



**Universidad de Chile**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

## **Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico**

Análisis genético de la morera de papel, una planta de importancia cultural en Asia y la Polinesia, mediante el uso de marcadores moleculares anónimos ISSR.

**Josué Patricio González Lorca**

**Director de Memoria y Patrocinante**

Dr. Sergio Lobos Camus

Laboratorio de Biología Molecular  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Codirector de Memoria**

Dr. Antonio Rivera Hutinel

Laboratorio de Ecología y Biogeografía  
Escuela de Historia y Geografía  
Facultad de Ciencias Sociales  
Universidad Academia de Humanismo Cristiano

Enero de 2014

*- ¡Vete de aquí! ¡Vuelve a Roma! ¡Eres joven! ¡El mundo es tuyo!*

*Y yo soy viejo.*

*No quiero oírte más. Solo quiero oír hablar de ti.*

*¡No vuelvas nunca!*

*¡No pienses en nosotros! ¡No mires para atrás, no escribas!*

*¡No dejes que la añoranza acabe contigo! ¡Olvídenos a todos!*

*¡Si no resistes y vuelves, no me busques. No te dejaré entrar en mi casa!*

*¿Entendiste?*

*- Gracias... Por todo lo que has hecho por mí.*

*- Lo que sea que termines haciendo, ámalo... como amaste la cabina del Paradiso...*

**- Alfredo, Cinema Paradiso.**

## **Agradecimientos**

En primer lugar quisiera agradecer a Dios y a mi familia por el apoyo y la compañía que me dieron durante este largo camino recorrido. Muchas gracias a María Inés, la mejor madre del mundo, a mi padre Patricio y a mi hermano Matías por quererme y aguantarme tanto, yo igual los quiero mucho. Mención especial merece mi tío Esteban Lorca, el cual me ha motivado a seguir siempre adelante y me ha aconsejado en los momentos en que más necesité de un amigo.

Agradezco a mis grandes amigos por su compañía y apoyo, sin ellos no hubiese podido concretar este loco desafío de ser científico. No puedo dejar de reconocer a mi gran amigo Ricardo Piña, cómplice de muchas aventuras, así como a mi grupo de quasi hermanos Konrad, Ta-Ying, Pablo, Adrián y Sebastián con los cuales compartí los mejores momentos durante mi carrera. Espero jamás separarme de ustedes.

Muchas gracias a mis compañeros de laboratorio, Johany, Clau y Adrián por compartirme todo su conocimiento; a mis amigos del INIA, en especial a Álvaro Castro por haber sido un tutor excepcional. Quisiera agradecer además a mis grandes amigos de colegio Jeréz y Rives por haber compartido muchas odiseas en el Nacional, y a Déborah por su amistad desde mucho antes que visualizara esta meta.

Quiero expresar mi infinito agradecimiento a todos los profesores que han sido parte en mi formación, en especial a la Dra. Daniela Seelenfreund por enseñarme a ser un científico íntegro y una mejor persona desde que entré al laboratorio en tercer año. Además agradezco a la Dra. María Antonieta Valenzuela por mostrarme esa maravillosa motivación por la ciencia.

Agradezco a jefa del proyecto, la Dra. Andrea Seelenfreund por darme la oportunidad de desarrollarme como profesional y por confiar en mi conocimiento. Además no puedo dejar de agradecer a mi codirector de memoria, el Dr. Antonio Rivera, el cual me brindó su apoyo y orientación durante todo mi trabajo, y a la Dra. Ximena Moncada por su paciencia y disponibilidad en los momentos en que necesité de ayuda.

Dejo intencionalmente para el final a mi director de memoria, el Dr. Sergio Lobos para dedicarle un poco más de líneas. Querido profesor, al fin he terminado y concretado este desafío que sin su apoyo y amistad jamás hubiese podido llevar a cabo. Le agradezco la confianza para elegirme como su alumno memorista y por todos los consejos y las brillantes fechorías de las cuales me hizo cómplice. Esto es simplemente un intermedio, jamás una despedida, seguiré luchando por alcanzar lo más alto que se me presente porque así me ha enseñado. Jamás me arrepentiré de

haber elegido esta carrera porque usted me ha demostrado lo genial que es la ciencia y en especial la biología molecular. Hasta pronto.

## **Financiamiento**

Esta memoria fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Sergio Lobos Camus.

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto FONDECYT N°1120175 titulado “Claves para entender la colonización de Isla de Pascua: Patrones de migración de los polinesios en Oceanía remota a través del análisis genético de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera*).”

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN .....	XII
ABSTRACT .....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1
El poblamiento de la Polinesia.....	1
La búsqueda de la ruta de los colonizadores .....	2
Acercamiento a un modelo migratorio a través de especies asociadas al hombre .....	3
<i>Broussonetia papyrifera</i> como especie ligada al hombre .....	3
Caracterización biológica de <i>B. papyrifera</i> .....	3
Caracterización genética de <i>B. papyrifera</i> .....	4
Genética del paisaje como herramientas de análisis del flujo migratorio.....	5
Análisis genético mediante el uso de marcadores moleculares .....	6
ISSR ( <i>Inter-Simple Sequence Repeats</i> ) .....	7
Análisis de agrupamiento y distribución de organismos .....	9
Métodos de correlación de caracteres .....	10
Problema .....	12
Hipótesis .....	12
Objetivo General .....	12
Objetivos Específicos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13

Material biológico.....	13
Soluciones y amortiguadores .....	13
Reactivos.....	14
<b>Métodos.....</b>	<b>14</b>
Extracción de DNA genómico de <i>B. papyrifera</i> .....	14
Análisis de integridad de DNA genómico .....	15
Determinación de la concentración de DNA genómico.....	15
Estandarización de las condiciones del sistema ISSR-PCR .....	16
Análisis estadísticos.....	17
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>Recolección de muestras de <i>B. papyrifera</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>Extracción de DNA genómico de <i>B. papyrifera</i> .....</b>	<b>20</b>
Análisis de integridad de DNA genómico .....	20
Selección de muestras .....	21
Análisis de pureza y cuantificación de DNA genómico .....	21
<b>Estandarización y optimización de condiciones para la ISSR-PCR .....</b>	<b>22</b>
Obtención de la $T_A$ óptima de cada partidor.....	23
Ajuste de condiciones experimentales de trabajo.....	25
<b>Validación del método ISSR .....</b>	<b>25</b>
<b>Obtención de perfiles genómicos ISSR.....</b>	<b>26</b>
<b>Análisis de agrupamiento.....</b>	<b>28</b>
Prueba de Mantel .....	30
Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	33
Análisis de coordenadas principales (PCoA).....	34
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>Montaje de la técnica ISSR .....</b>	<b>36</b>
<b>Optimización de la técnica ISSR.....</b>	<b>36</b>
<b>Validación de la técnica ISSR.....</b>	<b>37</b>
<b>Análisis de bandas .....</b>	<b>37</b>
<b>Análisis de distribución de poblaciones .....</b>	<b>38</b>
<b>La subdivisión de Hawái.....</b>	<b>40</b>

Proyecciones del modelo de la morera de papel .....	41
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>48</b>



## Índice de Figuras

Figura 1: Mapa señalando los posibles movimientos del hombre en Oceanía cercana y remota.....	2
Figura 2: Morera de papel ( <i>Broussonetia papyrifera</i> ).....	5
Figura 3: Esquema general de la técnica ISSR-PCR.....	8
Figura 4: Esquema general para la construcción de un dendrograma.....	11
Figura 5: Localización geográfica de los sectores muestreados. ....	19
Figura 6: Integridad de DNA genómico de <i>B. papyrifera</i> . ....	20
Figura 7: Perfiles de ISSR-PCR obtenidos a partir del diseño ortogonal de Taguchi. ....	23
Figura 8: Perfiles de amplificación obtenidos mediante una PCR en gradiente. ....	24
Figura 9: Ensayos de validación del método ISSR.....	26
Figura 10: Perfiles de amplificación generados mediante ISSR-PCR.....	27
Figura 11: Dendrograma utilizando el algoritmo de agrupamiento <i>neighbor-joining</i> . ....	29
Figura 12: Dendrograma utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA.....	30
Figura 13: Correlación observada entre las distancias geográfica y genética dentro de Asia y dentro de Polinesia, mediante la prueba de Mantel.....	32
Figura 14: Correlación observada entre las distancias geográfica y genética de todas las localidades de Asia y Polinesia, mediante la prueba de Mantel. ....	32
Figura 15: Análisis de coordenadas principales (PCoA) para 83 individuos muestreados.....	35
Figura 16: Modelo de migración planteado en Addison y Matisoo-Smith, complementado con un posible flujo de migración proveniente de Asia en la localidad de Hawái. ....	41

## Índice de Tablas

Tabla 1: Código y secuencia de cada partidador utilizado en la técnica de ISSR-PCR.....	16
Tabla 2: Concentraciones finales utilizadas en la optimización de la ISSR-PCR. ....	17
Tabla 3: Número de muestras recolectadas por localidad y ubicación geográfica de cada sector de recolección de muestras. ....	19
Tabla 4: Muestras seleccionadas para análisis de ISSR. ....	21
Tabla 5: Optimización de reactivos de la ISSR-PCR mediante un diseño ortogonal de Taguchi. ....	22
Tabla 6: Temperatura óptima de apareamiento de los trece partidores ISSR. ....	24
Tabla 7: Caracterización de bandas informadas por cada partidador ISSR. ....	28
Tabla 8: Matriz pareada de Distancia Genética entre 9 poblaciones de Asia y Polinesia. ....	31
Tabla 9: Matriz pareada de Distancia Geográfica entre 9 poblaciones de Asia y Polinesia. ....	31
Tabla 10: AMOVA incluyendo 5 localidades de Polinesia. ....	33
Tabla 11: Promedio de diversidad genética y número de muestras por grupo para 5 localidades de Polinesia. ....	33
Tabla 12: AMOVA incluyendo 4 localidades de Polinesia y excluyendo la población de Hawái. ....	33

## Índice de Abreviaturas

Abs <sub>260</sub>	Absorbancia medida a 260 nanómetros
Abs <sub>280</sub>	Absorbancia medida a 280 nanómetros
A.P.	Antes del presente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AMOVA	<i><u>A</u>nalysis of <u>M</u>olecular <u>V</u>ariance</i>
cm	Centímetros
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
g	Aceleración de gravedad
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua bidestilada
ISSR	<i><u>I</u>nter-<u>S</u>imple <u>S</u>equence <u>R</u>epeats</i>
kb	Kilo pares de bases
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Mb	Mega pares de bases
NaCl	Cloruro de sodio
NJ	<i>neighbor-joining</i>
OTU	<i><u>O</u>perational <u>T</u>axonomic <u>U</u>nit</i>
pb	Pares de bases
PCoA	<i><u>P</u>rincipal <u>C</u>oordinates <u>A</u>nalysis</i>
PCR	<i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>
SSR	<i><u>S</u>imple <u>S</u>equence <u>R</u>epeats</i>
T <sub>A</sub>	Temperatura de apareamiento
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-HCl/ácido bórico/EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad enzimática
UBC	<i><u>U</u>niversity of <u>B</u>ritish <u>C</u>olumbia</i>
UPGMA	<i><u>U</u>nweighted <u>P</u>air <u>G</u>roup <u>M</u>ethod with <u>A</u>rithmetic <u>M</u>ean</i>
UV	Ultravioleta
V	Voltios
µg	Microgramo
µm	Micrometro
µl	Microlitro

## Resumen

El último gran evento migratorio llevado a cabo por las poblaciones humanas fue la colonización de las islas de la Polinesia. Esta travesía, realizada a través de la mayor extensión de océano de la superficie terrestre, fue un hecho que necesitó de una gran planificación para sobrellevar las grandes distancias entre las islas. Para comprender cabalmente estos flujos migratorios se hace necesario establecer el contexto espacio-temporal en que este proceso fue llevado a cabo.

En cada una de las áreas de investigación, el modelo de estudio se presenta como un factor determinante a la hora de obtener información útil y sin sesgos. En este trabajo se ha propuesto a *Broussonetia papyrifera* o la morera de papel, como un modelo de estudio apropiado para dilucidar las rutas migratorias del hombre en la Polinesia debido a su gran importancia cultural, económica y política en Asia y en Oceanía. *B. papyrifera* ha estado ligada al hombre desde el comienzo de sus viajes y ha sido propagada en Polinesia mediante reproducción vegetativa.

Con el advenimiento de técnicas moleculares capaces de identificar cambios a nivel de la secuencia de DNA, surgieron una serie de herramientas biológicas de alta resolución. Los ISSR son un tipo de marcador molecular dominante, el cual utiliza las repeticiones de nucleótidos del genoma para informar los cambios que suceden. Entre sus ventajas están su alta reproducibilidad, bajo costo y la posibilidad de utilizarlos sin conocer la secuencia de DNA blanco. La propuesta de este trabajo es determinar la diversidad genética de *B. papyrifera* como modelo de estudio en Asia y Polinesia para establecer los posibles movimientos migratorios sucedidos en la Polinesia mediante métodos de agrupamiento y herramientas estadísticas basadas en distancia.

Para este trabajo fue necesario montar y optimizar la técnica de ISSR, lo cual permitió contar con un perfil genético de datos para distintos individuos provenientes de 3 poblaciones de Asia y 6 islas de la Polinesia. Esta información fue organizada en una matriz binaria de presencia-ausencia de bandas para ser analizada mediante un dendrograma utilizando los algoritmos *neighbor-joining* y UPGMA. Se generó una matriz de distancia genética y geográfica la cual fue analizada utilizando la prueba de Mantel. Para explorar la similitud de poblaciones se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA).

El montaje y la optimización de la técnica ISSR permitió obtener perfiles genéticos de alta resolución, intensidad y con un alto número de bandas para 83 muestras de distintas localidades de Asia y Polinesia. Los dendrogramas obtenidos agruparon en distintas ramas las 3 poblaciones de Asia y diferenciaron dos grupos de

individuos de Hawái; sin embargo, no diferenciaron las poblaciones de individuos provenientes de Polinesia. La prueba de Mantel mostró una correlación entre las diferencias genéticas entre las poblaciones y su localización geográfica en el contexto global de Asia-Polinesia; sin embargo, dentro de la región asiática como en Polinesia no se encontró una correlación. El análisis de coordenadas principales (PCoA) confirmó la separación de los individuos de Asia y la subdivisión de Hawái en dos grupos, aunque no fue capaz de distinguir las poblaciones de Polinesia.

La técnica molecular ISSR resultó útil para diferenciar las distintas poblaciones asiáticas y separar éstas de las localidades de Polinesia. Sin embargo, la capacidad de discriminación de bandas obtenida mediante esta técnica no permitió resolver totalmente las poblaciones polinésicas. A pesar de esto, los estudios realizados con el marcador molecular ISSR entregaron información valiosa acerca de las diferencias entre poblaciones de Asia y Polinesia y la subdivisión de Hawái, complementando la información entregada por marcadores SSR, de DNA de cloroplastos e ITS.

## Abstract

### **Genetic analysis of the paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*), a plant of cultural significance in Asia and Polynesia, using anonymous molecular ISSR markers.**

The last major migration event conducted by human populations was the colonization of the islands of Polynesia. This trip, made through the largest area of surface ocean, was an event that required planning to overcome the great distances between islands. To fully understand these flows is necessary to establish the spatial and temporal context in which this process was conducted.

In each of the areas of research, the study model is presented as a determining factor in obtaining useful and unbiased information. This paper has proposed *Broussonetia papyrifera* or paper mulberry, as a model to elucidate the migratory routes in Polynesia due to its cultural, economic and political importance in Asia and Oceania. *B. papyrifera* has been linked to man since the beginning of his trip and has been propagated in Polynesia by vegetative reproduction.

With the advent of molecular techniques able to identify subtle changes in the DNA sequence, a series of high-resolution biological tools emerged. ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) are dominant markers, which uses nucleotide repeats in the genome to report changes that occur. Among its advantages are its high reproducibility, low cost and the possibility to use them prior knowledge the target DNA sequence. The purpose of this study is to determine the genetic diversity of *B. papyrifera* as a study model in Asia and Polynesia to establish potential migration occurred in Polynesia by clustering methods and statistical tools based on distance.

For this work it was necessary to set up and optimize ISSR technique, which allowed us to have a genetic profile data for different individuals from 3 populations of Asia and 6 islands of Polynesia. This information was organized into a binary presence-absence matrix and analyzed using the neighbor-joining and UPGMA algorithms to build a dendrogram. An array of genetic and geographic distance was generated and analyzed by a Mantel Test. To explore the population similarity, a Principal Coordinates Analysis (PCoA) was performed.

ISSR Installation and optimization allowed to obtain genetic profiles of high resolution, intensity and number of bands for 83 samples from different Asian and Polynesian locations. Three Asian populations were grouped into 3 different branches and two Hawaiian groups were differentiated, however Polynesian populations were not

differentiated. The Mantel Test showed a correlation between genetic distance and geographic location for populations in the global context of Asia and Polynesia, nevertheless within the Asian and Polynesian region, no correlation was found. The Principal Coordinates Analysis (PCoA) confirmed the separation of Asian individuals and the Hawaiian subdivision into two groups, but was unable to distinguish the Polynesian populations.

ISSR molecular marker proved usefulness to differentiate the different Asian populations and separate them from the Polynesian samples. Nevertheless, the discrimination of bands obtained by this technique did not resolve the Polynesian populations. Despite this, studies with ISSR molecular marker gave valuable information about the differences between populations of Asia and Polynesia, and allow to identify the Hawaiian subdivision, complementing the information provided by SSR markers, chloroplast DNA and ITS.

## Introducción

### El poblamiento de la Polinesia

La colonización de las islas de la Polinesia, situadas en la Oceanía remota, fue el último gran evento migratorio realizado por las poblaciones humanas, en el cual fue necesario un gran dominio de la tecnología marítima para superar un entorno disociado por el Océano Pacífico (Lum y Cann, 2000). Entender el proceso de asentamiento en cada una de estas islas aún se presenta como un tema controversial, con distintas teorías que han tratado de resolver “el problema de los orígenes de la Polinesia” (Kirch, 2000). Para conocer cabalmente los flujos migratorios que sucedieron en la Polinesia se deben establecer los tiempos y la secuencia de eventos en el cual este proceso de colonización fue llevado a cabo.

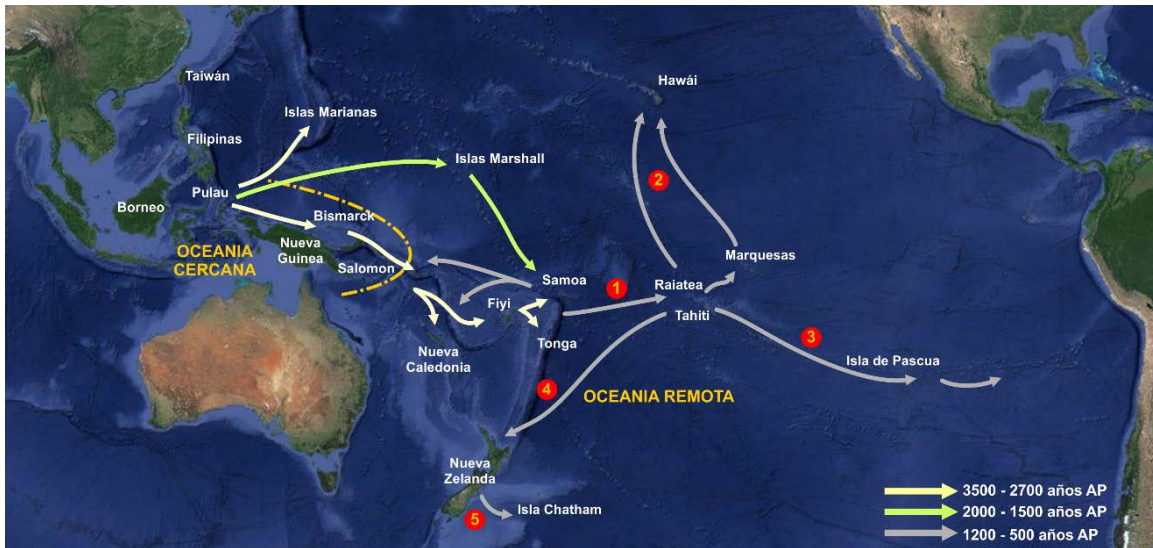
El inicio del asentamiento de los pueblos en las islas del Pacífico se puede dividir en una primera fase de ocupación, la cual se remonta a los movimientos del hombre durante el Pleistoceno en Nueva Guinea y las islas de Oceanía cercana (Archipiélago de Bismarck hasta las islas Salomón) hace unos 40.000 - 60.000 años A.P. Posteriormente, se ha presentado evidencia de una segunda fase de colonización más allá de las islas Salomón, en la cual fueron ocupadas distintas localidades de Oceanía remota durante la mitad del Holoceno alrededor de unos 4.000 años A.P. (Green, 1991, Kirch y Weisler, 1994).

Esta última fase de expansión fue llevada a cabo por los primeros pueblos que aparecieron durante el surgimiento de la cultura Lapita, en el archipiélago Bismarck, un conjunto de islas volcánicas situadas al este de Nueva Guinea, hace aproximadamente unos 3.500 años A.P. (Kirch y Weisler, 1994, Sheppard, 2011) (Figura 1). Estas travesías fueron posiblemente motivadas por el rápido crecimiento de la población en las islas que estaban libres de la malaria y otras enfermedades, además del incentivo de colonizar territorio que estuviese libre de posesión por parte de familias ya establecidas (Kirch, 2012).

Los estudios de datación mediante radiocarbono en muestras orgánicas de distintas localidades polinésicas, sitúan temporalmente estos últimos movimientos de colonización en dos etapas (Wilmshurst *et al.*, 2011). Una fase temprana de establecimiento establece la ocupación de las islas de la Sociedad entre los años ~1025–1120 D.C., la cual es seguida de una fase de dispersión hacia las demás islas entre los años ~1190–1290 D.C. (Wilmshurst *et al.*, 2011).

Con respecto a las últimas rutas de migración, no se conoce a ciencia cierta los trayectos que se llevaron a cabo en Polinesia, sin embargo la evidencia arqueológica transmitida esencialmente por patrones decorativos y lingüísticos (Sheppard, 2011), precisa un flujo cultural, el cual se expande a partir del Archipiélago Bismarck hacia localidades de Oceanía remota como Fiyi, Tonga y Samoa (Matisoo-Smith y Robins, 2004, Thomas, 2011).





**Figura 1: Mapa señalando los posibles movimientos del hombre en Oceanía cercana y remota.**

Los números indican el orden de eventos de poblamiento en Polinesia. Adaptado de Addison y Matisoo-Smith (2010).

### La búsqueda de la ruta de los colonizadores

Un hecho más complejo que definir la temporalidad de la ocupación humana en esta región, ha sido establecer la o las rutas que siguieron los colonizadores en su expansión en Oceanía. Si bien se ha señalado al Archipiélago Bismarck como el posible lugar de origen de la cultura Lapita, existen teorías que sitúan este punto como un paso intermedio de ancestros polinésicos provenientes del sureste asiático (Kayser *et al.*, 2006, Kirch, 2010). Asimismo, aún no existe un consenso de las posibles rutas de expansión que estos pueblos podrían haber trazado en sus extensos viajes de colonización (Kirch, 2010).

El enfoque antropológico ha permitido entender la cultura de los pueblos, logrando explicar de gran manera la forma en que estos navegantes debieron abordar los viajes a través del mar (Kirch y Kahn, 2007). Existe evidencia, generada en base a estudios lingüísticos, que mostraría una serie de movimientos directos repetidos de poblaciones del noroeste hacia el sureste de Oceanía cercana en unas pocas generaciones (Pawley, 2006). Además existe bastante evidencia arqueológica extendida por gran parte de Oceanía, proveniente principalmente de la alfarería realizada por los pueblos originarios, la cual ha entregado valiosa información acerca de los patrones de asentamiento en la Polinesia (Sheppard, 2011).

Actualmente, los estudios a nivel molecular han permitido determinar la diversidad genética de estos pueblos originarios y entregar una visión complementaria de la expansión humana en Oceanía (Kayser, 2010, Knapp *et al.*, 2012). El estudio genético en las

poblaciones polinésicas actuales ha surgido como una posibilidad concreta para trazar el o los trayectos de estas migraciones. Sin embargo, diversos eventos históricos tales como traslados forzosos, esclavitud, mestizaje y la introducción de enfermedades en tiempos recientes (siglos XIX y XX), han introducido distintos sesgos en los estudios de flujo génico aplicados directamente a poblaciones humanas contemporáneas (Kirch, 2000).

### **Acercamiento a un modelo migratorio a través de especies asociadas al hombre**

El análisis de especies ligadas al hombre ha surgido como una estrategia para abordar el estudio de las rutas migratorias. Este acercamiento experimental se inició con investigaciones utilizando ratas de la Polinesia (Matisoo-Smith y Robins, 2004), y se ha ampliado al estudio de gallinas (Storey *et al.*, 2008), y *Helicobacter pylori* (Moodley *et al.*, 2009) y se ha ampliado también en especies vegetales como el árbol del pan (Zerega *et al.*, 2004) y el taro (Caillon *et al.*, 2006).

### ***Broussonetia papyrifera* como especie ligada al hombre**

La morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L) Vent) es una de las especies culturalmente más importante de la Oceanía remota (Seelenfreund *et al.*, 2010). Es un árbol nativo del sureste de China y Taiwán. En su área de distribución natural, la morera de papel se ha utilizado para elaborar papel de alta calidad, además de ser utilizada como planta medicinal y árbol ornamental. En Polinesia se ha considerado un elemento ceremonial de importancia como también ha sido fuente de materia prima para la confección de vestimentas y cuerdas (Seelenfreund *et al.*, 2011).

Esta especie fue introducida a las islas del Pacífico por los pueblos colonizadores de esta región y a diferencia de otras plantas polinésicas, la morera de papel tiene un origen exclusivamente asiático, sin rastros nativos americanos (Seelenfreund *et al.*, 2011).

La gran separación geográfica entre las islas hizo que el hombre participara forzosamente en su propagación, por lo que cada asentamiento se basó en sus propias tradiciones y principios culturales a la hora de seleccionar fenotípicamente (y genotípicamente) los cultivos. En definitiva, la asociación de la morera de papel con la economía, política y cultura ceremonial lo hace uno de los árboles cultivados más importantes de Oceanía remota (Seelenfreund *et al.*, 2010).

### **Caracterización biológica de *B. papyrifera***

La morera de papel es un árbol perteneciente a la familia de las moráceas, la cual incluye 37 géneros y 1100 especies. Esta familia se caracteriza por presentar un látex

lechoso o aguado en la savia y por exhibir hojas alternadas o en su mayoría subopuestas, generalmente de forma individual, simple o pinadamente venadas (Francis, 2004).

El origen de su nombre proviene del latín *papyrifera*, el cual significa productora de papel, debido a su importancia en el Oriente como precursor de este material. Por otro lado, el nombre *Broussonetia* procede de la clasificación taxonómica asignada por Charles-Louis L'Héritier de Brutelle, fundamentada en las observaciones realizadas anteriormente por el naturalista francés Pierre Broussonet. En el año 1799, Etienne Ventenat, botánico francés, tomó este nombre para clasificarla dentro del género *Broussonetia* en su libro *Tableau du Règne Végétal*. Finalmente, en el año 1930 el nombre *Broussonetia papyrifera* fue reconocido y oficializado por el Consejo Internacional Botánico en Cambridge, Inglaterra, legitimando la clasificación de Ventenat (Barker, 2002).

*B. papyrifera*, es un árbol dioico, caducifóleo, el cual puede alcanzar alturas entre los 8 a 12 metros. Sus hojas comprenden un tamaño variable (8 a 20 cm), las cuales se presentan de forma ovalada o lobulada, incluso coexistiendo ambos tipos en un mismo individuo (Seelenfreund *et al.*, 2010).

Los individuos masculinos presentan flores de forma alargada, agrupadas en racimos, las cuales pueden alcanzar hasta 8 cm de longitud. Los ejemplares femeninos poseen flores globulares de 2,5 cm de diámetro, las cuales dan origen a un fruto de 3 a 4 cm, compuesto por numerosas drupas de color amarillo o rojo (Whistler y Elevitch, 2006) (Figura 2).

### **Caracterización genética de *B. papyrifera***

Uno de los pocos estudios genéticos de *B. papyrifera* estima el tamaño del genoma en 503 Mb (Yamanouchi *et al.*, 2010). En cuanto a su patrón cromosómico, este árbol presenta un cariotipo diploide de 26 cromosomas. El par de cromosomas más largo presenta una longitud de 2,1 - 2,2  $\mu\text{m}$ , mientras que los otros poseen un tamaño de 0,7 a 1,7  $\mu\text{m}$ . Los cromosomas 13 y 14 presentan secuencias satélites en las regiones distales en sus brazos cortos y en los cromosomas de mayor longitud se observan pequeñas constricciones de las regiones distales en los brazos largos (Oginuma y Tobe, 1995).



**Figura 2: Morera de papel (*Broussonetia papyrifera*).**

(A) Hoja de *B. papyrifera* con forma ovalada observada en Isla de Pascua. (B) Hoja de *B. papyrifera* con forma lobulada observada en Tonga. (C) Flores masculinas y (D) flores femeninas de *B. papyrifera*.

### **Genética del paisaje como herramienta de análisis del flujo migratorio**

Para entender los procesos de variación genética y adaptación de una población en determinada localidad es necesario considerar cómo podría influir el entorno en su distribución. La genética del paisaje (suma de genética de poblaciones con ecología del paisaje) es una disciplina relativamente nueva, la cual se encarga de estudiar la interacción entre las variables del paisaje y los procesos microevolutivos tales como el flujo génico y la selección (Manel *et al.*, 2003).

Este acercamiento integrativo ha mostrado ser una herramienta poderosa en la comprensión de la variación genética de una especie en su hábitat, lo cual se ha visto

reflejado en el aumento exponencial de trabajos que han utilizado este enfoque en la última década (Storfer *et al.*, 2010).

Los avances tecnológicos han entregado un gran número de marcadores en esta área, con distinta resolución temporal y espacial. Actualmente se dispone de un número considerable de marcadores moleculares dirigidos tanto a DNA mitocondrial como cromosomal y otros que se basan en regiones particulares del genoma tales como microsatélites, polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*) o genes candidatos (Manel *et al.*, 2003). También existe una gran cantidad de recursos estadísticos que permiten examinar la información, como test de asignaciones, test de correlaciones de matrices y análisis de rutas de dispersión, entre otros, los cuales pueden ser aplicados usando una amplia variedad de programas bioinformáticos y estadísticos (Storfer *et al.*, 2006).

La estrategia de trabajo en la genética del paisaje depende directamente del modelo de estudio en el cual se trabaje. Si se desea evaluar la variación adaptativa en una localidad, las plantas suelen presentarse como un modelo de mejor proyección al entregar información inmediata de su sitio de crecimiento, a diferencia de las poblaciones animales, las cuales tienen la habilidad de movilizarse por grandes distancias. Por otro lado, los estudios del flujo genético o los fenómenos migratorios son más complejos de realizar en plantas debido a que su propagación por medio de semillas y polen puede responder a otros factores, tales como agentes polinizadores o vectores animales (Holderegger *et al.*, 2010).

El uso de *B. papyrifera* en la genética del paisaje entrega una visión que se sobrepone a los problemas que presentan otros modelos vegetales. Los antecedentes que se tienen de esta especie indican que su propagación desde Asia y a través de la Polinesia se llevó a cabo principalmente por vía agámica mediante esquejes o brotes desde la raíz, restringiendo la presencia de semillas o polen (Seelenfreund *et al.*, 2010, Seelenfreund *et al.*, 2011). Por otro lado, su distribución en una geografía altamente fragmentada, como son las islas del Pacífico, supone un caso muy particular en donde el hombre determinó el flujo de migración de *B. papyrifera* (Seelenfreund *et al.*, 2010, Seelenfreund *et al.*, 2011).

Es por esto que la morera del papel surge como un modelo ideal de estudio de los movimientos migratorios a través de la genética del paisaje, entregando una perspectiva contemporánea de los posibles procesos que afectaron la variación genética.

### **Análisis genético mediante el uso de marcadores moleculares**

Los estudios genéticos en plantas se fundamentaron inicialmente en la observación del fenotipo entre dos o más organismos en un hábitat establecido. Si bien esta metodología de análisis permitió obtener una aproximación inicial de la diversidad genética entre individuos, la

escasez de caracteres morfológicos analizables y la relación presente entre el ambiente y un determinado fenotipo fue limitando el potencial uso de esta técnica molecular (Rajapakse, 2003). Con el uso de las isoenzimas a fines de la década de 1950 (Hunter y Markert, 1957), surgió una segunda generación de marcadores bioquímicos que superaron en parte los problemas presentados por el uso de marcadores basados en morfología. El concepto de isoenzima se definió como cada una de las formas moleculares estructuralmente diferentes de una enzima con la misma función catalítica, las cuales son generadas por alteraciones en la composición de aminoácidos, repercutiendo finalmente en cambios a nivel de carga neta, conformación y movilidad electroforética (Kumar *et al.*, 2009). En sus inicios, la separación de estas proteínas mediante electroforesis permitió obtener distintos perfiles para estimar variabilidad genómica a través de métodos de bajo costo, reproducibles y sin la necesidad de contar con material genómico. Sin embargo el uso de los marcadores bioquímicos aún presenta una serie de desventajas debido a la baja abundancia de isoenzimas y la dependencia de éstas de las condiciones ambientales (Kumar *et al.*, 2009).

Posteriormente, el desarrollo de una tercera generación de marcadores moleculares basados en el análisis del DNA, surgió como una alternativa capaz de identificar cambios a nivel de genomas, entregando un enfoque distinto a las técnicas de análisis morfológicas (estudio del color o la forma) o bioquímicas (estudio de un producto génico) ya establecidas (Rajapakse, 2003). Entre sus ventajas, los marcadores moleculares presentan gran especificidad en el reconocimiento de una o varias secuencias particulares para un grupo de organismos, identificando variabilidad ya sea a nivel de un único nucleótido o distintos *loci* dentro de un genoma (Mohan *et al.*, 1997). Además, esta técnica permite seguir cambios en secuencias específicas únicas para uno o un grupo de individuos a través de distintas generaciones sin ser afectadas por variables ambientales (Koebner, 2003, Rajapakse, 2003). Por último, la gran facilidad con la cual se pueden generar nuevos marcadores moleculares a partir de los ya existentes permite contar con una amplia gama de herramientas en la evaluación de progenies y cultivos de plantas de interés (Rajapakse, 2003).

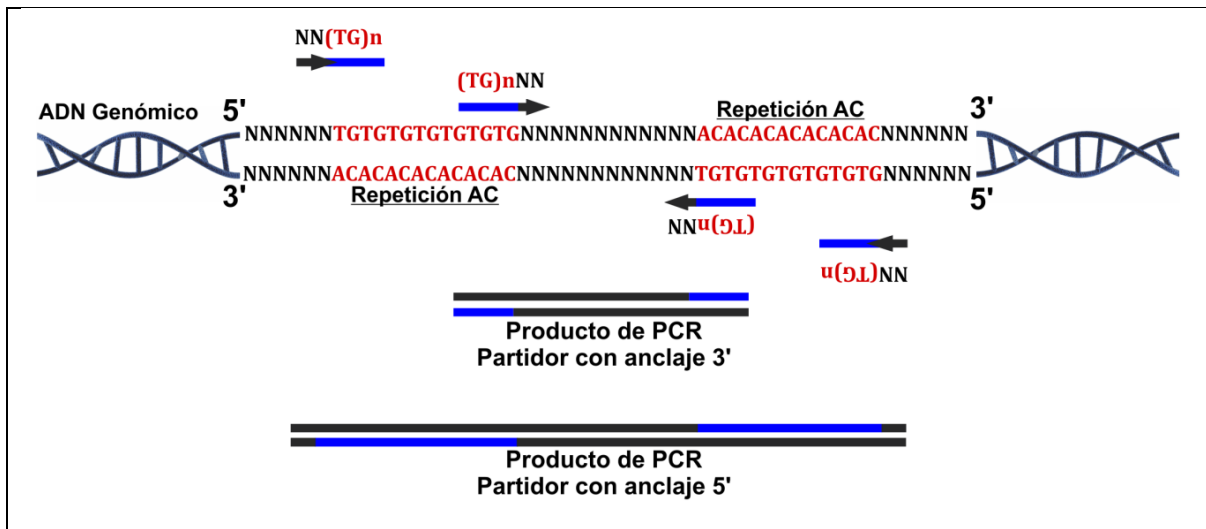
### **ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*)**

Con la advenimiento de la técnica “Reacción en Cadena de la Polimerasa” o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), desarrollada por Kary Mullis en 1987 (Mullis y Faloona, 1987), ha aumentado en forma considerable la utilización de marcadores moleculares con el fin de diferenciar y/o identificar individuos en diversas áreas de las ciencias biológicas y la biotecnología.

La reacción en cadena de la polimerasa necesita de partidores diseñados por el usuario o diseñados comercialmente en base al conocimiento de uno o más *loci* de interés (Burke, 1998). En el caso de desconocer la secuencia blanco o no disponer de la información necesaria para generar partidores específicos, es esperable que la síntesis de una secuencia arbitraria de 10 nucleótidos se encuentre al menos una vez cada un millón de bases en el genoma (Zietkiewicz *et al.*, 1994). De esta forma, si dos de estas secuencias se presentan dentro de una distancia amplificable y en una orientación invertida, la PCR podría generar un amplicón (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los microsatélites o SSR ("Simple Sequences Repeats") son secuencias cortas repetidas en tándem que consisten en unidades de di-, tri-, o tetra- nucleótidos repetidos *n* veces a lo largo del genoma de una amplia variedad de organismos eucariontes, procariontes y arqueas. Este número de copias puede variar entre alelos y son altamente proclives a presentar polimorfismos, constituyendo una herramienta poderosa en el estudio de poblaciones (Feldheim, 2013, Rajapakse, 2003, Sarwat, 2012).

En base al principio anterior, Zietkiewicz y colaboradores (Zietkiewicz *et al.*, 1994), diseñaron un enfoque general de análisis taxonómico en base a PCR, el cual permitía examinar simultáneamente una variedad de *loci* genómicos utilizando estas repeticiones como sitios de anclaje a un único partidor. (Reddy *et al.*, 2002, Zietkiewicz *et al.*, 1994). Utilizando una única secuencia de oligonucleótidos de 16 a 25 pb era posible amplificar regiones entre microsatélites o zonas ISSR (Inter-Simple Sequences Repeats) que estuviesen flanqueadas por microsatélites orientados de forma inversa y a una distancia comprendida entre 100 a 3000 pb (Sarwat, 2012). En la Figura 3 se presenta un esquema general de la técnica ISSR.



**Figura 3: Esquema general de la técnica ISSR-PCR.**

En el partidor, se muestra la región complementaria (en azul) a la zona de repetición en el DNA genómico.

Los ISSR son marcadores moleculares de naturaleza dominante (no permiten discriminar entre homocigotos y heterocigotos) y anónimos (generan bandas de secuencia desconocida) con una distribución indeterminada en el genoma. Los partidores ISSR están conformados por di-nucleótidos hasta penta-nucleótidos repetidos y pueden presentar de una hasta cuatro bases degeneradas en los extremos 5' o 3'. La presencia de bases distintas en los extremos de la repetición define la zona de anclaje o apareamiento del partidor, encontrándose aquellos anclados por el extremo 3', los que se unen por el extremo 5', y aquellos que no presentan bases degeneradas en ningún extremo, siendo capaces de unirse en cualquier región de la repetición (Reddy *et al.*, 2002).

Los marcadores moleculares ISSR presentan algunas ventajas con respecto a otros tipos de marcadores (Sarwat, 2012). Entre éstas destacan:

- a) No es necesario conocer la secuencia genómica *a priori*.
- b) Permite evaluar varios *loci* simultáneamente.
- c) No existe requisito de clonación y caracterización, por lo que esta técnica requiere de menos tiempo y es más económica que otras técnicas basadas en microsatélites.
- d) Los productos de PCR obtenidos quedan determinados por las secuencias microsatélites que se utilicen, por lo tanto son más fiables que las técnicas basadas en secuencias arbitrarias del partidor.
- e) Es eficaz para distinguir especies estrechamente relacionadas.
- f) Esta técnica es menos engorrosa que otras metodologías, y por lo tanto presenta mayor facilidad de uso.

### **Análisis de agrupamiento y distribución de organismos**

Para establecer las relaciones presentes entre un grupo de individuos, existen distintos acercamientos capaces de interpretar las características tanto genómicas como fenotípicas y traducirlas en esquemas o diagramas de agrupamiento.

La fenética surgió a fines de la década de 1950 como un enfoque alternativo a la cladística, la cual, a diferencia de este último, favoreció los métodos operacionales basados en la comparación de fenotipos prescindiendo de los procesos evolutivos involucrados (Richard, 2013). Aunque la fenética como herramienta de agrupamiento permite el estudio de organismos en base a sus características fenotípicas, este estudio no se limita únicamente a la comparación de rasgos morfológicos. Por esta razón, un set de datos genotípicos o genómicos de un grupo de individuos pueden ser analizados mediante parámetros cladísticos o fenéticos indistintamente (Sneath, 2001).



Pese a que los análisis fenéticos han presentado ciertas objeciones y en los últimos años han sido desplazados ampliamente por la cladística, su uso muchas veces entrega una visión preliminar y complementaria a los análisis de mayor poder analítico (Richard, 2013).

### **Métodos de correlación de caracteres**

Actualmente, uno de los métodos empleados más habituales para representar las relaciones entre individuos o poblaciones, denominados unidades taxonómicas operacionales, OTUs ("*operational taxonomic unit*") en taxonomía numérica, es mediante un diagrama de árbol o dendrograma (Sneath, 2001). Como punto de partida, esta técnica requiere de una matriz de datos construida en base a las variaciones que presentan todos los OTUs, los cuales son posteriormente comparados en base a similitud, disimilitud o afinidad, para originar una matriz de distancia bidimensional (Richard, 2013).

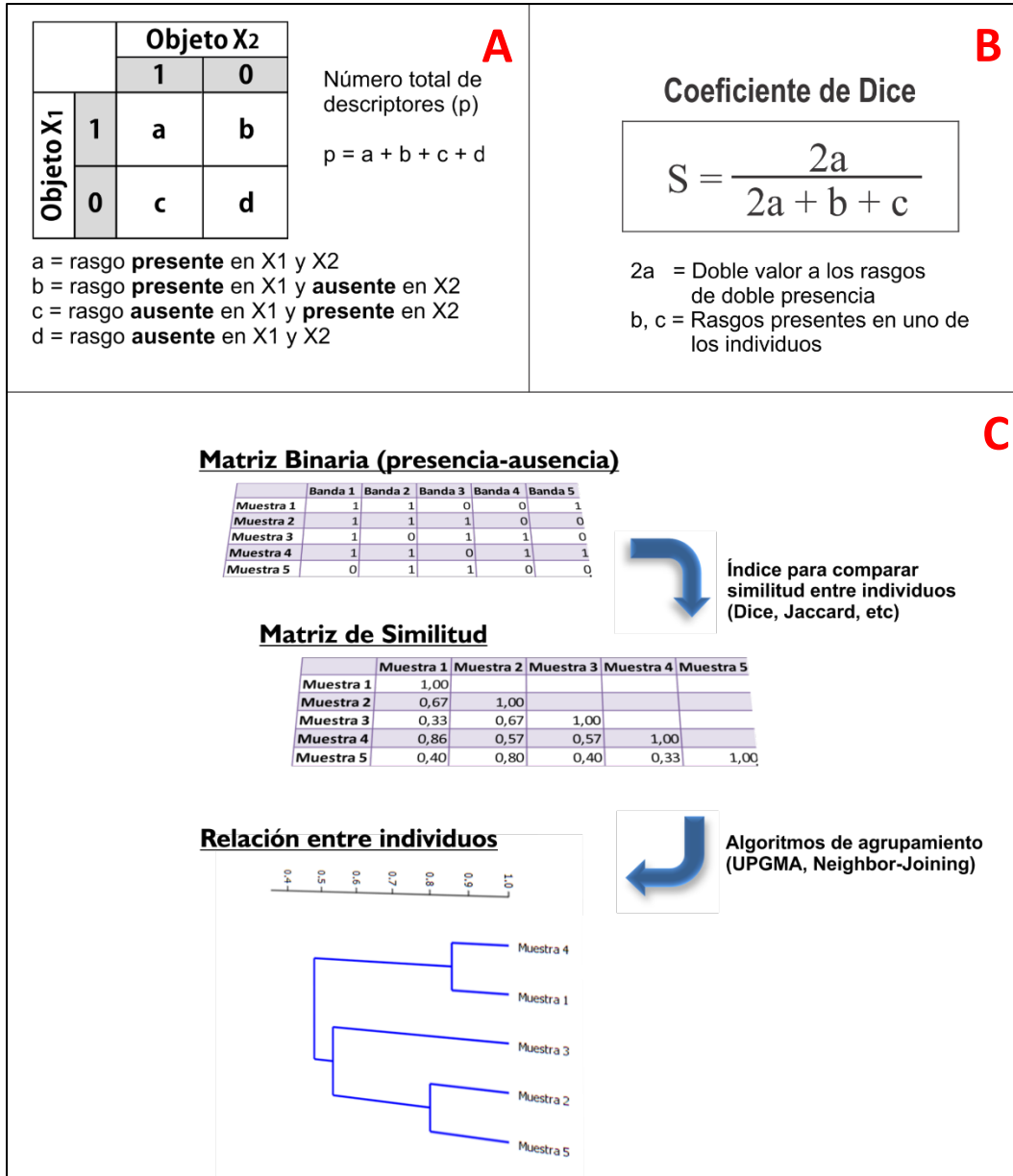
Existe un gran número de coeficientes que miden la asociación entre individuos. Estos toman valores desde 0 hasta 1, siendo este último un indicativo de la similitud entre dos objetos idénticos o un objeto comparado con sí mismo (Legendre y Legendre, 2012). El fundamento estadístico de los coeficientes de similitud surge de la descripción de características capaces de representarse en forma binaria, tal como la información de presencia o ausencia de un determinado rasgo o el sistema de respuestas sí-no para una pregunta en particular (Legendre y Legendre, 2012).

La similitud que existe entre dos OTUs se puede expresar en base a las características que compartan ambos individuos, los rasgos que se presenten sólo en alguno de ellos y las propiedades que ninguno de ellos presenten, para lo cual distintos autores han establecido coeficientes que expresan esta similitud ponderando de manera distinta cada uno de estas situaciones (Legendre y Legendre, 2012). Entre los coeficientes más utilizados destacan Simple-Matching, Jaccard y Dice (Dice, 1945, Legendre y Legendre, 2012, Meyer *et al.*, 2004, Sokal y Michener, 1958).

A partir de una matriz de similitud, se pueden utilizar distintos algoritmos de agrupamiento con el fin de presentar las relaciones entre individuos de forma esquemática a través de un dendrograma. Entre éstos, los algoritmos más utilizados son el método UPGMA y *neighbor-joining* (Sneath, 2001).

UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (Sneath y Sokal, 1973) utiliza un acercamiento por agrupamiento sucesivo en donde se genera una matriz con todas las similitudes presentes y se agrupan los dos *taxa* más similares, agregando el tercer *taxa* de mayor similitud al grupo anterior. En este caso, el proceso es repetido hasta que se agregan todos los *taxa* y el dendrograma es construido (Stavrinides y Ochman, 2009). El método

*neighbor-joining* (o de Pares-Vecinos) ocupa un principio similar a UPGMA; sin embargo, agrupa los individuos más similares en primer lugar y luego recalcula las distancias entre los pares vecinos (Stavrinides y Ochman, 2009). En la Figura 4 se presenta un esquema señalando los pasos más importantes para la construcción de un dendrograma.



**Figura 4: Esquema general para la construcción de un dendrograma.**

A) Tabla de frecuencia esquemática describiendo la similitud entre dos individuos. El valor 1 indica presencia de un carácter y el valor 0 indica ausencia de éste. B) Coeficiente de similitud de Dice. C) Etapas involucradas en la construcción de un dendrograma.

## **Problema**

Debido a nuestra imposibilidad de trazar una ruta migratoria específica de los pueblos colonizadores de las islas de la Polinesia, el uso de *B. papyrifera* se presenta como un modelo de estudio atractivo para resolver esta interrogante utilizando marcadores moleculares. El uso de *B. papyrifera* como un modelo de estudio de diversidad poblacional demostró ser una buena alternativa para diferenciar localidades de Taiwán utilizando el marcador molecular ISSR (Ho y Chang, 2006). En este caso, el uso de marcadores moleculares anónimos ISSR se presenta como un método reproducible, de alta discriminación y de bajo costo.

En base a lo anterior, este trabajo intenta resolver la siguiente pregunta:

¿Es posible diferenciar individuos de *B. papyrifera* mediante el uso de marcadores anónimos ISSR para inferir una posible ruta de dispersión de *B. papyrifera* durante el proceso de colonización de la Polinesia?

## **Hipótesis**

La diversidad genética de *Broussonetia papyrifera* en Asia y Polinesia se puede determinar mediante el uso de marcadores moleculares anónimos ISSR, y su análisis multivariante nos permite deducir la dispersión de esta planta en Oceanía remota.

## **Objetivo General**

Analizar la diversidad genética de distintas poblaciones de *B. papyrifera* de Asia y Polinesia utilizando el marcador molecular anónimo ISSR, con el fin de conocer la dispersión de esta especie en la Oceanía remota.

## **Objetivos Específicos**

1.- Determinar la diversidad genética de muestras foliares de *B. papyrifera* provenientes de Asia (Taiwán, Japón y Vietnam) y de Oceanía remota usando marcadores moleculares ISSR.

2.- Correlacionar los resultados obtenidos con modelos de dispersión y rutas migratorias en Polinesia mediante los análisis multivariante de agrupamiento y distribución.

## **Materiales y Métodos.**

### **Material biológico**

En el marco de los proyectos FONDECYT 1080061 y 1120175 se obtuvieron muestras foliares de *B. papyrifera* provenientes de distintas localidades de Asia y Polinesia. Se contó con muestras de hojas procedentes de Taiwán, enviadas por gentileza del Dr. Kuo-Fang Chung (National University of Taiwan, Taipei, Taiwán) y se pudo disponer de muestras de Japón y Vietnam gracias a la colaboración del Dr. Peter Matthews (National Museum of Ethnology, Kyoto, Japón).

La recolección de muestras foliares de Polinesia incluyó distintas islas de Oceanía remota: isla de Pascua, Marquesas, Tahiti, Raiatea, Pitcairn, Hawái, Samoa, Tonga y Fiyi. Además se seleccionaron muestras de Santiago colectadas en el Parque Arrieta, adyacente al Campus Parque Arrieta de la Universidad Internacional SEK.

Para los análisis filogenéticos incluidos en este trabajo, se analizaron adicionalmente ejemplares de *Broussonetia kazinoki*, morácea perteneciente al mismo género que *B. papyrifera*, proporcionados por el Dr. Peter Matthews.

La recolección de muestras de hojas de *B. papyrifera* se realizó en varias localidades dentro de cada isla, acorde a la disponibilidad de acceso, abundancia de individuos y número de hojas recolectadas por excursión. Se registraron características fenotípicas y localización geográfica. Las muestras se enviaron en filtros de papel conteniendo silica gel. En el laboratorio se almacenaron en bolsas plásticas a -20°C o a temperatura ambiente mantenidas libres de humedad.

### **Soluciones y amortiguadores**

**Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1 v/v)**

**Tampón TBE 5X:** 54 g Tris; 27,5g ácido bórico; 4,65g EDTA en 1 litro de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> pH 8,4.

**Tampón de extracción:** Tris-HCl 100 mM (pH: 8,0); EDTA 50 mM (pH: 8,0); NaCl 0,3 M; β-mercaptoetanol (1:100) agregado al momento de la extracción.

**Etanol:** etanol 70%, etanol absoluto.

**Solución de teñido:** Solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml.

**Solución de desteñido:** Solución de MgSO<sub>4</sub> 1 mM.

## Reactivos

Se adquirieron los siguientes reactivos de las empresas que se nombran a continuación:

**Biotium Inc (Hayward, California, EE.UU.):** GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10.000 X en DMSO.

**Fermelo Biotec (Santiago, Chile):** Agarosa Lafken grado analítico.

**USBiological (Swampscott, Massachusetts, EE.UU.):** Tris-Base, EDTA, ácido bórico, Ribonucleasa A (bovino).

**Merck (Darmstadt, Alemania):** Silica gel, Sulfato de magnesio p.a.

**Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.):** bromuro de etidio, CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio)

**Thermo Scientific (Pittsburgh, Pensilvania, EE.UU.):** tampón de carga 6 X.

**Promega® (Madison, Wisconsin, EE.UU.):** DNA polimerasa GoTaq; dNTPs: dATP, dCTP, dTTP y dGTP; MgCl<sub>2</sub>; tampón green GoTaq flexi 5 X

## Métodos

### Extracción de DNA genómico de *B. papyrifera*

Se utilizó un protocolo de extracción de DNA modificado que se basa en el uso del detergente CTAB (Lodhi *et al.*, 1994). Las modificaciones realizadas consistieron en la eliminación del uso de PVP y en el aumento de  $\beta$ -mercaptoetanol a 1,0 %.

En primer lugar, se seleccionaron las muestras que presentaban condiciones apropiadas para la extracción. En este caso se tomó como parámetro de calidad aquellas hojas jóvenes, que mantenían un color verde intenso, evitando aquellas muestras con zonas oscuras o dañadas.

Se cortó aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de área de la hoja y se maceró usando mortero y pistilo en presencia de 700  $\mu$ l de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM (pH: 8,0); EDTA 50 mM (pH: 8,0); NaCl 0,3 M;  $\beta$ -mercaptoetanol (1:100)). El homogeneizado se traspasó a tubos de centrifuga de 1,5 ml y éstos se incubaron a 65°C durante 30 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos mediante inversión. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

La eliminación de las proteínas se realizó mediante extracción con solvente orgánico utilizando cloroformo, junto con alcohol isoamílico para favorecer la formación de fases durante la extracción. Se agregó a cada tubo un volumen de 600  $\mu$ l de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se homogeneizó por inversión. La mezcla resultante se centrifugó a 3780 g utilizando una centrifuga Mikro 22R con rotor 1153 (Hettich-Zentrifugen,

Tuttlingen, Alemania) durante 15 minutos y con ello se obtuvo una separación de fases de las cuales se rescataron 450 µl de la fracción superior (acuosa) en tubos de 1,5 ml.

A cada tubo se agregó 0,5 volúmenes de NaCl 5 M junto con 2 volúmenes de etanol absoluto (almacenado a -20°C). El uso de altas concentraciones de NaCl permitió la remoción de polisacáridos, aumentando la solubilidad del DNA en etanol. La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos a 4°C, previa homogeneización, con el fin de precipitar el DNA. Transcurrido este tiempo, se realizó una nueva centrifugación a 945 g durante 3 minutos más otros 3 minutos a 3.780 g a temperatura ambiente, para evitar el deterioro excesivo del DNA, obteniendo un precipitado en la base del tubo. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó agregando 500 µl de etanol 76 % v/v a 4°C y centrifugando a 3.780 g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el remanente se secó invirtiendo los tubos en toallas de papel o bajo vacío en un concentrador “speed vac” (Savant ISS110 Integrated speedVac System).

Finalmente el precipitado se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y se incubó con 1 µl de RNasa a una concentración final de 0,1 mg/ml (previamente hervida a 100°C) durante 30 minutos a 37°C más 15 minutos a 42°C, con el fin de eliminar posibles trazas de RNA, las cuales pudiesen interferir en la pureza o amplificación de DNA. El DNA resuspendido se transfirió a un tubo Eppendorf de 0,6 ml y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **Análisis de integridad de DNA genómico**

El análisis de integridad se realizó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 0,8 % en tampón TBE 0,5 X. En cada pocillo del gel se cargó un volumen de 4 µl de DNA genómico más 1 µl de tampón de carga y 1 µl de GelRed™ 100 X. Adicionalmente, se agregó 1,5 µl de estándar de peso molecular Lambda DNA/*Hind III*. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 100 V y el DNA se visualizó mediante luz UV en un UV-Transiluminator (ULTRA-LUM).

### **Determinación de la concentración de DNA genómico**

La concentración de cada muestra se determinó mediante espectrofotometría utilizando un lector multi-modal de microplacas basado en monocromadores Synergy (Biotek, Winooski, Vermont, EE.UU.). Se cargó 1 µl de muestra por pocillo y se utilizó 1 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> como blanco de lectura. Los valores entregados por el equipo se obtuvieron en base a la ley de Beer-Lambert, la cual corresponde a:

$$\mu\text{g/ml DNA} = (\text{Abs}_{260} \text{ medida}) \times (50 \mu\text{g/ml}) \times \text{Factor de dilución}$$

Por otro lado, el grado de pureza se obtuvo mediante la razón:

$$\frac{Abs_{260} \text{ (m\u00e1ximo de absorbancia de \u00e1cidos nucleicos)}}{Abs_{280} \text{ (m\u00e1ximo de absorbancia de prote\u00ednas)}}$$

Se consideraron razones entre 1,8 y 2,0 como \u00f3ptimas para DNA gen\u00f3mico de doble hebra (Lobos y Seelenfreund, 1998).

### Estandarizaci\u00f3n de las condiciones del sistema ISSR-PCR

Para la estandarizaci\u00f3n de las condiciones del sistema de PCR, se seleccionaron 13 partidores ISSR de la serie UBC # 9 (University of British Columbia) (Tabla 1), seg\u00fan los datos reportados por Ho y Chang (2006).

**Tabla 1: C\u00f3digo y secuencia de cada partidor utilizado en la t\u00e9cnica de ISSR-PCR.**

C\u00f3digo	Secuencia 5' \u2192 3'	Anclaje
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	Extremo 3'
UBC825	ACACACACACACACT	Extremo 3'
UBC827	ACACACACACACACAG	Extremo 3'
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	Extremo 3'
UBC855	ACACACACACACACACYT	Extremo 3'
UBC856	ACACACACACACACAYA	Extremo 3'
UBC857	ACACACACACACACAYG	Extremo 3'
UBC861	ACCACCACCACCACC	Sin anclaje
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	Sin anclaje
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	Sin anclaje
UBC888	BDBCACACACACACA	Extremo 5'
UBC889	DBDACACACACACAC	Extremo 5'
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	Extremo 5'

A=adenina; T=timina; G=guanina; C=citosina; D=A, G o T; B=C, G o T; H=A, C o T; Y=C o T; V=A, C o G.

Para optimizar los par\u00e1metros utilizados en la ISSR-PCR se emple\u00f3 un arreglo ortogonal basado en el m\u00e9todo de Taguchi (Cobb y Clarkson, 1994), el cual permiti\u00f3 evaluar la concentraci\u00f3n \u00f3ptima de 5 factores por medio de 16 reacciones: DNA polimerasa Taq (U), MgCl<sub>2</sub> (mM), dNTPs (mM), partidor (\u00b5M) y templado de DNA (ng/25 \u00b5L); probando en cada caso cuatro concentraciones distintas (cuatro niveles) (Tabla 2). El volumen de tamp\u00f3n de la polimerasa permaneci\u00f3 constante (5 \u00b5l) y se complet\u00f3 un volumen total de reacci\u00f3n de 25 \u00b5l usando H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

**Tabla 2: Concentraciones finales utilizadas en la optimización de la ISSR-PCR.**

Reactivos	Concentración Final			
	1	2	3	4
DNA polimerasa (U)	0,5	1,0	1,5	2,0
MgCl <sub>2</sub> (mM)	2,5	3,0	3,5	4,0
dNTPs (mM)	0,10	0,15	0,20	0,25
Partidor (μM)	0,2	0,4	0,6	0,8
Templado de DNA (ng/25 μL)	20	40	60	80

El programa de amplificación de la PCR consistió en una temperatura de desnaturación inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50 segundos a la temperatura de apareamiento para cada partidor y una extensión de 2 minutos a 72°C, para terminar con una extensión final de 72°C durante 10 minutos (Ho y Chang, 2006).

Las temperaturas de apareamiento de cada partidor se determinaron mediante una PCR en gradiente con 4 temperaturas: 50°C, 53°C, 56°C y 58°C, de las cuales se seleccionó como temperatura óptima aquella que presentó un perfil genómico con fragmentos distinguibles y de buena resolución en geles de agarosa al 1,0 %.

Para visualizar cada perfil genético en un gel de agarosa, se probaron dos agentes intercalantes usados comúnmente en el laboratorio: GelRed™ y bromuro de etidio. Para reducir la fluorescencia de fondo observada post-tinción, se evaluaron los efectos del uso de una solución de lavado compuesta de MgSO<sub>4</sub> 1mM.

### **Análisis estadísticos**

Para los análisis comparativos, se registró la presencia (1) o ausencia (0) de fragmentos en cada perfil ISSR mediante una matriz binaria, considerando cada posición como un locus-ISSR (Powell *et al.*, 1996). Para el sistema de asignación de bandas, se registraron sólo aquellos fragmentos claramente distinguibles y definidos.

La matriz de similitud se construyó en base a los datos de presencia o ausencia de bandas en cada individuo utilizando el coeficiente de Dice (Dice, 1945) incluido en el programa Splitstree4 versión 4.13.1 (Huson y Bryant, 2006). Con esta misma herramienta estadística se realizaron los análisis de agrupamiento utilizando los algoritmos UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) y *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987), definiendo para la construcción de cada dendrograma un *bootstrap* de 10.000 repeticiones.

Para observar las diferencias en cada población y entre distintas localidades de la Polinesia, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando el programa



GenAEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Los análisis se efectuaron a partir de la matriz de distancia calculada en base al índice de Dice, utilizando 1.000 permutaciones.

Con el fin de establecer las posibles relaciones entre los individuos, se construyó una matriz de distancia basada en la diversidad genética no sesgada de Nei (Nei, 1978), ingresando la matriz de presencia/ausencia al programa POPGENE versión 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Junto con esto, se generó una matriz de distancias geográficas en base al sistema de coordenadas angulares de longitud y latitud para cada región, por medio del programa GenAEx 6.5.

Para determinar la posible correlación entre las matrices de distancia genética y geográfica considerando 3 poblaciones de Asia y 6 poblaciones polinésicas, se realizó la prueba de Mantel. Para esto se utilizó el programa GenAEx 6.5, asignando el máximo número de permutaciones (9.999).

## Resultados

### Recolección de muestras de *B. papyrifera*

Para el desarrollo de esta memoria de título, se recolectaron 236 muestras de distintas islas de la Polinesia, Asia y un ejemplar introducido en territorio chileno continental. La ubicación geográfica de las localidades en donde se recolectaron muestras y número de individuos por sector en la recolección se detallan en la Figura 5 y Tabla 3 respectivamente.

**Tabla 3: Número de muestras recolectadas por localidad y ubicación geográfica de cada sector de recolección de muestras.**

Localidad	N	Ubicación geográfica	
		Latitud	Longitud
Fiya	4	18° 10' 0" S	178° 27' 0" E
Hawái	43	21° 18' 41" N	157° 47' 47" O
isla de Pascua	79	27° 7' 10" S	109° 21' 17" O
Japón	5	35° 41' 22" N	139° 41' 30" E
Marquesas	19	9° 18' 6" S	139° 29' 21" O
Pitcairn	5	25° 4' 0" S	130° 6' 0" O
Raiatea	1	16° 44' 0" S	151° 27' 0" O
Samoa	28	13° 35' 0" S	172° 20' 0" O
Santiago	3	33° 27' 0" S	70° 40' 0" O
Tahiti	3	17° 40' 0" S	149° 27' 0" O
Taiwán	20	23° 46' 0" N	121° 0' 0" E
Tonga	19	20° 0' 0" N	175° 0' 0" O
Vietnam	7	21° 2' 0" N	105° 51' 0" E
<b>Total</b>	<b>236</b>		

N=número de individuos recolectados; Sistema de coordenadas lat/long.



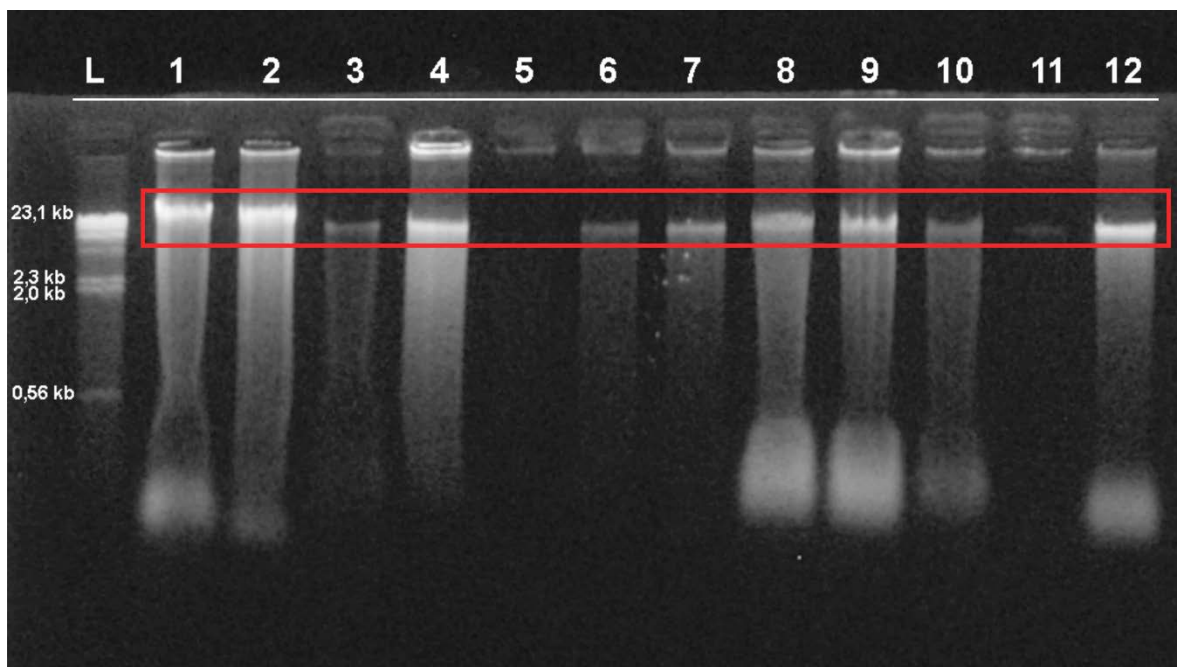
**Figura 5: Localización geográfica de los sectores muestreados.**

### Extracción de DNA genómico de *B. papyrifera*

La obtención de un perfil ISSR apropiado para análisis genómico requiere de una fuente de DNA de calidad y de un adecuado protocolo de extracción (Narayanan *et al.*, 2006). En este trabajo, se utilizó un protocolo modificado de extracción de DNA genómico de plantas (Lodhi *et al.*, 1994) que incluyó pasos adicionales de eliminación de contaminantes que pudiesen interferir en la reacción de amplificación (Narayanan *et al.*, 2006).

### Análisis de integridad de DNA genómico

La integridad del DNA genómico se determinó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa, agregando un estándar de peso molecular Lambda/*Hind III*. Esto permitió confirmar la presencia de una banda de alto peso molecular, superior a los 23 kilobases. En la Figura 6 se presenta un gel representativo con muestras de Vietnam e Isla de Pascua. Las muestras que presentaron bandas borrosas o débiles fueron descartadas para los análisis posteriores debido a la posible presencia de DNA genómico degradado o de baja calidad.



**Figura 6: Integridad de DNA genómico de *B. papyrifera*.**

En el recuadro se destaca la presencia de DNA genómico. Carril 1 y 2: muestras de Vietnam; carril 3-12: muestras de Isla de Pascua.

Electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% visualizado con GelRed™.

## Selección de muestras

Con el fin de establecer la diversidad genética entre individuos, fue necesario seleccionar un grupo representativo de muestras con DNA genómico de buena calidad. En base a los criterios de integridad definidos anteriormente, se seleccionaron 92 muestras de DNA provenientes de 10 localidades distintas de Asia y Polinesia (Tabla 4). El origen de todas las muestras se detalla en la Tabla I incluida en la sección “Anexos”. Los individuos recolectados en Raiatea, Tahiti y Pitcairn fueron descartados debido a que el DNA presentó degradación y por lo tanto no cumplió con las condiciones óptimas de calidad de DNA necesarias para la obtención de perfiles genéticos reproducibles (Sarwat, 2012). Adicionalmente, se incluyó una muestra de *Broussonetia kazinoki*, con la finalidad de contar con un grupo externo (“outgroup”) que permitiese polarizar los caracteres de los perfiles de *B. papyrifera* en los análisis de agrupamiento (Kitching *et al.*, 2001).

**Tabla 4: Muestras seleccionadas para análisis de ISSR.**

Localidad	Número de muestras
Fiji	1
Hawái	14
isla de Pascua	36
Japón	4
Marquesas	3
Samoa	6
Santiago	3
Taiwán	4
Tonga	15
Vietnam	5
Grupo externo	1
<b>Total</b>	<b>92</b>

## Análisis de pureza y cuantificación de DNA genómico

Con el fin de evaluar la pureza del DNA genómico, se determinó la razón de absorbancia  $260_{nm}/280_{nm}$  para cada una de las 92 muestras. Las lecturas obtenidas estuvieron dentro del rango óptimo esperado de 1,8 a 2,0. Por otro lado, las concentraciones de DNA genómico fluctuaron entre los 88 ng/ $\mu$ l y los 2538 ng/ $\mu$ l, lo cual permitió contar con las cantidades requeridas para la amplificación. Las razones de absorbancia y la cuantificación de DNA genómico para cada muestra se detalla en la Tabla I, sección Anexos.

## Estandarización y optimización de condiciones para la ISSR-PCR

Para ajustar las concentraciones de DNA polimerasa *Taq*,  $MgCl_2$ , dNTPs, partidor y templado de DNA en la técnica ISSR-PCR, fue necesario diseñar una estrategia experimental que permitiese generar la mayor cantidad de información usando la mínima cantidad de experimentos y recursos posibles.

Para determinar la concentración óptima de cada reactivo de la ISSR-PCR, se utilizó una estrategia de optimización basada en los métodos de Taguchi (Cobb y Clarkson, 1994, Lin *et al.*, 2012, Wilson, 2005) considerando un sistema de cinco factores (reactivos) y cuatro niveles (concentraciones). Este enfoque permitió reducir los 1024 posibles experimentos generados por combinación a tan sólo 16 reacciones de amplificación.

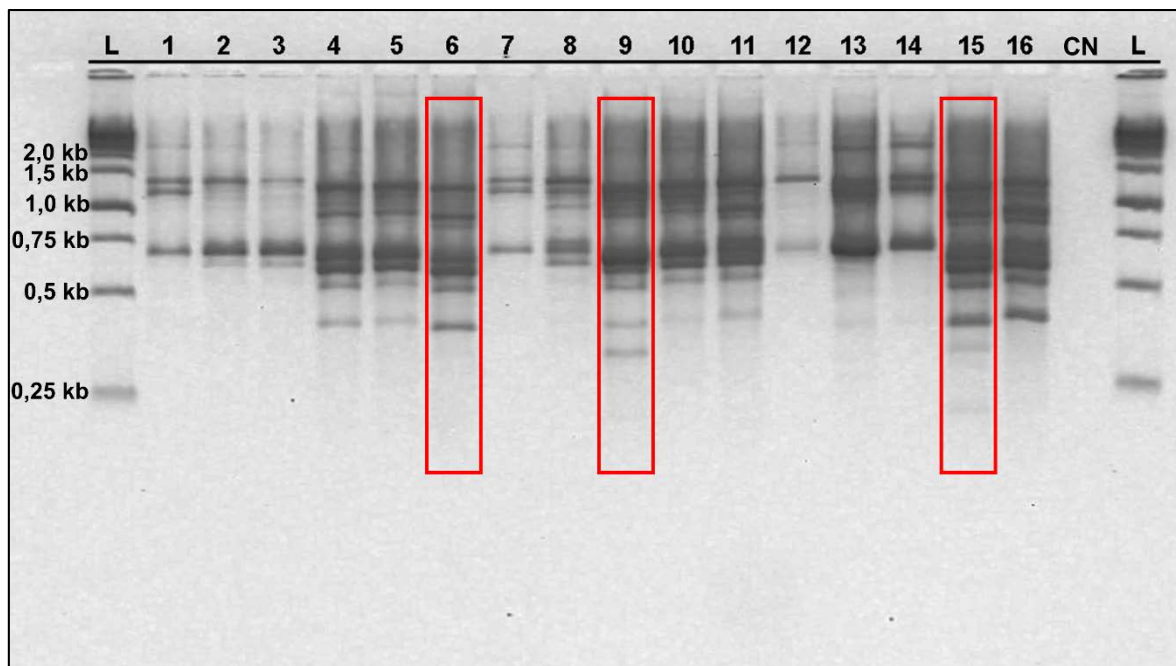
La distribución de cada parámetro se obtuvo mediante la versión de prueba del programa estadístico Minitab versión 15 (Minitab, State College, Pennsylvania, EE.UU.), resultando un arreglo ortogonal de reactivos de PCR, tal como se presenta en la Tabla 5.

**Tabla 5: Optimización de reactivos de la ISSR-PCR mediante un diseño ortogonal de Taguchi.**

No.	DNA polimerasa (U)	$MgCl_2$ (mM)	dNTPs (mM)	Partidor ( $\mu M$ )	Templado de DNA (ng/25 $\mu L$ )
1	0,5	2,5	0,10	0,2	20
2	0,5	3,0	0,15	0,4	40
3	0,5	3,5	0,20	0,6	60
4	0,5	4,0	0,25	0,8	80
5	1,0	2,5	0,15	0,6	80
6	1,0	3,0	0,10	0,8	60
7	1,0	3,5	0,25	0,2	40
8	1,0	4,0	0,20	0,4	20
9	1,5	2,5	0,20	0,8	40
10	1,5	3,0	0,25	0,6	20
11	1,5	3,5	0,10	0,4	80
12	1,5	4,0	0,15	0,2	60
13	2,0	2,5	0,25	0,4	60
14	2,0	3,0	0,20	0,2	80
15	2,0	3,5	0,15	0,8	20
16	2,0	4,0	0,10	0,6	40

Se realizó la PCR de cada reacción presente en el arreglo ortogonal utilizando una muestra de *B. papyrifera* proveniente de Santiago y cada conjunto de 16 reacciones fue amplificado utilizando 3 partidores distintos (UBC825, UBC856 y UBC861). Posteriormente, se evaluaron los patrones de amplificación resultantes en base a los criterios de resolución,

intensidad y número de bandas observadas cargando 5 µl de producto de PCR de cada una de los 16 productos de reacción en un gel de agarosa (Figura 7). Para los 3 partidores utilizados, las reacciones 6, 9 y 15 presentaron los mejores perfiles de amplificación. De esta forma se escogieron estas tres concentraciones de reactivos para continuar la optimización.



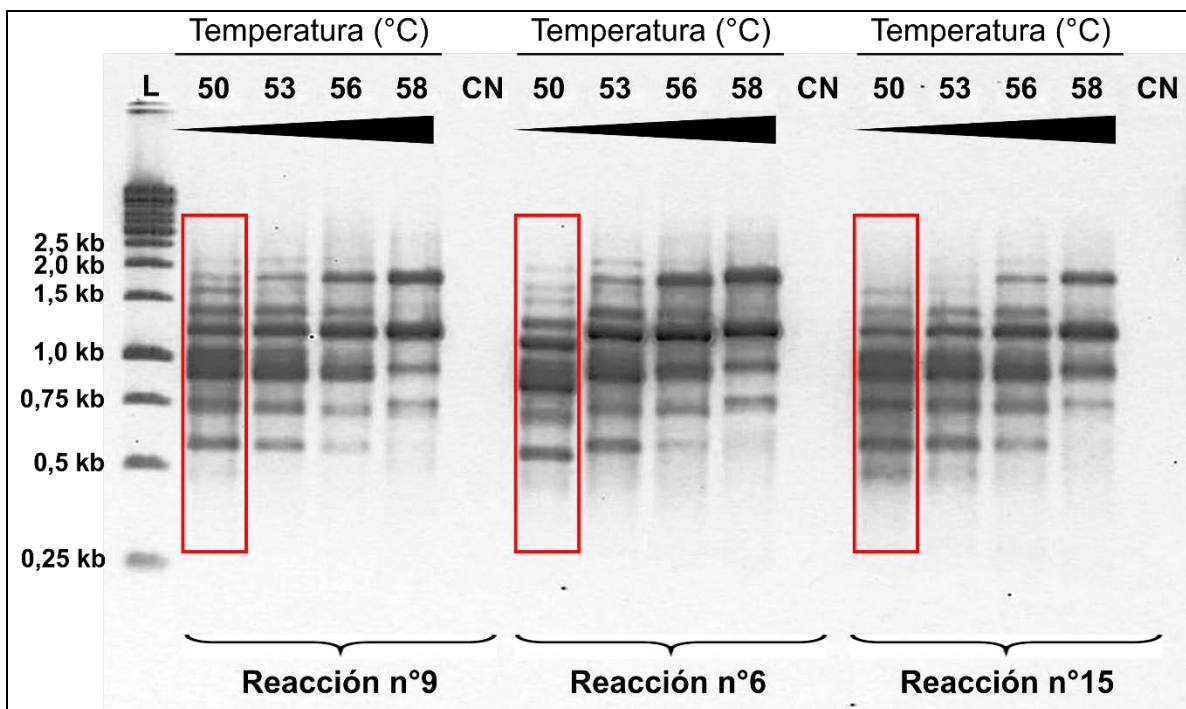
**Figura 7: Perfiles de ISSR-PCR obtenidos a partir del diseño ortogonal de Taguchi.**

Foto en negativo de la reacción de amplificación utilizando el partidore UBC825. En cada carril se cargaron 5 µl de producto de PCR obtenidos a partir de las 16 concentraciones establecidas en el arreglo de Taguchi. En los recuadros se señalan los perfiles de amplificación de mejor calidad obtenidos a partir de las reacciones **6, 9 y 15**.

L: Estándar de peso molecular 1 kb; CN: control negativo. Electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % visualizado con GelRed™.

#### **Obtención de la $T_A$ óptima de cada partidore**

En un segundo paso, se determinó la temperatura óptima de apareamiento de cada partidore ISSR utilizando las tres reacciones obtenidas a partir del diseño ortogonal. Para esto, se realizó una PCR en gradiente de temperaturas para cada partidore y se escogió el perfil que presentase un patrón de amplificación con bandas de alta intensidad, resolución y número. A modo de ejemplo, en la Figura 8 se muestra uno de los geles de agarosa correspondiente al partidore UBC856 en el que se observan los distintos perfiles de amplificación. Las temperaturas óptimas de apareamiento ( $T_{op}$ ) de cada partidore se resumen en la Tabla 6.



**Figura 8: Perfiles de amplificación obtenidos mediante una PCR en gradiente.**

Foto en negativo de uno de los geles correspondientes al partidor UBC856. En la parte superior se indica la gradiente de temperatura (°C) utilizada para las 3 reacciones de amplificación seleccionadas como óptimas. En los recuadros se señalan los perfiles de amplificación que se utilizaron para determinar la  $T_{op}$  del partidor UBC856.

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. Electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % visualizado con GelRed™.

**Tabla 6: Temperatura óptima de apareamiento de los trece partidores ISSR.**

Código	Secuencia abreviada 5' → 3'	$T_{op}$ (°C)
UBC823	(TC)8C	56
UBC825	(AC)8T	53
UBC827	(AC)8G	53
UBC842	(GA)8YG	53
UBC855	(AC)8YT	50
UBC856	(AC)8YA	50
UBC857	(AC)8YG	53
UBC861	(ACC)6	56
UBC864	(ATG)6	50
UBC866	(CTC)6	53
UBC888	BDB(CA)7	56
UBC889	DBD(AC)7	56
UBC891	HVH(TG)7	58

A=adenina; T=timina; G=guanina; C=citosina; D=A, G o T; B=C, G o T; H=A, C o T; Y=C o T; V=A, C o G.

### **Ajuste de condiciones experimentales de trabajo**

Para visualizar cada perfil genético en geles de agarosa, se probaron dos agentes intercalantes usados comúnmente en el laboratorio: bromuro de etidio y GelRed™. La molécula de bromuro de etidio, así como su derivado GelRed™ tienen la capacidad de intercalarse al DNA de doble hebra, emitiendo luz fluorescente de fácil identificación y registro cuando es irradiada con luz UV. La longitud de onda óptima de absorción del bromuro de etidio es a 300 nm (Brunk y Simpson, 1977). El bromuro de etidio y sus derivados difieren en su toxicidad, por lo que su uso en el laboratorio deben ser evaluadas apropiadamente (Quillardet y Hofnung, 1988).

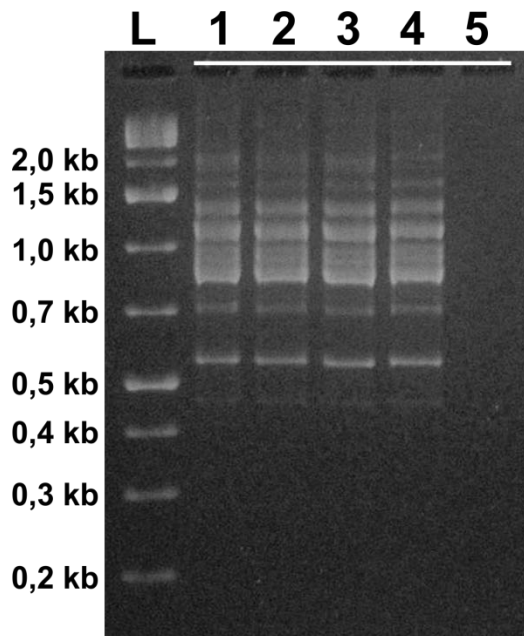
Al analizar ambos sistemas de tinción, se obtuvieron perfiles con bandas de mayor calidad al sumergir los geles en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml durante 10 minutos, posterior a una electroforesis a voltaje constante de 75 V en tampón TBE 0,5 X durante 2 horas y 30 minutos.

Con el objeto de eliminar el exceso de tinción con bromuro de etidio en el gel de agarosa y de esta forma facilitar la visualización de amplicones en los perfiles genéticos, los geles se sometieron a un ciclo de lavado en sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 1 mM durante 10 minutos y una electroforesis post-lavado a voltaje constante de 75 V en tampón TBE 0,5 X durante 15 minutos.

### **Validación del método ISSR**

Una de las etapas de validación de la técnica ISSR se realizó amplificando DNA genómico extraído en duplicado (réplicas biológicas) y contrastando ambos perfiles en un gel de agarosa. Los replicados biológicos para cada uno de los trece partidores mostraron un patrón de amplificación similar en intensidad y número de bandas. Adicionalmente, se repitió cada experimento en días distintos, utilizando las mismas condiciones de trabajo (réplicas técnicas), lo cual permitió contar con un control de la técnica de amplificación. Al igual que en el caso anterior, los perfiles genéticos obtenidos en dos días distintos mostraron patrones de bandas similares para cada uno de los partidores (Figura 9).





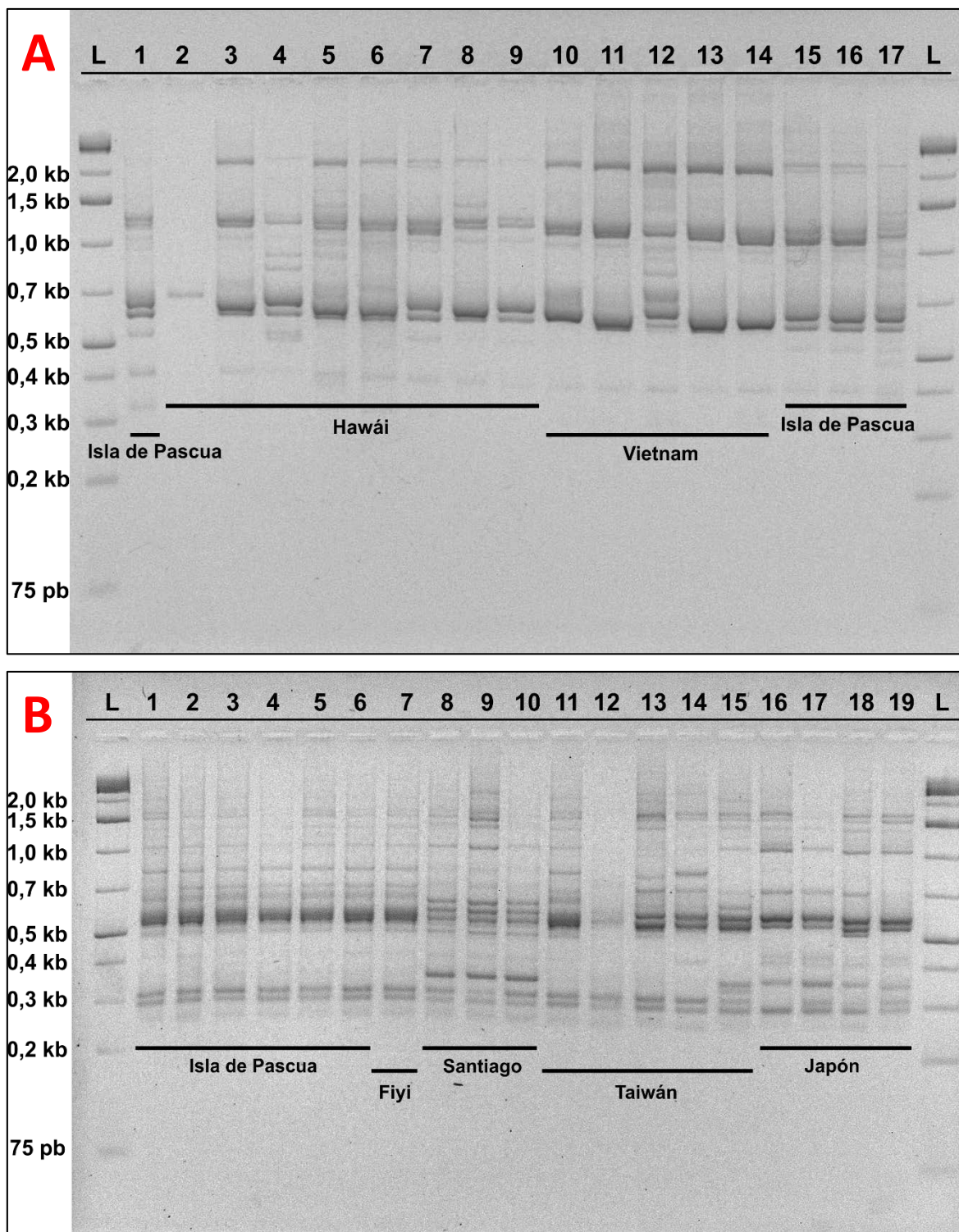
**Figura 9: Ensayos de validación del método ISSR.** En la figura se observan los replicados biológicos y técnicos para el partidor UBC856. Los patrones de bandas para los replicados biológicos se comparan en los **carriles 1 y 2**; y en los **carriles 3 y 4**. La comparación de las réplicas técnicas se muestra en los **carriles 1 y 3**; y en los **carriles 2 y 4**. **Carril 5:** control negativo; **L:** Estándar de peso molecular 1 kb plus. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % visualizado con bromuro de etidio.

#### Obtención de perfiles genéticos ISSR

La amplificación de las 92 muestras seleccionadas utilizando el conjunto de 13 partidores ISSR generó 83 perfiles genéticos con bandas de alta resolución e intensidad. Las muestras BQUCH0074, BQUCH0106, BQUCH0148 y BQUCH0188 fueron descartadas para los análisis al presentar perfiles de amplificación de baja calidad, al igual que las muestras BQUCH0013, BQUCH0015, BQUCH0032, BQUCH0137 y BQUCH0145, las cuales no amplificaron con al menos uno de los partidores.

Se descartaron los partidores UBC842, UBC857, UBC861 y UBC864, los cuales presentaron perfiles de difícil lectura debido a la baja resolución de las bandas. Finalmente, los análisis de agrupamiento y genética del paisaje se realizaron utilizando las 83 muestras que mostraron patrones de banda de buena calidad (Tabla I, Anexo) utilizando los 9 partidores indicados en la Tabla 7.

La información en cada perfil genético generó una matriz de datos de presencia/ausencia con un total de 142 bandas registradas para los 9 partidores ISSR, de las cuales 86 fueron polimórficas, lo cual representó el 60,56% del número total de las bandas asignadas. A modo de ejemplo, se presentan dos geles representativos de los perfiles de amplificación obtenidos a partir de muestras *B. papyrifera* de Isla de Pascua, Hawái y Vietnam, utilizando el partidor UBC825 (Figura 10A) y muestras de Isla de Pascua, Fiyi, Santiago, Taiwán y Japón, utilizando el partidor UBC891 (Figura 10B). En la sección Anexos se adjuntan los geles representativos del resto de los partidores utilizados con sus respectivos controles negativos y los perfiles genéticos obtenidos por el *outgroup* *B. kazinoki*.



**Figura 10: Perfiles de amplificación generados mediante ISSR-PCR.**

Fotos en negativo presentando los perfiles genéticos de muestras de *B. papyrifera* provenientes de A) Isla de Pascua, Hawái y Vietnam, utilizando el partidor **UBC825** y B) Isla de Pascua, Fiyi, Santiago, Taiwán y Japón, utilizando el partidor **UBC891**.

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.

**Tabla 7: Caracterización de bandas informadas por cada partidior ISSR.**

Partidior	Número de bandas asignadas	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de <i>loci</i> polimórficos (%)	Diversidad genética de Nei
UBC823	12	7	58,33	0,1817
UBC825	15	10	66,67	0,0775
UBC827	17	15	88,24	0,1947
UBC855	10	4	40,00	0,0822
UBC856	11	3	27,27	0,0638
UBC866	14	6	42,86	0,0596
UBC888	18	8	44,44	0,0665
UBC889	21	14	66,67	0,1184
UBC891	24	19	79,17	0,1363
<b>Total</b>	<b>142</b>	<b>86</b>	<b>60,56</b>	<b>0,1125</b>
<b>Promedio por partidior</b>	15,78	9,56		

### **Análisis de agrupamiento**

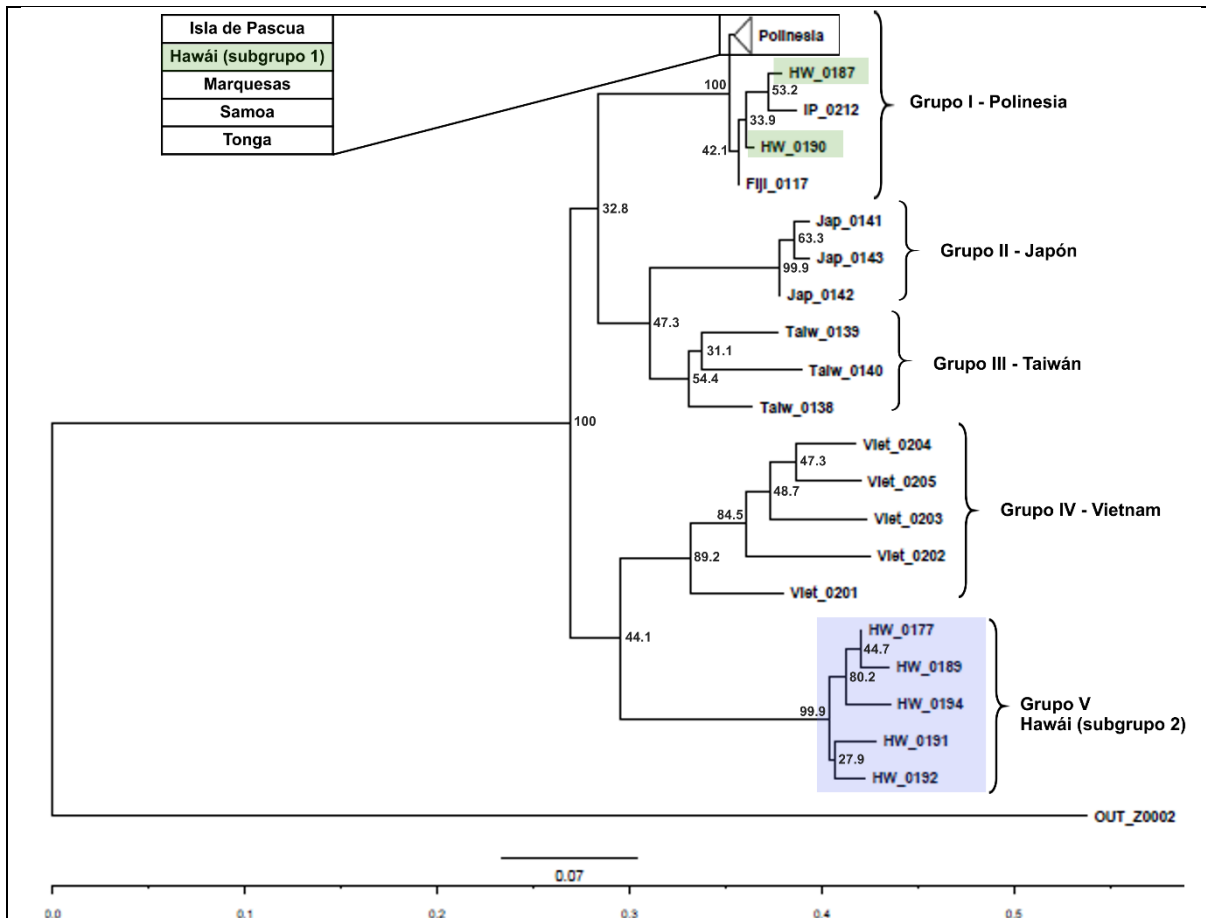
Con la matriz de datos se determinó la relación presente entre individuos por medio de un dendrograma, utilizando el programa estadístico Splitstree4 versión 4.13 (Huson y Bryant, 2006). En este análisis, no se consideraron los individuos de *B. papyrifera* provenientes de Santiago al no contar con información precisa respecto a su posible origen geográfico que se presume asiático.

El método de agrupamiento *neighbor-joining* (NJ) generó un árbol de distancias con 5 grupos principales. El Grupo I incluyó muestras polinésicas provenientes de Isla de Pascua, Marquesas, Samoa, Tonga y Fiyi, además de un subgrupo de muestras de Hawái (Hawái subgrupo 1). El Grupo II y Grupo III, conformado por muestras de Japón y Taiwán respectivamente, presentaron una distribución más próxima a la rama polinésica. Por otra parte, las muestras de Vietnam (Grupo IV) y el segundo subgrupo de muestras de Hawái (Grupo V) se distanciaron de las poblaciones de Japón y Taiwán, y además fueron las más distantes del grupo polinésico.

En el caso de las muestras de Hawái, éstas presentaron una distribución en dos subgrupos altamente disímiles entre ellos. El subgrupo 1 se presentó dentro del grupo de muestras polinésicas, no pudiéndose observar diferencias entre éstas y el resto de poblaciones de esta localidad. Por otro lado, el subgrupo 2 se organizó en una rama opuesta a Polinesia, más cercana a las poblaciones asiáticas de Vietnam (Figura 11).

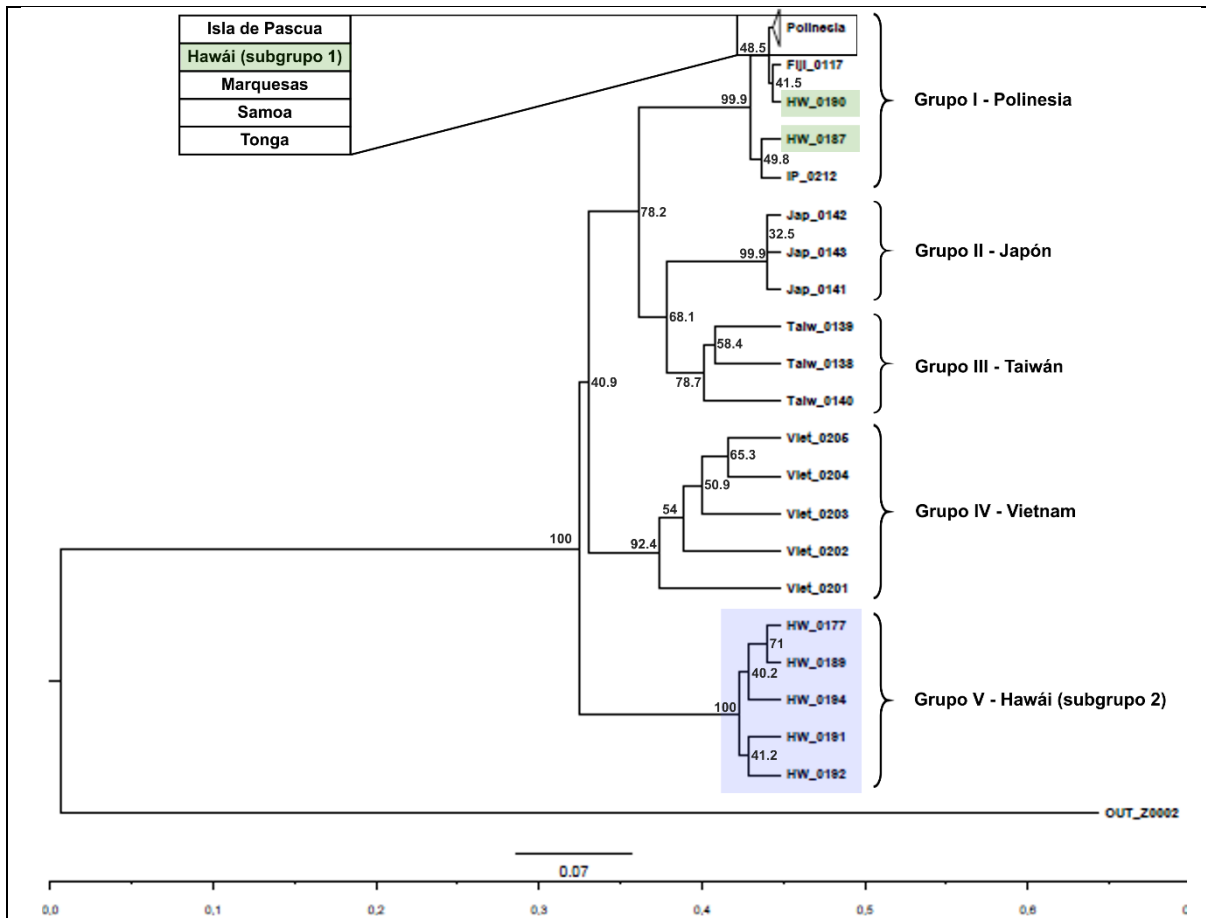
En el dendrograma generado a partir de *neighbor-joining* se logró discriminar las poblaciones asiáticas, separando los individuos de Japón, Taiwán y Vietnam en 3 ramas distintas. En el caso de Polinesia, no fue posible observar diferencias entre las poblaciones de

Isla de Pascua, Marquesas, Samoa y Tonga además de una parte de las muestras de Hawái, sin embargo la muestra de Fiyi pudo ser separada del resto de muestras polinésicas, permaneciendo dentro del grupo polinésico (Grupo I).



**Figura 11: Dendrograma utilizando el algoritmo de agrupamiento *neighbor-joining*.** Coeficiente de similitud de Dice, utilizando un *bootstrap* de 10.000 permutaciones. OUT\_Z0002: *Outgroup, Broussonetia kazinoki*.

El algoritmo de agrupamiento UPGMA confirmó la presencia de 5 grupos principales y la subdivisión de Hawái en dos grupos distintos. En este caso el grupo de muestras de Vietnam (Grupo IV) se distribuyó más cercano a Polinesia, distanciándose del segundo subgrupo de muestras de Hawái (Grupo V) (Figura 12). El detalle de las muestras que se incluyen en la rama Polinesia se señalan en la sección Anexos.



**Figura 12: Dendrograma utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA.**

Índice de similitud de Dice, utilizando un *bootstrap* de 10.000 permutaciones.

OUT\_Z0002: *Outgroup, Broussonetia kazinoki*.

### Prueba de Mantel

Mediante la prueba de Mantel se pudo analizar si la diversidad genética de 9 poblaciones de *B. papyrifera* en Asia y Polinesia presentaba una correlación con la distribución geográfica de cada una de ellas. Para este análisis se consideraron 3 poblaciones de Asia: Japón, Taiwán y Vietnam; y 6 poblaciones de Polinesia: Isla de Pascua, Fiyi, Hawái, Marquesas, Samoa y Tonga. En base a matriz de datos de presencia/ausencia de bandas se generó una matriz de distancia genética calculada a partir del índice de Nei sin sesgo (1978) (Tabla 8), y con la información geográfica disponible en el sistema de coordenadas latitud-longitud para cada población, se calculó una matriz de distancia (Tabla 9).

Con estos datos fue posible comparar las matrices de distancia genética y geográfica para observar si existía alguna relación entre estas variables. Para la prueba de Mantel se efectuaron dos análisis distintos, en un primer caso observando la posible correlación al

interior de las regiones de Asia y Polinesia y luego efectuando el análisis en el contexto global de Asia-Polinesia.

**Tabla 8: Matriz pareada de Distancia Genética entre 9 poblaciones de Asia y Polinesia.**

	Fiyi	Hawái	Isla de Pascua	Japón	Marquesas	Samoa	Taiwán	Tonga	Vietnam
Fiyi	0,0000								
Hawái	0,0507	0,0000							
isla de Pascua	0,0075	0,0450	0,0000						
Japón	0,1744	0,1267	0,1673	0,0000					
Marquesas	0,0071	0,0448	0,0006	0,1661	0,0000				
Samoa	0,0071	0,0448	0,0006	0,1661	0,0000	0,0000			
Taiwán	0,1329	0,1058	0,1288	0,1017	0,1277	0,1277	0,0000		
Tonga	0,0071	0,0448	0,0006	0,1661	0,0000	0,0000	0,1277	0,0000	
Vietnam	0,1929	0,1445	0,1821	0,1905	0,1839	0,1839	0,1950	0,1839	0,0000

La Distancia Genética es expresada mediante el coeficiente de Nei sin sesgo, 1978.

**Tabla 9: Matriz pareada de Distancia Geográfica entre 9 poblaciones de Asia y Polinesia.**

	Fiyi	Hawái	Isla de Pascua	Japón	Marquesas	Samoa	Taiwán	Tonga	Vietnam
Fiyi	0,000								
Hawái	5037,34	0,000							
isla de Pascua	7380,79	7207,22	0,000						
Japón	7246,90	6487,25	13524,80	0,000					
Marquesas	4637,72	3668,38	3731,50	9793,52	0,000				
Samoa	1109,35	4093,89	6670,78	7444,72	3608,13	0,000			
Taiwán	7802,36	8380,72	14952,36	2093,30	11331,91	8342,56	0,000		
Tonga	4260,59	3045,76	9679,60	3856,13	5950,91	3983,08	5476,35	0,000	
Vietnam	9026,99	10052,83	16389,70	3665,24	12926,74	9721,72	1673,98	7140,85	0,000

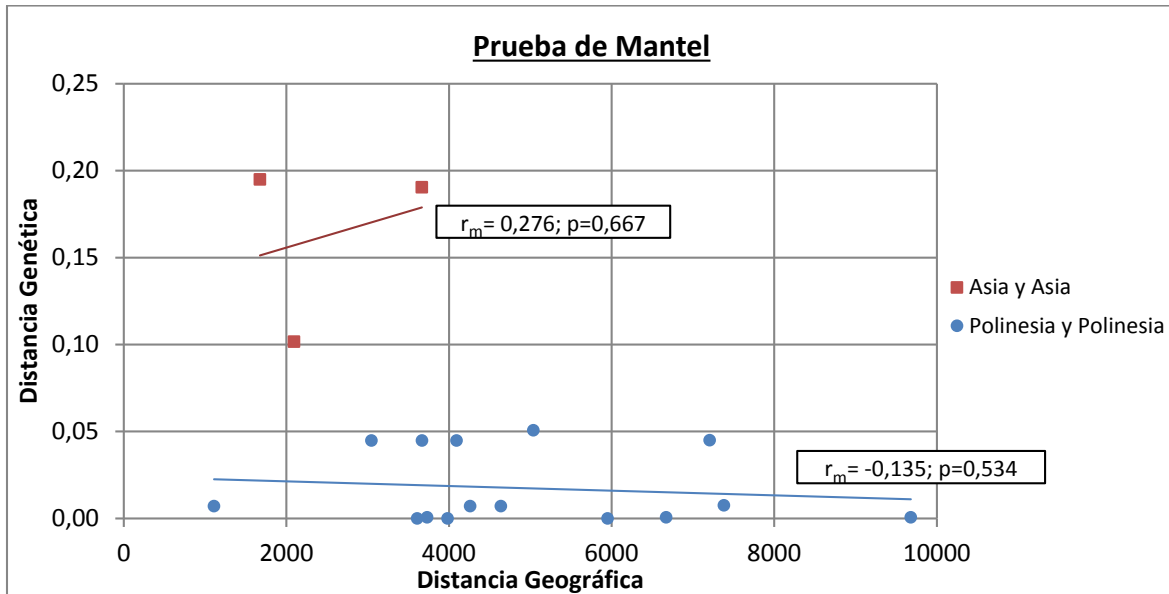
La Distancia Geográfica es expresada en kilómetros.

En la Figura 14 se presentan los resultados al analizar Asia y Polinesia por separado, y en la Figura 15 se presenta la correlación considerando el total de poblaciones de Asia-Polinesia. La población de Santiago no fue considerada en este análisis, al no contar con información precisa respecto a su posible origen, evitando así cualquier interpretación errónea de las distancias geográficas.

La prueba de Mantel para el análisis por separado de las zonas de Asia y Polinesia no mostró una relación entre las matrices de distancia genética y geográfica al interior de cada región, con valores de correlación no significativos para Asia ( $r_m=0,276$  y  $p=0,667$ ) y Polinesia ( $r_m=-0,135$  y  $p=0,534$ ), lo cual sugiere que el espacio geográfico al interior de Asia y en Polinesia no es un factor que se relacione con la diversidad genética presente en cada una de estas zonas (Figura 13).

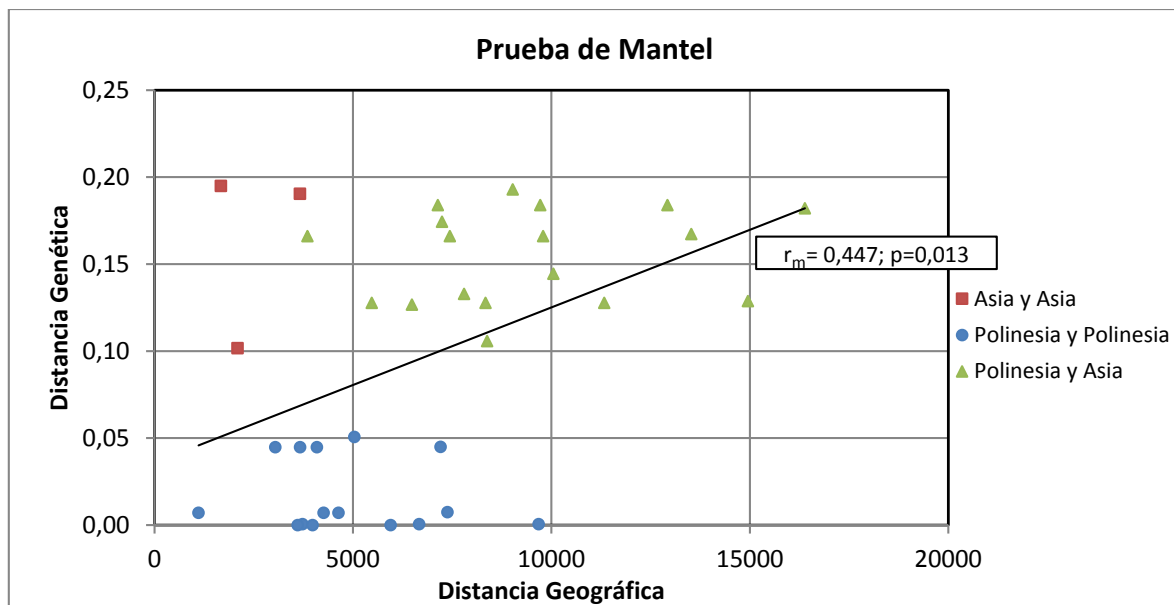
Por otra parte, el contexto Asia-Polinesia analizado de forma global presentó una correlación significativa entre las matrices de distancia genética y la distancia geográfica ( $r_m=0,447$ ;  $p=0,013$ ), lo cual indica que la distancia geográfica contribuye a la presencia de

diversidad genética cuando se amplía el rango de espacio geográfico entre Asia y Polinesia (Figura 14).



**Figura 13: Correlación observada entre las distancias geográfica y genética dentro de Asia y dentro de Polinesia, mediante la prueba de Mantel.**

Localidades polinésicas: Fiyi, Hawái, isla de Pascua, Marquesas, Samoa y Tonga.  
Localidades asiáticas: Japón, Taiwán y Vietnam.



**Figura 14: Correlación observada entre las distancias geográfica y genética de todas las localidades de Asia y Polinesia, mediante la prueba de Mantel.**

Localidades polinésicas: Fiyi, Hawái, isla de Pascua, Marquesas, Samoa y Tonga.  
Localidades asiáticas: Japón, Taiwán y Vietnam.

## Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Para el Análisis de Varianza Molecular se utilizó una matriz de distancia generada a partir de los 142 bandas detectadas para 5 localidades de la Polinesia: isla de Pascua (32 individuos), Marquesas (3 individuos), Hawái (13 individuos), Samoa (5 individuos) y Tonga (14 individuos). Los resultados de este análisis mostraron una mayor variación genética dentro de las poblaciones, con un 71 %, en comparación a la observada entre poblaciones, la cual fue de un 29 %. En este caso, ambos resultados fueron significativos ( $p=0,006$ ). En la Tabla 10 se presenta un resumen del análisis de AMOVA para las 5 poblaciones.

**Tabla 10: AMOVA incluyendo 5 localidades de Polinesia.**

Fuente de variación	GI	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrados medios (MS)	F	R2	P
<b>Población</b>	4	0,36835	0,092088	6,3871	0,29182	0,006
<b>Residuales</b>	62	0,89390	0,014418		0,70818	
<b>Total</b>	66	1,26225			1,00000	

Para este análisis se consideraron las localidades de isla de Pascua, Marquesas, Hawái, Tonga y Vietnam. El análisis de AMOVA se realizó a partir de una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Dice. Análisis generado con 1.000 permutaciones.

Al analizar los niveles medios de diversidad genética para las 5 localidades polinésicas, se observa que Hawái fue la población que presentó una mayor diversidad (Tabla 11).

**Tabla 11: Promedio de diversidad genética y número de muestras por grupo para 5 localidades de Polinesia.**

Poblaciones	Hawái	Isla de Pascua	Marquesas	Samoa	Tonga
<b>Delta</b>	0,3147	0,02804	0	0	0
<b>n</b>	13	32	3	5	14

Al analizar el grupo de muestras polinésicas, excluyendo la población de Hawái, se observó que los individuos presentaron una diversidad genética similar entre islas; sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos ( $p=0,901$ ). Los resultados se presentan en la Tabla 12.

**Tabla 12: AMOVA incluyendo 4 localidades de Polinesia y excluyendo la población de Hawái.**

Fuente de variación	GI	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrados medios (MS)	F	R2	P
<b>Población</b>	3	0,001004	0,00033477	0,2782	0,01642	0,901
<b>Residuales</b>	50	0,060169	0,00120337		0,98358	
<b>Total</b>	53	0,061173			1,00000	

Para este análisis se consideraron las localidades de isla de Pascua, Marquesas, Tonga y Vietnam; excluyendo la población de Hawái. El análisis de AMOVA se realizó a partir de una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Dice. Análisis generado con 1.000 permutaciones.

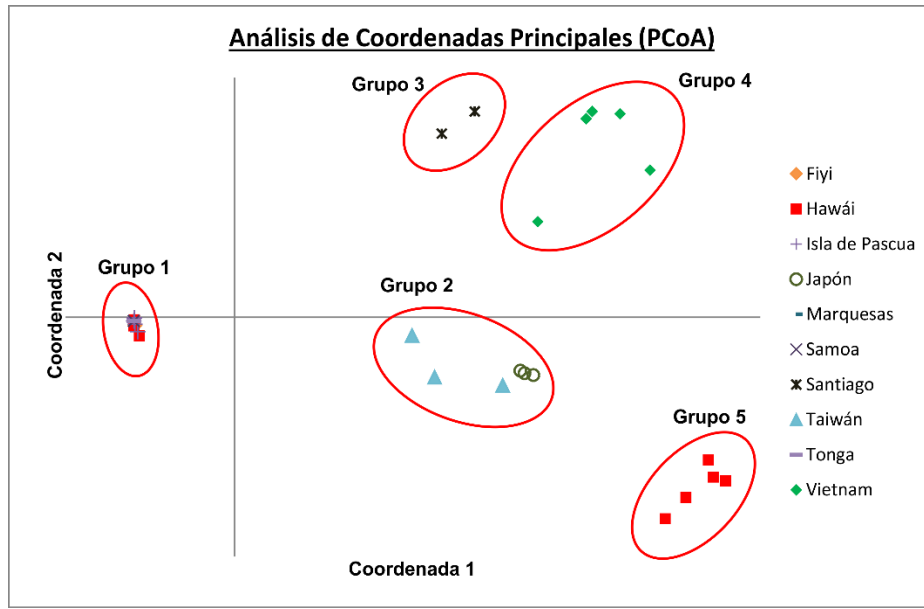


## **Análisis de coordenadas principales (PCoA)**

Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con la finalidad de observar la distribución y ordenación de los individuos sobre un sistema de ejes multidimensional (Jackson *et al.*, 1989). Para este análisis se incluyeron muestras de *B. papyrifera* de 3 localidades de Asia y 9 localidades de Polinesia, junto con 3 muestras provenientes de Santiago.

El total de 82 muestras presentó una distribución en cinco grupos principales (Figura 16). La distribución de las muestras de Polinesia (**Grupo 1**) se presentó de forma uniforme, distante de las muestras provenientes de Taiwán y Japón (**Grupo 2**), Santiago (**Grupo 3**), Vietnam (**Grupo 4**) y un subgrupo de muestras de Hawái (**Grupo 5**). Las muestras asiáticas se agruparon en dos grandes zonas (ver **Grupo 2** y **Grupo 4**), diferenciándose la población de Vietnam de las muestras provenientes de Taiwán y Japón. El grupo de muestras de Hawái presentó dos grupos claramente distinguibles, con un primer subgrupo de individuos distribuidos dentro de las muestras de Polinesia (**Grupo 1**) y otra población de muestras incluidas en un segundo subgrupo, distinta a todos los demás individuos analizados en este trabajo (**Grupo 5**).

Cada coordenada logró determinar en gran medida las diferencias entre las muestras, explicándose un 45,54% de la variación genética a través de la coordenada X, un 14,51% por medio de la coordenada Y, y un 12 % mediante la coordenada Z. De esta forma, el 60,05% del total de la variación genética observada pudo ser resuelta por medio de un sistema de coordenadas bidimensional tal como se muestra en la Figura 15.



Ejes	1	2	3
Porcentaje	45,5	14,5	12,0
Porcentaje acumulado	45,5	60,0	72,0

**Figura 15: Análisis de coordenadas principales (PCoA) para 83 individuos muestrados.**  
 En el cuadro se presenta el porcentaje de variación explicado mediante las tres primeras coordenadas.

## **Discusión**

### **Montaje de la técnica ISSR**

La técnica molecular ISSR se caracteriza por generar un patrón de fragmentos de distinto tamaño molecular amplificando múltiples *loci* en el genoma. Por esta razón se hace necesario optimizar el método en una serie de pasos previos tales como la obtención del material genómico íntegro, la obtención de un patrón de bandas de buena calidad y luego disponer de un método que permita registrar la presencia de bandas de forma inequívoca.

El protocolo de extracción de DNA de *B. papyrifera* mostró buenos resultados con respecto a la integridad del material genómico, lo cual fue corroborado mediante la presencia de una banda uniforme en la mayoría de las muestras. Además el promedio de las razones de absorbancia 260/280 se encontró en el rango óptimo esperado aunque con valores muy cercanos a 2,0, lo cual se explicaría debido a la presencia de RNA en las muestras. Si bien el protocolo de extracción de material genómico utilizado en este trabajo contempló una etapa de remoción de RNA por medio de incubación con RNasa, este paso no sería suficiente para remover totalmente estos ácidos nucleicos.

### **Optimización de la técnica ISSR**

La metodología experimental utilizada en este trabajo se diseñó en base a los métodos de optimización de Taguchi, los cuales buscan obtener las condiciones óptimas de recursos que permitan entregar la mayor cantidad de información para un proceso en particular (Cobb y Clarkson, 1994). Si bien esta metodología se dirige principalmente al sector industrial, su implementación no es excluyente de otras áreas que requieran optimizar recursos y tiempo.

Para este trabajo fue necesario establecer las concentraciones óptimas de reactivos para la reacción de ISSR-PCR, debido a que cada perfil de amplificación debía facultar el registro de bandas según su presencia o ausencia. El diseño experimental de Taguchi permitió adaptar un protocolo de reacción de ISSR-PCR más flexible en comparación a los diseños experimentales clásicos, analizando cinco factores a cuatro concentraciones distintas en cada uno de los casos. Este enfoque limitó los 1024 posibles experimentos generados por permutación de una variable a la vez, a tan sólo 16 combinaciones distintas de reactivos. De esta forma, el diseño experimental de Taguchi fue un factor clave en definir un método de bajo costo y factible de realizar en un tiempo acotado.

En base a los antecedentes presentados por Ho y Chang (2006) se seleccionó un conjunto inicial de 12 partidores ISSR, debido a que estos presentaron buenos resultados amplificando DNA de muestras de *B. papyrifera*. Para el registro de cada perfil genético se utilizó un criterio de asignación de bandas conservador, registrando sólo aquellas que fuesen

claramente distinguibles y cuya presencia no presentase incertidumbre. Por esta razón se definió un área de análisis considerando sólo los fragmentos con un tamaño molecular menor a los 2,0 kb y mayor a los 0,5 kb.

### **Validación de la técnica ISSR**

La técnica ISSR ha demostrado ser una metodología eficiente y capaz de generar perfiles consistentes en distintos eventos de experimentación (Bornet y Branchard, 2001). Sin embargo, en este trabajo se decidió implementar una estrategia de validación, con el fin de garantizar que cada perfil genómico mostrase un alto grado de confiabilidad.

El marcador molecular ISSR requiere de material genómico íntegro; sin embargo, el número de hojas recolectadas por localidad se presentaba como una fuente limitada de DNA. Al implementar una validación previa a cada partidor y no dirigida a cada experimento, se pudo reducir la cantidad de muestras, reactivos, equipamiento y tiempo necesarios para comprobar la consistencia de los amplificados, a diferencia de la inversión de recursos que hubiese sido necesaria para efectuar cada experimento en duplicado o triplicado. Para ambos tipos de controles, la validación biológica y técnica del conjunto completo de partidores fue satisfactoria al obtener perfiles de bandas consistentes y reproducibles, lo que finalmente ratificó la conservación de los perfiles genómicos en ensayos de amplificación diferentes.

### **Análisis de bandas**

El promedio de bandas registradas por partidor fue más del doble de la media informada en el trabajo de Ho y Chang (2006) con un promedio de 16 fragmentos, a diferencia de la media de 7 fragmentos reportados anteriormente (Ho y Chang, 2006). En cuanto al set de partidores, el grupo con anclaje en el extremo 5' fue el más informativo, al establecer una media por sobre las 20 bandas, de las cuales un 65% fueron polimórficas.

De los tres partidores sin anclaje, uno presentó patrones de bandas apropiados para el registro de presencia-ausencia y dos presentaron patrones difusos y de difícil registro de bandas, no cumpliendo con el criterio de calidad establecido inicialmente. Debido a esto, ambos partidores fueron excluidos de los análisis posteriores, con el fin de evitar posibles asignaciones incorrectas. Es habitual que este grupo de partidores sin anclaje presente perfiles conformados por bandas menos definidas que los partidores con anclaje 5' o 3' (Reddy *et al.*, 2002). Esto se debe principalmente a que su estructura puede deslizarse dentro de un microsatélite, a diferencia de los que presentan un par de bases que impiden el apareamiento en zonas entre repeticiones (Reddy *et al.*, 2002).

En relación a los partidores con anclaje en el extremo 3', los datos generados por los partidores UBC842 y UBC857 fueron excluidos de los análisis debido a que un gran número de muestras presentaron patrones de bandas ambiguos, en donde no fue posible distinguir la presencia o ausencia de los fragmentos generados. Este problema probablemente hubiese sido corregido optimizando los parámetros de forma particular para ambos partidores o implementando métodos de detección con un mayor poder resolutivo como electroforesis capilar o tinción con plata en geles de poliacrilamida (Benbouza *et al.*, 2006, Reddy *et al.*, 2002, Wenz *et al.*, 1998); sin embargo, los costos de tiempo y recursos asociados a montar una nueva técnica en este trabajo hicieron descartar estas alternativas.

### **Análisis de distribución de poblaciones**

En su hábitat nativo, la propagación de la morera de papel mediante reproducción sexual ha permitido que la evolución de esta planta en Asia sea llevada a cabo sin grandes limitaciones. Por otro lado, su propagación en Polinesia se ha visto influenciado por los eventos de transporte antrópico llevados a cabo durante la colonización de las islas del Pacífico (Seelenfreund *et al.*, 2011).

Al seguir un curso evolutivo normal en su lugar de origen, las distintas poblaciones de *B. papyrifera* se han ido adaptando a su entorno y se han diferenciado según las variables del paisaje, tales como la geografía y el ambiente (Storfer *et al.*, 2010). Sin embargo, en Polinesia el flujo génico entre poblaciones se ha visto limitado por la gran separación geográfica presente entre islas.

El hecho de presentarse una gran separación entre dos o más poblaciones limita el flujo génico continuo entre éstas causando que la distancia genética entre ellas aumente (Slatkin, 1985). Además la introducción de una especie vegetal catalogada como invasiva, tal como la morera de papel, genera cambios evolutivos más rápidos en su nuevo hábitat a causa de ser liberados de sus competencias naturales y la necesidad de adaptarse rápidamente en su entorno (Bossdorf *et al.*, 2005). Por lo tanto, se espera que dos poblaciones propagadas de forma separada sean muy disímiles entre sí.

Al contrario de lo esperado, la distancia geográfica al interior de Asia y dentro de Polinesia no fue un factor responsable en el origen de diferenciación genética tal como se observa en los resultados entregados por la prueba de Mantel. El análisis de Asia y Polinesia por separado no entregó valores significativos (ambos casos con un  $p > 0,05$ ) al correlacionar la distancia geográfica con la distancia genética entre las poblaciones de ambas regiones.

Para el caso de Asia, el hecho de presentarse un flujo génico continuo a través de la reproducción sexual reduciría la distancia genética entre poblaciones asiáticas y este evento

no sería limitado en gran medida por la distancia geográfica presente entre ellas. Por otra parte, en las islas de Polinesia, la propagación de esta planta por vía antrópica y la reproducción vegetativa mediante esquejes sin la presencia de semillas y polen (Seelenfreund *et al.*, 2010) restringiría el flujo génico entre poblaciones impidiendo la especiación alopátrica.

Al analizar el contexto Asia-Polinesia en su conjunto, los datos aportados por la prueba de Mantel mostraron una correlación entre las variables de distancia geográfica y genética para el total de poblaciones ( $r_m=0,447$ ;  $p=0,013$ ). En este caso, la distancia geográfica existente entre las regiones de Asia y Polinesia ha diferenciado a los individuos en dos grupos distintos según su procedencia, datos soportados por los análisis de agrupamiento que logran distinguir las poblaciones provenientes de Asia de las localidades polinésicas.

En el contexto polinésico, el análisis de AMOVA permitió determinar que la mayor fuente de diversidad genética provenía del interior de cada localidad, más que de la variabilidad entre poblaciones. Este hecho se explicaría por la poca diversidad genética presente en el sector polinésico, tal como lo demuestran los análisis de agrupamiento y distribución. Por otro lado, el nivel de significancia menor a 0,05 permitió rechazar el hecho de que la diversidad genética de *B. papyrifera* es similar entre localidades y confirmar la posibilidad de que al menos una de las islas fuese distinta genéticamente al resto de las poblaciones ( $p<0.05$ ). En el grupo de islas polinésicas, Hawái presentó el mayor nivel de diversidad genética, lo cual reafirmaría la posibilidad de que en esta localidad existieron al menos dos eventos de flujo génico distintos.

Considerando lo anterior, fue esperable que al analizar las poblaciones de Polinesia excluyendo los individuos de Hawái, existiera una disminución de la diversidad entre islas, lo cual quedó demostrado con la segunda prueba de AMOVA. En este caso, el nivel de significancia mayor a 0.05 ( $p=0,901$ ) permitió aceptar que la homogeneidad de *B. papyrifera* en Polinesia, a excepción de Hawái, no es suficiente como para establecer diferencias entre las localidades de Isla de Pascua, Samoa, Tonga y Marquesas.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) permitió confirmar el patrón de agrupamiento obtenido previamente mediante UPGMA y *neighbor-joining*. En el caso de las muestras asiáticas, fue posible discriminar entre las 3 poblaciones analizadas. En Polinesia no fue posible diferenciar las localidades de distintas islas, aun cuando el sistema de ejes bidimensional logró explicar el 60% de la variación. Considerando lo anterior, se desprende que el marcador molecular ISSR discrimina las poblaciones asiáticas entre sí y las diferencia de los individuos polinésicos; sin embargo, la variación genética detectada mediante ISSR entre las localidades polinésicas no es suficiente como para diferenciarse mediante este marcador molecular.

En este análisis se incluyeron 3 muestras de Santiago, de las cuales solo existen vagos antecedentes acerca de su posible introducción desde Europa durante el siglo XIX (Piña, 2010). La distribución espacial de estos individuos mediante PCoA mostró un agrupamiento distinto al resto de muestras de Asia y Polinesia, descartando a Taiwán, Japón y Vietnam como su posible lugar de origen. Los antecedentes entregados por este análisis permiten descartar las localidades asiáticas incluidas en este trabajo como un posible lugar de origen de estos ejemplares.

### **La subdivisión de Hawái**

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, la población de Hawái evidencia al menos dos eventos distintos de flujo genético. El hecho de presentar al menos dos fuentes de flujo genético distinto es respaldado por los análisis de agrupamiento de poblaciones junto con los de distribución espacial de las localidades en un contexto global de Asia Polinesia.

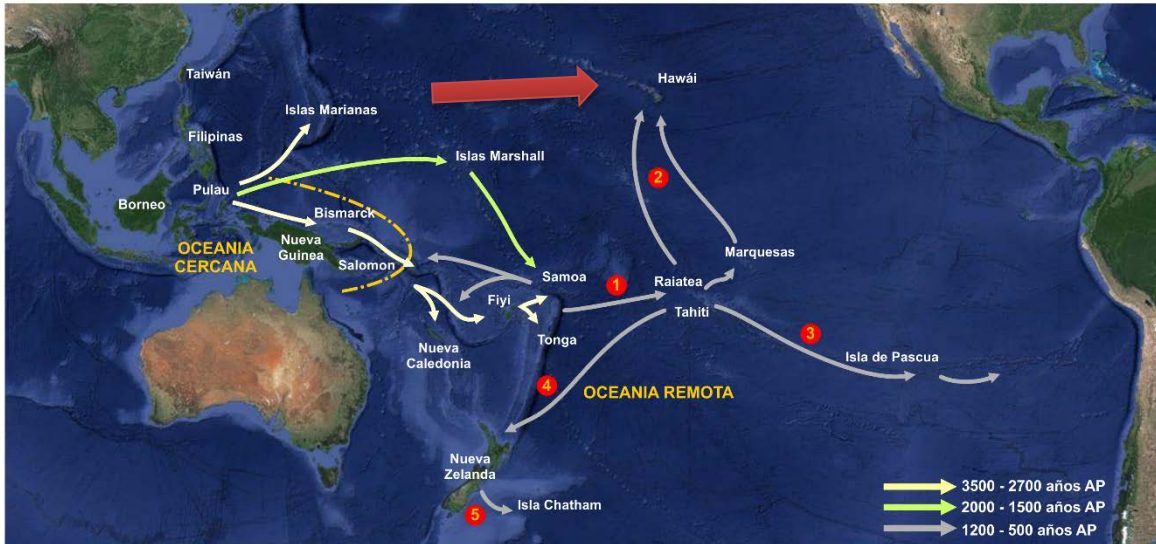
Existen antecedentes aún no comprobados y controversiales que presentan las posibles travesías de navegantes Chinos en épocas precolombinas hasta llegar a América. Esta posibilidad podría señalar a Hawái como un posible lugar de contacto; sin embargo, no existe mucha evidencia que sustente esta propuesta (Finlay, 2004).

La introducción de poblaciones asiáticas en Hawái en tiempos modernos tuvo su apogeo a fines del siglo XIX, principalmente de pueblos provenientes de China con motivos de trabajo en las plantaciones de azúcar (McKeown, 2001, Rowland, 1933). Estas introducciones podrían explicar la variabilidad observada, aunque tampoco esta posibilidad ha sido comprobada.

La migración es un evento capaz de generar diversidad genética en una determinada localidad; sin embargo, no es el único mecanismo por el cual se puede generar flujo génico (Slatkin, 1985). Otras de las causas que podrían explicar la mayor diversidad genética en Hawái sería debido a la presencia de individuos masculinos y femeninos (Peñailillo, 2013). Este hecho sugiere una mayor diversidad genética aportada por individuos masculinos de un origen distinto y además a la posibilidad de presentarse reproducción sexual en esta localidad; sin embargo, el patrón de agrupamiento dispuesto en dos subgrupos, con individuos dentro de Polinesia y otro distante al resto de poblaciones, no se correspondería con la diversidad genética esperada para esta situación.

En este trabajo se plantea la posibilidad de una introducción de morera de papel en Hawái desde Asia por poblaciones distintas a las de habla austronésica que dieron lugar a la cultura polinésica. Este evento sería de gran importancia para esclarecer las posibles rutas de migración del hombre en Polinesia. Aun cuando los datos obtenidos revelan un segundo

subgrupo de Hawái emparentado con Asia, las muestras disponibles no permiten esclarecer el origen que generaría este perfil genético en esta localidad. En la Figura 16 se plantea un posible modelo que abre la posibilidad de una vía completamente original en la ruta de migración, lo cual complementaría los modelos ya reportados.



**Figura 16: Modelo de migración planteado en Addison y Matisoo-Smith, complementado con un posible flujo de migración proveniente de Asia en la localidad de Hawái.** La flecha roja señala la alternativa de la migración asiática.

### Proyecciones del modelo de la morera de papel

La estrecha relación que existe entre *B. papyrifera* y los pueblos polinésicos permite asociar los patrones moleculares a cómo el hombre introdujo la morera de papel en su entorno. De este modo la presencia de patrones genéticos homogéneos de *B. papyrifera* podría indicar una única introducción o múltiples introducciones de un mismo material genético en eventos distintos.

Por otra parte, la identificación de diferentes genotipos permitiría establecer la presencia de al menos dos o más eventos generadores de diversidad genética, los cuales pueden ser explicados por distintos movimientos migratorios o la introducción de material genético heterogéneo, sin descartarse otras posibilidades generadoras de un flujo génico. La caracterización y distinción de cada isla del contexto Asia-Polinesia mediante su perfil genético demostró ser de gran utilidad para establecer las posibles alternativas de establecimiento de *B. papyrifera* en el Pacífico.

Es así como *B. papyrifera* se presenta como un modelo atractivo para probar los distintos modelos arqueológicos de expansión en Oceanía mediante técnicas de biología



molecular, de esta forma la “arqueología molecular” surge como una rama capaz de resolver el último gran evento migratorio llevado a cabo por las poblaciones humanas.

## Conclusiones

- Se logró obtener DNA genómico íntegro de 92 muestras de *B. papyrifera* provenientes de 3 poblaciones de Asia, 6 localidades de Oceanía remota y 1 muestra obtenida en territorio chileno continental.
- Se montó y optimizó la técnica ISSR-PCR en el laboratorio, permitiendo la caracterización de 82 individuos de *B. papyrifera* provenientes de las poblaciones señaladas.
- El marcador molecular ISSR diferenció entre las poblaciones de Japón, Taiwán, Vietnam, y a su vez éstas de las muestras de Oceanía remota. No se discriminó entre las muestras de las distintas islas de Polinesia, a excepción de Hawái.
- Las muestras de Hawái mostraron dos grupos. Un primer grupo presentó características compartidas con las demás muestras polinésicas y un segundo grupo presentó características similares a las poblaciones asiáticas.
- Se observó una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica en las poblaciones para el contexto global de Asia-Polinesia. Sin embargo, esta correlación no fue observada al analizar las localidades de Asia y Polinesia por separado.
- La presencia de dos perfiles diferentes de amplificación en la población de Hawái, permite establecer al menos dos eventos distintos de flujo génico, Lo cual se podría explicar por la introducción de *B. papyrifera* proveniente de al menos dos orígenes distintos.

## Referencias

- Barker, C. (2002) Plate 432. *Broussonetia papyrifera*, *Curtis's Botanical Magazine* 19(1): 8 - 18.
- Benbouza, H., Jacquemin, J.-M., Baudoin, J.-P. y Mergeai, G. (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels., *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 10(2): 77 - 81.
- Bornet, B. y Branchard, M. (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting, *Plant Molecular Biology Reporter* 19(3): 209-215.
- Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L., Rogers, W. E., Siemann, E. y Prati, D. (2005) Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations, *Oecologia* 144(1): 1-11.
- Brunk, C. F. y Simpson, L. (1977) Comparison of various ultraviolet sources for fluorescent detection of ethidium bromide-DNA complexes in polyacrylamide gels, *Analytical Biochemistry* 82(2): 455-462.
- Burke, J. F. (1998) Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification, En *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, pp 1987-1988, Elsevier, Oxford.
- Caillon, S., Quero-Garcia, J., Lescure, J. P. y 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.
- Cobb, B. D. y Clarkson, J. M. (1994) A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods, *Nucleic Acids Res* 22(18): 3801-3805.
- Dice, L. R. (1945) Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species, *Ecology* 26(3): 297-302.
- Feldheim, K. A. (2013) Microsatellite, En *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, pp 412-413, Academic Press, San Diego.
- Finlay, R. (2004) How not to (re) write world history: Gavin Menzies and the Chinese discovery of America, *Journal of World History* 15(2): 229-242.
- Francis, J. K. (2004) TROPICAL ECOSYSTEMS | *Ficus* spp. (and other important Moraceae), En *Encyclopedia of Forest Sciences*, pp 1699-1704, Elsevier, Oxford.
- Green, R. C. (1991) Near and remote Oceania: disestablishing "Melanesia" in culture history, *Man and a half: essays in Pacific anthropology and ethnobiology in honour of Ralph Bulmer* 491-502.
- Ho, K.-Y. y Chang, J.-F. (2006) Relationship between Population Genetic Structure and Riparian Habitats of *Broussonetia papyrifera* Vent. On the Western Taiwan, *Bioresources and Agriculture of National Taiwan University Experimental Forest* 20(3): 165-174.
- Holderegger, R., Buehler, D., Gugerli, F. y Manel, S. (2010) Landscape genetics of plants, *Trends in Plant Science* 15(12): 675-683.
- Hunter, R. L. y Markert, C. L. (1957) Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels, *Science* 125(3261): 1294-1295.
- Huson, D. H. y Bryant, D. (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Molecular biology and evolution* 23(2): 254-267.
- Jackson, D. A., Somers, K. M. y Harvey, H. H. (1989) Similarity coefficients: measures of co-occurrence and association or simply measures of occurrence?, *American Naturalist* 436-453.
- Kayser, M. (2010) The Human Genetic History of Oceania: Near and Remote Views of Dispersal, *Current Biology* 20(4): R194-R201.

- Kayser, M., Brauer, S., Cordaux, R., Casto, A., Lao, O., Zhivotovsky, L. A., Moise-Faurie, C., Rutledge, R. B., Schiefenhoevel, W., Gil, D., Lin, A. A., Underhill, P. A., Oefner, P. J., Trent, R. J. y 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.
- Kirch, P. (2000) *On the road of the winds: an archaeological history of the Pacific Islands before European contact*, University of California Press, Berkeley, CA.
- Kirch, P. y Kahn, J. (2007) Advances in Polynesian Prehistory: A Review and Assessment of the Past Decade (1993–2004), *Journal of Archaeological Research* 15(3): 191-238.
- Kirch, P. V. (2010) Peopling of the Pacific: A holistic anthropological perspective, *Annual Review of Anthropology* 39:131-148.
- Kirch, P. V. (2012) *A Shark Going Inland is My Chief: The Island Civilization of Ancient Hawai'i*, University of California Press.
- Kirch, P. V. y Weisler, M. I. (1994) Archaeology in the Pacific Islands: An appraisal of recent research, *Journal of Archaeological Research* 2(4): 285-328.
- Kitching, I. J., Forey, P. L. y Williams, D. M. (2001) Cladistics, En *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*, pp 33-45, Academic Press, Waltham.
- Knapp, M., Horsburgh, K. A., Prost, S., Stanton, J.-A., Buckley, H. R., Walter, R. K. y Matisoo-Smith, E. A. (2012) Complete mitochondrial DNA genome sequences from the first New Zealanders, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*.
- Koebner, R. M. D. (2003) CROP IMPROVEMENT | Molecular Markers, En *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, pp 140-146, Elsevier, Oxford.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D. y Pandey, B. (2009) Potential of molecular markers in plant biotechnology, *Plant Omics Journal* 2(4): 141-162.
- Legendre, P. y Legendre, L. (2012) Ecological resemblance, En *Developments in Environmental Modelling*, pp 265-335, Elsevier.
- Lin, Y., Fuping, L., Shanshan, L., Xiao, W., Ruixuan, Z., Ziqin, L. y Hui, Z. (2012) ISSR analysis of *Fusarium oxysporum* Schl. in Hebei province, *Procedia Environmental Sciences* 12, Part B(0): 1237-1242.
- Lobos, S. y Seelenfreund, D. (1998) *Técnicas experimentales en genética molecular*, Cuarta ed.
- Lodhi, M., Ye, G.-N., Weeden, N. y Reisch, B. (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*., *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-13.
- Lum, J. K. y Cann, R. L. (2000) mtDNA lineage analyses: Origins and migrations of Micronesians and Polynesians, *American Journal of Physical Anthropology* 113(2): 151-168.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G. y Taberlet, P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics, *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* 18(4): 189-197.
- Matisoo-Smith, E. y 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 (PNAS)* 101(24): 9167-9172.
- McKeown, A. (2001) *Chinese Migrant Networks and Cultural Change: Peru, Chicago, and Hawaii 1900-1936*, University of Chicago Press.
- Meyer, A. d. S., Garcia, A. A. F., Souza, A. P. d. y Souza Jr., C. L. d. (2004) Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.), *Genetics and Molecular Biology* 27:83-91.

- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T. G., Yano, M., Bhatia, C. R. y Sasaki, T. (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants, *Molecular Breeding* 3(2): 87-103.
- Moodley, Y., Linz, B., Yamaoka, Y., Windsor, H. M., Breurec, S., Wu, J.-Y., Maady, A., Bernhöft, S., Thiberge, J.-M., Phuanukoonnon, S., Jobb, G., Siba, P., Graham, D. Y., Marshall, B. J. y Achtman, M. (2009) The Peopling of the Pacific from a Bacterial Perspective, *Science* 323(5913): 527-530.
- Mullis, K. B. y Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, En *Methods in Enzymology*, pp 335-350, Academic Press.
- Narayanan, C., Dubey, S., Wali, S. A., Shukla, N., Kumar, R., Mandal, A. y Ansari, S. (2006) Optimization of DNA extraction for ISSR studies in *Tectona grandis* Lf-an important forest tree species, *African Journal of Biotechnology* 5(13): 1220 - 1223.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics* 89(3): 583-590.
- Oginuma, K. y Tobe, H. (1995) Karyomorphology of some Moraceae and Cecropiaceae (Urticales), *Journal of Plant Research* 108(3): 313-326.
- Pawley, A. (2006) Nayacakalou medal address: Explaining the aberrant Austronesian languages of Southeast Melanesia: 150 years of debate, *The Journal of the Polynesian Society* 115(3): 215-258.
- Peakall, R. y Smouse, P. E. (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update, *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. y Rafalski, A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, *Molecular Breeding* 2(3): 225-238.
- Quillardet, P. y Hofnung, M. (1988) Ethidium bromide and safety - readers suggest alternative solutions, *Trends in Genetics* 4(4): 89-90.
- Rajapakse, S. (2003) GENETICS | Molecular Markers, En *Encyclopedia of Rose Science*, pp 334-341, Elsevier, Oxford.
- Reddy, M. P., Sarla, N. y Siddiq, E. A. (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, *Euphytica* 128(1): 9-17.
- Richard, V.-W. (2013) Taxonomy, Methods of, En *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*, pp 97-111, Academic Press, Waltham.
- Rowland, D. (1933) The United States and the Contract Labor Question in Hawaii, 1862-1900, *Pacific Historical Review* 2(3): 249-269.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular biology and evolution* 4(4): 406-425.
- Sarwat, M. (2012) ISSR: A Reliable and Cost-Effective Technique for Detection of DNA Polymorphism, En *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding*, pp 103-121, Humana Press.
- Seelenfreund, D., Clarke, A. C., Oyanedel, N., Piña, R., Lobos, S., Matisoo-Smith, E. A. y Seelenfreund, A. (2010) Paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) as a commensal model for human mobility in Oceania: anthropological, botanical and genetic considerations, *New Zealand Journal of Botany* 48(3-4): 231-247.
- Seelenfreund, D., Piña, R., Ho, K. Y., Lobos, S., Moncada, X. y 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.

- Sheppard, P. J. (2011) Lapita colonization across the Near/Remote Oceania boundary, *Current Anthropology* 52(6): 799-840.
- Slatkin, M. (1985) Gene flow in natural populations, *Annual review of ecology and systematics* 16: 393-430.
- Sneath, P. H. A. (2001) Phenetics, En *Encyclopedia of Genetics*, p 1446, Academic Press, New York.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973) *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- Sokal, R. R. y Michener, C. D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships, *University of Kansas Scientific Bulletin* 28: 1409-1438.
- Stavrinides, J. y Ochman, H. (2009) Phylogenetic Methods, En *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, pp 247-260, Academic Press, Oxford.
- Storey, A. A., Ladefoged, T. y Matisoo-Smith, E. A. (2008) Counting your chickens: density and distribution of chicken remains in archaeological sites of Oceania, *International Journal of Osteoarchaeology* 18(3): 240-261.
- Storfer, A., Murphy, M., Evans, J., Goldberg, C., Robinson, S., Spear, S., Dezzani, R., Delmelle, E., Vierling, L. y Waits, L. (2006) Putting the 'landscape' in landscape genetics, *Heredity* 98(3): 128-142.
- Storfer, A., Murphy, M., Spear, S., Holderegger, R. y Waits, L. (2010) Landscape genetics: where are we now?, *Molecular Ecology* 19(17): 3496-3514.
- Thomas, F. R. (2011) Pacific Islands Archaeology, En *Comparative Archaeologies*, pp 731-766, Springer New York.
- Wenz, H.-M., Robertson, J. M., Menchen, S., Oaks, F., Demorest, D. M., Scheibler, D., Rosenblum, B. B., Wike, C., Gilbert, D. A. y Efcavitch, J. W. (1998) High-Precision Genotyping by Denaturing Capillary Electrophoresis, *Genome Research* 8(1): 69-80.
- Whistler, W. A. y Elevitch, C. R. (2006) *Broussonetia papyrifera* (paper mulberry), En *Broussonetia papyrifera (paper mulberry)*.
- Wilmshurst, J. M., Hunt, T. L., Lipo, C. P. y 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 (PNAS)* 108(5): 1815-1820.
- Wilson, G. (2005) Taguchi's techniques, En *Six Sigma and the Product Development Cycle*, pp 107-178, Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Yamanouchi, H., Koyama, A., Takyu, T. y Muramatsu, N. (2010) Nuclear DNA amounts in diploid mulberry species (*Morus* spp.), *Journal of insect biotechnology and sericology* 79.
- Yeh, F. C., Yang, R., Boyle, T., Ye, Z. y Mao, J. X. (1999) POPGENE, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis, *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada*.
- Zerega, N. J. C., Ragone, D. y 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.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D. (1994) Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification, *Genomics* 20(2): 176-183.

## Anexos

**Tabla I: Muestras utilizadas para los análisis de agrupamiento y genética del paisaje**

Código	Localidad	Concentración DNA (ng/ul)	Razón Abs <sub>260/280</sub>
BQUCH0002	isla de Pascua	302,0	1,92
BQUCH0003	isla de Pascua	662,5	1,95
BQUCH0005	isla de Pascua	142,0	1,91
BQUCH0013	isla de Pascua	354,2	2,05
BQUCH0014	isla de Pascua	111,7	1,97
BQUCH0015	isla de Pascua	148,3	1,92
BQUCH0023	isla de Pascua	235,8	1,95
BQUCH0027	isla de Pascua	247,2	1,97
BQUCH0028	isla de Pascua	171,3	2,02
BQUCH0030	isla de Pascua	322,8	1,88
BQUCH0031	isla de Pascua	820,9	2,08
BQUCH0032	isla de Pascua	267,6	2,03
BQUCH0036	isla de Pascua	327,4	1,72
BQUCH0037	isla de Pascua	317,0	1,89
BQUCH0038	isla de Pascua	200,0	2,02
BQUCH0051	Marquesas	190,5	1,93
BQUCH0059	Hawái, Big island	236,4	1,91
BQUCH0066	Hawái, Big island	716,0	1,94
BQUCH0074	Samoa, Savaii	393,3	1,96
BQUCH0075	Samoa, Savaii	796,1	2,10
BQUCH0077	Samoa, Savaii	533,7	2,04
BQUCH0086	Samoa, Savaii	457,8	2,00
BQUCH0093	Samoa, Upolu	217,7	1,99
BQUCH0094	Samoa, Upolu	284,4	1,95
BQUCH0095	Tonga, Tongatapu	654,6	1,97
BQUCH0096	Tonga, Tongatapu	247,3	2,01
BQUCH0097	Tonga, Tongatapu	352,6	1,97
BQUCH0098	Tonga, Tongatapu	479,3	1,92
BQUCH0099	Tonga, Tongatapu	451,0	1,94
BQUCH0100	Tonga, Tongatapu	584,3	2,01
BQUCH0101	Tonga, Tongatapu	388,8	2,01
BQUCH0103	Tonga, Tongatapu	196,8	1,96
BQUCH0105	Tonga, Tongatapu	268,1	2,03
BQUCH0106	Tonga, Tongatapu	475,1	1,97
BQUCH0107	Tonga, Tongatapu	318,0	2,01

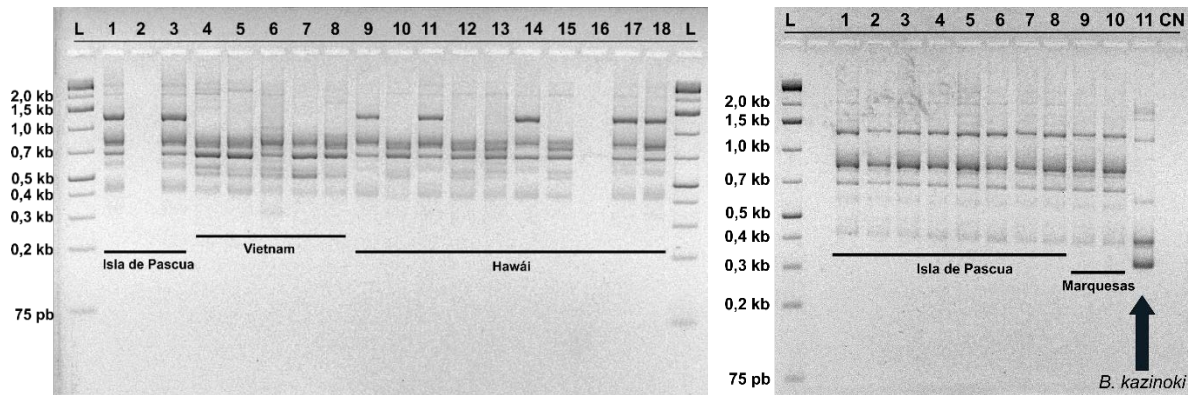
BQUCH0109	Tonga, Tongatapu	310,0	1,98
BQUCH0110	Tonga, Tongatapu	514,3	1,82
BQUCH0111	Tonga, Tongatapu	103,3	1,96
BQUCH0113	Tonga, Tongatapu	254,4	1,99
BQUCH0117	Fiyi, Vitilevu	715,4	2,07
BQUCH0134	Santiago	223,0	2,06
SEKAA	Santiago	781,2	2,16
SEKAH	Santiago	420,0	2,05
BQUCH0135	isla de Pascua	226,6	1,97
BQUCH0137	Taiwán	1308,8	2,03
BQUCH0138	Taiwán	1169,1	2,02
BQUCH0139	Taiwán	1448,4	2,03
BQUCH0140	Taiwán	981,9	2,04
BQUCH0141	Japón	256,7	2,06
BQUCH0142	Japón	2538,0	2,22
BQUCH0143	Japón	303,3	2,10
BQUCH0145	Japón	120,4	2,00
BQUCH0147	isla de Pascua	307,7	1,96
BQUCH0148	isla de Pascua	617,8	1,90
BQUCH0149	isla de Pascua	355,3	1,61
BQUCH0152	isla de Pascua	687,6	1,61
BQUCH0153	isla de Pascua	472,9	1,83
BQUCH0155	isla de Pascua	205,5	1,98
BQUCH0156	isla de Pascua	195,8	1,97
BQUCH0157	isla de Pascua	265,4	2,01
BQUCH0158	isla de Pascua	169,4	2,01
BQUCH0177	Hawái, Big island	1942,0	2,03
BQUCH0181	Hawái, Big island	270,0	2,05
BQUCH0184	Hawái, Big island	821,5	2,05
BQUCH0187	Hawái, Big island	215,4	1,92
BQUCH0188	Hawái, Big island	116,2	1,80
BQUCH0189	Hawái, Big island	321,4	1,98
BQUCH0190	Hawái, Oahu	278,9	1,94
BQUCH0191	Hawái, Big island	153,9	2,06
BQUCH0192	Hawái, Big island	805,2	2,12
BQUCH0193	Hawái	638,4	2,07
BQUCH0194	Hawái, Oahu	282,0	1,77
BQUCH0195	Hawái, Oahu	472,0	1,72
BQUCH0201	Vietnam	453,0	1,94
BQUCH0202	Vietnam	1262,0	1,66



BQUCH0203	Vietnam	610,5	1,94
BQUCH0204	Vietnam	1361,0	1,95
BQUCH0205	Vietnam	1290,0	1,89
BQUCH0208	isla de Pascua	517,1	2,07
BQUCH0211	isla de Pascua	312,4	1,94
BQUCH0212	isla de Pascua	88,6	2,00
BQUCH0213	isla de Pascua	164,7	2,05
BQUCH0215	isla de Pascua	222,0	1,88
BQUCH0218	isla de Pascua	396,4	2,06
BQUCH0220	isla de Pascua	162,9	1,92
BQUCH0221	isla de Pascua	290,7	2,08
BQUCH0224	isla de Pascua	100,5	2,13
BQUCH0225	isla de Pascua	228,2	2,12
BQUCH0226	isla de Pascua	476,8	2,05
BQUCH0233	Marquesas	196,9	2,03
BQUCH0234	Marquesas	841,4	2,11
Z0002	<i>Outgroup</i>	871,6	1,99

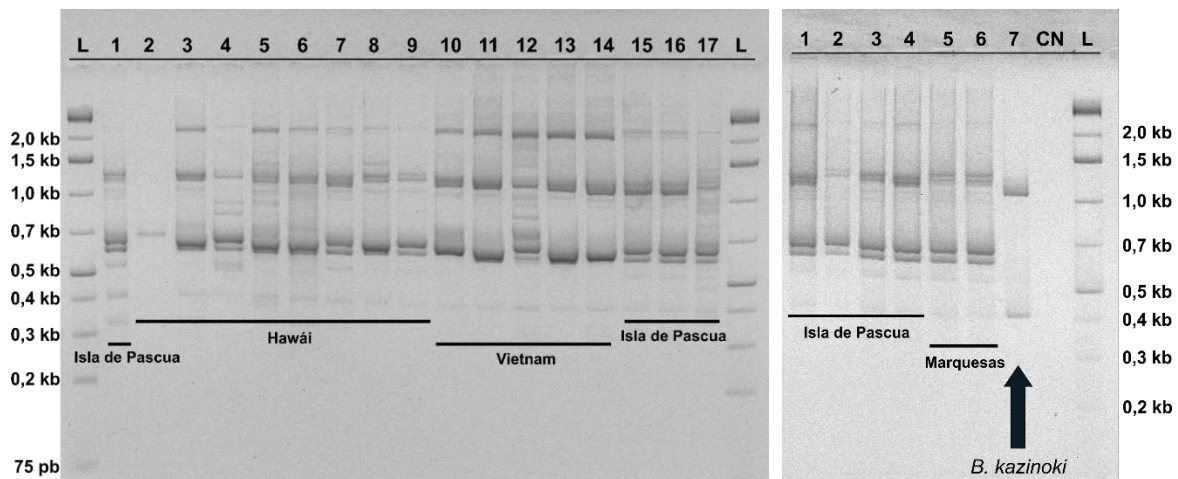
**Tabla II: Individuos incluidos en el grupo Polinesia. Agrupamiento mediante *neighbor joining* y UPGMA**

Agrupación	Localidad	Muestras				
Polinesia	Isla de Pascua	BQUCH0002	BQUCH0003	BQUCH0005	BQUCH0014	BQUCH0023
		BQUCH0027	BQUCH0028	BQUCH0030	BQUCH0031	BQUCH0036
		BQUCH0037	BQUCH0038	BQUCH0135	BQUCH0147	BQUCH0149
		BQUCH0152	BQUCH0153	BQUCH0155	BQUCH0156	BQUCH0157
		BQUCH0158	BQUCH0208	BQUCH0211	BQUCH0213	BQUCH0215
BQUCH0218	BQUCH0220	BQUCH0221	BQUCH0224	BQUCH0225		
BQUCH0226						
	Hawái	BQUCH0059	BQUCH0066	BQUCH0181	BQUCH0184	BQUCH0193
		BQUCH0195				
	Marquesas	BQUCH0051	BQUCH0233	BQUCH0234		
	Samoa	BQUCH0075	BQUCH0077	BQUCH0086	BQUCH0093	BQUCH0094
	Tonga	BQUCH0095	BQUCH0096	BQUCH0097	BQUCH0098	BQUCH0099
		BQUCH0100	BQUCH0101	BQUCH0103	BQUCH0105	BQUCH0107
		BQUCH0109	BQUCH0110	BQUCH0111	BQUCH0113	



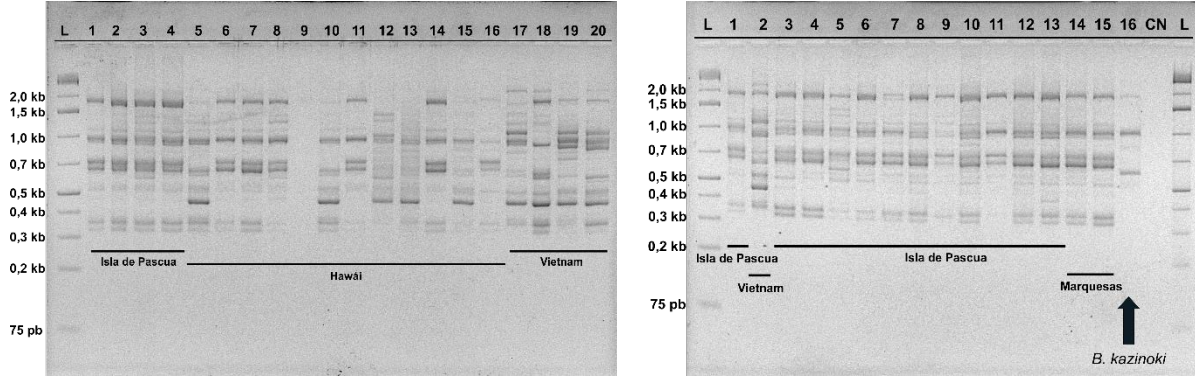
**Figura I:** Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Vietnam, Hawái y Marquesas utilizando el partidor UBC823.

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.



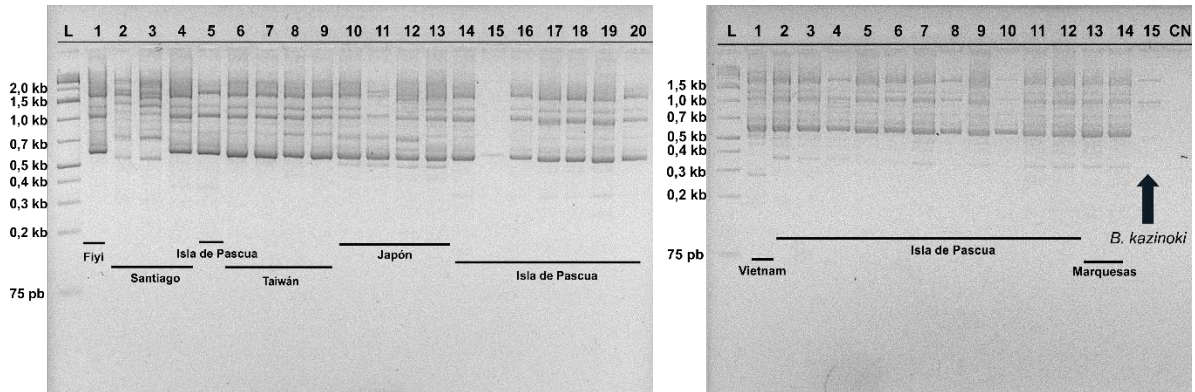
**Figura II:** Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Hawái, Vietnam y Marquesas utilizando el partidor UBC825.

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.



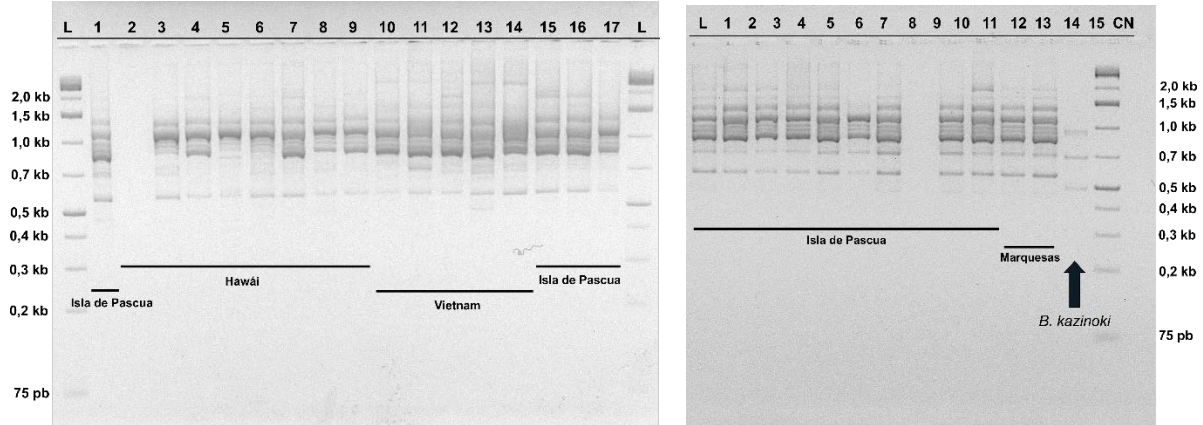
**Figura III: Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Hawái, Vietnam y Marquesas utilizando el partidor UBC827.**

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.



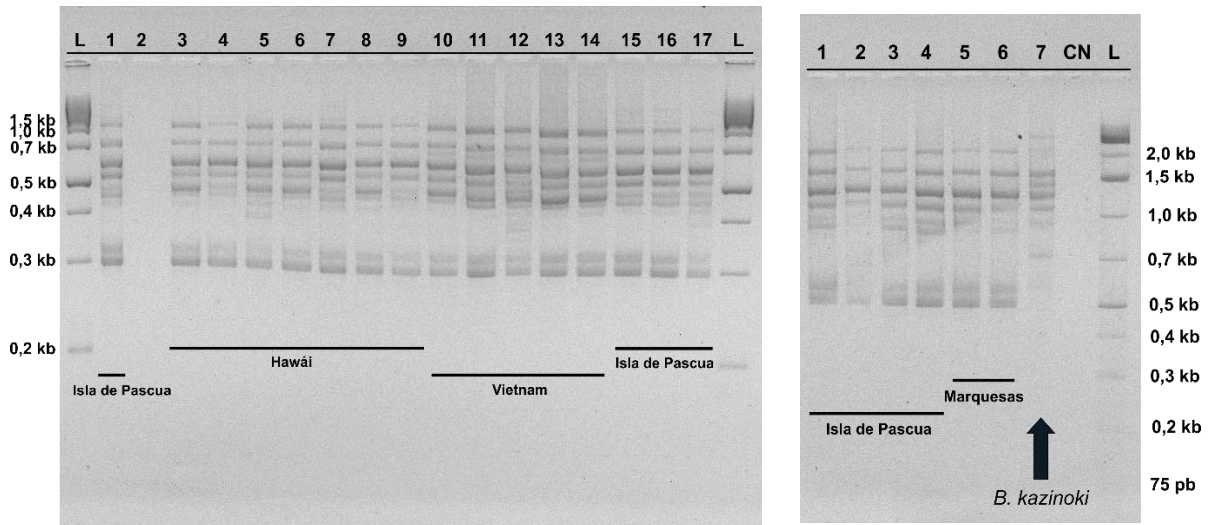
**Figura IV: Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Fiji, Santiago, Hawái, Taiwán, Japón, Vietnam y Marquesas utilizando el partidor UBC855.**

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.



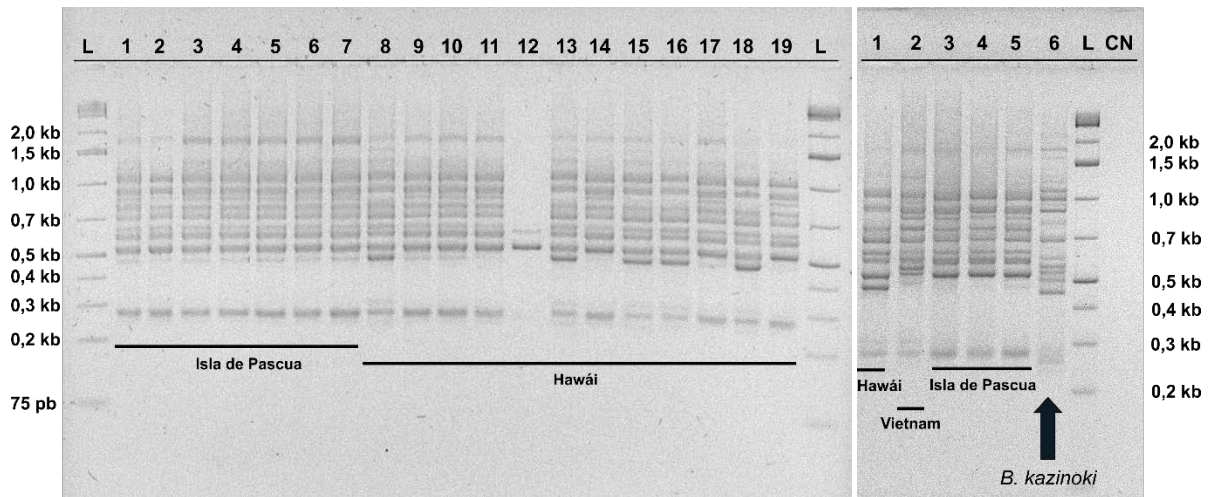
**Figura V:** Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Vietnam, Hawái y Marquesas utilizando el partidor UBC856.

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.



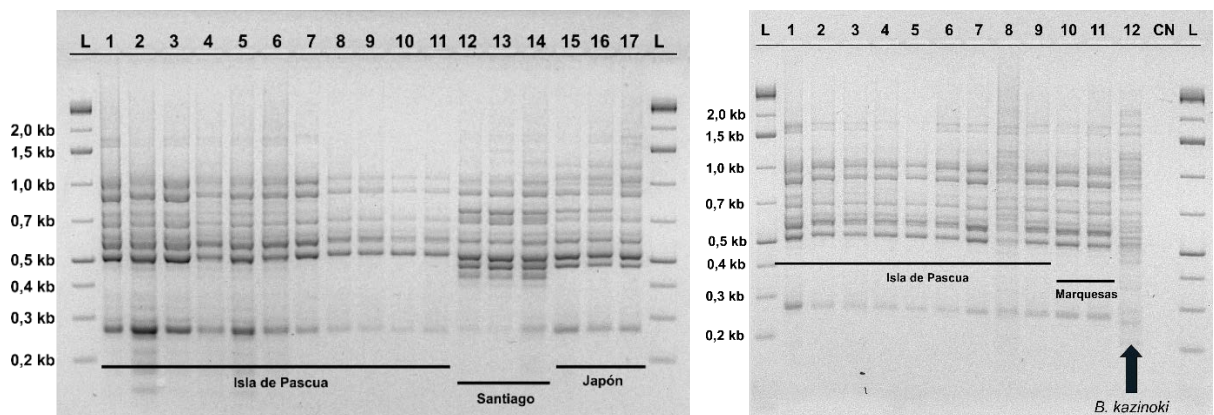
**Figura VI:** Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Vietnam, Hawái y Marquesas utilizando el partidor UBC866.

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.



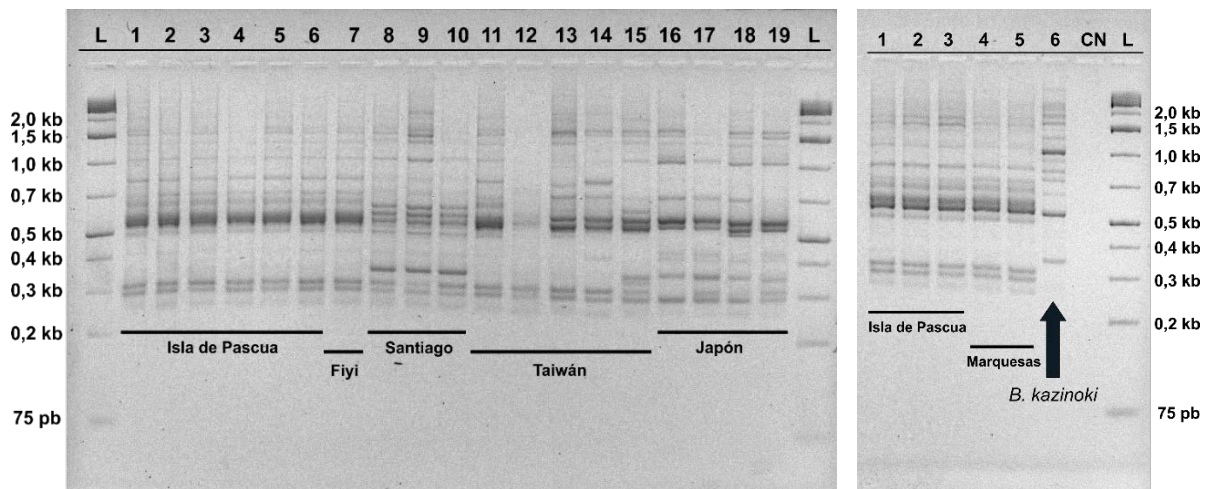
**Figura VII: Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Vietnam y Hawái utilizando el partidor UBC888.**

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.

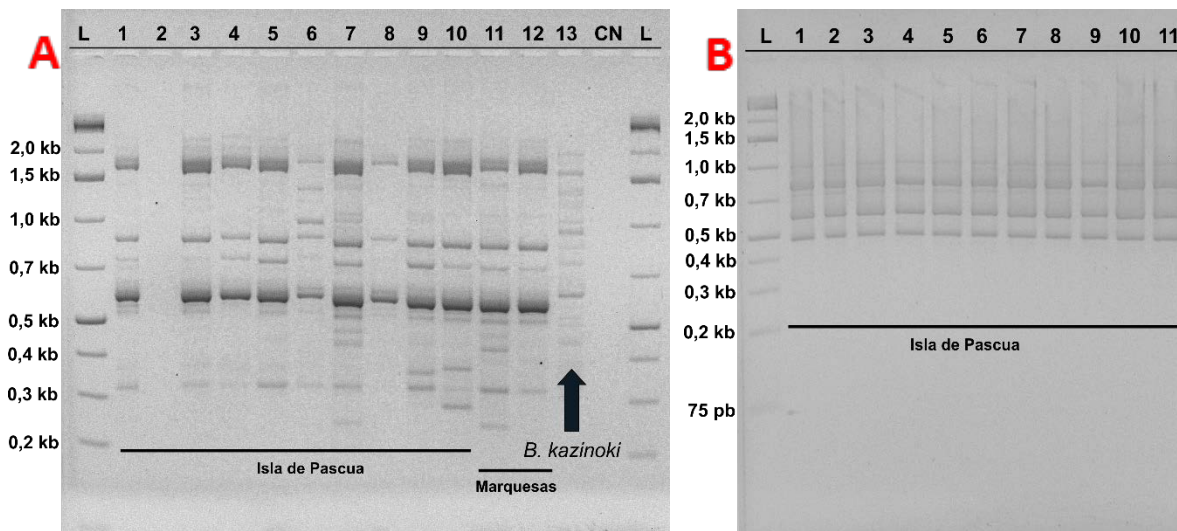


**Figura VIII: Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Santiago, Japón y Marquesas utilizando el partidor UBC889.**

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.



**Figura IX:** Foto en negativo de dos geles representativos con muestras de Isla de Pascua, Fiyi, Santiago, Taiwán, Vietnam y Marquesas utilizando el partidor UBC891. L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.



**Figura X:** Foto en negativo de dos geles representativos con patrones de bandas descartados.

A) Partidor UBC857 con muestras de Isla de Pascua y Marquesas. Las presencia de bandas inespecíficas no permiten una correcta interpretación de los patrones genéticos, por lo cual fue descartado este partidor.

B) Partidor UBC864 con muestras de Isla de Pascua. Los constantes patrones genéticos de débil intensidad no permitieron la inequívoca asignación de bandas utilizando este partidor.

L: Estándar de peso molecular 1 kb plus. CN: control negativo. La flecha señala el *outgroup* *B. kazinoki*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% visualizado con bromuro de etidio.