observa que la población de *B. papyrifera* de las islas del Pacífico, exceptuando Hawái, tienen la variante polinésica T en la posición relativa 203 de la transversión G a T, mientras que los individuos de Asia poseen la variante asiática G. Análisis previos muestran que un individuo de herbario de Oceanía Cercana (Nueva Guinea) posee la variante G. Los resultados de esta tesis sugieren que esta transversión ocurrió en una región geográfica entre Asia y Oceanía Remota, dejando a Oceanía Cercana como la zona candidata más probable. Sería necesario realizar un análisis focalizado en individuos contemporáneos de *B. papyrifera* de Oceanía Cercana mediante este marcador para determinar esta variante y así contrastar estos datos con los obtenidos en análisis de muestras de herbario de esta región.

En resumen, en el contexto de esta tesis, se confirman los resultados previos (Seelenfreund y cols., 2011; González-Lorca y cols., 2015) que indican que ITS-1 es un marcador que diferencia individuos de *B. papyrifera* provenientes de Asia y de las islas del Pacífico. Hay que destacar que los resultados de esta tesis permiten además identificar dos grupos de individuos en Hawái: uno que es genéticamente similar a los individuos de Oceanía Remota y otro a los individuos de Asia, específicamente de China. Este marcador no diferencia la población de plantas de morera de papel entre las islas del Pacífico, por lo que ITS-1 no es el marcador más apropiado para estudiar la diversidad genética de Oceanía Remota Oeste y Este y así inferir posibles rutas de migración desde el Ocenía Remota Oeste a Oceanía Remota Este, los que son objetivos de esta tesis.

6.2.2 Análisis de la diversidad genética de *B. papyrifera* mediante el marcador de sexo

6.2.2.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste

Los análisis anteriores de nuestro laboratorio muestran una diferencia en la distribución de sexo de la morera de papel en Asia y Oceanía Remota. El análisis de muestras de Taiwán, Japón, Vietnam y China mostró una distribución cercana al 50% de cada sexo, mientras que todos los ejemplares de *B. papyrifera* de Oceanía Remota corresponden al sexo femenino, excepto en Hawái donde se obtuvo una distribución similar a la del hábitat nativo (Peñailillo y cols., 2016). Estos análisis habían incluido sólo un número

reducido de individuos de Oceanía Remota Oeste, por lo que resulta interesante determinar la distribución de sexos de *B. papyrifera* en esta región.

Se analizaron exitosamente los 120 individuos de morera de papel de Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga con el marcador de sexo, identificándose todos los individuos como de sexo femenino. Por lo tanto, este marcador muestra una homogeneidad en la región de Oceanía Remota Oeste.

Con respecto a los amplicones de intensidad variable de las muestras originarias de Oceanía Remota Oeste (**Figura 11**), hay que mencionar que si bien se utilizaron alícuotas de 0,6 ng/ μ L de ADN (cuantificación realizada por metodología Picogreen), las muestras se extrajeron con un método manual de extracción que no evita la co-extracción de proteínas, polisacáridos, pigmentos y metabolitos secundarios de la hoja, que podrían interferir como inhibidores de la PCR al interactuar con la enzima ADN polimerasa Taq. Hay que recordar que las muestras presentan valores variables de la razón $A_{260/280}$, lo cual da cuenta que en la solución de extracción hay más moléculas co-extraídas de la hoja además de ADN genómico. Por otro lado, hasta la fecha no se ha secuenciado el genoma de *B. papyrifera* y no se sabe la ubicación o el número de repeticiones en el genoma del marcador de sexo. En el caso que este marcador tuviera una sola repetición o un número bajo de repeticiones en el genoma, la presencia de inhibidores de la PCR haría aún más crítica la actividad de la enzima ADN polimerasa Taq en la reacción de PCR.

6.2.2.2 Integración con los análisis previos de la diversidad genética en Asia y Oceanía Remota

La adición de las 120 muestras de Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga a las muestras contemporáneas de Oceanía Remota analizadas previamente, muestran que la totalidad de las plantas de Oceanía Remota son femeninas, con la excepción de Hawái (**Tabla 7**). La presencia de individuos femeninos en Oceanía Remota sugiere que en esta región existe una baja diversidad genética. Esto concordaría con la forma vegetativa en que se propaga esta planta en Oceanía Remota y, aún más importante, con la baja diversidad genética encontrada con el marcador ITS-1 y el marcador de cloroplasto en las islas del Pacífico. Hay que destacar que estos resultados no implicarían que todas las plantas de una isla en particular fueron traídas por los primeros viajeros, o que fueron introducidas sólo una vez; y tampoco afirmarían que un único clon femenino se introdujo en Oceanía Remota, pudiendo haber existido la introducción de varios clones femeninos o, inclusive, la introducción de individuos masculinos que desaparecieron con el tiempo. Por lo tanto, estos resultados dan cuenta de ya sea una selección o una supervivencia diferencial de las plantas femeninas cultivadas en el Pacífico.

Análisis previos en individuos de herbario de morera de papel de Oceanía Remota mediante el marcador de sexo mostraron que dos individuos de esta región (Marquesas e Islas Australes) se identificaron como masculinos. Hay que destacar que ambas muestras presentaron el genotipo polinésico con ITS-1 y

marcadores SSR (Payacán, 2015). Por lo tanto, sería posible afirmar que en los primeros viajes se llevaron plantas de ambos sexos a Oceanía Remota, pero en el transcurso del tiempo se perdieron las plantas masculinas o se privilegió el cultivo de uno o más clones femeninos en Oceanía Remota. Alternativamente, es posible que las plantas masculinas y femeninas presenten distinta capacidad de supervivencia en las islas del Pacífico. Si las plantas femeninas tuvieran características que les permita crecer mejor en esta región o propiedades más deseables como fuente de fibra para la elaboración de textiles, existiría una selección natural o cultural que inclinaría a los primeros habitantes de Oceanía Remota a cultivar preferencialmente plantas de sexo femenino.

En el caso de Hawái, de las 38 muestras analizadas, 20 individuos se identificaron como femeninos y 18 como masculinos. Es interesante observar las secuencias de ITS-1 de estos individuos, debido a que las muestras femeninas de Hawái poseen la variante del Pacífico, y las plantas masculinas poseen la variante asiática en la posición polimórfica 203 (González-Lorca y cols., 2015) y heterocigocidad en la posición 99. Además, se ha reportado mediante ISSR (González-Lorca y cols., 2015) y el marcador *ndhF-rpl32* (Chang y cols., 2015) que los individuos masculinos hawaianos poseen un genotipo asiático, mientras que las muestras femeninas de esta isla muestran un genotipo similar al resto de las muestras de Oceanía Remota. Estos resultados sugieren que las plantas femeninas y masculinas de Hawái representan dos introducciones separadas de distintos orígenes. Las muestras femeninas hawaianas son parte de la población femenina encontrada en Oceanía Remota que probablemente llegaron con los colonizadores polinésicos hace alrededor de 1.000 AP. Por otra parte, las muestras masculinas corresponderían a una introducción reciente desde Asia, específicamente de chinos y/o japoneses que fueron llevados a trabajar a las plantaciones de caña de azúcar en Hawái a finales del siglo XIX (Odo y Sinoto, 1985; Chang y cols., 2015). Hay que recordar que la morera de papel tiene un uso medicinal en el rango nativo y se ha visto que las plantas masculinas son las que representan un interés económico en la medicina tradicional (Wang y cols., 2012), por lo que es razonable pensar que los trabajadores asiáticos llevarían consigo individuos masculinos como plantas medicinales a Hawái, lo cual evidencia una selección en base a un criterio cultural diferente.

Los resultados obtenidos con el marcador de sexo son consistentes con lo observado mediante ITS-1, donde se ve que los individuos de *B. papyrifera* de Asia poseen una mayor diversidad genética que en el Pacífico. La presencia exclusiva de individuos femeninos en plantas contemporáneas de morera de papel en Oceanía Remota sugiere que existió un proceso de selección en el cultivo y reproducción de esta especie vegetal en esa región. Además, abre la posibilidad que las poblaciones existentes en Oceanía corresponderían a uno o varios individuos femeninos introducidos en uno o más viajes de colonización de las islas del Pacífico, y reproducidos clonalmente. En Hawái, por otro lado, habría dos poblaciones claramente distintas de morera de papel: una polinésica que se compone por individuos femeninos y otra

asiática compuesta por individuos masculinos. Sin embargo, los resultados que entrega el marcador de sexo en conjunto con los marcadores ITS-1 no permiten diferenciar los individuos de morera de papel de Oceanía Remota Oeste y Este y, de este modo, estudiar su diversidad genética entre ambas zonas geográficas.

6.2.3 Análisis de la diversidad genética de *B. papyrifera* mediante marcadores SSR

6.2.3.1 Caracterización de la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste

Se amplificaron exitosamente las 120 muestras de *B. papyrifera* de Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga con los diez marcadores SSR seleccionados. Estos marcadores se eligieron debido a su facilidad de amplificación y al grado de información entregada en análisis previos de individuos de Oceanía Remota Este.

Con respecto a las muestras problemáticas (sin amplificación en la PCR estándar, **Figura 13**) de algunos marcadores SSR, es importante recordar que las muestras de ADN se extrajeron con un método manual de extracción que permite la co-extracción de proteínas, polisacáridos, pigmentos y metabolitos de la hoja, los que podrían actuar como inhibidores de la PCR al interactuar con la enzima Taq polimerasa. Una forma de solucionar esto sería purificando las extracciones de ADN genómico de las muestras, para así eliminar agentes que inhibieran la actividad polimerasa de la enzima ADN polimerasa Taq en la PCR. Sin embargo, esto reduciría el volumen de las extracciones de ADN, ya que los sistemas comerciales de purificación además concentran las muestras. Por lo tanto, en esta tesis se decidió repetir las PCR de las muestras problemáticas añadiendo BSA a la mezcla de reacción. Se han descrito diversas funciones del BSA en la PCR. Este reactivo actúa como un agente estabilizante de la enzima ADN polimerasa Taq o atrapa inhibidores de la PCR, por lo que se utiliza como aditivo común para reacciones de PCR, “*footprinting*” (Nagai y cols., 1998) o en metodologías donde el ADN se encuentra muy degradado, como sería el caso de ADN de herbario (Särkinen y col., 2012). La adición de BSA en las PCR de las muestras problemáticas logró que todas estas muestras amplificaran exitosamente (**Figura 14**).

Los 13 genotipos diferentes identificados en los 120 ejemplares de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste con los diez marcadores SSR corresponden a dos genotipos de Nueva Caledonia, uno compartido entre Fiji y Tonga, seis genotipos identificados sólo en Fiji, un único genotipo de Wallis y cuatro identificados sólo en Tonga (**Tabla 8**). El hallazgo de diversidad genética en Oceanía Remota Oeste, nuestra región de interés, contrasta con los resultados de los análisis anteriores con los marcadores ITS-1 y marcador de sexo, los cuales no detectan diversidad genética en los individuos de la región de interés. Sin embargo, con los marcadores SSR se demostró que estos marcadores poseen un poder resolutivo mayor que permite identificar genotipos particulares de *B. papyrifera* en Oceanía Remota Oeste.

La identificación de un mayor número de genotipos en Fiji sugiere que en este archipiélago se encontraría la mayor diversidad genética de las 120 muestras analizadas. Este resultado es interesante, ya que otros modelos de estudio como ADN mitocondrial de rata (Matisoo-Smith y cols., 2010) y el análisis de marcadores nucleares de humano (Kayser y cols., 2010) también señalan a Fiji como la localidad de Oceanía Remota donde existiría una mayor diversidad genética detectable.

Por otro lado, cabe destacar que todos los individuos de la isla de Eua, en Tonga presentan genotipos distintos al mayoritario (genotipos 11, 12 y 13). Este resultado sugiere que la diversidad de las plantas en esta isla es diferente del resto de plantas de Tonga, y es de interés. Estos genotipos no se habían reportado en las restantes 18 muestras de Tonga analizadas previamente en nuestro laboratorio. Por primera vez, se observa que una población de una isla pequeña y muy cercana a la isla principal de un archipiélago presenta un perfil de SSR particular en comparación con el resto de los individuos del mismo archipiélago.

Los análisis anteriores mediante marcadores SSR de individuos *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota, principalmente de Oceanía Remota Este, muestran que hay mayor diversidad genética en el hábitat nativo que en el rango introducido. En el caso de Oceanía Remota, estos marcadores también permitieron discriminar individuos pertenecientes a Oceanía Remota Oeste y Este, sugiriendo que la diversidad genética en la parte Oeste sería diferente de la identificada en Oceanía Remota Este (Peñailillo, 2014). El análisis de las 120 muestras de Oceanía Remota Oeste permite concluir que los marcadores SSR efectivamente permiten diferenciar individuos de los cuatro grupos de islas estudiadas de Oceanía Remota Oeste. Se identificaron 13 genotipos diferentes de morera de papel en esta región y se observó que Fiji es el archipiélago con mayor número de genotipos, lo que sugiere que en esta isla existe una mayor diversidad genética que en Tonga, Wallis y Nueva Caledonia. Por lo tanto, los marcadores SSR son útiles para estudiar la diversidad genética de Nueva Caledonia, Fiji, Wallis y Tonga y compararla con la diversidad encontrada en Oceanía Remota Este.

6.2.3.2 Integración con los análisis previos de la diversidad genética en Asia y Oceanía Remota

Los análisis estadísticos de la genotipificación de 314 individuos de morera de papel de Asia y Oceanía Remota mediante 10 SSR, muestran que los 33 individuos de origen asiático poseen 136 alelos, mientras que los 281 individuos de Oceanía Remota tienen 54 alelos, siendo sólo 12 alelos exclusivos de muestras de esta región (**Tabla 9**). El mayor número de alelos identificados en Asia en comparación a Oceanía Remota se correlacionaría con que Asia es el rango nativo de la morera de papel. En el rango nativo existe reproducción sexual de esta especie vegetal, por lo que su diversidad genética es mayor que la del rango introducido, donde el bajo número de alelos y genotipos identificados dan cuenta que esta especie posee un origen clonal.

Al enfocar este análisis en Oceanía Remota, se obtiene que existen 34 alelos en Oceanía Remota Oeste y 48 alelos Oceanía Remota Este (**Tabla 10**). Si bien este resultado se consideraría como inesperado en primera instancia, hay que recordar que en Oceanía Remota Este existe una diversidad genética diferente al tener individuos de sexo masculino que poseen un componente genético asiático, como se ha observado mediante los marcadores anteriores. El número de alelos en esta región cambia al restar el aporte de los 18 individuos masculinos de Hawái, identificándose sólo 33 alelos en total en Oceanía Remota Este. La diferencia de alelos entre la Oceanía Remota Oeste (34 alelos) y Este (33 alelos) es muy baja, lo cual sugiere que la diversidad genética es baja en ambas regiones (**Tabla 11**).

Por otra parte, al analizar la combinación de los alelos a nivel de genotipos, se identificaron en total 67 genotipos en las 314 muestras de morera de papel de Asia y Oceanía Remota, siendo 32 genotipos diferentes para los 33 individuos asiáticos y 35 genotipos diferentes para las 281 muestras provenientes de Oceanía Remota (**Tabla 12**). Hay que recalcar que, si bien en ambas regiones existe un número similar de genotipos, cada individuo de Asia representaría un genotipo diferente, mientras que se necesitarían aproximadamente 9 individuos del Pacífico para identificar un genotipo nuevo. Estos resultados nuevamente demuestran que la diversidad en el rango nativo es mucho mayor que en el rango introducido, lo cual concuerda con el análisis anterior de número de alelos.

El número total de genotipos identificados en las muestras de las 15 localidades de Oceanía Remota Oeste y Este es muy similar, ya que poseen 21 y 20 genotipos diferentes, respectivamente. Los 18 individuos masculinos de Hawái aportan tres genotipos diferentes, por lo que, si se considera únicamente los individuos femeninos de Oceanía Remota Este, existen 17 genotipos diferentes en Oceanía Remota Este. Esta diferencia relativamente pequeña del número de genotipos en cada región (21 *versus* 17) sugiere que la diversidad genética de la morera de papel en Oceanía Remota es relativamente homogénea. Hay que considerar que la dispersión de esta especie vegetal desde Oceanía Cercana a los extremos del triángulo polinésico de Oceanía Remota Este (Isla de Pascua, Hawái y Nueva Zelanda) ocurrió en un período breve (menos de 3.000 años) y concluyó hace sólo 1.500 a 1.000 AP. Además, se debe considerar la reproducción clonal de esta especie en Oceanía Remota, que sumado a la temporalidad del proceso explica la diversidad baja y homogénea identificada en Oceanía Remota Oeste y Este.

Por otra parte, uno de los análisis realizados en este trabajo fue la evaluación de cuellos de botella mediante el Test de Wilcoxon (**Tabla 13**). Los cuellos de botella corresponden a una reducción significativa y drástica del tamaño de una población en un período acotado de tiempo, debido a eventos ambientales (por ejemplo, cataclismos) o a la acción humana, como sería la caza de una especie de interés (Ramakrishnan y cols., 2005). La reducción del tamaño de una población conlleva la disminución de la heterocigosidad de *loci* o marcadores de interés y del número de alelos, lo cual implica un exceso de heterocigosidad en la

población que ha presentado un cuello de botella reciente (Cournet y Luikartt, 1996; Piry y cols., 1999). Cabe destacar que los análisis realizados en esta tesis mediante cuatro tipos de marcadores moleculares muestran que en los individuos de *B. papyrifera* de Oceanía Remota existe una baja diversidad genética en comparación con la detectada en los individuos asiáticos, lo cual es esperable debido a la naturaleza clonal de esta especie en el Pacífico. Por lo tanto, es altamente probable que, al comparar ambas poblaciones, se observe que la diversidad genética de los individuos de Oceanía Remota presente un cuello de botella en relación a la diversidad genética identificada en Asia. Sin embargo, se consideró relevante analizar si existen localidades de Oceanía Remota con una diversidad genética diferente respecto al resto de las islas del Pacífico. De este modo, fue de interés analizar si esta diferencia de diversidad se pudiera identificar como cuellos de botella entre los individuos de Oceanía Remota.

La evaluación de acuerdo los modelos IAM y SMM sugiere cuellos de botella actuales en todas las regiones de *B. papyrifera* de las islas de Oceanía Remota, excepto en Fiji y en menor medida en Tonga, donde el cuello de botella sólo fue identificado según el modelo IAM. Esta diferencia entre Fiji y Tonga respecto al resto de Oceanía Remota se explicaría debido a la hipotética llegada de una mayor diversidad genética a estas islas. Efectivamente, en estas localidades existe una mayor diversidad genética, ya que poseen el mayor número de genotipos de Oceanía Remota (siete genotipos cada localidad). La arqueología muestra la existencia de una pausa migratoria de aproximadamente 1.500 años en Fiji (Wollstein y cols., 2010) y los análisis de ADN humano también señalan que existe una diversidad genética mayor en esta isla que en el resto del Pacífico (Kayser, 2010). Por lo tanto, estos resultados son consistentes con los datos aportados por la arqueología y la genética de otras especies, y apoyan la existencia de una diversidad diferente en Fiji, donde llegó posiblemente la mayor diversidad de morera de papel desde Asia. Por otra parte, la diversidad relativamente alta detectada también en Tonga se podría deber a varias razones, puesto que la planta podría haber llegado en una temporalidad similar que a Fiji, o la diversidad identificada en Fiji y Tonga es un reflejo de la importancia cultural que tiene esta especie actualmente y que determina la mantención de sus cultivos en ambos países. Sería de gran utilidad analizar un número considerable de muestras de herbario de ambas regiones, para así comparar la diversidad detectada en material antiguo con la correspondiente al material contemporáneo y analizar cuál localidad tendría más diversidad y si el cuello de botella estaría presente en ambos archipiélagos o únicamente en algunas de las islas que actualmente presentan mayor diversidad genética.

Por otro lado, el análisis de estructura poblacional bayesiano de mezclas realizado con el programa Structure 2.3.4, identificó dos claros conglomerados genéticos en el grupo de estudio, donde se presentaría un conglomerado distintivo y homogéneo entre la mayoría de los individuos asiáticos y polinésicos, excepto en Taiwán y Hawái (**Figura 16**). En estas localidades se encontró la coexistencia de ambos conglomerados

genéticos. En Taiwán se identificó varios individuos que presentan mezcla de ambos conglomerados genéticos. Estos resultados sugieren a Taiwán como ancestro de las poblaciones morera de papel de Oceanía Remota, lo cual concuerda con los antecedentes genético moleculares de nuestro grupo (Chang y cols., 2015) y los antecedentes lingüísticos y arqueológicos que sitúan a esta isla asiática como el centro de origen de los colonizadores polinésicos que trasladaron la morera de papel hacia Oceanía. En Hawái estos conglomerados están presentes por separado en cada individuo, donde existen muestras que forman parte del conglomerado encontrado en el resto del Pacífico y otros con el identificado en Asia. Estos últimos corresponden a los individuos masculinos, por lo que nuevamente los análisis confirman que las muestras masculinas de Hawái poseen un componente genético asiático y tienen un origen diferente al resto de muestras de Oceanía Remota. Además, hay que destacar que estos resultados indican sorprendentemente que no existe reproducción sexual en Hawái, a pesar de la presencia próxima de individuos masculinos y femeninos, ya que se observa que los individuos de esta localidad se presentan en dos grupos diferentes, cada uno correspondiente a un conglomerado homogéneo.

El análisis de coordenadas principales muestra que los genotipos de Oceanía Remota agrupan de forma aglomerada, con excepción de los tres genotipos de individuos masculinos de Hawái (**Figura 17A**). Hay que destacar que los genotipos asiáticos más cercanos a la nube polinésica son los correspondientes a Taiwán. Esto es consistente con lo observado mediante el análisis bayesiano de estructura poblacional. En el caso de las muestras de Hawái, se observa que los tres genotipos agrupan con los genotipos asiáticos, mientras que los cinco genotipos de las muestras femeninas agrupan con los genotipos del Pacífico. Por lo tanto, las muestras masculinas tienen un origen asiático y las femeninas tendrían un origen común con el resto de ejemplares de Oceanía Remota.

Al realizar el análisis de coordenadas principales enfocado en los genotipos de Oceanía Remota y excluyendo los genotipos de las muestras masculinas de Hawái (**Figura 17B**), se presentan tres grupos de genotipos: el grupo 1 está compuesto mayoritariamente por genotipos de Oceanía Remota Oeste y corresponde al grupo que se sitúa más cerca de los genotipos asiáticos; el grupo 2 posee mayoritariamente genotipos pertenecientes a Tahití, Rapa y Pitcairn, es decir, la parte central de Oceanía Remota Este; y el grupo 3 está compuesto principalmente por genotipos del extremo de Oceanía Remota Este y se sitúa más lejos de los genotipos asiáticos. Llama la atención que en cada grupo existan genotipos que pertenecen a localidades ajenas y geográficamente lejanas a la región mayoritaria del grupo. En el grupo 2 se encuentran genotipos de Fiji, Tonga y Hawái, mientras que en GP3 hay genotipos de Fiji y de Nueva Caledonia. Por lo tanto, los tres grupos poseen genotipos de Oceanía Remota Oeste, lo que señalaría una relación entre Oceanía Remota Oeste y Este. Además, los grupos 1 y 2 poseen genotipos de Hawái, lo que también daría cuenta de una relación entre este archipiélago con Oceanía Remota Oeste y la parte central de Oceanía

Remota Este. Las investigaciones arqueológicas sugieren que el poblamiento de Hawái se originó desde el archipiélago de las Marquesas y Tahití (Matisoo-Smith y cols., 1998), ambas localidades pertenecientes a la parte central de Oceanía Remota Este. Por lo tanto, la relación entre genotipos de Hawái con esta región apoyaría los estudios arqueológicos. Sin embargo, estos resultados también conectan a la morera de papel de Hawái con Oceanía Remota Oeste, sugiriendo otra ruta de migración o de intercambio con esta región.

Por otra parte, la construcción de la red de genotipos muestra nuevamente que los genotipos de Asia y los tres genotipos de individuos masculinos de Hawái tienen una relación lejana a los demás genotipos que se encuentran de Oceanía Remota (**Figura 18A**). Los individuos del Pacífico son genéticamente muy similares entre ellos, por lo tanto, esto podría explicar el motivo por el cual el programa utilizado para la construcción de la red muestra que los individuos de Asia se relacionan con genotipos identificados en Oceanía Remota Oeste y Este. Los resultados de esta red no son del todo congruentes con los modelos de poblamiento de Oceanía Remota sugeridos por los datos arqueológicos (Kirch, 2000; Weisler y cols., 2016). Sin embargo, hay que señalar que existe un genotipo asiático que se encuentra más cercano a los genotipos de Oceanía Remota, inclusive que los genotipos de los individuos masculinos de Hawái, siendo éste el genotipo 17, el cual corresponde a la muestra BQUCH0137 de Taiwán. Este genotipo taiwanés se relaciona con Oceanía Remota Oeste, sugiriendo una cercanía entre ambas localidades, lo cual es concordante con lo observado con el marcador de ADNcp *ndhF-rpl32* (Chang y cols., 2015). Además, hay que destacar que el genotipo de Taiwán más cercano a Oceanía Remota corresponde al de una muestra femenina de Taiwán.

El análisis enfocado en los genotipos de Oceanía Remota, excluyendo los genotipos de los individuos masculinos de Hawái, presenta tres grupos de genotipos (**Figura 18B**). El grupo GG1 incluye al centro a los genotipos mayoritarios de Fiji y Tonga, y a partir de éste se derivan genotipos de Tonga, Wallis, Samoa, Tahití y Hawái. El genotipo mayoritario de Samoa es compartido con el único genotipo identificado en Wallis. Durante el siglo XII, Samoa y Wallis fueron parte del reino de Tonga (Kirch, 2010) y ambas localidades se encuentran a una distancia relativamente cercana, lo cual explicaría la relación entre ambas islas. Además, se muestra la relación de Hawái con Oceanía Remota Oeste observada en el PCoA de forma más detallada, ya que existe una relación entre Hawái con Samoa, Wallis y Tonga. Esta relación podría corresponder a los primeros viajes de los colonizadores polinésicos, a viajes posteriores al período de colonización inicial o a viajes recientes. Una manera de estudiar la temporalidad de la relación entre estos genotipos sería genotipificar muestras de material antiguo proveniente de estas localidades para analizar la relación entre estas cuatro localidades, e integrar los genotipos identificados en aquellos individuos con el análisis de muestras contemporáneas.

A partir del genotipo GG1 también se deriva el genotipo central del segundo grupo (GG2), el cual conectaría Oceanía Remota Oeste con Oceanía Remota Este, a través de la región central de ésta última. El

centro de este grupo está compuesto por un genotipo compartido entre Pitcairn y Fiji. Es llamativo que Pitcairn esté en el centro de este grupo, ya que se trata de una isla lejana a Oceanía Remota Oeste, muy pequeña, de difícil acceso y que estaba deshabitada cuando los europeos llegaron a ella durante el siglo XVI (Benton y Spencer, 1995). Los estudios arqueológicos señalan que, a pesar de las condiciones aisladas de Pitcairn, esta localidad fue habitada por los primeros colonizadores polinésicos. Cabe destacar que esta isla probablemente tuvo un importante rol en la cultura polinésica, ya que es la más próxima al islote de Henderson, que tiene afloramientos basálticos que fueron explotados en tiempos prehistóricos para extraer materia prima usada en la manufactura de hachas, azuelas y otras herramientas de piedra (Benton y Spencer, 1995). Las azuelas de la parte central de Oceanía Remota Este son muy similares a las encontradas en Oceanía Remota Oeste, principalmente en Tonga y Samoa (Clark y cols., 2014). Los análisis geoquímicos (isótopos) muestran que la mayoría de las herramientas líticas de Tonga y Samoa tendrían como origen las canteras de basalto de las islas Cook y Henderson (Weisler y Woodhead, 1995). Adicionalmente, estudios muy recientes han encontrado herramientas líticas prehistóricas provenientes de Samoa, específicamente hachas y azuelas, en puntos tan distantes entre sí como las islas Marquesas, Islas Australes y, principalmente, en las Islas Cook (parte central de Oceanía Remota Este) (Weisler y cols., 2016), lo cual sugiere extensas redes de interacción e intercambio. Por lo tanto, el genotipo compartido de *B. papyrifera* entre Pitcairn y Fiji detectado en esta tesis, apoya la estrecha relación detectada entre Oceanía Remota Oeste y Oceanía Remota Este, en forma similar a los análisis geoquímicos de artefactos líticos de contextos arqueológicos.

A partir del genotipo central de GG2 deriva un genotipo de Fiji y, por otra parte, un genotipo compartido entre Marquesas, Hawái y Tonga. Esto también concuerda con los análisis arqueológicos que señalan que Hawái se pobló desde Marquesas (Matisoo-Smith, 1998) y nuevamente apoya la relación entre Hawái con Oceanía Remota Oeste que se observa en el grupo GG1 de la red de genotipos. Según datos arqueológicos, las Islas Marquesas fueron colonizadas por navegantes polinésicos provenientes de Samoa y Tonga (Rolett, 1993). Nuestros resultados confirman esta relación con Tonga. Además, el genotipo de Rapa (Islas Australes) se deriva de este genotipo compartido. Los análisis de isótopos de artefactos sugieren que los habitantes de Rapa mantuvieron contacto con las Islas de la Sociedad y Marquesas (Collerson y Weisler, 2007), lo cual también se observa en la red de genotipos de la morera de papel.

El último grupo, GG3, está compuesto principalmente por genotipos de la parte central y los extremos de Oceanía Remota Este, como sería Isla de Pascua. El genotipo central del tercer grupo deriva a partir del genotipo compartido entre Pitcairn, Tonga y Fiji y se compone del genotipo mayoritario de Isla de Pascua y un genotipo de Marquesas. Los datos arqueológicos sugieren que el poblamiento de Isla de Pascua provino de Marquesas y Mangareva del archipiélago de Gambier (Kirch, 2010), por lo que nuestros resultados apoyarían esta relación entre Isla de Pascua y Marquesas. No tenemos datos para la isla Mangareva, que

podrían reforzar esta relación observada desde la arqueología, debido a que la morera de papel ha desaparecido localmente del archipiélago de Gambier (Seelenfreund y cols., 2010). A partir de este genotipo central de GG3 se derivan genotipos de Isla de Pascua, Tahití y Raiatea, estas dos últimas correspondiendo a localidades de la parte central de Oceanía Remota Este, y un genotipo compartido entre ejemplares de Marquesas y Tahití, lo cual sugeriría algún tipo de contacto.

Adicionalmente, a partir del genotipo central de GG3 derivan genotipos encontrados en Nueva Caledonia, Fiji y Tonga. La literatura no describe una relación entre Isla de Pascua o Marquesas con estas localidades de Oceanía Remota Oeste. Al observar la red de genotipos en general, Fiji posee genotipos que son parte del centro de dos de los tres grupos, y a partir de estos genotipos centrales, se derivan genotipos adicionales presentes en Tonga y Fiji. Nuestros resultados sugieren que *B. papyrifera* posee una diversidad genética diferente en estos dos archipiélagos, ya que a partir de ellas los colonizadores polinésicos habrían viajado hacia el Este. Por lo tanto, sería lógico que el genotipo central del tercer grupo estuviera presente en Fiji y/o Tonga, ya que estas últimas localidades poseen una alta diversidad. Sería posible, entonces, que el genotipo compartido entre Isla de Pascua y Marquesas sea un genotipo que previamente también se encontraba en Oceanía Remota Oeste y que no se detectó en los individuos analizados de aquella región. La existencia de un genotipo compartido entre Isla de Pascua, Marquesas, Tonga y/o Fiji explicaría la aparición de dos genotipos de Nueva Caledonia, tres de Fiji y uno de Tonga en el tercer grupo de genotipos de la red.

Hay que destacar que la red de genotipos muestra que los genotipos de Fiji y Tonga se encuentran en los tres grupos de genotipos identificados, siendo los únicos genotipos que se relacionan con *todas* las localidades de Oceanía Remota analizadas en este trabajo. Esta conexión con todas las regiones del Pacífico apoya que la diversidad genética de la morera de papel de Fiji y Tonga es mayor en comparación al resto de Oceanía Remota y, además, indicaría que esta especie vegetal tiene un origen común a partir de ambas localidades de Oceanía Remota Oeste.

6.3 Análisis de la diversidad genética de individuos seleccionados de Oceanía Remota mediante la región de cloroplasto *ndhF-rpl32*

Se analizaron exitosamente 41 muestras de morera de papel de Oceanía Remota con el marcador *ndhF-rpl32*. Al integrar las secuencias de estas 41 muestras con 101 secuencias que poseen los 48 haplotipos descritos previamente para esta región de ADNcp (Chang y cols., 2015), se observó que el hábitat nativo posee la mayor diversidad genética con 48 haplotipos de esta región (**Figura 21**). En el caso de Oceanía Remota, todas las muestras de Oceanía Remota Oeste y la mayoría de Oceanía Remota Este (35 individuos en total) agruparon con el haplotipo cp17. Este haplotipo se encuentra en el sur de Taiwán y mayoritariamente en las islas del Pacífico, confirmando su presencia predominante en esta última región.

El análisis ampliado y focalizado en Oceanía le otorga más peso a la estrecha relación observada entre el sur de Taiwán y Oceanía Remota. Estos resultados nuevamente indican que la morera de papel presente en Oceanía Remota tiene su origen en Asia, específicamente en el sur de Taiwán.

Por otra parte, los cuatro individuos masculinos de Hawái agruparon con dos muestras de Hawái analizadas anteriormente (Chang y cols., 2015). Los análisis previos confirmaban que existen dos poblaciones de morera de papel en Hawái: una posee el haplotipo cp17 común para todas las islas de Oceanía Remota, que corresponde a los individuos femeninos de *B. papyrifera*, mientras que los individuos masculinos presentan el haplotipo cp41. El haplotipo cp41 deriva del haplotipo cp28, que se encuentra en plantas de Japón y en la región de Guangdong, del este de China. Estos resultados eran esperables, ya que se ha visto en este trabajo que, de acuerdo con los marcadores ITS-1, de sexo y SSR, los individuos masculinos de Hawái son genéticamente cercanos a Asia. Hay que destacar si bien estos resultados sugieren una relación entre los individuos masculinos de Hawái e individuos de Japón y China, el origen exacto de estas plantas masculinas hawaianas no se ha determinado. Hay tres posibilidades: que las plantas de Hawái sean de origen exclusivamente chino, exclusivamente japonés o de ambos. El marcador *ndhF-rpl32* no posee suficiente resolución para dirimir la relación entre las muestras masculinas de Hawái, China y Japón. No obstante, hay que destacar que en este trabajo se observó que los individuos masculinos de Hawái se relacionan con muestras de China mediante el marcador ITS-1.

La gran sorpresa de este análisis fue el hallazgo de tres nuevos haplotipos de la región *ndhF-rpl32* en Oceanía Remota, específicamente en Marquesas e Isla de Pascua. Estos tres nuevos haplotipos derivan del haplotipo cp17, por lo que la relación entre el sur de Taiwán y Oceanía Remota sigue manteniéndose (**Figura 21**). Sin embargo, la identificación de los haplotipos cp49 (presente en plantas de *B. papyrifera* del oeste de Isla de Pascua), cp50 (presente en plantas de Fatu Hiva, la isla sur del archipiélago de Marquesas) y cp51 (del lado oeste de Isla de Pascua) muestra que la diversidad genética en Oceanía Remota es mayor a la anteriormente documentada. De hecho, estos resultados son inesperados, puesto que esta especie tiene un origen clonal en Oceanía Remota y que estos cambios han ocurrido en menos de 2.000 años. Se considera de interés el uso ampliado y focalizado del marcador *ndhF-rpl32* en Oceanía Remota, ya que se encontraron nuevos haplotipos derivados de cp17 en Oceanía Remota Este. Estos resultados sugieren que Oceanía Remota posee una diversidad genética mayor a la reportada, especialmente en zonas alejadas como Marquesas e Isla de Pascua. De todos modos, sería recomendable analizar más muestras de Oceanía Remota, con especial atención a muestras de Marquesas e Isla de Pascua (especialmente de Fatu Hiva en Marquesas y el lado oeste de la Isla de Pascua) para determinar si estos haplotipos están presentes en muestras particulares o son compartidos para los individuos de la misma localidad, e incluso si hay haplotipos adicionales.

Finalmente, se concluye que la región de ADNcp *ndhF-rpl32* también es un marcador útil para discriminar individuos de *B. papyrifera* de Asia y Oceanía Remota. En el caso de Oceanía Remota, se observa que existen 5 poblaciones de morera de papel en esta región. La primera y predominante en todas las islas del Pacífico es el haplotipo cp17, el cual también se encuentra en el sur de Taiwán. La segunda corresponde a los individuos masculinos de Hawái que poseen un haplotipo derivado de China y Japón, lo cual coincide con lo visto con marcadores como ITS-1 y SSR. Por otra parte, las tres nuevas poblaciones de *B. papyrifera* identificadas con este marcador corresponden a los haplotipos cp49 y cp51 en Isla de Pascua y cp50 en islas Marquesas, todas ellas en Oceanía Remota Este. Por lo tanto, el análisis de la región *ndhF-rpl32* en un número seleccionado de individuos sugiere hasta la fecha una mayor diversidad genética en Oceanía Remota Este que en Oceanía Remota Oeste. Cabe señalar que no se han analizado todas las muestras disponibles en nuestro laboratorio, por lo que no se debe descartar la posibilidad de encontrar nuevos haplotipos derivados de cp17 en Oceanía Remota Oeste. De este modo, es altamente recomendable expandir el análisis mediante este marcador a un mayor número de individuos de Oceanía Remota, puesto que el estudio en un número reducido de individuos sugiere que existe una diversidad genética detectable en esta región.

Por otra parte, es necesario señalar que el desarrollo de marcadores moleculares más sensibles e informativos es un proyecto muy importante de colaboración entre nuestro grupo de investigación y el grupo del Dr. Chung, debido a la naturaleza clonal de esta especie vegetal. Uno de los objetivos para cumplir este proyecto, es la secuenciación del genoma de cloroplasto de *B. papyrifera*, para así identificar sitios variables que permitan el desarrollo de nuevos marcadores. El criterio de elección de las muestras para secuenciar su genoma de cloroplasto se basó en los haplotipos que presentaran. En este contexto, hay que destacar que de las cuatro muestras de Oceanía Remota con nuevos haplotipos identificados, sólo las muestras BQUCH0221 (haplotipo cp49) y BQUCH00036 (haplotipo cp51) se enviaron a secuenciar a la Academia Sinica (Taipéi), puesto que eran las únicas con extracciones de ADN que cumplieran con los requisitos para secuenciación mediante NGS (ver sección 4.2.5 de Materiales y Métodos). El análisis de la secuencia del genoma de cloroplasto permitirá el desarrollo de marcadores informativos, como SNPs o microsatélites de ADNcp, que serán útiles para analizar y diferenciar individuos de morera de papel, contribuyendo de este modo a comprender la dispersión de esta especie en las islas del Pacífico.

6.4 Propuesta de rutas de dispersión de la morera de papel en Oceanía Remota

En base a los resultados obtenidos, es posible plantear un modelo de poblamiento inferido a partir de los análisis mediante SSR de *B. papyrifera*, como se discutió previamente, y compararlo con las rutas propuestas por otros modelos de estudio, como serían los análisis genéticos de otros modelos, como la rata

polinésica (Matisoo-Smith y Robins, 2004), los análisis genéticos de ADN humano (Kayser, 2010, Wollstein y cols., 2010) y los estudios arqueológicos (Kirch, 2010).

A partir de lo expuesto, es posible concluir que los marcadores SSR diferencian a los individuos de Asia, Oceanía Remota y los individuos masculinos de Hawái. De hecho, estos marcadores permiten analizar la diversidad genética de individuos de *B. papyrifera* en Oceanía Remota, lo cual los posiciona como los marcadores de mayor resolución utilizados en esta tesis. Los resultados de genotipificación en esta tesis muestran que aunque la diversidad genética de la región es relativamente baja, es diferente entre Oceanía Remota Oeste y Este, y además descubren una red de conexiones no azarosa entre los individuos de todas las islas del Pacífico. Los individuos con un mayor número de relaciones entre islas de diferentes regiones corresponden a Fiji y Tonga, localidades pertenecientes a Oceanía Remota Oeste. Este es el primer análisis genético de una especie vegetal realizada en múltiples localidades de 15 islas o archipiélagos del Pacífico y que demuestra relaciones entre los genotipos identificados de las distintas islas, reflejando la compleja interacción humana de esta región. Esta relación compleja se ha observado mediante los estudios arqueológicos, que dan cuenta de una gran esfera de interacción e intercambio entre Oceanía Remota Oeste y Este (Weisler y Woodhead, 1995; Clark y cols., 2014; Weisler y cols., 2016). Estas relaciones de intercambio entre localidades podrían corresponder a los primeros viajes de los navegantes pre-polinésicos, a rutas de intercambio posteriores o a ambas. Los viajes post-colonización entre las islas eran esenciales para asegurar una línea de vida entre las comunidades parentales y filiales, para que la élite de una localidad pudiera obtener artículos prestigiosos de las islas distantes, y para la integración de las comunidades remotas bajo una autoridad centralizada, como fue el reino de Tonga (Weisler y cols., 2016). Sin embargo, hay que señalar que no se puede descartar que estas relaciones sean también reflejo de los primeros movimientos de los colonizadores.

Todas las relaciones observadas entre los tres grupos de genotipos identificados en Oceanía Remota corresponden a rutas de dispersión de la morera de papel en Oceanía Remota, y se presentan en la **Figura 22** a continuación.

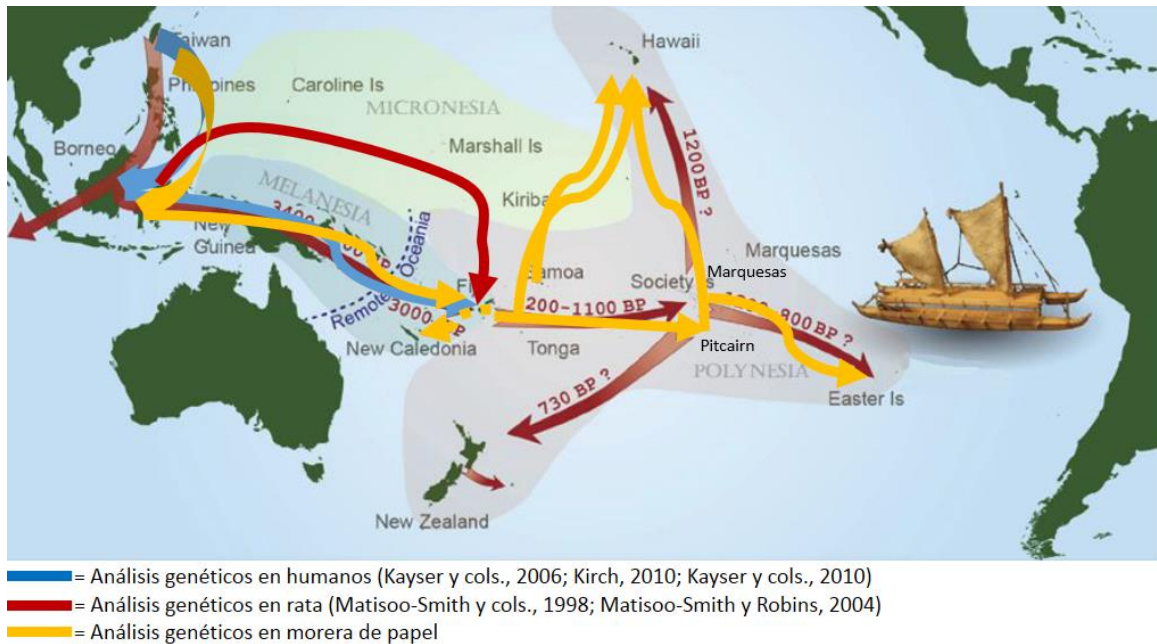


Figura 22: Modelo de poblamiento de Oceanía Remota a partir de estudios genéticos de humanos, rata polinésica y morera de papel (Imagen adaptada de Matisoo-Smith, 2015).

En la **Figura 22** se muestra la integración de los resultados obtenidos mediante los análisis genéticos de morera de papel de Asia y Oceanía Remota, con los análisis genéticos previos de humanos (Kayser y cols., 2006; Kirch, 2010; Kayser y cols., 2010) y de la rata polinésica (Matisoo-Smith y cols., 1998; Matisoo-Smith y Robins, 2004), otra especie transportada intencionalmente por los navegantes austronésicos en el Pacífico. Se observa que las tres especies analizadas apoyan la colonización de Oceanía Remota a partir de un movimiento migratorio proveniente desde Asia y que transitó por Oceanía Cercana hasta llegar a Fiji. Con análisis de ADNmt de rata se propone además una ruta paralela de migración, correspondiente a una ola desde el sudeste asiático hacia Micronesia, que terminó en Fiji (Matisoo-Smith y Robins, 2004). A partir de este archipiélago, el estudio de humanos no ha entregado resultados que permitan establecer relaciones entre las poblaciones de diferentes islas (Matisoo-Smith, 2015). No obstante, los estudios en rata polinésica proponen que esta especie se transportó desde Oceanía Remota Oeste hasta las Islas de la Sociedad, en la parte central de Oceanía Remota Este, y a partir de esta región se poblaron las islas más extremas de Oceanía Remota Este, siendo estas Hawái, Isla de Pascua y Nueva Zelanda (Matisoo-Smith y cols., 1998). Por una parte, el análisis genético de la morera de papel apoya estas rutas; sin embargo, además entrega relaciones interesantes que no se habían observado en otros estudios de este tipo: existiría una conexión directa entre Oceanía Remota Oeste con Hawái y, de forma sorprendente, los resultados de este trabajo posicionan a la pequeña isla de Pitcairn en la parte central de Oceanía Remota Este como un centro que conecta Oceanía Remota Oeste con los extremos de Oceanía Remota Este.

Por lo tanto, el estudio de la dispersión de especies estrechamente asociadas al hombre constituye una herramienta útil para la comprensión del poblamiento de Oceanía Remota. Los análisis realizados en esta tesis demuestran que la caracterización genética de la morera de papel de las islas del Pacífico apoya los resultados observados en la arqueología y otros estudios genéticos, y entrega nuevas rutas de dispersión que aportan a la reconstrucción de las rutas de migración desde Oceanía Remota Oeste hacia la parte central de Oceanía Remota Este y contribuyen a la comprensión del complejo proceso de poblamiento de Oceanía Remota.

Finalmente, los resultados obtenidos sugieren que la diversidad genética de la morera de papel en Oceanía Remota es baja y homogénea en comparación a la detectada en Asia. Sin embargo, hay que recordar que los humanos viajaron desde el Oeste de Oceanía Remota hacia el este del Pacífico, llegando a Isla de Pascua en un lapso de aproximadamente 1.000 años. Este corto margen de tiempo se refleja en el número similar de genotipos encontrados en Oceanía Remota Oeste y Este. Sin embargo, se logró detectar una diversidad genética diferente entre ambas zonas, puesto que los genotipos de Oceanía Remota Oeste, especialmente los de Fiji y Tonga, se relacionan con diversas localidades de los genotipos de Oceanía Remota. Estos resultados señalan que la morera de papel de Oceanía Remota tendría como origen a Fiji y Tonga y que hubo una extensa red de interacción que conectaba diversas islas de Oceanía Remota Oeste y Oceanía Remota Este entre sí y que es detectable aún en las plantas contemporáneas de morera de papel.

7. CONCLUSIONES

- Se analizaron exitosamente 120 individuos de Oceanía Remota Oeste con ITS-1, confirmando que todos los individuos poseen la variante T identificada como el polimorfismo común en Oceanía Remota. Los resultados con este marcador sugieren que la diversidad genética en Oceanía Remota Oeste y en las islas del Pacífico en general es homogénea.
- Se analizaron exitosamente 120 individuos de Oceanía Remota Oeste mediante el marcador de sexo, donde se determinó que todos son del sexo femenino, al igual que en Oceanía Remota Este. Este resultado abre dos posibles escenarios: (i) existió una selección para transportar y/o cultivar clones de individuos femeninos en el Pacífico por parte de los pre-polinésicos, o (ii) las plantas femeninas poseen características distintas en Oceanía Remota en comparación a las masculinas, y por ende en la actualidad sólo se encuentran presentes ejemplares femeninos en la región (Peñailillo y cols., 2016).
- Se analizaron exitosamente 120 individuos de Oceanía Remota Oeste mediante 10 marcadores de SSR, pudiendo diferenciar 13 genotipos en las cuatro localidades de esta región. Se observa que los genotipos de Oceanía Remota Oeste nacen a partir del genotipo mayoritario compartido entre Fiji y Tonga. Este marcador es el más informativo de los cuatro utilizados en este trabajo.
- Al integrar los datos de Oceanía Remota Oeste y Este analizadas previamente y en esta tesis, respectivamente, se obtiene que los 32 genotipos identificados en esta región se organizan en tres grupos: 1) Oceanía Remota Oeste, 2) Oceanía Remota Oeste y la parte central de Oceanía Remota Este y 3) Parte central y los extremos de Oceanía Remota Este. En todos ellos se encuentran genotipos de Oceanía Remota Oeste, correspondiendo éstos a Fiji y Tonga. Además, se observa que los genotipos centrales de dos grupos se encuentran en Fiji.
- Se analizaron exitosamente 41 individuos de Oceanía Remota con el marcador de cloroplasto *ndhF-rpl32*, identificando cinco haplotipos en total: la mayoría de las muestras poseen el haplotipo cp17, identificado previamente como común para el Pacífico y los individuos masculinos de Hawái poseen el haplotipo cp41 (Chang y cols., 2015). Adicionalmente, cuatro individuos de Oceanía Remota presentaron tres nuevos haplotipos, siendo dos haplotipos pertenecientes a Isla de Pascua y uno a

Marquesas, lo cual da cuenta que la diversidad genética es mayor a la previamente reportada en la región.

- Es necesario expandir el análisis del ADN de cloroplasto mediante el marcador *ndhF-rpl32* al número total de individuos de Oceanía Remota Oeste y Este y mediante herramientas genómicas, ya que la identificación de nuevos haplotipos en Oceanía Remota Este entrega resultados auspiciosos respecto al análisis de la diversidad genética de la morera de papel en Oceanía Remota.
- Los resultados de esta tesis indican por primera vez que la diversidad genética de *B. papyrifera* es diferente entre Oceanía Remota Oeste y Este. Adicionalmente, estos resultados sugieren que hubo una red de interacción que conectaba las diversas islas de Oceanía Remota Oeste y la parte central y los extremos de Oceanía Remota Este entre sí.

8. REFERENCIAS

- Austin C.C. (1999). Lizards took express train to Polynesia. *Nature*, 397(6715), 113-114.
- Baldwin B.G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(1), 3-16.
- Barker C. (2002) Plate 432 *Broussonetia papyrifera*. *Curtis's Botanical Magazine*, 19, 8-18.
- Bawa K.S. (1980). Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15-39.
- Bell F.L.S. (1946). An Introduction to Polynesian Anthropology. *Mankind*, 3(9), 277-278.
- Benton T.G., Spencer T. (Eds.). (1995). The Pitcairn Islands: Biogeography, Ecology and Prehistory. *Proceedings of an International Discussion Meeting Held at the Linnean Society, 5-6 May 1994* (Vol. 56). Academic Press.
- Brumfield R.T., Beerli P., Nickerson D.A., Edwards S.V. (2003). The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), 249-256.
- Caillon S., Quero-García J., Lescure J.P., Lebot V. (2006). Nature of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) genetic diversity prevalent in a Pacific Ocean island, Vanua Lava, Vanuatu. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(6), 1273-1289.
- Chang C.S., Liu H.L., Moncada X., Seelenfreund A., Seelenfreund D, Chung K.F. (2015) A holistic picture of Austronesian migrations revealed by phylogeography of Pacific paper mulberry. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 112(44), 13537-42.
- Chen R.M., Hu L.H., An T.Y., Li J., Shen Q. (2002). Natural PTP1B inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(23), 3387-3390.
- Clarke A.C., Burtenshaw M.K., McLenachan P.A., Erickson D.L., Penny D. (2006). Reconstructing the origins and dispersal of the Polynesian bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). *Molecular Biology and Evolution*, 23(5), 893-900.
- Clark G.R., Reepmeyer C., Melekiola N., Woodhead J., Dickinson W.R., Martinsson-Wallin H. (2014). Stone tools from the ancient Tongan state reveal prehistoric interaction centers in the Central Pacific. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111(29), 10491-10496.
- Collerson K.D., Weisler M.I. (2007). Stone adze compositions and the extent of ancient Polynesian voyaging and trade. *Science*, 317(5846), 1907-1911.
- Cornuet J.M., Luikart G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001-2014.
- Diamond J. (1988). Express train to Polynesia. *Nature*, 336, 307.
- Diamond J.M. (2000). Linguistics: Taiwan's gift to the world. *Nature*, 403(6771), 709-710.

- Dice L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3), 297-302.
- Ericson D.B., Wollin G. (1968). Pleistocene climates and chronology in deep-sea sediments. *Science*, 162(3859), 1227-1234.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Gray R.D., Drummond A.J., Greenhill S.J. (2009). Language phylogenies reveal expansion pulses and pauses in Pacific settlement. *Science*, 323(5913), 479-483.
- Green Roger C. (1996). "Prehistoric transfers of portable items during the Lapita horizon in Remote Oceania: a review." *Bulletin of the Indo-Pacific Prehistory Association*, 15, 119-130.
- González-Lorca, J., Rivera-Hutinel, A., Moncada, X., Lobos, S., Seelenfreund, D., Seelenfreund, A. (2015). Ancient and modern introduction of *Broussonetia papyrifera* ([L.] Vent.; Moraceae) into the Pacific: Genetic, geographical and historical evidence. *New Zealand Journal of Botany*, 53(2), 75-89.
- Green R.C., Weisler M.I. (2002). The Mangarevan sequence and dating of the geographic expansion into southeast Polynesia. *Asian Perspectives*, 41(2), 213-241.
- Guo F., Li F., Cheng H., Hongxia D., Xintian Z., Zhaoyi W., Yiming L. (2012) Prenylflavone derivatives from *Broussonetia papyrifera*, inhibit the growth of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Phytochemistry Letters* 013, 6(3):331–336.
- Joshi S.P., Ranjekar P.K., Gupta V.S. (1999). Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science*, 77(2), 230-240.
- Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334.
- Kayser M., Brauer S., Weiss G., Underhill P., Roewer L., Schiefenhövel W., Stoneking, M. (2000). Melanesian origin of Polynesian Y chromosomes. *Current Biology*, 10(20), 1237-1246.
- Kayser M., Brauer S., Cordaux R., Casto A., Lao O., Zhivotovsky L.A., Moyse-Faurie C., Rutledge R.B., Schiefenhövel W., Gil D., Lin A.A., Underhill P.A., Oefner P.J., Trent R.J., Stoneking, M. (2006). Melanesian and Asian origins of Polynesians: mtDNA and Y chromosome gradients across the Pacific. *Molecular Biology and Evolution*, 23(11), 2234-2244.
- Kayser M. (2010). The human genetic history of Oceania: near and remote views of dispersal. *Current Biology*, 20(4), 194-201.
- Kennedy J. (2008). Pacific bananas: complex origins, multiple dispersals? *Asian Perspectives*, 47(1), 75-94.

- Kiran U., Khan S., Mirza K.J., Ram M., Abdin M.Z. (2010). SCAR markers: a potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia*, 81(8), 969-976.
- Kirch P.V. (2010). Peopling of the Pacific: A Holistic Anthropological Perspective. *Annual Review of Anthropology*, 39, 131-148.
- Kmiec B., Woloszynska M., Janska H. (2006). Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current Genetics*, 50(3), 149-159.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Lafontaine D.L., Tollervey D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(7), 514-520.
- Larson G., Cucchi T., Fujita M., Matisoo-Smith E, Robins J., Anderson A., Rolett B., Spriggs M., Dolman G., Kim, T.H., Thuy N.T., Randi, E., Doherty, M., Due R.A., Bollt R., Djubiantono T., Griffin B., Intoh M., Keane E., Kirch P., Li K.T., Morwood M., Pedriña L.M., Piper P.J., Rabett R.J., Shooter P., Van den Bergh G., West E., Wickler S., Yuan J., Cooper A., Dobney K. (2007). Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 4834-4839.
- Lebot V., Merlin M., Lindstrom L. (1997). Kava: The Pacific elixir: The definitive guide to its ethnobotany, history, and chemistry. *Inner Traditions/Bear & Company*.
- Lee D., Bhat K.P., Fong H.H., Farnsworth N.R., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. (2001). Aromatase Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Journal of Natural Products*, 64(10), 1286-1293.
- Wang L., Dai C., Liu D., Liu Q. (2012). Identification of a male-specific amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker in *Broussonetia papyrifera*. *African Journal of Biotechnology*, 11(33), 8196-8201.
- Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Reisch B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevines cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13.
- Nagai M., Yoshida A., Sato N. (1998). Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol and glycerol on PCR. *IUBMB Life*, 44(1), 157-163.
- Macaya, J. 2004. Las Moraceae cultivadas en Chile. *Chloris Chilensis*. Año 7 N° 2.
- Matisoo-Smith E., Roberts R., Irwin G., Allen J., Penny D., Lambert D. (1998). Patterns of prehistoric human mobility in Polynesia indicated by mtDNA from the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95(25), 15145-15150.

- Matisoo-Smith E., Robins J.H. (2004). Origins and dispersals of Pacific peoples: evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(24), 9167-9172.
- Matisoo-Smith E. (2015). Ancient DNA and the human settlement of the Pacific: A review. *Journal of Human Evolution*, 79, 93-104.
- Matthews P. (1996) Ethnobotany, and the Origins of *Broussonetia papyrifera* in Polynesia. (An essay on tapa prehistory). *New Zealand Journal of Archaeology*, 117-132.
- Moncada X., Payacán C., Arriaza F., Lobos S., Seelenfreund, D., Seelenfreund, A. (2013). DNA extraction and amplification from contemporary Polynesian bark-cloth. *PLoS ONE*, 8(2), e56549.
- Odo F., Sinoto K. (1985). A pictorial history of the Japanese in Hawai'i, 1885-1924. Hawai'i Immigrant Heritage Preservation Center Dept., Bishop Museum Press, Honolulu, HI.
- Page R.D.M. (1996). TREEVIEW: And application to display phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS*, 12, 357-358.
- Patrick V.K. (2010). Peopling of the Pacific: A holistic anthropological perspective. *Annual Review of Anthropology*, 39, 131-148.
- Pavliček A., Hrdá Š., Flegr J. (1998). Free-Tree: Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia biologica*, 45(3), 97-99.
- Payacán C. (2015) Caracterización genética a partir de ADN antiguo de muestras de herbarios de *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Herit. ex. Vent. del Pacífico mediante marcadores moleculares. (Tesis de Magíster en Bioquímica). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Peakall R., Smouse P.E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539.
- Peñailillo J. (2014). Estudio de la diversidad genética de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Herit. ex. Vent.) en el Pacífico mediante un marcador molecular de sexo y microsatélites. (Tesis de Magíster en Bioquímica). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Peñailillo J., Olivares G., Moncada X., Payacán C., Matthews P.M.; Chung K.F., Seelenfreund A., Seelenfreund D. (2016). Sex distribution of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) in the Pacific. *PLoS ONE*, 11(8), e0161148.
- Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. (1999). BOTTLENECK: A program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity*, 90, 502-503.

- Pray L. (2008). Genetic drift: bottleneck effect and the case of the bearded vulture. *Nature Education*, 1(1), 61.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Ramakrishnan U.M.A., Hadly E.A., Mountain J.L. (2005). Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. *Molecular Ecology*, 14(10), 2915-2922.
- Rohlf F.J. (1997). NTSYS-pc 2.1. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, Setauket, NY.
- Rolett B.V. (1993). Marquesan prehistory and the origins of East Polynesian culture. *Journal de la Société des Océanistes*, 96, 29-47.
- Roullier C., Benoit L., McKey D.B., Lebot V. (2013). Historical collections reveal patterns of diffusion of sweet potato in Oceania obscured by modern plant movements and recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 2205-2210.
- Rutherford J., Almond M, Nunn P. (2012) Analysis of pottery samples from Bourewa, the earliest known Lapita site in Fiji. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 85(1), 155-9.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Savolainen P., Leitner T., Wilton A.N., Matisoo-Smith E., Lundeberg J. (2004). A detailed picture of the origin of the Australian dingo, obtained from the study of mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), 12387-12390.
- Särkinen T., Staats M., Richardson J.E., Cowan R.S., Bakker F.T. (2012). How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens. *PloS ONE*, 7(8), e43808.
- Schuelke M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233-234.
- Seelenfreund D., Piña R., Ho K.Y., Lobos S., Moncada X., Seelenfreund A. (2011). Molecular analysis of *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. (Magnoliophyta: Urticales) from the Pacific, based on ribosomal sequences of nuclear DNA. *New Zealand Journal of Botany*, 49(3), 413-420.
- Shabir A.W., Bhat M.A., Malik G.N., Kamili A.S., Mir M.R., Bhat S.A., Wani Nawsheeda, Razn S.M., Akhtan Sabina, Bhat K.A. (2010). Molecular markers and their role in mulberry improvement. *International Journal of Current Research*, 4, 20-24.

- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the Hare III. *American Journal of Botany*, 94(3), 275-288.
- Sneath P.H., Sokal R.R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Stoneking M., Krause J. (2011). Learning about human population history from ancient and modern genomes. *Nature Reviews Genetics*, 12(9), 603-614.
- Storey A.A., Athens J.S., Bryant D., Carson M., Emery K., deFrance S., Higham C., Huynen L., Intoh M., Jones S., Kirch P.V., Ladefoged T., McCoy P., Morales-Muñiz A., Quiroz D., Reitz E., Robins J., Walter R., Matisoo-Smith E. (2012). Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures. *PLoS ONE*, 7(7), e39171.
- Sun J., Liu S.F., Zhang C.S., Yu L.N., Bi J., Zhu F., Yang Q.L. (2012). Chemical composition and antioxidant activities of *Broussonetia papyrifera* fruits. *PLoS ONE*, 7(2), e32021.
- Sykes W.R., West C.J. (1996). New records and other information on the vascular flora of the Kermadec Islands. *New Zealand Journal of Botany*, 34(4), 447-462.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11030-11035.
- Terrell J. (1988). History as a family tree, history as an entangled bank: constructing images and interpretations of prehistory in the South Pacific. *Antiquity*, 62(237), 642-657.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Timme, R. E., Kuehl, J. V., Boore, J. L., & Jansen, R. K. (2007). A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats. *American Journal of Botany*, 94(3), 302-312.
- Underhill P.A., Kivisild T. (2007). Use of Y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations. *Annual Review of Genetics*, 41, 539-564.
- Wang G.W., Huang B.K., Qin L.P. (2012). The genus *Broussonetia*: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytotherapy Research*, 26(1), 1-10.
- Weisler M.I., Woodhead J.D. (1995). Basalt Pb isotope analysis and the prehistoric settlement of Polynesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(6), 1881-1885.

- Weisler MI, Bolhar R, Ma J, St Pierre E, Sheppard P, Walter RK, Feng Y, Zhao JX, Kirch PV. (2016). Cook Island artifact geochemistry demonstrates spatial and temporal extent of pre-European interarchipelago voyaging in East Polynesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), 8150–8155.
- Whistler W.A., Wichman C. (2009). Plants of the canoe people: an ethnobotanical voyage through Polynesia. *National Tropical Botanical Garden*. 241.
- Wilmshurst J.M., Hunt T.L., Lipo C.P., Anderson A.J. (2011). High-precision radiocarbon dating shows recent and rapid initial human colonization of East Polynesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 1815-1820.
- Wollstein A., Lao O., Becker C., Brauer S., Trent R.J., Nürnberg P., Stoneking M, Kayser M. (2010). Demographic history of Oceania inferred from genome-wide data. *Current Biology*, 20(22), 1983-1992.
- Wu W.T. (2012). Evaluation of anti-inflammatory effects of *Broussonetia papyrifera* stem bark. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(1), 26.
- Yamanouchi H., Koyama A., Takyu T., Muramatsu N. (2010). Nuclear DNA amounts in diploid mulberry species (*Morus* spp.). *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 79(1), 1-8.
- Zerega N.J., Ragone D., Motley T.J. (2004). Complex origins of breadfruit (*Artocarpus altilis*, Moraceae): implications for human migrations in Oceania. *American Journal of Botany*, 91(5), 760-766.
- Zhao W.G., Miao X.X., Zang B., Zhang L., Pan Y.L., Huang Y.P. (2006). Construction of fingerprinting and genetic diversity of mulberry cultivars in China by ISSR markers. *Acta Genetica Sinica*, 33(9), 851-860.

9. ANEXOS

ANEXO I

Tabla I: Nombre de cada muestra, origen, detalle de la extracción, pureza y concentración de las 120 muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste

N°	Nombre muestra	Origen	Isla	Detalle	A _{260/280}	Nanodrop	Picogreen	Relación N/PG
						(N)	(PG)	
						[ADN] ng/μL	[ADN] ng/uL	
1	BQUCH0246	Fiji	Taveuni	G	2,0	573,7	2,6	224
2	BQUCH0247	Fiji	Taveuni	GD	2,0	740	16,1	46
3	BQUCH0248	Fiji	Taveuni	G	1,9	749,9	20,1	37
4	BQUCH0249	Fiji	Taveuni	Gd	1,9	147,8	1,9	77
5	BQUCH0250	Fiji	Taveuni	NSO	1,9	448,3	4,1	110
6	BQUCH0251	Fiji	Taveuni	Gd	1,9	382,9	8,2	47
7	BQUCH0252	Fiji	Taveuni	GD	1,9	684,7	18,0	38
8	BQUCH0253	Fiji	Taveuni	GDR	1,9	669,5	15,1	44
9	BQUCH0258	Fiji	Vanua Levu	GDr	2,0	1042,2	20,8	50
10	BQUCH0259	Fiji	Vanua Levu	Gd	1,8	544,1	5,1	107
11	BQUCH0260	Fiji	Vanua Levu	G	1,7	1405,9	17,3	81
12	BQUCH0261	Fiji	Vanua Levu	Gd	1,9	713,2	11,1	64
13	BQUCH0262	Fiji	Vanua Levu	Gdr	2,0	648,6	12,4	52
14	BQUCH0263	Fiji	Vanua Levu	G	1,7	210,4	2,3	91
15	BQUCH0264	Fiji	Vanua Levu	Gd	1,9	1158,1	10,6	109
16	BQUCH0265	Fiji	Vanua Levu	Gd	1,9	1264,6	7,0	181
17	BQUCH0266	Fiji	Vanua Levu	GD	1,9	587	2,8	207
18	BQUCH0267	Fiji	Vanua Levu	NSO	2,0	456,3	2,7	169
19	BQUCH0268	Wallis	Utu fua	G	2,0	1317,4	6,5	204
20	BQUCH0269	Wallis	Utu fua	Gd	1,9	885,5	9,3	95
21	BQUCH0270	Wallis	Ha'afuasiasia	Gd	2,0	638,7	11,3	56
22	BQUCH0271	Wallis	Kolopopo	Gd	2,0	799,3	17,5	46
23	BQUCH0272	Wallis	Utu fua	NSO	1,9	605,7	4,3	140
24	BQUCH0273	Wallis	Utu fua	GD	1,9	493,7	4,3	115
25	BQUCH0274	Wallis	Utu fua	gd	1,9	321,1	2,6	123
26	BQUCH0275	Fiji	Vanua Levu	G	1,7	314,3	5,8	54
27	BQUCH0276	Fiji	Vanua Levu	GDr	1,8	374,3	8,3	45
28	BQUCH0277	Fiji	Vanua Levu	G	1,9	199,8	2,6	78
29	BQUCH0278	Fiji	Vanua Levu	NSO	1,7	73,1	1,6	47

La simbología se muestra a continuación: G: presencia de banda genómica de alto peso molecular, g: leve presencia de banda genómica de alto peso molecular, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: abundante presencia de ARN, r: leve presencia de ARN, NSO: no se observa. Por otra parte, la columna "Relación N/PG" muestra la relación de las concentraciones de ADN obtenidas mediante Nanodrop (N) y Picogreen (G).

ANEXO I (Continuación)

Tabla I: Nombre de cada muestra, origen, detalle de la extracción, pureza y concentración de las 120 muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste

N°	Nombre muestra	Origen	Isla	Detalle	A _{260/280}	Nanodrop (N)	Picogreen (PG)	Relación N/PG
						[ADN] ng/μL	[ADN] ng/uL	
30	BQUCH0279	Fiji	Vanua Levu	GD	1,8	479,8	8,2	58
31	BQUCH0280	Fiji	Vanua Levu	Gd	1,7	409,7	8,1	51
32	BQUCH0281	Fiji	Vanua Levu	g	1,8	147,1	1,8	81
33	BQUCH0282	Fiji	Vanua Levu	GDr	2,0	983,6	17,6	56
34	BQUCH0283	Fiji	Vanua Levu	G	1,8	395	4,5	88
35	BQUCH0284	Fiji	Vanua Levu	g	2,0	967,2	3,1	313
36	BQUCH0285	Fiji	Vanua Levu	Gd	1,8	314,9	2,4	130
37	BQUCH0286	Fiji	Vanua Levu	G	1,9	525,5	9,6	55
38	BQUCH0287	Fiji	Vanua Levu	GD	1,6	653,2	16,3	40
39	BQUCH0288	Fiji	Vanua Levu	Gd	1,8	322,6	5,5	59
40	BQUCH0289	Fiji	Vanua Levu	G	1,9	499,7	5,3	94
41	BQUCH0290	Fiji	Vanua Levu	G	1,9	313,8	4,8	66
42	BQUCH0291	Fiji	Taveuni	g	1,9	342,3	2,6	130
43	BQUCH0292	Fiji	Taveuni	g	1,6	1178,3	8,0	147
44	BQUCH0293	Fiji	Taveuni	gd	1,8	484,7	7,4	65
45	BQUCH0294	Fiji	Taveuni	G	1,8	879,3	20,1	44
46	BQUCH0295	Fiji	Taveuni	Gd	1,8	961,7	17,0	56
47	BQUCH0296	Fiji	Taveuni	Gd	1,8	697,4	19,5	36
48	BQUCH0297	Fiji	Taveuni	Gd	1,8	652,6	18,1	36
49	BQUCH0298	Fiji	Taveuni	G	1,8	529,7	10,7	50
50	BQUCH0299	Fiji	Taveuni	D	1,7	576,4	20,2	28
51	BQUCH0300	Fiji	Taveuni	G	1,9	747,6	11,4	66
52	BQUCH0301	Fiji	Taveuni	G	1,9	457,2	7,1	64
53	BQUCH0302	Fiji	Taveuni	G	1,7	709,2	5,8	123
54	BQUCH0303	Fiji	Taveuni	Gd	1,9	578,4	9,5	61
55	BQUCH0304	Fiji	Vatulele	Gd	1,9	2027,7	21,9	93
56	BQUCH0305	Fiji	Vatulele	GD	1,6	909,4	16,6	55
57	BQUCH0306	Fiji	Vatulele	NSO	1,8	274,6	2,5	111
58	BQUCH0307	Fiji	Vatulele	g	2,0	806,6	6,5	124
59	BQUCH0308	Fiji	Vatulele	Gdr	1,9	2137,1	11,1	192
60	BQUCH0309	Fiji	Vatulele	Gd	1,9	2325,4	13,6	171

La simbología se muestra a continuación: G: presencia de banda genómica de alto peso molecular, g: leve presencia de banda genómica de alto peso molecular, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: abundante presencia de ARN, r: leve presencia de ARN, NSO: no se observa. Por otra parte, la columna "Relación N/PG" muestra la relación de las concentraciones de ADN obtenidas mediante Nanodrop (N) y Picogreen (G).

ANEXO I (Continuación)

Tabla I: Nombre de cada muestra, origen, detalle de la extracción, pureza y concentración de las 120 muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste

N°	Nombre muestra	Origen	Isla	Detalle	A _{260/280}	Nanodrop	Picogreen	Relación N/PG
						(N)	(PG)	
						[ADN] ng/μL	[ADN] ng/uL	
61	BQUCH0310	Fiji	Vatulele	Gdr	1,8	825	13,1	63
62	BQUCH0311	Fiji	Vatulele	G	1,9	831,1	5,9	140
63	BQUCH0312	Fiji	Vatulele	Gd	1,9	656,2	6,3	104
64	BQUCH0313	Fiji	Vatulele	Gd	1,8	748,7	11,3	66
65	BQUCH0314	Fiji	Vatulele	G	2,0	1337	14,3	94
66	BQUCH0315	Fiji	Vatulele	NSO	1,8	203,8	2,0	104
67	BQUCH0316	Fiji	Vatulele	Gdr	1,8	1739,9	19,4	90
68	BQUCH0317	Fiji	Vatulele	Gd	1,9	834	13,5	62
69	BQUCH0318	Fiji	Vatulele	Gd	1,9	853,3	6,6	128
70	BQUCH0319	Fiji	Vatulele	Gd	1,8	735,5	9,1	80
71	BQUCH0320	Fiji	Vatulele	GD	1,8	1506,8	20,8	72
72	BQUCH0321	Fiji	Vatulele	G	1,8	861,9	11,5	75
73	BQUCH0322	Fiji	Vatulele	GD	1,7	1569,9	31,9	49
74	BQUCH0323	Fiji	Viti Levu	G	2,0	771	4,0	195
75	BQUCH0324	Fiji	Viti Levu	NSO	2,0	588,2	2,3	256
76	BQUCH0325	Fiji	Viti Levu	G	1,9	701,7	9,4	74
77	BQUCH0326	Fiji	Viti Levu	NSO	1,9	522,1	1,8	290
78	BQUCH0327	Fiji	Viti Levu	gd	1,9	235,4	2,0	118
79	BQUCH0328	Wallis	Utu fua	NSO	1,9	494,1	2,6	193
80	BQUCH0329	Wallis	Utu fua	Gd	1,8	436,5	9,0	48
81	BQUCH0330	Wallis	Mata Utu	NSO	1,6	102,5	1,5	67
82	BQUCH0331	Wallis	Ha'afuasia	G	1,9	1279,6	11,8	108
83	BQUCH0332	Wallis	Vaimalau	gDr	1,7	957,8	11,7	82
84	BQUCH0333	Wallis	Kolopopo	Gd	1,8	1171,2	22,4	52
85	BQUCH0338	Tonga	Tongatapu	gD	1,6	827,2	7,3	114
86	BQUCH0339	Tonga	Tongatapu	Gd	1,9	782,2	19,5	40
87	BQUCH0340	Tonga	Tongatapu	NSO	1,6	374,2	2,5	152
88	BQUCH0341	Tonga	Tongatapu	Gd	1,8	517,1	7,0	74
89	BQUCH0342	Tonga	Tongatapu	Gd	1,9	721,2	9,1	79
90	BQUCH0343	Tonga	Tongatapu	gd	1,9	1598,9	12,6	127
91	BQUCH0344	Tonga	Tongatapu	Gd	1,9	967	11,4	85

La simbología se muestra a continuación: G: presencia de banda genómica de alto peso molecular, g: leve presencia de banda genómica de alto peso molecular, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: abundante presencia de ARN, r: leve presencia de ARN, NSO: no se observa. Por otra parte, la columna "Relación N/PG" muestra la relación de las concentraciones de ADN obtenidas mediante Nanodrop (N) y Picogreen (G).

ANEXO I (Continuación)

Tabla I: Nombre de cada muestra, origen, detalle de la extracción, pureza y concentración de las 120 muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota Oeste

N°	Nombre muestra	Origen	Isla	Detalle	A _{260/280}	Nanodrop (N)	Picogreen (PG)	Relación N/PG
						[ADN] ng/μL	[ADN] ng/uL	
92	BQUCH0345	Tonga	Tongatapu	g	1,7	1078,6	6,3	170
93	BQUCH0346	Tonga	Tongatapu	NSO	2,0	612,9	2,1	298
94	BQUCH0347	Tonga	Tongatapu	G	1,9	632,8	10,3	62
95	BQUCH0348	Tonga	Tongatapu	NSO	1,8	384,9	3,7	103
96	BQUCH0349	Tonga	Tongatapu	GD	1,9	491,9	2,7	180
97	BQUCH0350	Tonga	Tongatapu	GD	1,9	839,6	9,5	88
98	BQUCH0351	Tonga	Tongatapu	g	1,4	452,9	5,4	84
99	BQUCH0352	Tonga	Tongatapu	Gd	1,6	997,3	6,2	160
100	BQUCH0353	Tonga	Tongatapu	g	1,9	273,7	3,3	83
101	BQUCH0354	Tonga	Tongatapu	Gd	1,9	1488,7	16,5	90
102	BQUCH0355	Tonga	Vava'u	gD	1,9	662,4	13,7	48
103	BQUCH0356	Tonga	Vava'u	GDr	1,8	1777,7	30,0	59
104	BQUCH0357	Tonga	Vava'u	G	1,7	890,8	9,9	90
105	BQUCH0358	Tonga	Vava'u	Gd	1,8	233,8	1,7	137
106	BQUCH0359	Tonga	Vava'u	Gd	1,8	693,6	15,8	44
107	BQUCH0360	Tonga	Vava'u	g	1,8	1184,3	28,1	42
108	BQUCH0361	Tonga	Eua	GD	1,8	997,9	25,7	39
109	BQUCH0362	Tonga	Eua	g	1,7	1534,3	15,7	98
110	BQUCH0363	Tonga	Eua	Gd	1,9	997,8	24,3	41
111	BQUCH0364	Tonga	Eua	DR	1,7	867,5	12,6	69
112	BQUCH0365	Tonga	Eua	gDR	1,6	1820,4	42,4	43
113	BQUCH0366	Tonga	Eua	NSO	1,6	456,3	3,5	130
114	BQUCH0367	Tonga	Eua	G	1,8	229,9	2,5	90
115	BQUCH0368	Tonga	Eua	g	1,7	1823,3	6,9	263
116	BQUCH0369	Tonga	Eua	GDr	1,9	1422,2	32,2	44
117	BQUCH0370	Tonga	Eua	GDr	1,9	1756,9	42,9	41
118	BQUCH0442	Nueva Caledonia	Grand Terre	gd	1,9	559,8	7,5	74
119	BQUCH0443	Nueva Caledonia	Grand Terre	G	1,9	560,4	6,1	92
120	BQUCH0444	Nueva Caledonia	Grand Terre	NSO	1,7	125,8	1,6	79

La simbología se muestra a continuación: G: presencia de banda genómica de alto peso molecular, g: leve presencia de banda genómica de alto peso molecular, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: abundante presencia de ARN, r: leve presencia de ARN, NSO: no se observa. Por otra parte, la columna "Relación N/PG" muestra la relación de las concentraciones de ADN obtenidas mediante Nanodrop (N) y Picogreen (G).

ANEXO I (Continuación)

Tabla II: Nombre muestra, origen, forma de almacenamiento de la hoja de la muestra, detalle de la extracción, pureza y concentración de las muestras seleccionadas de individuos de *B. papyrifera* de Oceanía Remota para analizar en el laboratorio del Dr. Chung en Taiwán.

N°	Muestra	Origen	Almacenamiento hoja	Detalle	Nanodrop	Qubit
					A _{260/280}	[ADN] ng/uL
1	BQUCH0443	Nueva Caledonia	Sílica-gel	NSO	2,4	4,9
2	BQUCH0116	Fiji	Congelada	D	1,7	12,1
3	BQUCH0280	Fiji	Sílica-gel	gD	1,5	29,8
4	BQUCH0285	Fiji	Sílica-gel	Gd	1,7	35,2
5	BQUCH0292	Fiji	Sílica-gel	Gd	1,9	2,2
6	BQUCH0296	Fiji	Sílica-gel	G	4,1	21,4
7	BQUCH0326	Fiji	Sílica-gel	g	1,9	1,2
8	BQUCH0333	Wallis	Sílica-gel	G	1,9	12,6
9	BQUCH0098	Tonga	Congelada	D	2,2	0,59
10	BQUCH0099	Tonga	Congelada	d	1,8	39,8
11	BQUCH0100	Tonga	Congelada	gD	1,8	44,0
12	BQUCH0101	Tonga	Congelada	GD	1,9	27,2
13	BQUCH0107	Tonga	Congelada	NSO	1,6	0,6
14	BQUCH0108	Tonga	Congelada	gD	1,8	4,7
15	BQUCH0110	Tonga	Congelada	D	1,8	2,5
16	BQUCH0068	Samoa	Congelada	gD	1,8	18,9
17	BQUCH0074	Samoa	Congelada	gd	1,8	18,2
18	BQUCH0075	Samoa	Congelada	NSO	2,0	4,8
19	BQUCH0084	Samoa	Congelada	D	2,1	28,4
20	BQUCH0063	Raitea	Congelada	D	1,9	44,4
21	BQUCH0439	Islas Australes	Sílica-gel	G	1,8	51,0
22	BQUCH0433	Tahití	Sílica-gel	Gd	1,9	13,6
23	BQUCH0435	Tahití	Sílica-gel	g	2,6	17,7
24	BQUCH0042	Marquesas	Congelada	gd	1,8	47,2
25	BQUCH0045	Marquesas	Congelada	g	1,6	3,6
26	BQUCH0051	Marquesas	Congelada	NSO	1,9	3,0
27	BQUCH0003	Isla de Pascua	Congelada	g	1,4	21,6
28	BQUCH0031	Isla de Pascua	Congelada	d	1,7	1,3
29	BQUCH0036	Isla de Pascua	Congelada	D	1,8	46,0
30	BQUCH0037	Isla de Pascua	Congelada	gD	1,8	30,4
31	BQUCH0213	Isla de Pascua	Sílica-gel	g	1,3	8,7
32	BQUCH0221	Isla de Pascua	Sílica-gel	Gd	1,5	17,2
33	BQUCH0226	Isla de Pascua	Sílica-gel	G	2,5	2,2
34	BQUCH0059	Hawái	Congelada	D	1,6	2,5
35	BQUCH0164	Hawái	Sílica-gel	Gd	1,9	12,5
36	BQUCH0166	Hawái	Sílica-gel	G	1,9	28,2
37	BQUCH0172	Hawái	Sílica-gel	Gd	1,9	52,6
38	BQUCH0177	Hawái	Sílica-gel	Gd	2,2	45,0
39	BQUCH0179	Hawái	Sílica-gel	Gd	1,9	29,8
40	BQUCH0190	Hawái	Sílica-gel	G	3,8	16,2
41	BQUCH0195	Hawái	Sílica-gel	Gd	1,8	2,7

G: presencia de banda genómica de alto peso molecular, g: leve presencia de banda genómica de alto peso molecular, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, NSO: no se observa.

ANEXO I (Continuación)

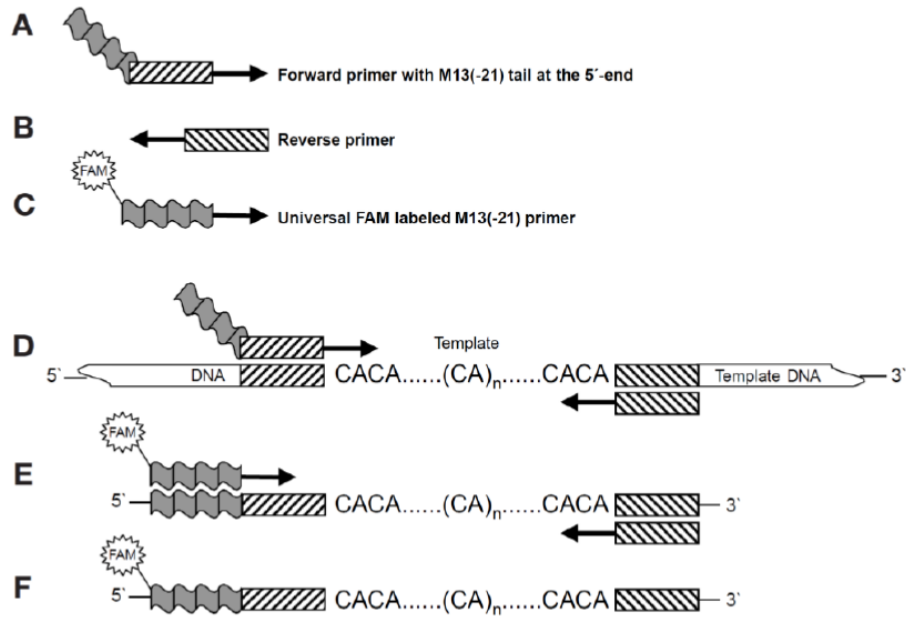


Figura A: Esquema de amplificación de microsatélites utilizando marcación con cola M13 unida a fluoróforo (Schuelke, 2000).

A. Partidor sentido con secuencia M13 en el extremo 5'.

B. Partidor antisentido.

C. Cola M13 marcada con fluoróforo en el extremo 5'.

D. En los primeros ciclos de la reacción de PCR, el partidor sentido con la cola M13 es incorporado al producto de PCR.

E. El producto de PCR generado es blanco para la cola M13 marcada con el fluoróforo, la cual es incorporada en los ciclos posteriores.

F. El producto de PCR final obtenido se encuentra marcado con fluorocromo en la región 5', el cual es analizado finalmente mediante electroforesis capilar.

ANEXO II

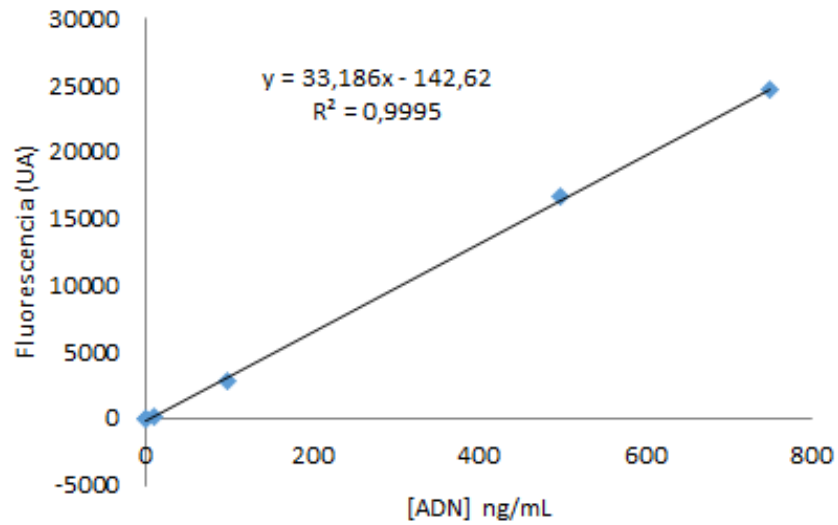


Figura B: Curva de calibración utilizada en la cuantificación de ADN con Picogreen. En el eje de las abscisas se muestra la concentración de ADN en ng/mL y en el eje de las ordenadas se encuentran las unidades arbitrarias de fluorescencia.

ANEXO III

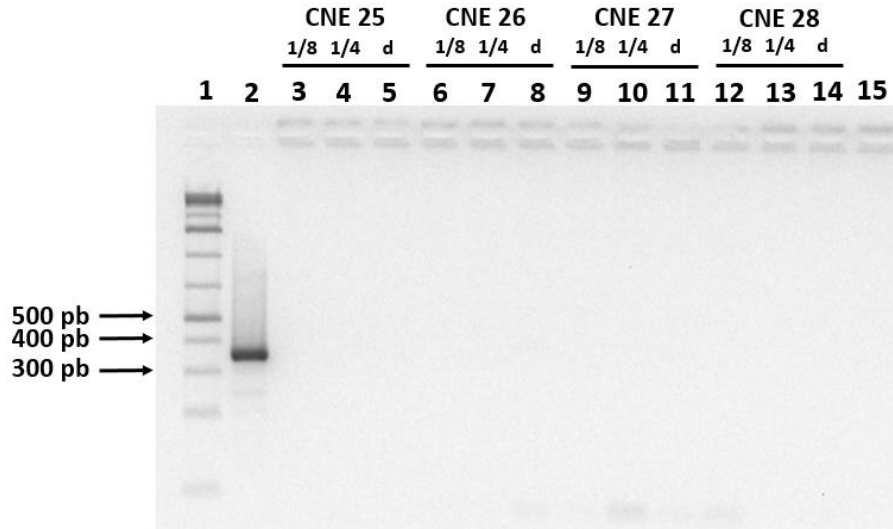


Figura C: Amplificación de los controles negativos de extracción con el marcador ITS-1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X. El orden de carga es el siguiente: carril 1: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 2: control positivo de amplificación (BQUCH0012 de Isla de Pascua), carril 3: control de extracción N° 25 (dilución 1/8 de la extracción), carril 4: control de extracción N° 25 (dilución 1/4 de la extracción), carril 5: control de extracción N° 25 (directo de la extracción), carril 6: control de extracción N° 26 (dilución 1/8 de la extracción), carril 7: control de extracción N° 26 (dilución 1/4 de la extracción), carril 8: control de extracción N° 26 (directo de la extracción), carril 9: control de extracción N° 27 (dilución 1/8 de la extracción), carril 10: control de extracción N° 27 (dilución 1/4 de la extracción), carril 11: control de extracción N° 27 (directo de la extracción), carril 12: control de extracción N° 28 (dilución 1/8 de la extracción), carril 13: control de extracción N° 28 (dilución 1/4 de la extracción), carril 14: control de extracción N° 28 (directo de la extracción) y carril 15: control negativo de amplificación.

ANEXO III (Continuación)

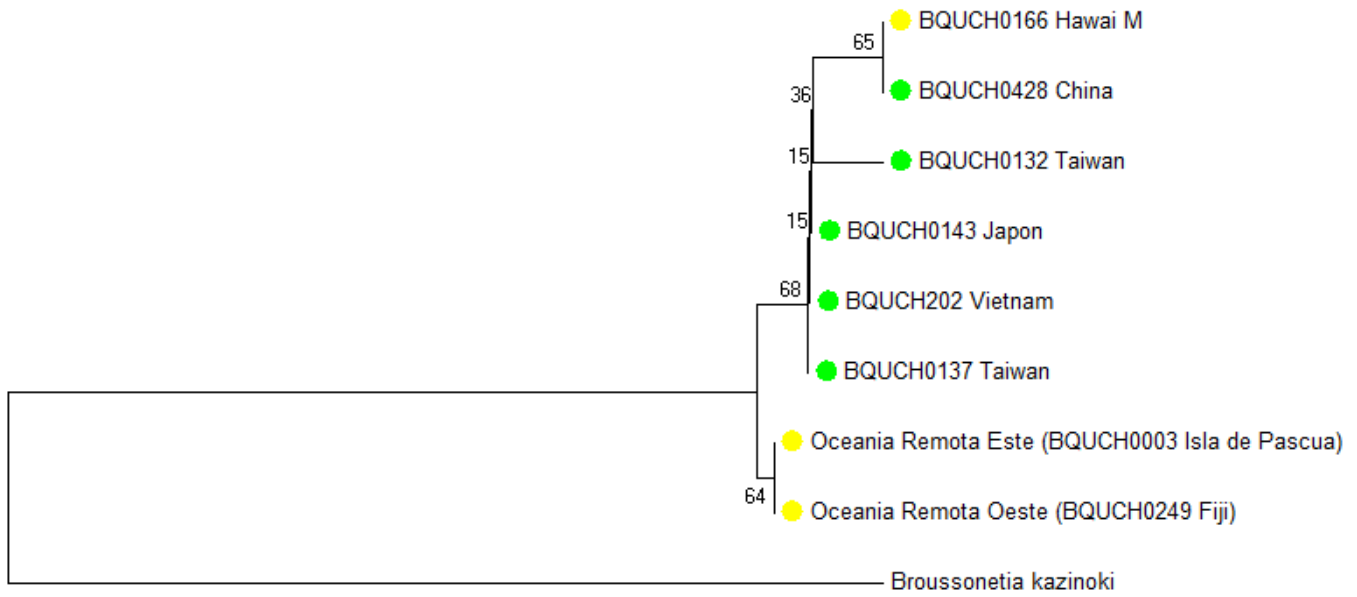


Figura D: Dendrograma generado a partir del agrupamiento de las secuencias de ITS-1 de individuos de Asia y Oceanía Remota mediante *Neighbor-Joining*. En el análisis se incluyeron secuencias de ITS-1 de cinco muestras de Asia, una muestra de Oceanía Remota Oeste, dos de Oceanía Remota Este (una perteneciente a Isla de Pascua y otra corresponde a una masculina de Hawái) y un individuo de *Broussonetia kazinoki* control externo. En cada nodo se adjunta el valor de *bootstrapping* correspondiente a 10.000 permutaciones. Los puntos verdes corresponden a las muestras de Asia y los puntos amarillos a las muestras de Oceanía Remota.

ANEXO IV

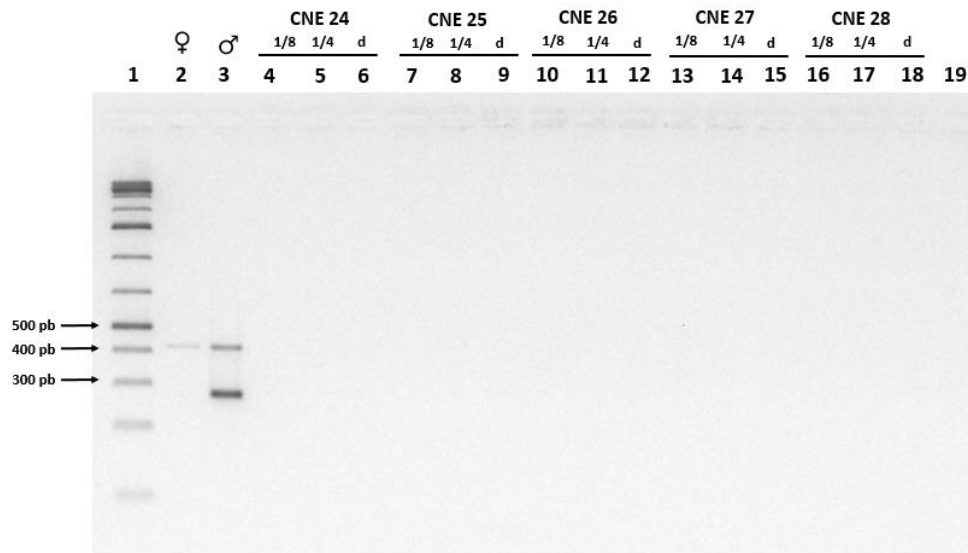


Figura E: Amplificación de los controles negativos de extracción con el marcador de sexo. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X. El orden de carga es el siguiente: carril 1: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 2: control femenino (BQUCH00139 de Taiwán), carril 3: control masculino (BQUCH0137 de Taiwán), carril 4: control de extracción N° 24 (dilución 1/8 de la extracción), carril 5: control de extracción N° 24 (dilución 1/4 de la extracción), carril 6: control de extracción N° 24 (directo de la extracción), carril 7: control de extracción N° 25 (dilución 1/8 de la extracción), carril 8: control de extracción N° 25 (dilución 1/4 de la extracción), carril 9: control de extracción N° 25 (directo de la extracción), carril 10: control de extracción N° 26 (dilución 1/8 de la extracción), carril 11: control de extracción N° 26 (dilución 1/4 de la extracción), carril 12: control de extracción N° 26 (directo de la extracción), carril 13: control de extracción N° 27 (dilución 1/8 de la extracción), carril 14: control de extracción N° 27 (dilución 1/4 de la extracción), carril 15: control de extracción N° 27 (directo de la extracción), carril 16: control de extracción N° 28 (dilución 1/8 de la extracción), carril 17: control de extracción N° 28 (dilución 1/4 de la extracción), carril 18: control de extracción N° 28 (directo de la extracción) y carril 19: control negativo de amplificación.

ANEXO V

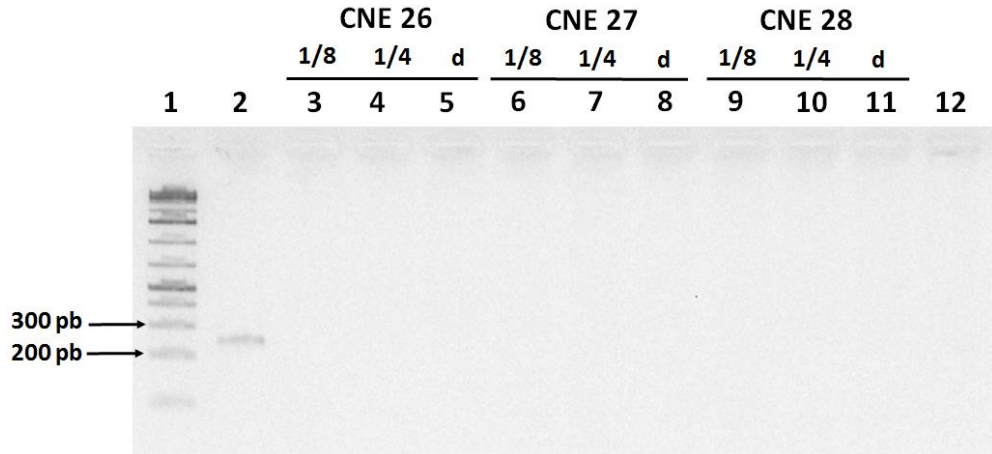


Figura F: Amplificación de los controles negativos de extracción con el marcador de SSR Bro 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X. El orden de carga es el siguiente: carril 1: Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), carril 2: control positivo (BQUCH0012 de Isla de Pascua), carril 3: control de extracción N° 26 (dilución 1/8 de la extracción), carril 4: control de extracción N° 26 (dilución 1/4 de la extracción), carril 5: control de extracción N° 26 (directo de la extracción), carril 6: control de extracción N° 27 (dilución 1/8 de la extracción), carril 7: control de extracción N° 27 (dilución 1/4 de la extracción), carril 8: control de extracción N° 27 (directo de la extracción), carril 9: control de extracción N° 28 (dilución 1/8 de la extracción), carril 10: control de extracción N° 28 (dilución 1/4 de la extracción), carril 11: control de extracción N° 28 (directo de la extracción) y carril 12: control negativo de amplificación.

ANEXO V (Continuación)

Tabla III: Detalle de los alelos encontrados en la genotipificación de 120 individuos de Oceanía Remota Oeste con 10 marcadores SSR

N°	Muestra	Origen	Bro 07		Bro 08		Bro 13		Bro 15		Bropap_02214		Bropap_02801		Bropap_20558		Bropap_25444		Bropap_26985		Bropap_30248	
1	BQUCH0246	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
2	BQUCH0247	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
3	BQUCH0248	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
4	BQUCH0249	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
5	BQUCH0250	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
6	BQUCH0251	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
7	BQUCH0252	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
8	BQUCH0253	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
9	BQUCH0258	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
10	BQUCH0259	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
11	BQUCH0260	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
12	BQUCH0261	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
13	BQUCH0262	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
14	BQUCH0263	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
15	BQUCH0264	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
16	BQUCH0265	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
17	BQUCH0266	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
18	BQUCH0267	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
19	BQUCH0268	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
20	BQUCH0269	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
21	BQUCH0270	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
22	BQUCH0271	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
23	BQUCH0272	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
24	BQUCH0273	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
25	BQUCH0274	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
26	BQUCH0275	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
27	BQUCH0276	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
28	BQUCH0277	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112

ANEXO V (Continuación)

Tabla III (continuación): Detalle de los alelos encontrados en la genotipificación de 120 individuos de Oceanía Remota Oeste con 10 marcadores SSR

N°	Muestra	Localidad	Bro 07		Bro 08		Bro 13		Bro 15		Bropap_02214		Bropap_02801		Bropap_20558		Bropap_25444		Bropap_26985		Bropap_30248	
29	BQUCH0278	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	266	270	168	189	236	240	195	205	196	201	112	112
30	BQUCH0279	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	266	270	168	189	236	243	195	205	196	201	112	112
31	BQUCH0280	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	266	270	168	189	236	243	195	205	196	201	112	112
32	BQUCH0281	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
33	BQUCH0282	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
34	BQUCH0283	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
35	BQUCH0284	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
36	BQUCH0285	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
37	BQUCH0286	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
38	BQUCH0287	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
39	BQUCH0288	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
40	BQUCH0289	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
41	BQUCH0290	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
42	BQUCH0291	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
43	BQUCH0292	Fiji	248	250	221	225	245	245	229	233	262	270	168	191	236	243	203	205	196	201	112	112
44	BQUCH0293	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
45	BQUCH0294	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
46	BQUCH0295	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
47	BQUCH0296	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	272	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
48	BQUCH0297	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
49	BQUCH0298	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
50	BQUCH0299	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
51	BQUCH0300	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
52	BQUCH0301	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
53	BQUCH0302	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
54	BQUCH0303	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
55	BQUCH0304	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
56	BQUCH0305	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112

ANEXO V (Continuación)

Tabla III (continuación): Detalle de los alelos encontrados en la genotipificación de 120 individuos de Oceanía Remota Oeste con 10 marcadores SSR

N°	Muestra	Localidad	Bro 07		Bro 08		Bro 13		Bro 15		Bropap_02214		Bropap_02801		Bropap_20558		Bropap_25444		Bropap_26985		Bropap_30248	
57	BQUCH0306	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
58	BQUCH0307	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
59	BQUCH0308	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
60	BQUCH0309	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
61	BQUCH0310	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
62	BQUCH0311	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
63	BQUCH0312	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
64	BQUCH0313	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
65	BQUCH0314	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
66	BQUCH0315	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
67	BQUCH0316	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
68	BQUCH0317	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
69	BQUCH0318	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
70	BQUCH0319	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
71	BQUCH0320	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
72	BQUCH0321	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
73	BQUCH0322	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
74	BQUCH0323	Fiji	246	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
75	BQUCH0324	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
76	BQUCH0325	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
77	BQUCH0326	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
78	BQUCH0327	Fiji	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
79	BQUCH0328	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
80	BQUCH0329	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
81	BQUCH0330	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
82	BQUCH0331	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
83	BQUCH0332	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
84	BQUCH0333	Wallis	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112

ANEXO V (Continuación)

Tabla III (continuación): Detalle de los alelos encontrados en la genotipificación de 120 individuos de Oceanía Remota Oeste con 10 marcadores SSR

N°	Muestra	Localidad	Bro 07		Bro 08		Bro 13		Bro 15		Bropap_02214		Bropap_02801		Bropap_20558		Bropap_25444		Bropap_26985		Bropap_30248	
			248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
85	BQUCH0338	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
86	BQUCH0339	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
87	BQUCH0340	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
88	BQUCH0341	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
89	BQUCH0342	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
90	BQUCH0343	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
91	BQUCH0344	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
92	BQUCH0345	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
93	BQUCH0346	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
94	BQUCH0347	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
95	BQUCH0348	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
96	BQUCH0349	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
97	BQUCH0350	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
98	BQUCH0351	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
99	BQUCH0352	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
100	BQUCH0353	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
101	BQUCH0354	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
102	BQUCH0355	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
103	BQUCH0356	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
104	BQUCH0357	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
105	BQUCH0358	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
106	BQUCH0359	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
107	BQUCH0360	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
108	BQUCH0361	Tonga	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
109	BQUCH0362	Tonga	248	248	221	225	245	245	229	240	260	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
110	BQUCH0363	Tonga	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
111	BQUCH0364	Tonga	248	248	223	229	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
112	BQUCH0365	Tonga	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112

ANEXO V (Continuación)

Tabla III (continuación): Detalle de los alelos encontrados en la genotipificación de 120 individuos de Oceanía Remota Oeste con 10 marcadores SSR

N°	Muestra	Localidad	Bro 07		Bro 08		Bro 13		Bro 15		Bropap_02214		Bropap_02801		Bropap_20558		Bropap_25444		Bropap_26985		Bropap_30248	
113	BQUCH0366	Tonga	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
114	BQUCH0367	Tonga	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
115	BQUCH0368	Tonga	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
116	BQUCH0369	Tonga	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
117	BQUCH0370	Tonga	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
118	BQUCH0442	N. Caledonia	248	248	221	225	245	245	229	233	262	268	168	199	236	240	205	207	196	201	112	112
119	BQUCH0443	N. Caledonia	248	248	221	225	245	245	229	233	262	268	168	199	236	240	205	207	196	201	112	112
120	BQUCH0444	N. Caledonia	248	248	221	225	245	245	229	233	262	268	168	199	236	240	203	205	196	201	112	112

ANEXO V (Continuación)

Tabla IV: Detalle de los 67 genotipos encontrados en 314 individuos de morera de papel de Asia y Oceanía Remota mediante 10 SSR

Genotipo	Localidad	N° muestras	Bro 07		Bro 08		Bro 13		Bro 15		Bropap_02214		Bropap_02801		Bropap_20558		Bropap_25444		Bropap_26985		Bropap_30248	
G1_Cn	China	1	265	289	229	235	242	248	229	229	254	258	166	166	236	236	201	207	201	201	124	124
G2_Cn	China	1	274	295	215	215	244	250	224	229	248	250	166	168	236	236	188	230	199	203	120	120
G3_Cn	China	1	234	234	207	233	242	245	229	230	252	260	168	168	236	240	196	196	201	201	120	120
G4_Cn	China	1	241	269	217	223	245	245	224	229	248	256	164	168	236	240	200	223	203	203	106	130
G1_Tw	Taiwán	1	248	252	211	239	242	243	233	233	262	264	168	168	240	240	192	192	201	201	110	110
G2_Tw	Taiwán	1	248	248	207	231	245	245	229	229	260	266	168	168	236	236	194	194	196	209	126	126
G3_Tw	Taiwán	1	248	267	211	211	242	242	229	233	248	260	178	187	236	236	211	230	196	203	108	108
G4_Tw	Taiwán	1	248	248	213	221	245	245	229	229	248	248	168	168	240	240	216	222	201	201	112	112
G5_Tw	Taiwán	1	248	257	219	237	242	245	221	229	248	270	168	178	236	240	222	224	196	196	108	112
G6_Tw	Taiwán	1	248	248	219	227	242	245	229	233	246	260	168	168	236	240	192	194	196	209	112	112
G7_Tw	Taiwán	1	248	251	219	225	242	245	229	229	248	256	168	187	240	240	192	217	199	201	114	114
G8_Tw	Taiwán	1	248	248	219	221	242	245	233	233	264	266	168	168	240	240	192	192	201	203	125	128
G9_Tw	Taiwán	1	248	248	219	219	245	245	233	233	258	262	168	178	236	240	194	211	201	201	116	116
G10_Tw	Taiwán	1	248	248	207	211	245	245	233	233	262	262	168	168	236	240	192	192	196	209	110	110
G11_Tw	Taiwán	1	248	265	211	225	242	245	229	229	252	260	168	168	240	240	192	192	201	209	110	110
G12_Tw	Taiwán	1	250	267	221	235	243	245	221	229	258	266	168	189	236	240	192	192	196	203	110	110
G13_Tw	Taiwán	1	248	248	225	225	242	245	229	233	268	268	178	189	236	240	176	196	196	209	110	110
G14_Tw	Taiwán	1	248	269	221	229	242	245	229	229	247	247	176	178	236	236	192	205	196	196	102	102
G15_Tw	Taiwán	1	248	279	207	215	245	245	229	233	246	268	178	189	236	240	192	226	196	203	102	110
G16_Tw	Taiwán	2	248	248	219	231	242	243	229	229	260	264	168	178	236	236	192	194	196	209	114	116
G17_Tw	Taiwán	1	248	248	227	233	245	245	229	233	260	268	168	189	237	240	192	192	196	201	112	114
G18_Tw	Taiwán	1	248	249	211	233	243	243	221	233	260	264	168	170	240	240	192	192	201	201	110	112
G1_Jp	Japón	1	283	283	227	227	241	241	229	229	246	250	168	168	236	236	201	201	196	203	131	167
G2_Jp	Japón	1	283	283	221	227	241	241	229	229	246	252	168	168	236	236	201	201	196	196	131	131
G3_Jp	Japón	1	283	283	227	227	241	241	229	229	250	274	168	168	236	239	201	203	196	203	119	133
G4_Jp	Japón	1	283	283	227	227	241	241	229	229	246	250	168	168	236	236	201	201	196	196	119	119
G5_Jp	Japón	1	200	287	221	227	241	241	229	229	250	250	168	168	236	236	203	203	196	203	131	131
G1_Vt	Vietnam	1	224	245	215	215	239	240	229	229	248	264	168	170	236	242	195	197	203	203	163	163

ANEXO V (Continuación)

Tabla IV (continuación): Detalle de los 67 genotipos encontrados en 314 individuos de morera de papel de Asia y Oceanía Remota mediante 10 SSR

Genotipo	Localidad	Nº muestras	Bro 07	Bro 08	Bro 13	Bro 15	Bropap_02214	Bropap_02801	Bropap_20558	Bropap_25444	Bropap_26985	Bropap_30248										
G2_Vt	Vietnam	1	279	287	213	213	240	245	166	168	248	258	166	168	236	236	226	244	201	201	118	118
G3_Vt	Vietnam	1	293	293	213	219	239	240	225	225	239	248	166	168	239	242	196	198	201	201	122	151
G4_Vt	Vietnam	1	287	287	205	213	239	245	229	229	248	250	166	168	240	242	192	194	201	201	142	175
G5_Vt	Vietnam	1	287	287	213	213	240	242	229	229	248	258	168	168	240	240	196	200	201	201	153	153
G1	Fiji, Tonga	67 (Fj), 36 (Tg)	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
G2	Tonga	1	248	248	217	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
G3	Tonga	1	248	248	223	229	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
G4	Tonga	9	248	248	223	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
G5	Wallis, Samoa	13 (Wl), 10 (Sm)	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
G6	Samoa	1	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	199	114	114
G7	Samoa	4	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	207	196	199	112	112
G8	Hawái	7	246	248	225	227	245	245	229	233	260	268	168	178	236	240	203	205	196	199	112	112
G9	Samoa	2	248	248	221	225	245	245	229	233	260	270	168	191	236	240	203	205	196	199	112	112
G10	Hawái	1	248	248	221	225	245	245	229	233	260	270	168	178	236	240	203	205	196	199	112	112
G11	Fiji	1	246	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
G12	Tahití	4	248	248	221	225	245	245	229	240	260	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
G13	Fiji, Pitcairn	1 (Fj), 5 (Pc)	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G14	Tonga, Hawái, Marquesas	1 (Tg), 9 (Hw), 9 (Mq)	248	248	221	225	245	245	229	240	260	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G15	Rapa	2	248	248	221	225	245	245	229	240	260	268	168	189	236	240	203	205	194	201	112	112
G16	Fiji	1	248	248	221	225	245	245	229	233	260	272	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G17	Tonga	1	248	250	221	225	245	245	229	233	260	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G18	Isla de Pascua, Marquesas	27 (IP), 2 (Mq)	248	248	221	225	245	245	229	233	262	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G19	Isla de Pascua	1	248	248	221	229	245	245	229	233	262	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G20	Isla de Pascua	3	248	248	221	225	245	245	229	233	262	268	168	189	236	240	203	209	196	201	112	112
G21	N. Caledonia	1	248	248	221	225	245	245	229	233	262	268	168	199	236	240	203	205	196	201	112	112
G22	N. Caledonia	2	248	248	221	225	245	245	229	233	262	268	168	199	236	240	205	207	196	201	112	112

ANEXO V (Continuación)

Tabla IV (continuación): Detalle de los 67 genotipos encontrados en 314 individuos de morera de papel de Asia y Oceanía Remota mediante 10 SSR

Genotipo	Origen	N° muestras	Bro 07		Bro 08		Bro 13		Bro 15		Bropap_02214		Bropap_02801		Bropap_20558		Bropap_25444		Bropap_26985		Bropap_30248	
G23	Tonga, Hawái	1 (Tg), 1 (Hw)	248	250	221	225	245	245	229	233	262	268	168	191	236	240	203	205	196	201	112	112
G24	Fiji	1	248	250	221	225	245	245	229	233	262	270	168	191	236	243	203	205	196	201	112	112
G25	Isla de Pascua	24	248	248	221	225	245	245	229	233	262	270	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G26	Isla de Pascua	2	248	248	221	225	245	245	229	233	266	270	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G27	Fiji	1	248	248	221	225	245	245	229	233	266	270	168	189	236	240	195	205	196	201	112	112
G28	Fiji	2	248	248	221	225	245	245	229	233	266	270	168	189	236	243	195	205	196	201	112	112
G29	Raiatea	1	248	248	221	227	245	245	229	233	262	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G30	Isla de Pascua	3	248	248	223	227	245	245	229	233	262	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G31	Tahití	1	248	248	221	225	245	245	229	230	262	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G32	Marquesas, Tahití	1 (Mq), 1 (Th)	248	248	221	225	245	245	229	233	262	272	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112
G1M_Hw	Hawái	7	279	279	221	225	239	245	232	232	250	256	158	166	239	239	190	217	201	201	108	144
G2M_Hw	Hawái	8	279	279	221	225	240	245	229	232	250	254	158	166	239	239	190	217	201	201	108	108
G3M_Hw	Hawái	3	279	279	221	225	239	245	232	232	250	256	158	166	239	239	190	217	201	201	108	131

ANEXO V (Continuación)

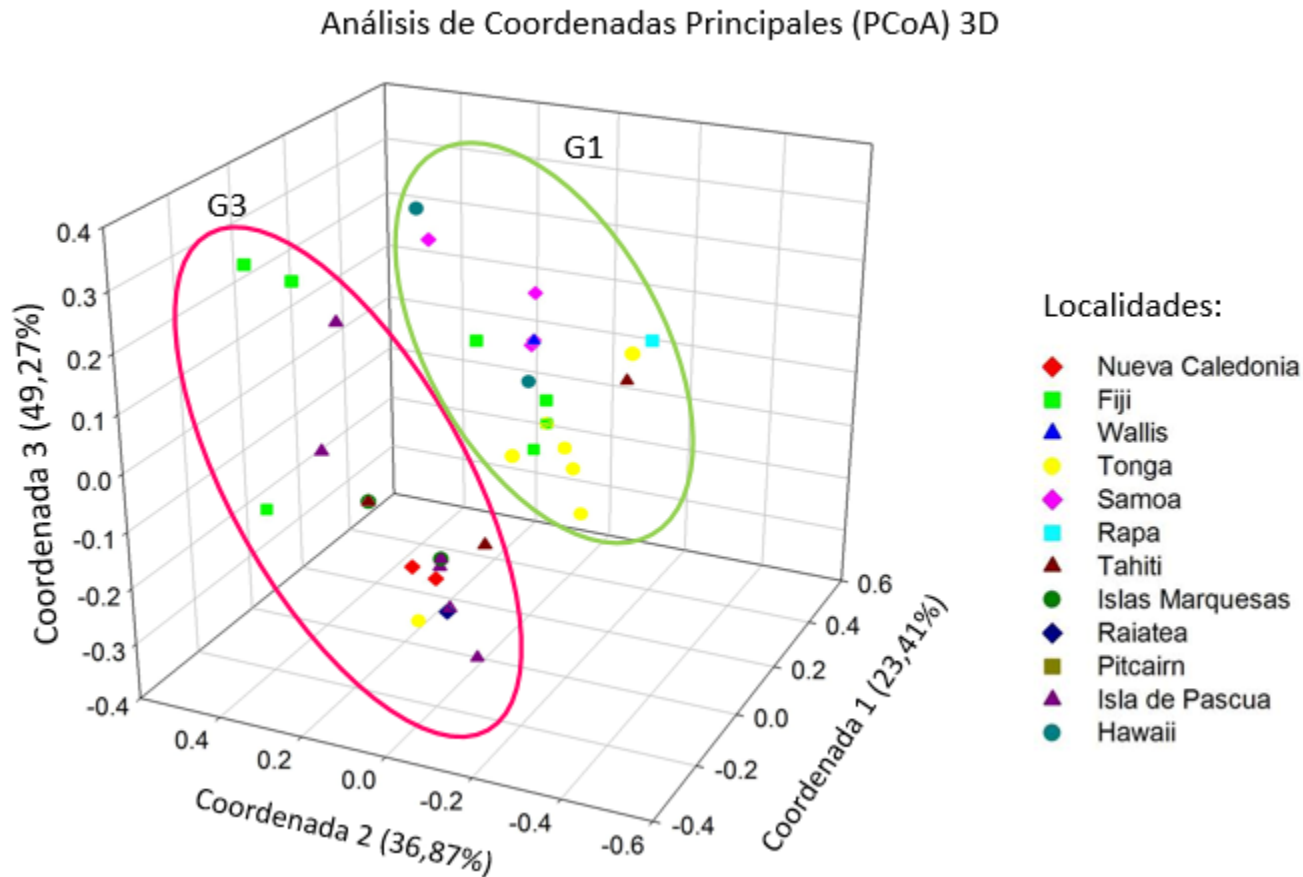


Figura G: Análisis de Coordenadas Principales en tres dimensiones de los 32 genotipos de *B. papyrifera* de Oceanía Remota. Se observa que los genotipos se dividen en dos grupos, siendo éstos el G1 (Oceanía Remota Oeste) y G3 (Oceanía Remota Este), los cuales corresponden a los grupos del mismo nombre del PcoA en dos dimensiones (**Figura 17**). Los genotipos del G2 de la **Figura 17** caen dentro de estos grupos, por lo que no se ve que Oceanía Remota Oeste se conecte a los extremos de Oceanía Remota Este por medio de la parte central de Oceanía Remota Este.

ANEXO V (Continuación)

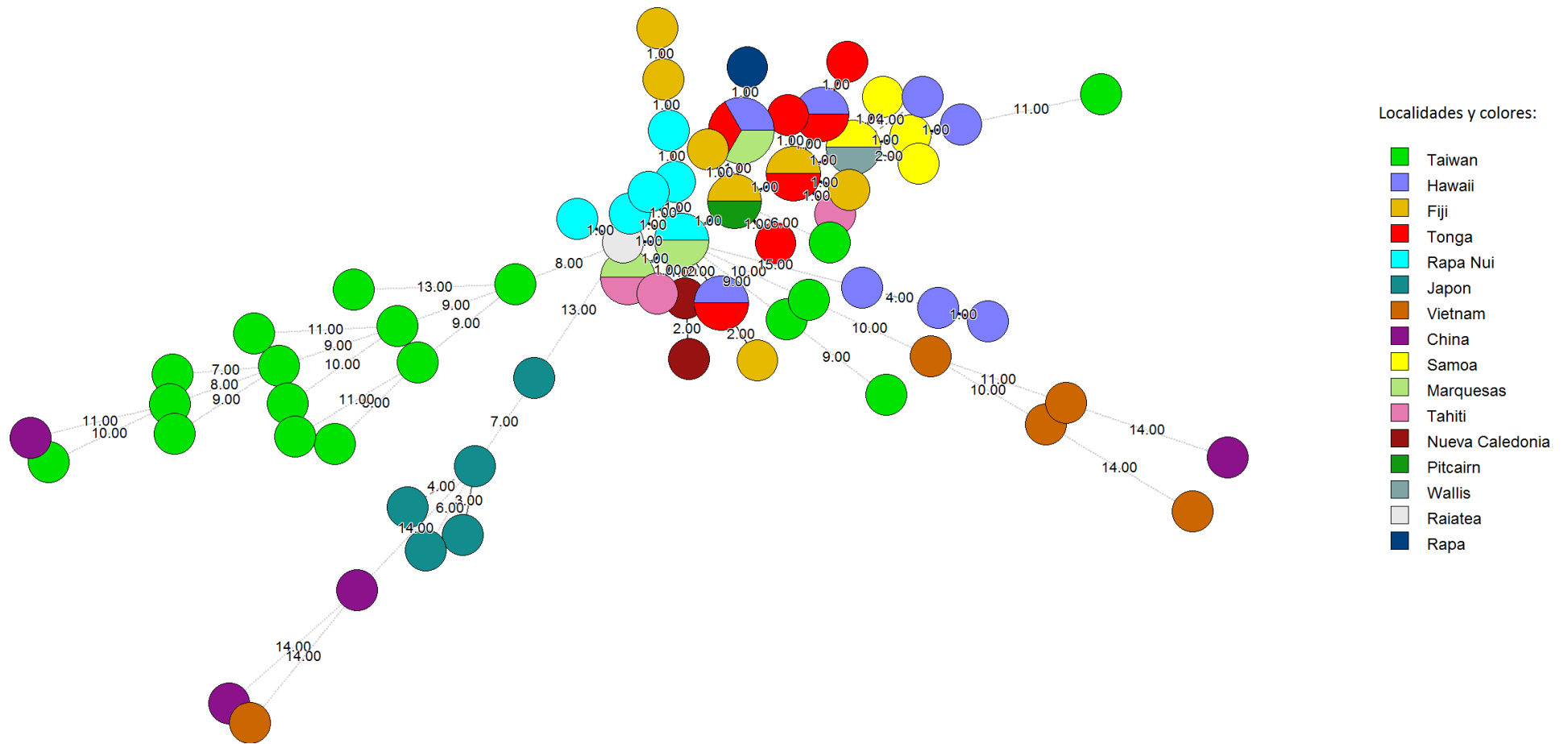
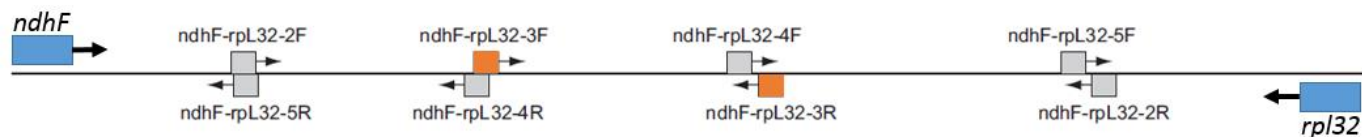


Figura H: Red de los 67 genotipos de *B. papyrifera* identificados en Asia y Oceanía Remota mediante el análisis de 10 SSR. Esta red se construyó mediante el programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths). La localidad se señala mediante un código de colores.

ANEXO VI



ndhF: 5'-GAA AGG TAT KAT CCA YGM ATA TT-3'
ndhF-rpl32-2F: 5'-GAG GTT AAA ATG GGT CAA CTG A-3' [201–222]
ndhF-rpl32-3F: 5'-CCG TAT TTG ATC TGAATC ATA AA-3' [422–444]
ndhF-rpl32-4F: 5'-CGA GCT TGA CCA ATT AAT TTA AT-3' [653–675]
ndhF-rpl32-5F: 5'-GAA TGA GAA TAT AAG AGG ACC A-3' [958–979]
ndhF-rpl32-5R: 5'-ATA TCA GTT GAC CCA TTT TAA CC-3' [203–225]
ndhF-rpl32-4R: 5'-CAG ATC AAA TAC GGA TTT TGG T-3' [414–435]
ndhF-rpl32-3R: 5'-ACT AAA CCA ACC CTT TTT TCT A-3' [682–705]
ndhF-rpl32-2R: 5'-CAC TAT CGA ATAATT CAT ATT TA-3' [986–1008]
rpl32-R: 5'-CCAATA TCC CTT YYT TTT CCA A-3'

Figura I: Esquema de las parejas de partidores para amplificar el marcador de cloroplasto *ndhF-rpl32*. Los partidores azules a los extremos corresponden a los que entregan el total de la secuencia de este marcador, mientras que los naranjos corresponden a los partidores internos 3f y 3r (Figura adaptada de material suplementario de Chang y cols., 2015).