



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

**“Caracterización genética de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.: Moraceae) mediante marcadores de retrotransposones IRAP y REMAP”**

**Gerardo Elías Andrés Silva Poblete**

**Patrocinante**

Dra. Daniela Seelenfreund H.

**Directoras de Memoria**

Dra. Daniela Seelenfreund H.

Dra. Ximena Moncada R.

**Laboratorio de Biología Molecular**

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

**Laboratorio de Biología Molecular**

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

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

Agosto 2016

- ¡Ésa es la cama de las malnacidas! (*Se dirige furiosa hacia Adela*).
- (*Haciéndole frente*) ¡Aquí se acabaron las voces de presidio! (*Adela arrebató el bastón a su madre y lo parte en dos.*) Esto hago yo con la vara de la dominadora. No dé usted un paso más.

Federico García Lorca – La Casa de Bernarda Alba

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado y apoyado en este gran camino. En primer lugar a mi familia. Mis padres Marcela y Sergio siempre han estado conmigo y me han ayudado en todo lo que necesitara, gracias infinitas por todo lo que me han brindado y por el esfuerzo que supone permitirme haber estudiado en la universidad. A mi hermana Katerinne que, aunque revoltosa e intranquila, me daba en el gusto y me deleitaba con sus habilidades culinarias. También a todos mis familiares, pero en particular a mi tía Pilar, que ha sido una persona vital en toda mi vida y la cual influyó importantemente en mi formación personal.

A los compañeros y amistades que he formado en todos estos años, durante las distintas etapas de mi infancia y adolescencia. En especial a Roberto, quien más se ha llevado la lata de escucharme hablar horas y horas sobre mi memoria de título, y es con quien más me he apoyado en los momentos de desafíos y problemas. Al señor Gastón Tornería (alias Jean Claude Van Daaaamn) por todo el apoyo técnico y emocional, y por hacer las mejores figuras de esta memoria. También quiero mencionar al *grupo afiatado*: Eliseo, Felipe, Lorena y Camila, con los que pasé los mejores momentos en los primeros años de la universidad.

Agradezco también al Laboratorio de Biología Molecular, que me acogieron desde el 2014 y me han ayudado durante todo este tiempo. Junto a Claudia, Gabriela, Bárbara y Leslie, siempre que iba al laboratorio, me divertía con las cosas que contaban y me sentía como en casa. Al profe Sergio Lobos, que siempre iba con sus comentarios tan característicos a sacarnos unas risas, le agradezco además el haberme permitido ser su ayudante.

Finalmente, agradezco a mis directoras de memoria, que durante la realización de ésta, me han hecho mejorar como científico y como persona. Me enseñaron a trabajar sistemáticamente, a buscar todas las posibilidades a los resultados obtenidos y a verlos siempre desde un enfoque positivo, lo cual no siempre es fácil de conseguir. Gracias a la profesora Daniela, que me ha brindado muchas posibilidades, desde la práctica profesional hasta la invitación a las clases de Genética Forense, lo que me han fortalecido respecto al camino que quiero seguir luego de titularme. A Ximena un especial agradecimiento, porque siempre mostró gran dedicación, y con su ingenio y capacidad de análisis, me ha guiado constantemente en la realización de esta memoria.

A todos con los que he tenido la fortuna de coincidir en esta vida y que me han llenado de experiencias memorables, ¡Muchas gracias!

**Lugar de realización**

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 de la Dra. Daniela Seelenfreund H. y la Dra. Ximena Moncada R.

**Financiamiento**

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 polinésicos en Oceanía Remota a través del análisis genético de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera*)”.

## Índice General

Índice General .....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Abreviaturas .....	viii
Resumen .....	x
Abstract .....	xii
<b>1 Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Poblamiento de la Polinesia.....	1
1.2 Estudios genéticos asociados al poblamiento de la Polinesia.....	2
1.3 Estudios de especies asociadas a los humanos en el poblamiento de la Polinesia .....	3
1.4 <i>Broussonetia papyrifera</i> como modelo de estudio .....	4
1.5 Uso de marcadores moleculares en <i>B. papyrifera</i> .....	5
1.6 Elementos móviles .....	6
1.7 Marcadores basados en elementos móviles: IRAP y REMAP .....	8
1.8 Planteamiento del problema .....	9
<b>2 Hipótesis .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>10</b>
3.1 Objetivo General .....	10
3.2 Objetivos Específicos .....	10
<b>4 Materiales y Métodos .....</b>	<b>11</b>
4.1 Materiales.....	11
4.1.1 Reactivos e insumos generales .....	11
4.1.2 Soluciones y tampones .....	11
4.1.3 Equipamiento .....	12
4.1.4 Programas computacionales .....	12
4.1.5 Obtención de muestras de <i>B. papyrifera</i> .....	13
4.1.6 Material microbiológico .....	14
4.2 Métodos .....	14
4.2.1 Extracción de ADN genómico de muestras de <i>B. papyrifera</i> .....	14
4.2.2 Análisis de integridad de ADN genómico .....	15

4.2.3	Cuantificación de ADN genómico y determinación de la pureza del ADN .....	15
4.2.4	Selección de partidores para IRAP y REMAP .....	15
4.2.5	Caracterización de retroelementos mediante clonamiento .....	16
4.2.5.1	Selección de muestras y ligación en el plasmidio pCR™4-TOPO® .....	16
4.2.5.2	Electrotransformación en células electrocompetentes .....	17
4.2.5.3	PCR de colonias .....	17
4.2.5.4	Purificación de productos de PCR .....	18
4.2.5.5	Purificación de plasmidios pCR™4-TOPO® .....	18
4.2.5.6	Secuenciación de plasmidios y productos de PCR purificados .....	18
4.2.5.7	Análisis de secuencias de plasmidios y productos de PCR .....	18
4.2.6	Estandarización del protocolo de amplificación con marcadores IRAP y REMAP.....	19
4.2.6.1	Optimización de la reacción de PCR para marcadores IRAP y REMAP .....	19
4.2.6.2	Optimización del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa .....	20
4.2.7	Análisis estadísticos .....	20
5	Resultados.....	22
5.1	Selección de muestras .....	22
5.2	Selección de partidores.....	23
5.2.1	Evaluación inicial de partidores IRAP .....	23
5.2.2	Evaluación inicial de partidores REMAP .....	24
5.3	Caracterización de retroelementos amplificados con partidores IRAP mediante clonamiento .....	26
5.3.1	Clonamiento de productos de PCR amplificados con el partidor IRAP Sukkula .....	26
5.3.2	Secuenciación y caracterización de insertos positivos clonados .....	28
5.4	Optimización del protocolo de PCR para los marcadores IRAP y REMAP .....	34
5.4.1	Optimización del protocolo de amplificación de marcadores IRAP.....	34
5.4.2	Optimización del protocolo de amplificación de marcadores REMAP.....	35
5.4.3	Determinación de la temperatura de apareamiento óptima mediante PCR en gradientes .....	37
5.4.4	Prueba de amplificación con BSA.....	39
5.4.5	Estandarización de la electroforesis en gel de agarosa y del método de tinción .....	40
5.5	Selección de partidores para el análisis de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota .....	41

5.5.1 Selección de partidores IRAP .....	42
5.5.2 Selección de partidores REMAP .....	43
5.6 Obtención de perfiles REMAP con muestras de <i>B. papyrifera</i> provenientes de la región nativa y de Oceanía Remota .....	44
6 Discusión .....	47
6.1 Caracterización de retroelementos de <i>B. papyrifera</i> .....	47
6.2 Optimización de protocolo IRAP y REMAP .....	48
6.3 Análisis IRAP y REMAP en muestras de <i>B. papyrifera</i> de la región nativa y de Oceanía Remota .....	49
6.4 Consideraciones al protocolo IRAP y REMAP .....	51
6.5 Rutas de migración en Oceanía Remota .....	52
6.6 Proyecciones del uso de retroelementos como marcadores moleculares.....	54
7 Conclusiones.....	55
8 Referencias.....	56
9 Anexos .....	63
9.1 Anexo 1: Muestras de <i>B. papyrifera</i> y especies utilizadas como grupos externos .....	63
9.2 Anexo 2: Caracterización de retroelementos amplificados con partidores IRAP .....	65
9.3 Anexo 3: Perfiles de amplificación con los marcadores REMAP seleccionados .....	68
9.4 Anexo 4: Dendrogramas de cada marcador REMAP seleccionado analizando muestras de <i>B. papyrifera</i> de la región nativa y de Oceanía Remota .....	77

## Índice de Figuras

Figura 1: Rutas migratorias humanas a través del Pacífico.....	2
Figura 2: Organización de genes de los retrotransposones con LTR.....	8
Figura 3: Marcadores moleculares basados en retrotransposones.....	9
Figura 4: Estrategia experimental para el análisis de <i>Broussonetia papyrifera</i> mediante IRAP y REMAP .....	21
Figura 5: Análisis de integridad de ADN para selección de muestras de <i>B. papyrifera</i> .....	22
Figura 6: Preselección de partidores IRAP en muestras de prueba de <i>B. papyrifera</i> .....	24
Figura 7: Preselección de partidores REMAP en muestras de prueba de <i>B. papyrifera</i> .....	25
Figura 8: PCR IRAP de muestras para clonamiento .....	26
Figura 9: Rastreo de clones positivos mediante PCR de colonias.....	27
Figura 10 Amplificación confirmatoria de insertos positivos.....	27
Figura 11: Alineamiento representativo de los cinco insertos positivos secuenciados, asociados a la amplificación con el partidor Sukkula .....	28
Figura 12: Alineamiento local representativo de los plasmidios 1, 3, 4 y 5 .....	29
Figura 13: Estructura del retrotransposón tipo TRIM identificado en los plasmidios 1, 3, 4 y 5, asociado al marcador Sukkula .....	29
Figura 14: Alineamiento local de la secuencia del plasmidio 2 .....	30
Figura 15: Estructura del retrotransposón tipo TRIM identificado en el plasmidio 2, asociado al marcador Sukkula .....	31
Figura 16: Alineamiento de secuencias de ADN ribosomal encontradas en el plasmidio 2.....	32
Figura 17: Dendrograma de secuencias ribosomales 5S.....	33
Figura 18: Optimización del protocolo de amplificación IRAP .....	35
Figura 19: Optimización de la concentración de partidores REMAP UBC891 y partidores LTR2105, LTR2118, LTR2119 y LTR2121 .....	36
Figura 20: Optimización de la temperatura de apareamiento en la reacción de PCR para partidores IRAP y REMAP .....	38
Figura 21: Prueba de amplificación utilizando BSA en la mezcla de reacción de PCR.....	39
Figura 22: Comparación de sistemas de tinción y de captura de imagen de perfiles de amplificación IRAP y REMAP .....	41
Figura 23: Amplificación IRAP con cuatro muestras control de <i>B. papyrifera</i> .....	42
Figura 24: Amplificación REMAP con cuatro muestras control de <i>B. papyrifera</i> .....	43

Figura 25: Amplificación de la combinación REMAP UBC855 con LTR2105 de muestras de <i>B. papyrifera</i> del hábitat nativo y de Oceanía Remota.....	45
Figura 26: Dendrograma integrado de marcadores REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> del hábitat nativo y de Oceanía Remota .....	46
Figura 27: Esquema resumen de la estrategia experimental y los resultados obtenidos .....	49
Figura 28: Distribución de muestras de <i>B. papyrifera</i> y <i>Lipina noctua</i> según su genotipo mayoritario. ....	53
Figura A: Alineamiento de los cinco insertos positivos secuenciados, asociados a la amplificación con el partidor Sukkula .....	67
Figura B: Amplificación de regiones REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> del área nativa usando la combinación de marcadores UBC827 y LTR2118. ....	68
Figura C: Amplificación de regiones REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota usando la combinación de marcadores UBC827 y LTR2118. ....	69
Figura D: Amplificación de regiones REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> del área nativa con la combinación de marcadores UBC855 con LTR2105 .....	70
Figura E: Amplificación de regiones REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota con la combinación de marcadores UBC855 y LTR2105.....	71
Figura F: Amplificación de regiones REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> del área nativa con la combinación de marcadores UBC855 y LTR2118 .....	72
Figura G: Amplificación de regiones REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota con la combinación de marcadores UBC855 y LTR2118.....	73
Figura H: Amplificación de regiones REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> del área nativa con la combinación de marcadores UBC866 y LTR2121 .....	74
Figura I: Amplificación de regiones REMAP de muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota con la combinación de marcadores UBC866 y LTR2121.....	75
Figura J: Amplificación mediante la combinación de marcadores IRAP BREPR con 3'LTR-BARE-1 .....	76
Figura K: Dendrograma obtenido con la combinación REMAP UBC827 y LTR2118 .....	77
Figura L: Dendrograma obtenido con la combinación REMAP UBC855 y LTR2105.....	78
Figura M: Dendrograma obtenido con la combinación REMAP UBC855 y LTR2118 .....	79
Figura N: Dendrograma obtenido con la combinación REMAP UBC866 y LTR2121.....	80

## Índice de Tablas

Tabla 1: Localidades y número de muestras de <i>B. papyrifera</i> utilizadas en esta memoria de título.....	13
Tabla 2. Localidades y número de muestras de grupos externos utilizados en esta memoria de título.....	14
Tabla 3: Partidores escogidos de retroelementos y temperaturas de apareamiento para IRAP .....	15
Tabla 4: Partidores escogidos de retroelementos y temperaturas de apareamiento para REMAP .....	16
Tabla 5: Partidores escogidos de regiones de microsátélites para REMAP.....	16
Tabla 6: Protocolo de PCR IRAP de colonias .....	17
Tabla 7: Programa de amplificación PCR IRAP de colonias .....	18
Tabla 8: Concentraciones finales para el protocolo de PCR con marcadores IRAP y REMAP .....	19
Tabla 9: Muestras control de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota .....	19
Tabla 10: Evaluación inicial de marcadores IRAP .....	23
Tabla 11: Evaluación inicial de marcadores REMAP .....	25
Tabla 12: Muestras identificadas mediante BLAST del inserto de los plasmidios 1, 3, 4 y 5.....	29
Tabla 13: Muestras identificadas mediante BLAST del inserto del plasmidio 2 .....	30
Tabla 14: Modificaciones en el protocolo de PCR IRAP de Kalendar y Schulman (2007) .....	34
Tabla 15: Modificaciones al programa de amplificación IRAP de Kalendar y Schulman (2007).....	34
Tabla 16: Modificación al protocolo de PCR REMAP de Kalendar y Schulman (2007) .....	36
Tabla 17: Modificaciones al programa de amplificación REMAP de Kalendar y Schulman (2007).....	37
Tabla 18: Temperaturas de apareamiento de partidores REMAP .....	39
Tabla 19: Muestras control de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota.....	41
Tabla 20: Partidores REMAP seleccionados.....	44
Tabla I: Muestras de <i>B. papyrifera</i> de la región nativa analizadas mediante IRAP y REMAP .....	63
Tabla II: Muestras de <i>B. papyrifera</i> de Oceanía Remota analizadas mediante IRAP y REMAP .....	63

<b>Tabla III: Muestras de material de prueba (<i>B. papyrifera</i>) y grupos externos usadas para análisis IRAP y REMAP.....</b>	<b>64</b>
--	-----------

## Índice de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMOVA: *Analysis of Molecular Variance*

AP: Antes del Presente

ARN: Ácido ribonucleico

cm: Centímetros

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfatos

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

g: Aceleración de gravedad

H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>: Agua destilada

IRAP: *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*

ISSR: *Inter-Simple Sequence Repeats*

kb: Kilo pares de bases

LTR: *Long Terminal Repeats* (Terminales Repetidos Largos)

M: Molar

min: Minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

mtDNA: ADN mitocondrial

µg: Microgramos

µL: Microlitros

µM: Micromolar

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PVP: Polivinilpirrolidona

SSR: *Short Sequence Repeats* (Secuencias cortas repetidas)

REMAP: *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*

rpm: Revoluciones por minuto

seg: Segundos

TBE: tampón Tris, borato, EDTA

U: Unidades de actividad enzimática

UBC: *University of British Columbia*

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

V: Voltios

$\lambda$ : Longitud de onda

## Resumen

La colonización del Pacífico se gestó en dos grandes procesos de migración: el primero alrededor de 50.000 a 30.000 años antes del presente, y el segundo hace 5.000 a 1.000 años antes del presente. Este último gran movimiento fue complejo y se ha estudiado integrando evidencias arqueológicas, lingüísticas y genéticas con el propósito de dilucidar incógnitas como las diferentes rutas migratorias propuestas sobre el poblamiento de Oceanía. Entre los modelos de estudios genéticos se han analizado muestras humanas, pero éstas presentan diversas complejidades que limitan el alcance de los estudios con este modelo. Por este motivo, surgen los estudios de especies asociadas a los colonizadores polinésicos, de los cuales se han analizado especies animales y vegetales. Entre estos últimos se encuentra la morera de papel (*Broussonetia papyrifera*), una planta nativa de Asia e introducida a la región de Oceanía Remota. Debido a su uso como fuente de fibra vegetal para textiles y la importancia cultural que representa, resulta interesante abordar su estudio para aportar a la comprensión de las rutas migratorias en Oceanía Remota.

La principal herramienta de los estudios genéticos son los marcadores moleculares, que corresponden a regiones de ADN que presentan cierto grado de variabilidad detectable. En *B. papyrifera* se han analizado regiones de ADN ribosomal y de ADN de cloroplastos, encontrando ausencia de diversidad en muestras de Oceanía Remota. Una alternativa para este tipo de análisis podría ser el uso de marcadores basados en retrotransposones, los cuales han sido descritos como ubicuos en plantas y como fuente de gran diversidad genética. Entre los marcadores basados en retrotransposones se encuentran los *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphisms* (IRAP) y *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphisms* (REMAP), los cuales amplifican regiones entre secuencias de Repeticiones Terminales Largas (LTR), o entre LTR y secuencias microsatélites, respectivamente. Estos marcadores han sido ampliamente empleados en estudios de diversidad genética debido a su facilidad de uso.

En base a los antecedentes presentados, se plantea la siguiente hipótesis: **“El estudio de *B. papyrifera* por medio de marcadores moleculares basados en retrotransposones IRAP y REMAP permite detectar diversidad genética presente en muestras obtenidas de Oceanía Remota que no han sido diferenciadas mediante otros marcadores moleculares”**. Con el objetivo de caracterizar la diversidad genética de muestras de *B. papyrifera* provenientes de Oceanía Remota usando marcadores IRAP y REMAP, se seleccionaron partidores a partir de la literatura para el análisis de muestras de *B. papyrifera* del hábitat nativo y de la región introducida. En primer lugar, se corroboró que las secuencias amplificadas mediante estos marcadores corresponden a retroelementos, caracterizando cinco secuencias amplificadas con un marcador IRAP. Estas secuencias corresponden a dos posibles tipos de elementos TRIM (*Terminal-repeat Retrotransposon In Miniature*), los cuales son derivados cortos de retrotransposones que conservan algunas regiones características de retroelementos, pero carecen de marcos de lectura abiertos funcionales. En una etapa siguiente se estandarizaron los protocolos IRAP y REMAP para obtener patrones de amplificación óptimos. Además, se ajustaron las condiciones de electroforesis y de captura de imagen.

Inicialmente, se probaron 45 combinaciones de partidores IRAP y 36 combinaciones de partidores REMAP con un grupo de cuatro muestras de prueba de Oceanía Remota. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron cuatro combinaciones REMAP para analizar 55 muestras representativas del banco genómico de *B. papyrifera* de distintas localidades del Pacífico. Estos análisis mostraron una baja diversidad genética, apoyando la noción de una dispersión clonal de la morera de papel en las distintas islas del Pacífico. Esta información complementa los resultados obtenidos con otros marcadores utilizados en esta y otras especies, y favorecen modelos migratorios como el “tren rápido” o el de la “Triple I”.

Esta memoria de título constituye el primer estudio de retrotransposones en *B. papyrifera* y abre la posibilidad a nuevos trabajos que profundicen el análisis de la dispersión y la diversificación clonal de la morera de papel en Oceanía Remota, considerando que los retroelementos han sido descritos como fuente importante de diversidad en otras especies vegetales.

## Abstract

### **“Genetic characterization of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.: Moraceae) by retrotransposon-based markers, IRAP and REMAP”**

The human colonization of the Pacific occurred in two major stages: the first migration took place about 50,000 to 30,000 years before present, and the second stage occurred more recently, about 5,000 to 1,000 years before present. This latter large movement was complex and has been widely studied gathering archeological, linguistic and genetic evidence in order to elucidate questions such as the different routes proposed for the settlement of Oceania. Human samples have been analyzed using genetic tools, but these present several complexities that limit their scope. Therefore studies centered on human-associated species (known as commensal species) arise. Animal and plant species have been studied, and among the latter, paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*), a plant native from Asia and introduced in the Remote Oceania Region has been used as a commensal model species. Due to its use as a fiber source to make textiles and the cultural importance of paper mulberry, it is interesting to address the study of this species to contribute to the understanding of migratory routes in Remote Oceania.

Molecular markers are the main tools to analyze DNA regions that present genetic diversity. In *B. papyrifera*, ribosomal and chloroplast DNA regions have been analyzed, finding no genetic diversity in samples from Remote Oceania. An alternative to approach this kind of analysis could be the use of retrotransposon-based markers, which have been reported as ubiquitous and a major source of genetic diversity in plants. Retrotransposon-based markers are *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphisms* (IRAP) and *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphisms* (REMAP), among others. IRAP and REMAP amplify regions between Long Terminal Repeats (LTR), or between LTR and microsatellites, respectively. These markers are easy to apply and have been widely used for genetic diversity studies in different plant species.

Based on this background, the following hypothesis is proposed: “The study of *B. papyrifera* by retrotransposon-based markers IRAP and REMAP allow to detect genetic diversity in samples from Remote Oceania not previously differentiated with others molecular markers”. In order to characterize the genetic diversity of *B. papyrifera* samples from Remote Oceania by IRAP and REMAP, primers were selected from the literature to analyze samples of *B. papyrifera* from native and introduced areas. First, we checked that the amplified sequences with these primers were obtained from retroelements. Five sequences amplified with an IRAP marker were characterized and shown to correspond to two types of TRIM (*Terminal-repeat Retrotransposon In Miniature*) elements, which are short retrotransposon derivatives that have some conserved regions characteristic of retroelements, but lack functional open reading frames. Then, protocols for IRAP and REMAP amplification were standardized in order to obtain optimal amplification patterns. In addition, electrophoresis and image capture conditions were defined.

From 45 IRAP and 36 REMAP primer combinations, 4 REMAP combinations showed distinct amplification patterns in a reduced group of *B. papyrifera* samples from Remote Oceania. The

results obtained from the analysis of 55 samples of *B. papyrifera* using four selected REMAP markers showed little diversity, supporting the notion of a clonal dispersal of paper mulberry among Pacific islands. These results complement data obtained with others markers in paper mulberry and other species, and are consistent with the previously proposed models of human colonization of the Pacific as the “*fast train*” or the “*Triple-I*” models.

The present work is the first retrotransposon study in *B. papyrifera* and opens the possibility to further work to analyze the clonal dispersal and diversification of paper mulberry in Remote Oceania, considering that retroelements have been described as an important source of molecular diversity in plant species.

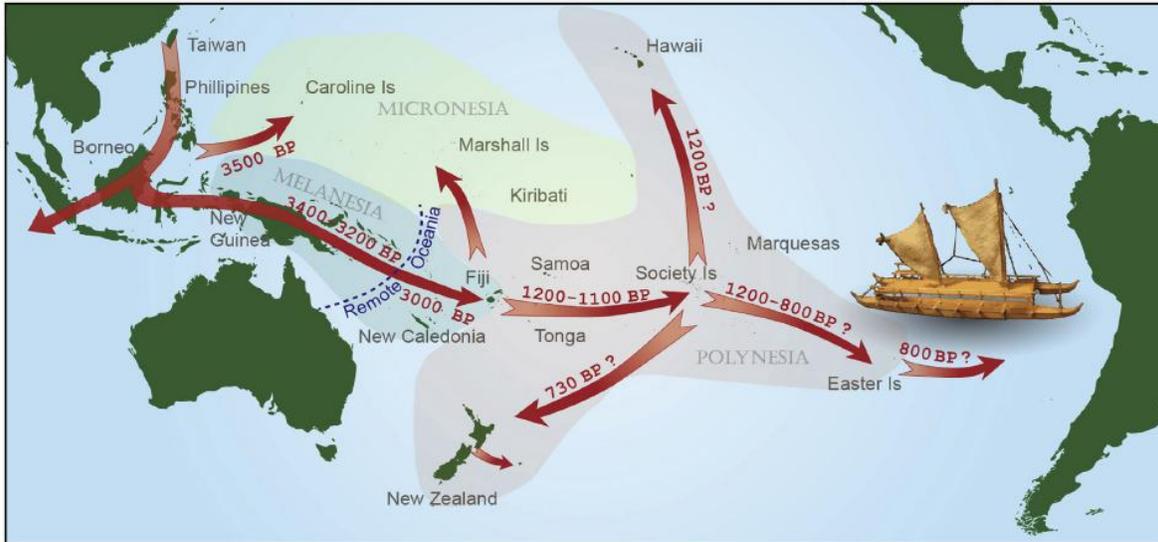
## 1 Introducción

### 1.1 Poblamiento de la Polinesia

Para abordar el proceso de colonización en el Pacífico, se han realizado diversos estudios utilizando herramientas y evidencias lingüísticas, arqueológicas y biológicas, los cuales han ayudado a responder distintas preguntas, respecto tanto al asentamiento del hombre en las Islas del Pacífico, como al establecimiento de conceptos acerca de la definición de Oceanía. La antigua definición racista establecida inicialmente por Dumont D'Urville en 1832 separaba el continente en Micronesia (islas pequeñas), Melanesia (islas de negros) y Polinesia (muchas islas). Actualmente, se ha establecido una categorización basada en la geografía y evidencias arqueológicas, diferenciando **Oceanía Cercana** (comprendida por Nueva Guinea, el Archipiélago Bismarck y las Islas Salomón, llegando hasta las Islas San Cristóbal y Santa Ana) y **Oceanía Remota** (comprendida por todas las islas al este de las Islas Salomón, abarcando Hawái, Nueva Zelanda y Rapa Nui). En la Figura 1 se presenta un mapa del Pacífico indicando la división antigua y actual del territorio.

El asentamiento y posterior colonización del Pacífico se gestó en dos grandes procesos de migración. El primero, durante el pleistoceno (alrededor de 50.000 a 30.000 años AP), desde el sur de Asia, en el cual se poblaron Australia y Nueva Guinea. El segundo movimiento ocurrió durante el holoceno (entre 5.000 a 1.000 años AP), por poblaciones que salieron desde Taiwán y Filipinas y el sudeste de Asia y se asentaron en las pequeñas islas deshabitadas frente a las costas de Nueva Guinea. Esta expansión se caracterizó por el surgimiento de la cultura Lapita, pueblo originado hace aproximadamente 5.000 años AP, de habla austronésica, y la cual se ha sugerido dio inicio a la colonización de Oceanía Remota (Kirch, 2010; Matisoo-Smith, 2015). Esta última gran expansión hacia Oceanía Remota fue un proceso complejo que involucró diversas rutas de migración hacia las numerosas islas del Pacífico, lo que ha llevado a un gran debate en relación a la reconstrucción de estas rutas. El primer estudio holístico contemporáneo se realizó con la expedición Bayard Dominick en 1920, que recopiló datos arqueológicos que sentaron las bases para que estudios posteriores de mayor profundidad generasen diversas teorías sobre las migraciones en Oceanía Remota (Kirch, 2000).

Una pregunta de gran interés que se puede abordar mediante herramientas genético-moleculares es dilucidar cuáles fueron las rutas de migración hacia Oceanía Remota. No es fácil establecer una respuesta definida para esta pregunta, dado que la escala temporal es muy estrecha (no más de 5.000 años), tiempo que no es suficiente para estudios evolutivos convencionales.



**Figura 1: Rutas migratorias humanas a través del Pacífico.** Se indican los movimientos de las poblaciones pre-polinésicas y las dataciones aproximadas de cada pulso migratorio desde Taiwán hasta las islas del triángulo polinésico (Nueva Zelanda, Hawái y Rapa Nui). Se muestra además los dos sistemas de división de Oceanía: el de D’Urville, que separa Micronesia, Melanesia y Polinesia, y la separación actual de Oceanía Cercana y Remota (Matisoo-Smith, 2015).

## 1.2 Estudios genéticos asociados al poblamiento de la Polinesia

Los estudios genéticos han aportado significativamente a la comprensión de los orígenes de las poblaciones polinésicas. Una de las primeras evidencias concluyentes fue la identificación de altas tasas de mutaciones en los genes de la globina en poblaciones humanas contemporáneas de Oceanía Remota, las cuales solo podrían haber sido heredadas por los habitantes de Oceanía Cercana (Hill y cols., 1987), descartando la teoría de un posible origen americano (Heyerdahl, 1950).

También se han realizado estudios genéticos de restos arqueológicos humanos, como la identificación de una delección de nueve pares de bases en el ADN mitocondrial, denominado “motivo polinésico”. Este motivo está presente en polinésicos y habitantes contemporáneos de las islas del sudeste asiático (Hertzeberg y cols., 1989; Hagelberg y Clegg, 1993; Lum y Cann, 1998; Merriwether, 2002). La detección y estudio de distribución de este motivo fue usado para plantear un modelo de poblamiento para esta región que plantea una migración reciente y continua desde Taiwán hacia la región de Melanesia, poblando luego las islas de Oceanía Remota en un período de 2.000 a 3.000 años (Diamond, 1988). Sin embargo, también se han presentado nuevos cuestionamientos, como la aparente contradicción entre dos ideas respecto a las migraciones humanas por Oceanía Remota. La primera describe que el “motivo polinésico” favorece un modelo de migración reciente y continuo desde Taiwán hacia la región de Melanesia, poblando luego las islas de Oceanía Remota en un período de 2.000 a 3.000 años (Diamond, 1988). Sin embargo, estudios en el cromosoma Y no recombinante (NRY) mostraron un haplotipo sugerente de un origen de Oceanía Cercana en habitantes de Oceanía Remota (Kayser, 2000). Esto se puede

resolver a través de un modelo de residencia matrilocal entre los hablantes oceánicos tempranos, como los Lapita, donde los hombres de regiones comprendidas en Oceanía Cercana fueron reclutados a las comunidades Lapita, conciliando así ambas posturas (Kayser y cols., 2006; 2008; Jordan y cols., 2009). De esta manera, los análisis genéticos han demostrado ser una herramienta con gran potencial para ayudar a dilucidar las posibles rutas de poblamiento humano del Pacífico.

Los análisis genéticos de la población humana actual son muy útiles para estudiar la diversidad genética presente en los distintos grupos contemporáneos, pero éstos no reflejan necesariamente la diversidad genética de las poblaciones que realizaron los viajes colonizadores hace miles de años atrás, por lo que el enfoque más directo para abordar este tema es a través del análisis de ADN antiguo de restos humanos arqueológicos. Sin embargo, éste resulta ser un modelo complicado de trabajo debido a diversos factores, como la dificultad de la obtención de ADN antiguo, la calidad del ADN producto del clima tropical de la zona geográfica y por las limitaciones culturales que restringen el acceso a restos de antepasados polinésicos (Matisoo-Smith, 2015), y la diversidad genética ocasionada por eventos ajenos a la migración, como los traslados forzados, la esclavitud, mezcla con otras poblaciones y la introducción de enfermedades (Kirch, 2000). Una estrategia alternativa para complementar los estudios genéticos en humanos es el estudio de las especies estrechamente asociadas al hombre en Oceanía Remota, ya que pueden representar un reflejo de las rutas migratorias humanas en esta región.

### **1.3 Estudios de especies asociadas a los humanos en el poblamiento de la Polinesia**

Se sabe que los procesos migratorios de los polinésicos incluyeron el traslado intencional de numerosas especies animales y vegetales para asegurar su subsistencia (Kirch, 2010), las que pueden aportar información para la comprensión de los procesos migratorios. Se han analizado diversas especies animales y vegetales desde esta perspectiva. Un ejemplo es la rata polinésica (*Rattus exulans*), estudio realizado por Matisoo-Smith (2004). Este fue el primer estudio genético de especies asociadas al humano como reflejo de las rutas de migración en Oceanía Remota. En este trabajo se identificaron tres haplogrupos analizando mtDNA, siendo el haplogrupo IIIa correspondiente a muestras de Oceanía Remota. Esta distribución es muy similar a la de los restos materiales de la cultura Lapita. Los autores concluyen que estos resultados apoyan un modelo de origen desde el sudeste asiático, pero con intercambio cultural en la región de Melanesia.

Entre las especies asociadas al hombre, pero transportadas de manera no intencional se encuentra la lagartija *Lipinia noctua*, que fue llevada desde el archipiélago Bismarck hacia Oceanía Remota. Austin (1999) analizó una región del citocromo b y encontró genotipos distintivos entre el área nativa y la introducida. Otra especie transportada inconscientemente fue *Helicobacter pylori*. Moodley y cols. (2009) mostraron dos poblaciones en muestras de Oceanía: la denominada hpSahul, con dataciones de entre 23.000 a 32.000 años AP, confinada a Oceanía Cercana, y la población hpMaori, la cual se cree que acompañó la expansión austronésica desde Taiwán hace ~5.000 años AP y que se encuentra en muestras de Tonga, Samoa y Nueva Zelanda.

Muchas especies asociadas al hombre son nativas del sudeste asiático, por lo que pueden entregar información sobre las trayectorias humanas que se originaron específicamente en esa región, como el cerdo (Larson y cols., 2007) y el pollo (Storey y cols., 2007), por lo que involucrarían determinados componentes de las culturas austronésicas y Lapita (Matisoo-Smith, 2015). Por otra parte, diversas evidencias apuntan a que los navegantes prehistóricos del Pacífico llegaron hasta las costas de América. Por ejemplo, estudios en *Gallus gallus* han relacionado mtDNA de restos arqueológicos de Samoa, Tonga e Isla de Pascua con restos encontrados en El Arenal, en la Península de Arauco, Chile (Storey, 2007; Fitzpatrick, 2009). Esta información se vería complementada con restos humanos en Isla Mocha (Houghton, 1996).

Los colonizadores polinésicos introdujeron además una gran cantidad de especies vegetales. Se han documentado alrededor de 70 especies introducidas a Oceanía Remota, aunque no todas alcanzaron a llegar hasta las islas más lejanas (Whistler, 2009). Entre ellas, se han estudiado la planta de ti (*Cordyline fruticosa*; Hinkle, 2007), el taro (*Colocasia esculenta*; Matthews, 2004; Horrocks y cols., 2007) y el árbol del pan (*Artocarpus altilis*, Zerega y cols., 2004). La mayoría de las especies vegetales estudiadas tienen importancia principalmente por ser fuente de alimento, mas no suponen necesariamente un traslado relacionado íntimamente con otros aspectos de su cultura. Además, de manera similar a las especies animales, las plantas introducidas también presentan distintos orígenes. Algunos ejemplos son el camote (*Ipomoea batatas*), que fue introducida por los navegantes polinésicos hacia las islas del Pacífico desde América (Hather y Kirch, 1991; Roullier y cols., 2013); la calabaza (*Lagenaria siceraria*), que fue introducida a Polinesia desde América y Asia, presentando un origen dual (Clarke y cols., 2006; Kistler y cols., 2014). La morera de papel o *Broussonetia papyrifera*, proveniente del sudeste asiático, ha sido ampliamente distribuida en Polinesia debido a su uso para la fabricación de textiles, convirtiéndola en un excelente modelo de estudio.

#### **1.4 *Broussonetia papyrifera* como modelo de estudio**

Entre las especies estrechamente asociadas a los humanos en Oceanía Remota, destaca la morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.: Moraceae), una planta dioica perteneciente a la familia de las Moráceas. Esta especie es nativa de países del este asiático como Tailandia, China y Taiwán (Zerega y cols., 2005). Crece como arbusto o árbol alcanzando los 12 metros o más, pero por lo general en Oceanía es mantenida a una altura de tres o cuatro metros de altura (Whistler, 2006). Sus hojas tienen formas altamente variables, incluso en la misma planta, desde ovaladas hasta con tres a cinco lóbulos (Seelenfreund y cols., 2010). La floración entre individuos femeninos y masculinos es distintiva: las plantas femeninas presentan flores de dos a cuatro periantos lobulados y un ovario superior, mientras que las plantas masculinas consisten en flores delgadas y cilíndricas de hasta 8 cm, de cuatro tépalos y cuatro estambres inflexos en el brote, que se agrupan en racimos (Whistler, 2006).

La morera de papel se ha registrado como una de las pocas especies vegetales que fue introducida hasta las islas más lejanas del Pacífico, como Hawái, Nueva Zelanda y Rapa Nui (Lebot y cols., 1997). Su nombre varía de acuerdo a su localización, como, por ejemplo, *wauke* en Hawái, *aute* en

Nueva Zelanda, y *mahute* en Rapa Nui (Matthews, 1996; Whistler, 2006) sugiriendo una relación lingüística entre las distintas islas de Oceanía Remota.

La corteza de *B. papyrifera* se utiliza para la fabricación de papel de alta calidad en Japón y China, el cual es empleado en libros y en actos ceremoniales (Berker, 2002), aunque también tiene usos en la medicina tradicional en Asia (Sun y cols., 2012). En Oceanía Remota es considerada una especie de gran importancia cultural, pues su corteza se utiliza como fuente de fibras para fabricar textiles (conocidos como *tapa*), brindando productos valorados debido a su durabilidad, calidez, suavidad y flexibilidad, los cuales se usan con propósitos ceremoniales y como símbolo de riqueza (Seelenfreund y cols., 2010). Su uso fue generalizado en las islas del Pacífico, pero fue reemplazado por textiles basados en otros materiales como el algodón, por la influencia europea, aunque su uso sigue vigente en Tonga, Fiyi y otras islas (Seelenfreund y cols., 2010). En la actualidad, esta planta es cultivada mediante reproducción vegetativa, a través de esquejes o brotes de raíces (Seelenfreund y cols., 2010).

Debido a la importancia cultural que representa la morera de papel en distintas islas del Pacífico y su presencia en numerosas islas de Oceanía Remota, es que resulta un modelo atractivo para estudiar su diversidad genética mediante distintos marcadores moleculares y relacionarla con las teorías de migración humana y poblamiento de Oceanía Remota.

### **1.5 Uso de marcadores moleculares en *B. papyrifera***

Los marcadores moleculares se definen como un segmento identificable de ADN con dos o más variantes polimórficas o alelos, con los que es posible rastrear su herencia (Goodfellow, 1992; Pagon y cols., 1993). Estos marcadores difieren respecto a su distribución en el genoma, nivel de polimorfismos detectados, especificidad del *locus*, reproducibilidad, requerimientos de la técnica y costos (Agarwal y cols., 2008). En estudios de diversidad genética en plantas, los marcadores más utilizados son microsatélites (SSR), AFLP, RAPD e ISSR, entre otros (Weising y cols., 2005).

En el estudio de la diversidad genética de la morera de papel se han empleado diversos marcadores moleculares, tales como SRAP (Zhiyuan y cols., 2009) e ISSR (Ho y Chang, 2006; Liao y cols., 2014) en muestras de China y Taiwán, así como ITS (Seelenfreund y cols., 2011), ISSR (González y cols., 2015), marcador de sexo (Peñailillo, 2013), regiones de cloroplastos (Chang y cols., 2015), y microsatélites (Peñailillo, 2013; Olivares, 2016) en Asia y Oceanía Remota. Los resultados obtenidos muestran una gran diversidad genética en el hábitat nativo, mientras que en la región introducida detectan una baja diversidad genética. Mediante el análisis de la región ribosomal ITS-1 se identificó una transversión nucleotídica específica que distingue las muestras de origen nativo (nucleótido G) de las muestras provenientes de la región introducida (nucleótido T) (Seelenfreund y cols., 2011). Los marcadores de regiones entre microsatélites, ISSR, y de la región de cloroplasto *ndhF-rpl32* básicamente no mostraron diferencias entre muestras de Oceanía Remota (González y cols., 2015; Chang y cols., 2015). Mediante el marcador de sexo se encontró que en el área nativa co-existen individuos de sexo masculino y femenino, mientras que

en el área introducida solo se encontraron individuos femeninos (Peñailillo, 2013). Sin embargo, en Hawái también se identificaron individuos de ambos sexos y, al igual que con marcadores ISSR, se observan genotipos diferentes a los encontrados en las muestras de Oceanía Remota. Estos datos sugieren que estos individuos fueron introducidos a Hawái en tiempos históricos desde Asia (González-Lorca, 2015). Mediante marcadores de microsátélites se ha encontrado diversidad en Oceanía Remota, en estudios que aún se encuentran en desarrollo (Peñailillo, 2013; Payacán, 2015; Olivares, 2016).

Dada la baja diversidad genética encontrada con la mayoría de los marcadores estudiados entre las muestras del área introducida, es de interés probar estrategias diferentes utilizando marcadores moleculares dirigidos a otras regiones del genoma que presenten alta variabilidad, como son los elementos móviles.

## **1.6 Elementos móviles**

Los elementos móviles son secuencias que comprenden una importante fracción del genoma de los organismos eucariontes. Los elementos móviles se dividen en dos grupos: los de Clase I, que corresponden a retrotransposones basados en ARN que se replican gracias a la transcriptasa inversa, y los de Clase II, correspondientes a transposones basados en ADN cuya movilización e inserción es llevada a cabo por medio de una transposasa. La activación de los elementos móviles puede deberse a factores estresores bióticos o abióticos (Kimura y cols., 2001; Wessler y cols., 1996) o bien, mediante cambios epigenéticos, como la disminución en la metilación del ADN (Cheng y cols., 2006). Los efectos de la transposición de elementos móviles tiene múltiples consecuencias, tales como la pérdida de la función de algunos genes, inducción de cambios regulatorios y epigenéticos, o incluso cambios en la estructuración genómica (revisado por Bonchev y Parisod, 2013).

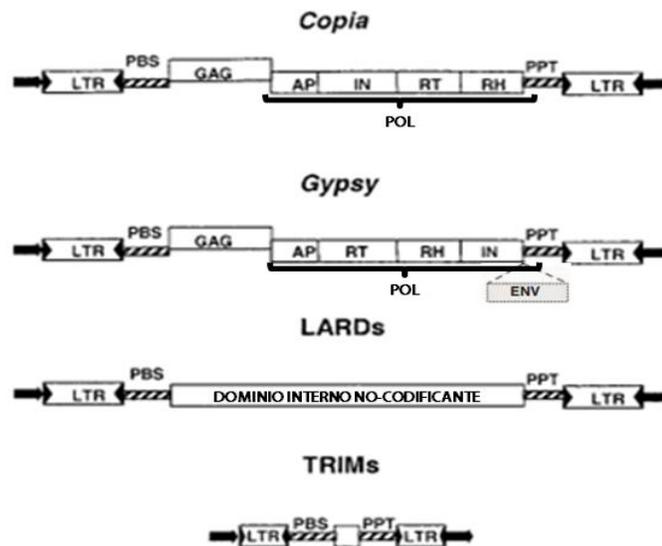
Los retrotransposones son ubicuos y abundantes dentro del reino vegetal (Kumar y Bennetzen, 1999; Freschotte y cols., 2002), llegando a constituir el 90% del genoma de algunas especies como el trigo (Sabot y cols., 2005). Se han estudiado en diferentes especies vegetales, como cítricos (Breto y cols., 2001; Bernet y cols., 2004), plátano (Teo y cols., 2005), leguminosas (Smykal, 2006) y vides (Villano y cols., 2014), entre muchas otras especies.

En este grupo de elementos móviles destacan los retrotransposones que poseen repeticiones terminales largas (*Long Terminal Repeats* o LTR), debido a que se encuentran en mayor proporción y son más activos que aquellos sin LTR, como los LINEs (*Long Interspersed Nuclear Element*) y SINEs (*Short Interspersed Nuclear Element*). En plantas cultivadas, alrededor del 40% al 70% del ADN total corresponde a retrotransposones con LTR (Pearce y cols., 1996; SanMiguel y cols., 1996; Shirasu y cols., 2000).

Los retrotransposones han sido ampliamente estudiados debido a que cada uno de ellos incorpora un número considerable de nucleótidos al genoma hospedero (desde cientos de pares de bases hasta kilobases), generando cambios fáciles de detectar (Kalendar y cols., 2011). La principal ventaja de los retrotransposones radica en que su transposición es un evento único y que el material genético integrado no tiene la capacidad de escindir por sí mismo, lo que le confiere gran importancia en estudios de reconstrucción de *pedigree* y filogenias, dada la mantención de inserciones ancestrales (Kalendar y cols., 2011).

Los retrotransposones que poseen LTR se dividen a su vez en dos superfamilias que corresponden a los elementos *Copia* (o Ty1) y los elementos *Gypsy* (o Ty3), las cuales presentan dos marcos de lectura abierto comunes: GAG (*Group-Specific Antigen*), para la proteína de la cápside, necesaria para el empaquetamiento del transcrito de manera similar a como lo hacen los virus; y POL, que codifica las enzimas del elemento móvil que incluye una actividad proteasa, una integrasa, una transcriptasa inversa y una RNasa (Figura 2). Los elementos *Copia* se diferencian de los *Gypsy* respecto a la disposición de los genes en el dominio POL. Además, algunos elementos *Gypsy* poseen un marco de lectura abierto adicional llamado ENV, cuya proteína participa en la envoltura de los retrovirus. En plantas, actualmente no se le atribuye ninguna función conocida (Weising y cols., 2005; Kalendar y cols., 2011). Se han descrito otros retroelementos que poseen LTR, como los terminales repetidos de retrotransposón en miniatura (*Terminal-repeat Retrotransposon In Miniature* o TRIM), correspondientes a elementos de aproximadamente 600 pb (Witte y cols., 2001), y los derivados grandes de retrotransposones (*LArge Retrotransposon Derivatives* o LARD), retroelementos que comprenden LTR de 4,4 kb y una región central de entre 3 a 5 kb. Los TRIMs y LARDs se caracterizan por ser retroelementos no autónomos que carecen de marcos de lectura abiertos funcionales para la síntesis de sus proteínas, por lo que requieren de un retroelemento autónomo para su transposición (Bonchev y Parisod, 2013).

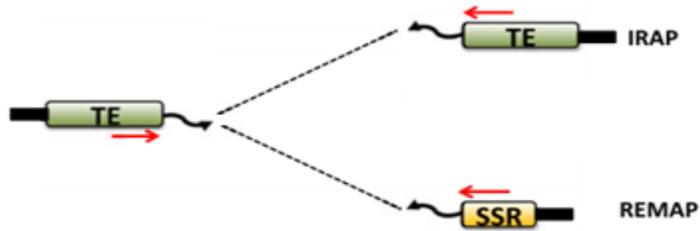
A pesar de las diferencias estructurales entre estos tipos de retroelementos con LTR, en general éstos poseen motivos conservados, como la secuencia de la transcriptasa inversa (RT), la de RNasa H (RH) (para retroelementos *gypsy* y *copia*), la del sitio de unión a partidores (PBS), y la del tracto polipurina (PPT) (para todos los retroelementos con LTR, Figura 2) (Guo y cols., 2014).



**Figura 2: Organización de genes de los retrotransposones con LTR.** Disposición de genes en las superfamilias *Copia*, *Gypsy*, LARD y TRIM. Se muestran los dominios LTR, sitio de unión a partidores (PBS), GAG: proteína de superficie, y las diferentes enzimas que conforman el gen POL (AP: proteasa aspártica, IN: Integrasa, RT: Transcriptasa inversa, y RH: RNasa H), ENV (para algunos retrotransposones *Gypsy*), y el tracto de polipurina (PPT). Figura modificada de Kalendar y cols. (2004).

### 1.7 Marcadores basados en elementos móviles: IRAP y REMAP

Debido al gran potencial informativo que ofrecen los retroelementos como marcadores moleculares, se han diseñado diversas aproximaciones experimentales para su empleo, basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, o PCR). Entre los marcadores destacan los *Inter-Retrotransposon Amplification Polymorphisms*, o IRAP, y los *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphisms*, o REMAP. La técnica de IRAP permite amplificar regiones entre dos LTR de retroelementos próximos, ya sean del mismo elemento, o entre elementos de la misma o de distintas familias. La técnica de REMAP amplifica regiones entre el LTR de un retroelemento y un microsatélite próximo (Figura 3). Las ventajas principales de IRAP y REMAP son que no requieren conocimiento previo del genoma en estudio, detectan polimorfismos sin la necesidad de digerir con enzimas de restricción o incluir etapas de ligación, y además los productos de PCR se pueden resolver en una electroforesis en gel de agarosa convencional (Kalendar y cols., 2007).



**Figura 3: Marcadores moleculares basados en retrotransposones.** Se muestran las regiones a amplificar mediante IRAP y REMAP: TE (región del retroelemento) y SSR (región de microsátélite). Figura modificada de Bochev y cols. (2013).

Si bien hasta la fecha el genoma de *B. papyrifera* no se ha secuenciado, y por lo tanto se desconoce la abundancia y naturaleza de retroelementos presentes en esta especie, sí se ha secuenciado el genoma de *Morus notabilis*, perteneciente a la misma familia. Esta especie posee un tamaño de genoma de 330 Mb y se han identificado más de 30.000 secuencias correspondientes a retroelementos (Li y cols., 2014). Mediante citometría de flujo se ha determinado que *B. papyrifera* tiene un tamaño de genoma de aproximadamente 500 Mb (Yamanouchi y cols., 2010). Este dato sugiere que *B. papyrifera*, una especie con un genoma estimado de mayor tamaño, también posea una amplia variedad y probablemente un mayor número de retroelementos.

### 1.8 Planteamiento del problema

Esta memoria está enmarcada en un proyecto que utiliza a la morera de papel como modelo para estudiar rutas de migración y poblamiento humano en Oceanía Remota, a través de estudios de diversidad genética mediante el análisis de marcadores moleculares. Es interesante explorar el uso de marcadores moleculares basados en retrotransposones, que hasta nuestro conocimiento no han sido empleados en *B. papyrifera*. Debido a que esta planta presenta baja diversidad genética dentro de Oceanía Remota, resulta atractivo evaluar marcadores moleculares basados en retrotransposones, los cuales se ha descrito presentan mayor fuente de variación genética en especies vegetales que otros marcadores moleculares (Carrier y cols., 2012). El propósito de esta memoria de título es detectar una mayor diversidad genética en muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota y complementar estos resultados con los datos previos obtenidos en el laboratorio con otros marcadores moleculares.

## 2 Hipótesis

El estudio de *B. papyrifera* por medio de marcadores moleculares basados en retrotransposones IRAP y REMAP, permite detectar diversidad genética presente en muestras obtenidas de Oceanía Remota que no han sido diferenciadas mediante otros marcadores moleculares.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Caracterizar la diversidad genética de muestras de *B. papyrifera* provenientes de Oceanía Remota usando dos tipos de marcadores moleculares basados en retrotransposones, IRAP y REMAP para evaluar el potencial informativo de estos marcadores en la búsqueda de mayor diversidad genética en muestras de Oceanía Remota.

### 3.2 Objetivos Específicos

**1. Identificar la presencia de retrotransposones en *B. papyrifera*.**

Se buscarán secuencias de retroelementos en bases de datos y/o de la literatura y se diseñarán partidores a partir de dichas secuencias. Además, se corroborará que las secuencias amplificadas corresponden a retroelementos.

**2. Seleccionar marcadores de IRAP y REMAP para el análisis de muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota**

Se realizarán combinaciones de partidores de retroelementos entre ellos o con partidores de regiones de microsatélites para amplificar muestras de *B. papyrifera* e identificar y seleccionar aquellas combinaciones que presenten un mejor desempeño para su aplicación como IRAP y REMAP, respectivamente.

**3. Caracterizar muestras de *B. papyrifera* por medio de IRAP y REMAP para evaluar la diversidad genética obtenida en muestras de Oceanía Remota.**

Se usarán los marcadores escogidos de IRAP y REMAP para efectuar el análisis genético de muestras de *B. papyrifera* provenientes de Oceanía Remota.

**4. Comparar la diversidad genética obtenida con IRAP y REMAP, y otros marcadores moleculares utilizados en *B. papyrifera* para evaluar el potencial informativo que entregan los marcadores basados en retroelementos.**

Se estudiará la diversidad genética obtenida con IRAP y REMAP. Posteriormente se realizará un análisis comparativo con la diversidad genética encontrada con otros marcadores moleculares.

## 4 Materiales y Métodos

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Reactivos e insumos generales

**Axygen Inc., Corning Life Sciences (Corning, Nueva York, E.E.U.U.):** sistema comercial AxyPrep™ Plasmid Miniprep.

**Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, Nueva Jersey, E.E.U.U.):** Bacto™ Agar, Bacto™ extracto de levadura, Bacto™ triptona.

**Biotium (Hayward, California, E.E.U.U.):** GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10.000X en DMSO.

**Clean Ice S.A. (Santiago, Chile):** nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>).

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

**Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, California, E.E.U.U.):** TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido).

**Life Technologies (Carlsbad, California, E.E.U.U.):** Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit.

**Merck (Darmstadt, Alemania):** alcohol isoamílico p.a., β-mercaptoetanol, cloroformo p.a., cloruro de magnesio, etanol absoluto, glucosa, sílica gel, sulfato de magnesio p.a.

**Promega (Madison, Wisconsin, E.E.U.U.):** ADN polimerasa GoTaq G2; dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP; cloruro de magnesio; tampón Green GoTaq flexi 5X, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido).

**Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, E.E.U.U.):** bromuro de etidio, CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), BSA (albúmina de suero bovino), sulfato de kanamicina.

**Thermo Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, E.E.U.U.):** tampón de carga 6X, estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus, placas negras de poliestireno Nunc™ F96 MicroWell™.

**US Biological (Swampscott, Massachussets, E.E.U.U.):** Tris-Base, EDTA, ácido bórico, ARNasa A.

**Vetec Analytical Reagents:** cloruro de sodio p.a.

**Winkler Ltda. (Santiago, Chile):** tampón TBE 10X.

**Zymo Research (Irvine, California, E.E.U.U.):** sistema comercial DNA Clean & Concentrator™ -5.

#### 4.1.2 Soluciones y tampones

**Cloroformo - alcohol isoamílico (24:1 v/v).**

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

**Etanol:** etanol 70%, etanol 76%, etanol absoluto.

**Medio Agar LB:** NaCl 1% m/v, triptona 1% m/v, extracto de levadura 0,5% m/v, agar 1,5% m/v.

**Medio SOC:** triptona 0,5% m/v, extracto de levadura 0,5% m/v, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM, glucosa 0,4% m/v.

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

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

**Solución concentrada de BSA:** 5 mg/mL, preparada en NaCl 100 mM.

#### 4.1.3 Equipamiento

**Bio-Rad (Hercules, California, E.E.U.U.):** equipo de electrotransformación: Gene Pulser, Pulse Controller y Capacitance Extender, fuente de poder PowerPac 3000.

**Biotek (Winooski, Vermont, E.E.U.U.):** lector de microplacas multimodal Synergy Mx.

**HAAKE (Karlsruhe, Alemania):** baño termostático DC1-K15.

**Heal Force (Shangai, China):** termociclador Genemate T960.

**Heraeus Instruments (Hanau, Alemania):** centrífuga Heraeus Biofuge Pico.

**Hettich (Tuttlingen, Alemania):** centrífuga Hettich®-Zentrifugen Mikro 22R, rotor 1153.

**Lab-Line Instruments (Kerala, India):** agitador termostático Environ Shaker 3527-1.

**Nikon Corporation (Tokio, Japón):** cámara fotográfica digital Nikon E4300.

**Savant Instruments (Farmingdale, Nueva York, E.E.U.U.):** concentrador Speedvac Savant ISS110 Integrated SpeedVac System.

**Thermo Scientific (Wilmington, Delaware, E.E.U.U.):** espectrofotómetro Nanodrop 2000, Termociclador PX2, fuente de poder Owl™ EC-105.

**Wealtec (Sparks, Nevada, E.E.U.U.):** transiluminador MD-20 UV.

**Syngene (Cambridge, Inglaterra):** capturador de imagen de fluorescencia Syngene G:BOX Chemi XT4.

#### 4.1.4 Programas computacionales

**Biology Assets:** GenAEx (Genetic Analysis in Excel) versión 6.5.

**Charles University (Praga, República Checa):** FreeTree.

**CLC bio, Qiagen® (Prismet, Dinamarca):** CLC Sequence Viewer 7.

**Exeter Software (Setauket, Nueva York, E.E.U.U.):** NTSYSpc, *Numerical Taxonomy System*.

**NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. Library of Medicine):** BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), VecScreen (*Screen a Sequence for Vector Contamination*).

**University of Glasgow (Glasgow, Reino Unido):** TreeView.

#### 4.1.5 Obtención de muestras de *B. papyrifera*

En el marco de los proyectos FONDECYT 1080061 y 1120175 se generó un banco genómico con más de 400 muestras de hojas de *B. papyrifera* recolectadas en Asia y en distintas islas de Oceanía. Para la realización de esta memoria de título se usaron 60 muestras de este banco, de las cuales 13 proceden de diversas localidades de Asia (Vietnam, Japón y Taiwán), 42 muestras provienen de las islas de Oceanía Remota (Fiyi, Tonga, Samoa, Hawái, Tahití, Islas Marquesas y Rapa Nui) y tres de Chile continental. Estas últimas corresponden a especímenes ubicados en el Parque Arrieta, Peñalolén, Santiago. Estas muestras se utilizaron solamente como muestras de prueba, debido a que son las únicas accesibles y abundantes, y no se consideraron para el análisis de diversidad genética. Se emplearon además como grupos externos muestras de *B. kazinoki* provenientes de Japón y *Ficus carica* (higuera) de Chile. Las muestras de Taiwán fueron enviadas gentilmente por el Dr. Kuo-Fang Chung (National University of Taiwan, Taipei, Taiwán), mientras que las muestras japonesas, vietnamitas y la de *B. kazinoki* fueron facilitadas por el Dr. Peter Matthews (National Museum of Ethnology, Kioto, Japón). El número de muestras empleadas por localidad se muestra en las Tablas 1 y 2 que se detallan en el Anexo 1.

**Tabla 1: Localidades y número de muestras de *B. papyrifera* utilizadas en esta memoria de título.**

	País / Región	Isla / Localidad	Nº de muestras
Hábitat nativo	Vietnam	Sapa	1
		Hanoi	1
		Ba vi	3
	Japón	Kioto	4
	Taiwán	Taichung	2
		Distrito de Wulai	2
Oceanía Remota	E.E.U.U.	Hawái	11
	Fiyi	Viti Levu	1
	Tonga	Tongatapu	8
	Samoa	Savaii	3
		Upolu	1
	Polinesia Francesa	Tahití	1
		Islas Marquesas	4
	Chile Insular	Rapa Nui	13
Chile Continental	Santiago (Parque Arrieta)	3	
	<b>Total</b>	<b>58</b>	

**Tabla 2. Localidades y número de muestras de grupos externos utilizados en esta memoria de título.**

Muestra	País / Región	Localidad	N° de muestras
<i>Ficus carica</i>	Chile Continental	Santiago	1
<i>Broussonetia kazinoki</i>	Japón	Tokio	1
<b>Total</b>			<b>2</b>

#### 4.1.6 Material microbiológico

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : Células electrocompetentes preparadas en el laboratorio.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Extracción de ADN genómico de muestras de *B. papyrifera*

Se extrajo ADN de las muestras de hoja de morera de papel utilizando el método de Lodhi y cols., (1994) modificando la concentración de  $\beta$ -mercaptoetanol (de 0,1 a 1%) y eliminando el uso de PVP. Este método consiste en homogeneizar el tejido vegetal en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y agregando posteriormente 800  $\mu$ L de tampón de extracción (EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%). El homogeneizado se transfirió a un microtubo de 2 mL y se incubó a 60°C durante 25 minutos. Luego, este tubo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 600  $\mu$ L de solución cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, agitando suavemente por inversión para aumentar la superficie de contacto de las proteínas y restos celulares apolares del tejido vegetal con la fase orgánica. Se centrifugó a 6000 rpm (3420 g) durante 15 minutos para separar la fase acuosa de la orgánica. Se recuperó la fase acuosa, se transfirió a un nuevo microtubo de 1,5 mL y luego se agregó 225  $\mu$ L de NaCl 5 M. El ADN se precipitó agregando 900  $\mu$ L de etanol absoluto guardado a -20°C. Se agitó suavemente por inversión y se dejó a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm (805 g) durante 3 minutos y luego a 6000 rpm (3420 g) durante otros 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionó etanol 76% para disolver el exceso de sal remanente. Se centrifugó a 6000 rpm (3240 g) durante 5 minutos y nuevamente se descartó el sobrenadante, para luego eliminar el etanol restante secando los microtubos en un concentrador SpeedVac. Finalmente, a cada tubo se le agregaron 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y 1  $\mu$ L de ARNasa para degradar el ARN que pudiese interferir en la pureza del ADN o en posteriores análisis. Se incubó a 37°C durante 40 minutos y el ADN extraído se almacenó a -20°C.

El protocolo de extracción se realizó de manera equivalente para las extracciones de ADN genómico de las muestras utilizadas como grupos externos.

#### 4.2.2 Análisis de integridad de ADN genómico

Tanto las muestras de ADN del banco genómico como las extraídas para la realización de esta memoria se analizaron para determinar su integridad. Esta prueba consistió en una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X. Se cargaron 5 µL de ADN genómico junto a 1 µL de GelRed 100X y 1 µL de tampón de carga 6X. En cada gel se incorporó un estándar de peso molecular de ADN 1 kb Plus. La electroforesis se realizó a 80 V durante 1 hora y el ADN en los geles se visualizó mediante luz UV ( $\lambda=320$  nm) en un transiluminador.

#### 4.2.3 Cuantificación del ADN genómico y determinación de la pureza del ADN

La concentración de las muestras se determinó mediante fluorescencia en un lector de microplacas multimodal Synergy Mx utilizando el sistema comercial Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Ahns y cols., 1996; Singer y cols., 1997). Para determinar el grado de pureza de las muestras, se empleó la razón de absorbancias 260 nm/280 nm entregadas por el equipo Nanodrop. Se utilizaron aquellas muestras cuyas razones de absorbancias se encontraban entre 1,8 – 2,0 para los análisis posteriores, lo cual es considerado ADN con un grado de pureza adecuado (Sambrook y cols., 1989).

#### 4.2.4 Selección de partidores para IRAP y REMAP

Se analizaron partidores para IRAP y REMAP seleccionados a partir de la literatura. Los partidores de regiones LTR para IRAP y REMAP se obtuvieron de lo informado por Kalendar y Schulman (2014) (Tabla 3 y 4). Los partidores de regiones de microsatélites se obtuvieron de lo informado por Ho y Chang (2006) y utilizados por González-Lorca y cols. (2015) (Tabla 5). En el caso de REMAP, las parejas de partidores fueron escogidas en relación a la cercanía de la temperatura de apareamiento de los partidores LTR con los partidores ISSR, de acuerdo a lo reportado por González-Lorca y cols. (2015).

**Tabla 3: Partidores escogidos de retroelementos y temperaturas de apareamiento para IRAP.**

Código	Secuencia (5' → 3')	Temp. de apareamiento (T <sub>m</sub> ), °C
BREP F	TTCAAGATTTCTGACCTTTCG	50,6
BREP R	CCAGTGGCACATCAAAACAAAA	54,7
IRAP-TDK11F	AGGTATGGTTTCAAGATGATGGATG	54,9
Sukkula	GATAGGGTCGCATCTGGGCGTGAC	63,4
5'LT R2-BARE-1	ATCATTCTCTAGGGCATAATTC	49,8
3'LT R-BARE-1	TGTTTCATGCGACGTTCAACA	55,2
Nikita	CGCATTGTTCAAGCCTAAACC	54,9
LTR6150-BARE-1	CTGGTTTCGGCCATGTCTATGTATCACACATGTA	62,2
P-Tst-6	ACTAAATCTGCCTACTCATTCAACACTC	56,6

Partidores informados por Kalendar y Schulman (2014).

**Tabla 4: Partidores escogidos de retroelementos y temperaturas de apareamiento para REMAP.**

Código	Secuencia (5' → 3')	Temp. de apareamiento (T <sub>m</sub> ), °C
LTR2105	ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA	55,1
LTR2118	GTAGATAATATAGCATGGAGCAATC	51,2
LTR2119	AGCCACTAGTGAAACCTATGG	54,1
LTR2121	ACTGGATTGATACCTTGGTTCTCAA	56,0

Partidores informados por Kalendar y Schulman (2014).

**Tabla 5: Partidores escogidos de regiones de microsatélites para REMAP.**

Código	Secuencia (5' → 3')	Temp. de apareamiento (T <sub>m</sub> ), °C
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC	56,0
UBC825	ACACACACACACACT	53,0
UBC827	ACACACACACACACAG	53,0
UBC855	ACACACACACACACACYT	50,0
UBC856	ACACACACACACACACYA	50,0
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTC	53,0
UBC888	BDBCACACACACACACA	56,0
UBC889	DBDACACACACACACAC	56,0
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	58,0

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. Partidores informados por Ho y Chang (2006) y González-Lorca y cols. (2015).

#### 4.2.5 Caracterización de retroelementos mediante clonamiento

##### 4.2.5.1 Selección de muestras y ligación en el plasmidio pCR™4-TOPO®

Con el propósito de caracterizar una secuencia de un retrotransposón en *B. papyrifera* se seleccionaron dos muestras, BQUCH139 (Taiwán) y BQUCH144 (Japón), para realizar un clonamiento de productos PCR usando el sistema comercial TOPO®TA Cloning® kit for Sequencing. Primero, se realizó PCR a las muestras seleccionadas utilizando el protocolo IRAP sin modificaciones, según lo indicado por Kalendar y Schulman (2007), utilizando el partidor Sukkula. Para realizar la ligación se prepararon en un microtubo de 0,2 mL: 3 µL de producto de PCR, 1 µL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 1 µL de solución salina entregada por el sistema comercial y 1 µL de la solución que contiene el vector (volumen final: 6 µL). Se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción se detuvo depositando los microtubos en hielo.

#### 4.2.5.2 Electrotransformación en células electrocompetentes

Previo a la electrotransformación se realizó una microdiálisis de la reacción de ligación para eliminar las sales que pudiesen interferir en la electroporación. Para ello, se preparó una placa Petri con agua destilada estéril y se depositó una membrana de nitrocelulosa en la superficie. Luego, se transfirieron cuidadosamente los 6  $\mu\text{L}$  de producto de ligación sobre la membrana de nitrocelulosa y dializó durante 15 minutos. Finalmente, se tomaron 3  $\mu\text{L}$  del producto dializado y se mezclaron con 50  $\mu\text{L}$  de bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes suspendidas en glicerol al 10%, mezclando suavemente. Se transfirió la mezcla a cubetas de electroporación de 0,1 cm de separación de electrodos. Se realizó la electrotransformación de acuerdo a los siguientes parámetros: Gene Pulser ajustado a 25  $\mu\text{F}$  y 1,8 kV, Pulse Controller a 200  $\Omega$  con un campo de 12,5 kV/cm. Posteriormente, se retiró rápidamente la cubeta y se recuperaron las bacterias transformantes con 1 mL de medio SOC, se resuspendieron suavemente, y se transfirieron a tubos de ensayo estériles. Se incubaron en agitador Environ Shaker a 37°C y 200 rpm durante 1 hora. Luego, se sembraron 50 ó 150  $\mu\text{L}$  de cultivo en placas de agar LB/kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con 50  $\mu\text{L}$  de indicador X-gal 20 mg/mL y 50  $\mu\text{L}$  de inductor IPTG (100 mM). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se confirmó la presencia del inserto por la formación de colonias blancas producto del sistema de selección mediante  $\alpha$ -complementación y se realizó un recuento de colonias transformantes por placa.

#### 4.2.5.3 PCR de colonias

Se traspasaron las colonias transformantes a una nueva placa de agar LB/kanamicina  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la cual se incubó a 37°C durante 24 horas. A partir de esta placa, se realizaron PCR de colonias siguiendo el protocolo de reacción y amplificación indicado en las Tablas 6 y 7, respectivamente.

**Tabla 6: Protocolo de PCR IRAP de colonias.**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
ADN (ng)	-	-
Tampón	5X	1X
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	2,5
dNTPs (mM)	25	0,625
Partidor Sukkula ( $\mu\text{M}$ )	5	0,275
Polimerasa (U/ $\mu\text{L}$ )	5	0,05
<b>Volumen final (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	-	<b>50</b>

**Tabla 7: Programa de amplificación PCR IRAP de colonias.**

Etapa		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturación inicial		94	4 min.
33 ciclos	Desnaturación	94	1 min.
	Apareamiento	53	1 min.
	Extensión	72	2 min.
Extensión final		72	5 min.

Los amplicones obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 0,5X. Se purificaron los plasmidios de las bacterias que presentaron amplificación positiva.

#### **4.2.5.4 Purificación de productos de PCR**

Los productos PCR positivos obtenidos mediante PCR de colonias se purificaron usando el sistema comercial DNAeasy DNA Clean & Concentrator™-5 para la secuenciación de los amplicones generados siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### **4.2.5.5 Purificación de plasmidios pCR™4-TOPO®**

Se identificaron las colonias blancas de *E. coli* (que contienen el inserto) y se inocularon en un tubo de ensayo estéril que contenía 5 mL de medio SOC con kanamicina 50 µg/mL. Se incubaron en agitador Environ Shaker a 37°C y 200 rpm durante 16 horas. La purificación de los plasmidios se llevó a cabo mediante el sistema comercial AxyPrep™ *Plasmid Miniprep* para su posterior secuenciación, según las especificaciones del fabricante.

#### **4.2.5.6 Secuenciación de plasmidios y productos de PCR purificados**

Los productos de PCR de colonias y los plasmidios purificados fueron secuenciados en MacroGen (Seoul, Korea) usando el servicio de secuenciación estándar y partidores Sukkula para los productos de PCR, o partidores universales para la secuenciación de plasmidios (M13F y M13R-pUC).

#### **4.2.5.7 Análisis de secuencias de plasmidios y productos de PCR**

Las secuencias de plasmidios obtenidas se analizaron con la herramienta VecScreen para identificar la secuencia del vector, las cuales posteriormente se removieron con el programa CLC Sequence Viewer. Luego, estas secuencias editadas junto a las secuencias de productos de PCR se sometieron a un alineamiento usando la herramienta BLASTn, con el propósito de comparar las secuencias obtenidas respecto a la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

#### 4.2.6 Estandarización del protocolo de amplificación con marcadores IRAP y REMAP

##### 4.2.6.1 Optimización de la reacción de PCR para marcadores IRAP y REMAP

Se utilizó el protocolo de PCR basado en las publicaciones del grupo de Kalendar (1999, 2007) para IRAP y REMAP. Se realizaron modificaciones de las concentraciones de los reactivos para favorecer el patrón de bandeo obtenido. En la Tabla 8 se muestran las condiciones finales definidas en esta memoria para realizar los análisis de PCR para IRAP y REMAP. Se seleccionaron aquellos partidores que mostraron un patrón legible de bandeo. Se realizaron PCR en gradientes de temperatura (50-60°C) para los partidores preseleccionados. Se seleccionaron aquellos que mostrasen el mejor patrón, consistente en la mayor cantidad de bandas distinguibles. Esta optimización se realizó en base a cuatro muestras de *B. papyrifera* escogidas, provenientes de Oceanía Remota, mostradas en la Tabla 9.

**Tabla 8: Concentraciones finales para el protocolo de PCR con marcadores IRAP y REMAP.**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	
		IRAP	REMAP
ADN (ng/ $\mu$ L)	0,6	0,06	0,06
Tampón	5X	X	X
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	2	2
dNTPs (mM)	25	0,2	0,2
Partidor LTR-1 ( $\mu$ M)	5	0,2	0,2
Partidor LTR-2 ( $\mu$ M)	5	0,2	-
Partidor ISSR ( $\mu$ M)	5	-	0,4
Polimerasa (U/ $\mu$ L)	5	0,05	0,05
<b>Volumen final (<math>\mu</math>L)</b>	-	<b>20</b>	<b>20</b>

**Tabla 9: Muestras control de *B. papyrifera* de Oceanía Remota.**

País / Región	Isla / Localidad	Código
Tonga	Tongatapu	BQUCH095
E.E.U.U.	Oahu, Hawái	BQUCH195
Polinesia Francesa	Fatuhiva, Omoa, Islas Marquesas	BQUCH234
Chile Insular	Rapa Nui	BQUCH221

El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, apareamiento a la temperatura designada para cada combinación de partidores elegida durante 2 minutos, y una extensión a 72°C durante 2 minutos. Por último, se realizó una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Los amplicones se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% en tampón TBE 0,5X y se visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain.

#### 4.2.6.2 Optimización del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa

Como Kalendar indica (2007), la electroforesis en gel de agarosa es una etapa crítica para la correcta resolución y caracterización de los perfiles obtenidos mediante PCR, por lo que se estandarizó esta etapa para todos los análisis. Para obtener un gel de agarosa al 2,5% se disolvieron 2,5 g de agarosa en 100 mL de tampón TBE 0,5 X y se calentó en microondas hasta la disolución completa de la agarosa. Se enfrió hasta  $\sim 60^{\circ}\text{C}$  y se vertió sobre bandejas para geles de 15 x 10 cm, usando peinetas para 20 carriles. Se dejó gelificar a temperatura ambiente durante al menos una hora. La electroforesis se llevó a cabo a 60 V durante 4,5 horas, utilizando un estándar de peso molecular 1 kb Plus para estimar el tamaño de los amplicones resueltos. Se evaluaron dos sistemas de tinción para visualizar los perfiles de bandeo: GelRed y bromuro de etidio. El método de carga con GelRed consistió en incorporar 5  $\mu\text{L}$  de producto de PCR con 1  $\mu\text{L}$  de GelRed, previa mezcla, en cada bolsillo del gel de agarosa antes de iniciar la corrida electroforética. Para la visualización mediante bromuro de etidio, se cargaron 5  $\mu\text{L}$  de amplicón en cada bolsillo del gel y se ejecutó la electroforesis. Luego, se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 10 minutos, y posteriormente se sumergió en una solución de  $\text{MgSO}_4$  1 mM durante 10 minutos para reducir el exceso de bromuro de etidio presente en el gel y favorecer la fluorescencia del intercalante en los productos de PCR.

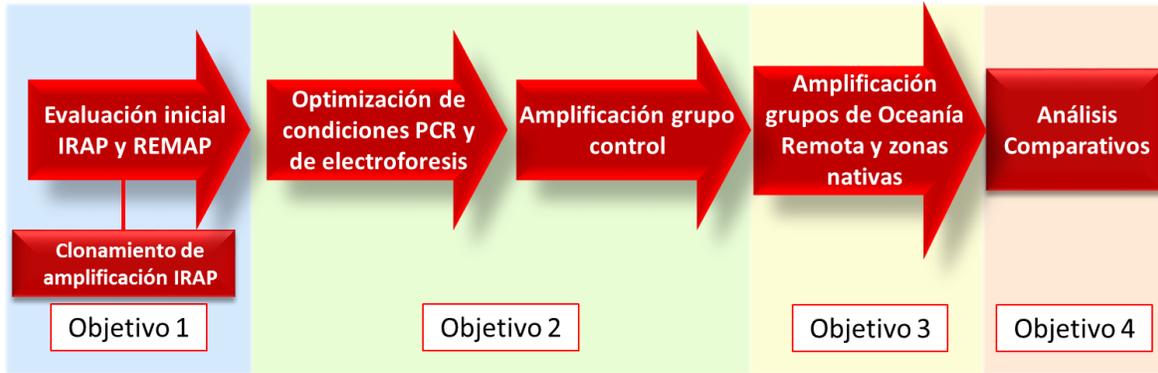
Se evaluaron además distintos tipos de captura de imágenes: mediante una cámara Nikon E4300 al irradiar el gel con luz UV en un transiluminador, y utilizando un equipo capturador de imagen de fluorescencia Syngene, mediante el software GeneSys 1.5.4.0. Todas las imágenes se capturaron en negativo para mejorar la detección de bandas y facilitar su lectura.

Para la lectura de las bandas, se usó siempre un criterio conservador, considerando solo bandas por sobre los 500 pb, ya que las bandas de menor tamaño molecular podrían corresponder a amplicones producto de ADN degradado o a uniones inespecíficas de los partidores.

#### 4.2.7 Análisis estadísticos

Para cada perfil de bandeo se construyó una matriz binaria indicando la presencia (1) o ausencia (0) de bandas que sean distinguibles e identificables en geles sometidos a las condiciones de electroforesis determinadas. Para comparar la similitud de la matriz formada, ésta se analizó mediante el coeficiente Dice (Dice, 1945) utilizando el software NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 1997). Este software permite además el análisis de agrupamiento mediante los algoritmos UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) y *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) para la construcción de dendrogramas.

La Figura 4 muestra un esquema que resume los procedimientos experimentales y análisis que se realizarán en esta memoria de título.

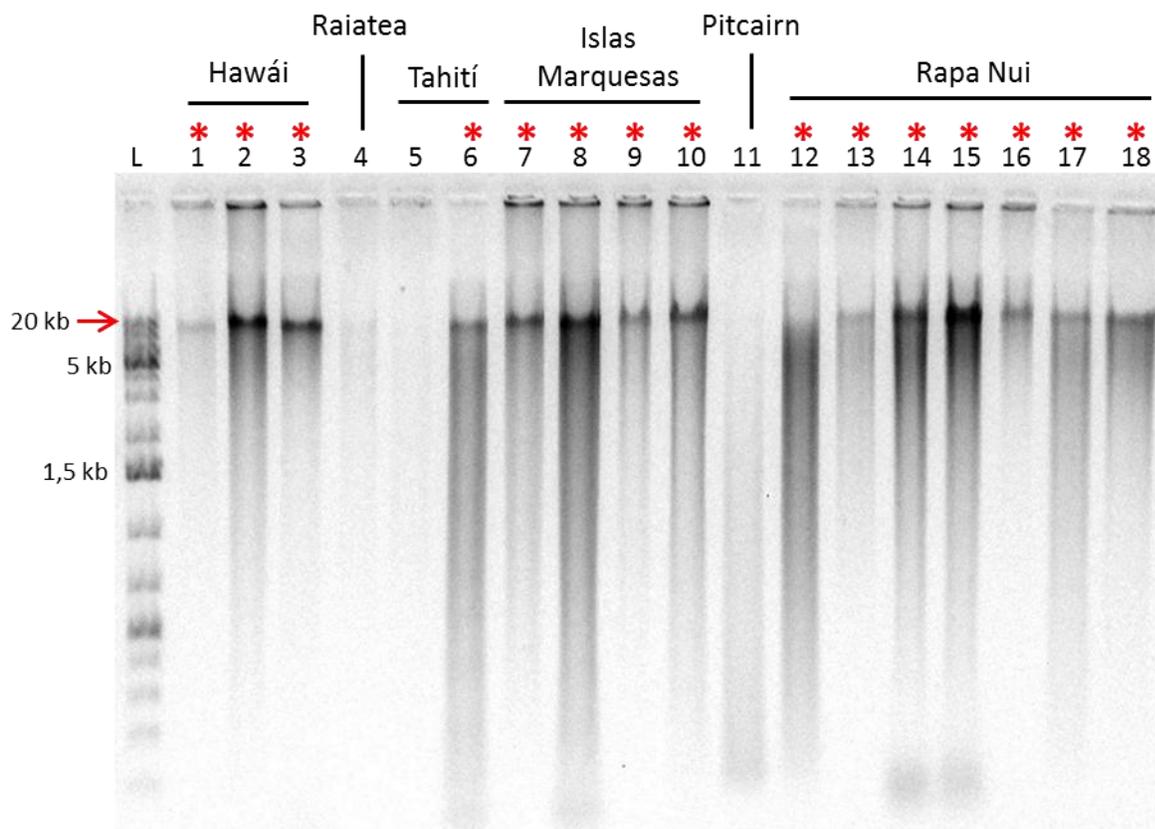


**Figura 4: Estrategia experimental para el análisis de *Broussonetia papyrifera* mediante IRAP y REMAP.** Se presentan las actividades que se llevarán a cabo en esta memoria de título para dar cumplimiento a cada objetivo específico propuesto.

## 5 Resultados

### 5.1 Selección de muestras

Las muestras de *B. papyrifera* para análisis fueron escogidas desde el banco genómico del laboratorio y solo se seleccionaron aquellas con un ADN íntegro y un buen índice de pureza, dado que estas propiedades son indispensables para obtener patrones de amplificación confiables (Kalendar y Schulman, 2014). Se resolvió el ADN genómico de las muestras seleccionadas en geles de agarosa al 0,8% y se descartaron aquellas muestras que no presentasen ADN íntegro, correspondiente a una banda de gran intensidad con un tamaño aproximado de 20 kb, destacadas en la Figura 5. La lista de muestras que cumplieron con los criterios de selección se muestra en el Anexo 1.



**Figura 5: Análisis de integridad de ADN para selección de muestras de *B. papyrifera*.** Electroforesis de ADN genómico de las muestras consideradas para ensayar las técnicas de IRAP y REMAP. La flecha indica la presencia de ADN genómico de alto peso molecular. Se destaca con asteriscos aquellas muestras que se incluyeron en los análisis posteriores. Muestras correspondientes a los carriles 1-3: Hawái, carril 4: Raiatea, carril 5 y 6: Tahití, carriles 7-10: Islas Marquesas, carril 11: Pitcairn, carriles 12-18: Rapa Nui. L: estándar de ADN de peso molecular 1kb Plus. Gel de agarosa al 0,8% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed.

## 5.2 Selección de partidores

### 5.2.1 Evaluación inicial de partidores IRAP

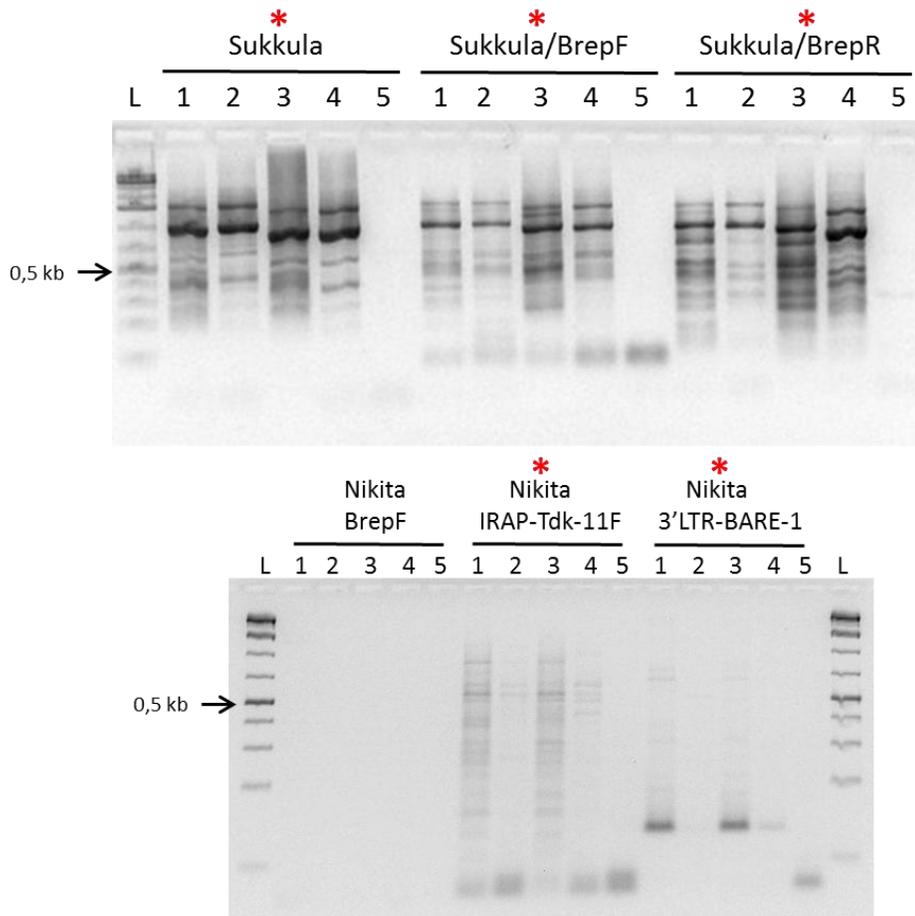
Los LTR presentes en algunos retroelementos corresponden a secuencias altamente conservadas a partir de los cuales se han definido los marcadores usados en esta memoria. En la familia de las Moráceas solo se han caracterizado de manera masiva los elementos móviles de *Morus notabilis* (Li y cols., 2014). Pese a la cercanía taxonómica entre *M. notabilis* y *B. papyrifera*, no es posible predecir el tipo y número de retroelementos presentes en *B. papyrifera* a partir de los datos publicados en la base de datos de *Morus notabilis* (MorusDB). Por otro lado, hasta la fecha, el genoma de *B. papyrifera* no ha sido secuenciado. Recientemente se ha publicado su transcriptoma (Peng y cols., 2014), lo cual no tiene relación con el conjunto de elementos móviles presentes en esta especie. Por estos motivos, se realizó una búsqueda bibliográfica de partidores de retroelementos.

Al revisar la literatura, se encontraron reportes de una gran cantidad de partidores basados en retroelementos (agrupados en Kalendar y Schulman, 2014), por lo cual se utilizaron estos partidores para dar cumplimiento al objetivo 1. A partir de la búsqueda bibliográfica realizada, se escogieron nueve partidores reportados por el grupo de Kalendar que habían sido usados en la especie taxonómicamente cercana sicomoro (*Ficus sycomorus*; Saleh, 2007). En una etapa inicial, se probó el protocolo de amplificación de acuerdo a lo reportado por Kalendar y Schulman (2007), para las 45 combinaciones IRAP a partir de los nueve partidores escogidos. Se probó una temperatura de apareamiento de 56°C y se usó el molde de ADN a dos concentraciones diferentes (0,6 y 6 ng/μL). Se amplificaron replicados biológicos de una muestra de *B. papyrifera* proveniente de Santiago (BQUCH134), la que se ensayó a partir de dos extracciones de ADN independientes (BQUCH134-1 y BQUCH134-2). Se preseleccionaron aquellas que presentaron una amplificación detectable. Se encontraron 13 combinaciones que mostraron un perfil aceptable de amplificación, consistente en la obtención de bandas numerosas y distinguibles, mientras que las 32 combinaciones restantes no presentaron amplificación o generaron perfiles con pocas bandas (Tabla 10). La Figura 6 muestra algunos de los perfiles obtenidos.

**Tabla 10: Evaluación inicial marcadores IRAP.**

	BREP F	BREP R	IRAP-TDK11F	Sukkula	5'LTR2-BARE-1	3'LTR-BARE-1	Nikita	LTR6150-BARE-1	P-Tst-6
BREP F									
BREP R									
IRAP-TDK11F		A							
Sukkula		A		A					
5'LTR2-BARE-1				A					
3'LTR-BARE-1		A	A	A					
Nikita			A	A		A			
LTR6150-BARE-1				A					
P-Tst-6		A		A					

A= Presentó amplificación.



**Figura 6: Preselección de partidores IRAP en muestras de prueba de *B. papyrifera*.** Patrones de amplificación de algunas combinaciones de partidores IRAP con material de prueba. Se escogieron las combinaciones marcadas con un asterisco. Carril 1: muestra BQUCH134-1 (0,6 ng/μL), carril 2: Muestra BQUCH134-2 (0,6 ng/μL), carril 3: BQUCH134-1 (6 ng/μL), carril 4: BQUCH134-2 (6 ng/μL), carril 5: control negativo. L: estándar de ADN de peso molecular 1kb Plus. Electroforesis en gel de agarosa al 2,0% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed.

### 5.2.2 Evaluación inicial de partidores REMAP

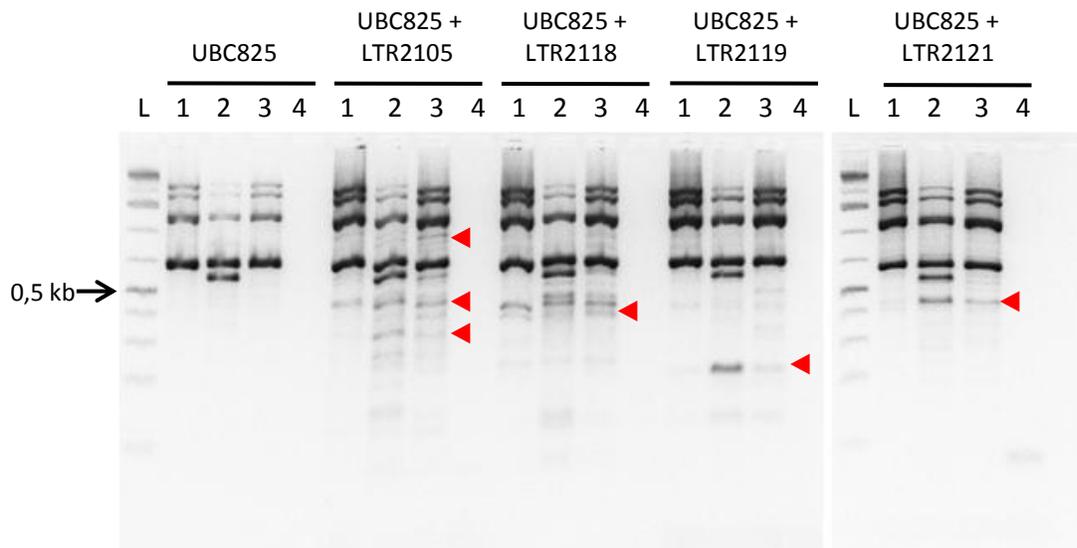
De manera similar, se seleccionaron cuatro partidores de regiones LTR (Kalendar y Schulman, 2014) y nueve partidores anclados en regiones de microsatélite (ISSR), obteniéndose 36 combinaciones posibles, descritos en la sección 4.2.4, utilizando el protocolo de Kalendar y Schulman (2007). Las muestras utilizadas para estos ensayos correspondieron a tres individuos de *B. papyrifera* diferentes provenientes del Parque Arrieta (BQUCH134, BQUCH254 y BQUCH235). En la Tabla 11 se resumen las combinaciones utilizadas y se indican las 22 combinaciones que presentaron bandas adicionales a las reportadas por González-Lorca (2015), obtenidas solamente con el partidor ISSR.

**Tabla 11: Evaluación inicial marcadores REMAP.**

	LTR2105	LTR2118	LTR2119	LTR2121
UBC823	A	A		
UBC825	A	A	A	A
UBC827	A	A		
UBC855	A	A	A	A
UBC856	A	A	A	A
UBC866	A	A		A
UBC888	A			
UBC889	A			
UBC891	A			

A= Presentó amplificación con bandas adicionales a las entregadas por el marcador ISSR.

En la Figura 7 se muestra un gel representativo de los perfiles de amplificación obtenidos, ya sea empleando únicamente el partidor de ISSR (UBC825), como al combinarlo con diferentes partidores LTR. Los perfiles de amplificación obtenidos con REMAP presentan un patrón similar al obtenido con el partidor de ISSR solo. Las bandas aportadas por el partidor LTR en la amplificación se destacan con cabezas de flechas en la Figura 7.

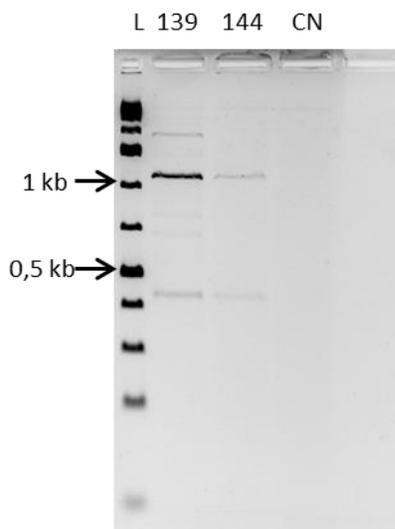


**Figura 7: Preselección de partidores REMAP en muestras de prueba de *B. papyrifera*.** Patrones de amplificación del partidor ISSR (UBC825) y las combinaciones con partidores de regiones LTR. Se destacan las bandas generadas con los partidores LTR con cabezas de flechas. Carril 1: muestra BQUCH134, carril 2: BQUCH254, carril 3: BQUCH235, carril 4: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed.

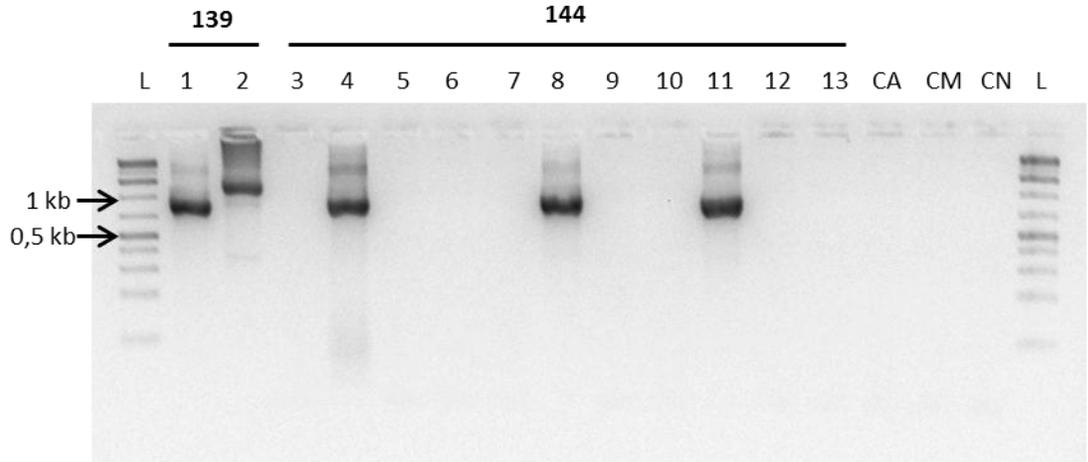
### 5.3 Caracterización de retroelementos amplificados con partidores IRAP mediante clonamiento

#### 5.3.1 Clonamiento de productos de PCR amplificados con el partidor IRAP Sukkula

Con el fin de confirmar que las secuencias amplificadas mediante los partidores escogidos efectivamente corresponden a retroelementos, se decidió aislar y caracterizar algunos productos de PCR obtenidos mediante IRAP, ya que este marcador permite amplificar regiones dentro de un retrotransposón, a diferencia de REMAP que amplifica regiones entre LTR de retroelementos y regiones microsatélites. Para ello, se amplificaron las muestras BQUCH139 (Taiwán) y BQUCH144 (Japón) con el partidor IRAP Sukkula bajo las condiciones indicadas por Kalendar y Schulman (2007), obteniéndose perfiles con un reducido número de bandas (Figura 8). Se clonaron los productos PCR usando el sistema comercial pCR™4-TOPO® *Cloning® kit for Sequencing* en bacterias *Escherichia coli* DH5α electrocompetentes, siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.3.4 de Materiales y Métodos. Se obtuvieron 13 colonias blancas (recombinantes) y 17 colonias azules (que no incorporaron el producto de PCR). Se realizó PCR de colonias usando el mismo partidor para confirmar la presencia del inserto en las colonias transformantes. La Figura 9 muestra el análisis de las 13 colonias blancas. Se observa la presencia de los insertos en cinco colonias que efectivamente incorporaron algún producto de amplificación. Cuatro colonias presentan una banda de ~750 pb (carriles 1, 4, 8 Y 11) y otra colonia presenta una banda de ~1 kb (carril 2). Estos productos de PCR se purificaron mediante el sistema comercial *DNAeasy DNA Clean & Concentrator™-5* para su posterior secuenciación.

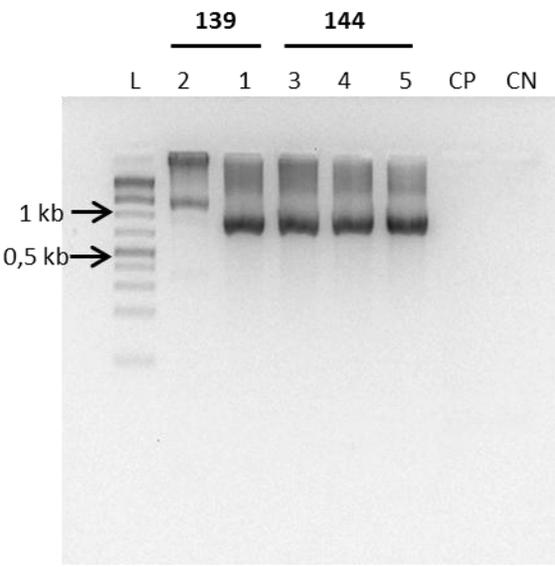


**Figura 8: PCR IRAP de muestras para clonamiento.** Amplificación IRAP usando el partidor Sukkula de las muestras seleccionadas para realizar clonamiento: muestra BQUCH139 (Taiwán) y BQUCH144 (Japón). Carril CN: control negativo de PCR. Gel de agarosa al 2% en TBE 0,5X. Electroforesis a 70V durante 1,5 horas.



**Figura 9: Rastreo de clones positivos mediante PCR de colonias.** Amplificación IRAP con el partidor Sukkula de las colonias blancas. Carriles 1 y 2: colonias de muestra BQUCH139 (Taiwán), carriles 3-13: colonias de muestra BQUCH144 (Japón), carril CA: control de colonia azul (que no incorporó un producto PCR), carril CM: control de manipulación durante la transformación (mondadiente estéril), carril CN: control negativo de PCR. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2% en TBE 0,5X. Electroforesis a 70V durante 1 hora.

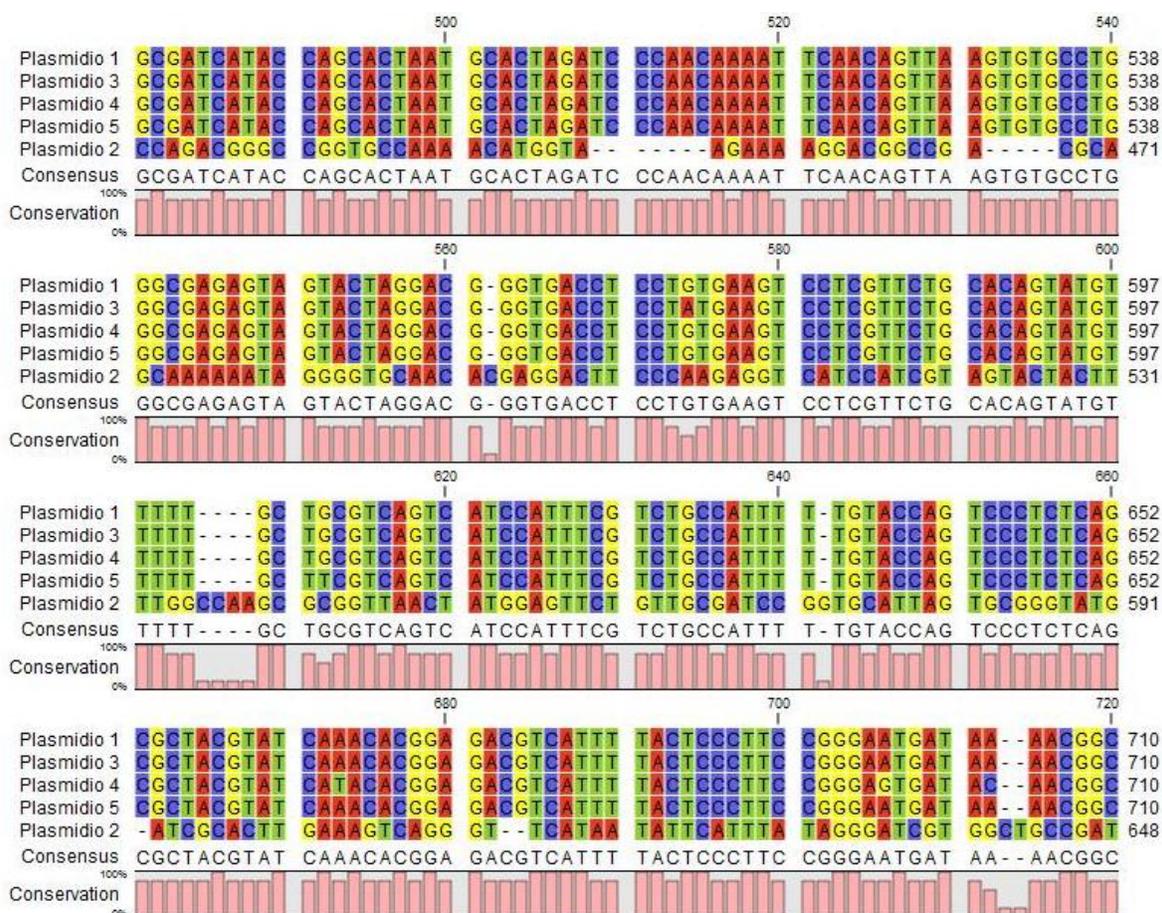
Se purificaron plasmidios de las cinco colonias transformantes y se realizó una PCR confirmatoria a los plasmidios purificados, como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10: Amplificación confirmatoria de insertos positivos.** Amplificación IRAP con el partidor Sukkula de los plasmidios purificados. Carriles 2 y 1: colonias 2 y 1 de muestra BQUCH139 (Taiwán), carriles 3-5: colonias de muestra BQUCH144 (Japón), carril CP: control de purificación de plasmidio (blanco), carril CN: control negativo de PCR. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2% en TBE 0,5X. Electroforesis a 70V durante 1 hora.

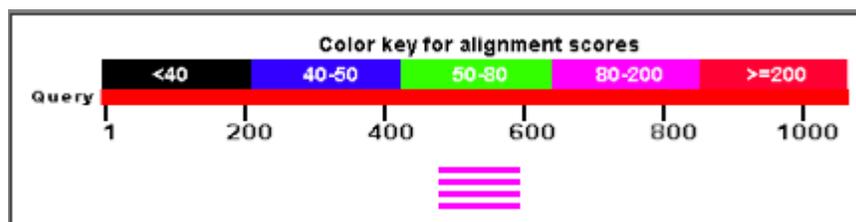
### 5.3.2 Secuenciación y caracterización de insertos positivos clonados

Tanto los productos de PCR purificados de las colonias como los de plasmidios se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias de los productos de PCR de las colonias resultantes no dieron electroferogramas legibles, por lo que se descartaron. Por otra parte, las secuencias de los plasmidios purificados fueron legibles, por lo que se emplearon para los análisis de alineamiento. Estas secuencias (sentido y antisentido) fueron editadas con la herramienta *VecScreen* para eliminar secuencias de vector. Luego, se alinearon mediante el programa CLC Sequence Viewer 7, identificando dos secuencias diferentes, correspondientes a los productos de ~750 pb (colonias 1, 3, 4 y 5) y al amplicón de ~1 kb (colonia 2). La Figura 11 muestra una parte representativa del alineamiento realizado a los cinco plasmidios secuenciados. El alineamiento completo se encuentra en el Anexo 2.



**Figura 11: Alineamiento representativo de los cinco insertos positivos secuenciados, asociados a la amplificación con el partidor Sukkula.** Alineamiento con el programa CLC Sequence Viewer 7 representativo de las cinco secuencias clonadas en los plasmidios de las muestras BQUCH139 (Plasmidio 1 y 2) y BQUCH144 (Plasmidios 3-5) amplificadas con el partidor IRAP Sukkula.

Se realizó un alineamiento local (BLASTn) con la base de datos del NCBI con el algoritmo MEGABLAST para cada secuencia. Las secuencias de las colonias 1, 3, 4 y 5 presentaron un resultado inesperado y con un valor esperado relativamente bajo ( $E \text{ value} = 3e^{-34}$ , Figura 12 y Tabla 12), pues mostraron coincidencia con secuencias cromosomales de distintas variedades de la especie de leguminosa *Vigna angularis* (soja verde) y de regiones que codifican el gen para ARN ribosomal 5S (ARNr 5S) de especies del género *Gossypium* (algodón).

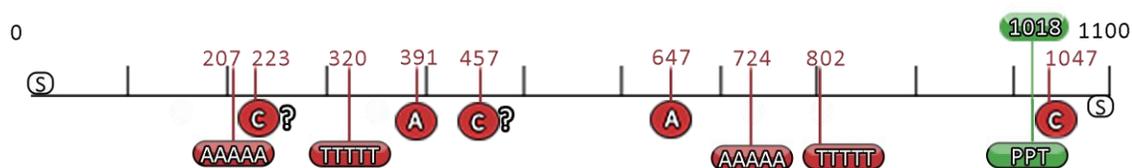


**Figura 12: Alineamiento local representativo de los plasmidios 1, 3, 4 y 5.** Resultado del BLAST alineando la secuencia del inserto de los plasmidios 1, 3, 4 y 5 con la base de datos del NCBI. Se muestran los cuatro mejores alineamientos encontrados.

**Tabla 12: Muestras identificadas mediante BLAST del inserto de los plasmidios 1, 3, 4 y 5.**

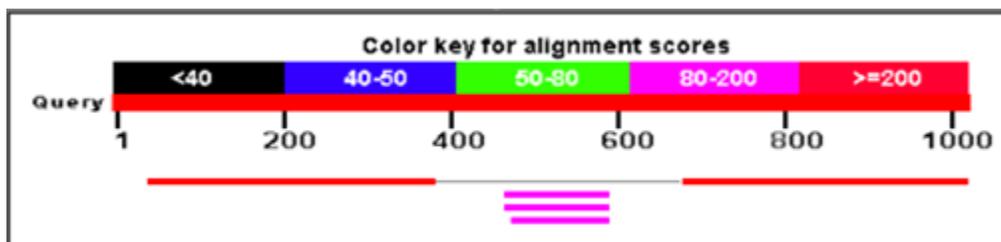
Código	Especie	Secuencia	Puntaje máximo	$E \text{ value}$	Identidad
AP016514.1	<i>Vigna angularis</i>	Scaffold de ADN 1470	158	$3e^{-34}$	91%
AP015043.1	<i>Vigna angularis</i>	Cromosoma 10	158	$3e^{-34}$	91%
U33061.1	<i>Gossypium klotzscianum</i>	ARNr 5S	148	$2e^{-31}$	90%
U32010.1	<i>Gossypium herbaceum</i>	ARNr 5S	148	$2e^{-31}$	90%

Para las secuencias de los plasmidios 1, 3, 4 y 5, mediante el programa CLC Sequence viewer 7 se identificaron regiones conservadas tanto de retroelementos *Sukkula* descritos por Kalendar y cols. (2004) como de secuencias ribosomales 5S descritas en retroelementos *Cassandra* (Kalendar y cols., 2008). La Figura 13 muestra la disposición de las regiones identificadas; sin embargo, no se logró identificar el sitio de unión al partidor (PBS) y las secuencias identificadas no suponen una distribución característica de un retrotransposón ni de un gen 5S funcional.



**Figura 13: Estructura del retrotransposón tipo TRIM identificado en los plasmidios 1, 3, 4 y 5, asociado al marcador *Sukkula*.** Distribución sugerida de las regiones características de ADN ribosomal 5S (círculos y cajas rojas) y de retroelementos (cajas verdes), además de su posición relativa. Se identificó la señal de terminación de la transcripción (TTTTT), la cola poliA (AAAAA), los sitios de unión de la ARN polimerasa (cajas A y C del promotor intragénico) y la región PPT. No se encontró una posible región PBS. El partidor *Sukkula* se indica con una S.

Para la secuencia del plasmidio 2, se encontró que dos regiones del producto clonado mostraron similitud con una secuencia del gen de ARNr 5S de *B. papyrifera*, obteniendo un buen puntaje (mayor a 200) y un valor de e muy bajo ( $1e^{-92}$ ), indicando que el alineamiento cubrió una gran parte de la secuencia introducida y con baja probabilidad de que éste haya sido alineado de manera aleatoria (Figura 14 y Tabla 13).

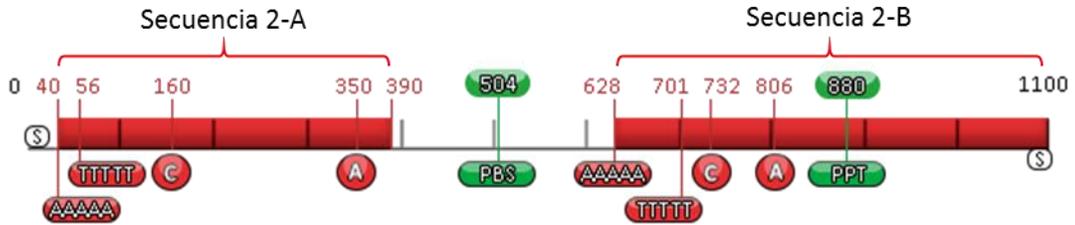


**Figura 14: Alineamiento local de la secuencia del plasmidio 2.** Resultado del BLAST alineando la secuencia del inserto del plasmidio 2 con la base de datos del NCBI. Se muestran los mejores alineamientos encontrados.

**Tabla 13: Muestras identificadas mediante BLAST del inserto del plasmidio 2.**

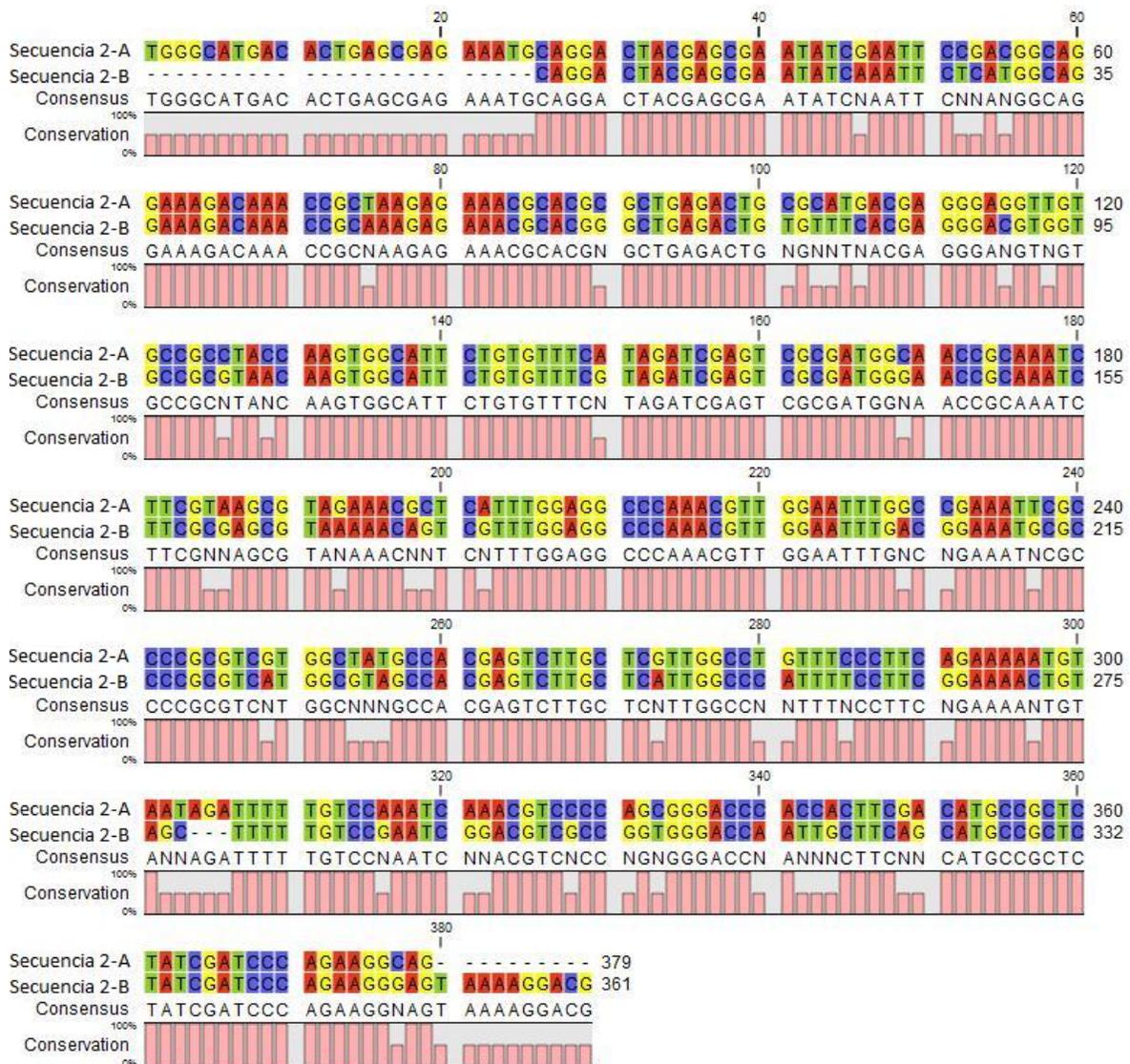
Código	Especie	Secuencia	Puntaje máximo	E value	Identidad
KT073703.1	<i>Broussonetia papyrifera</i>	ARNr 5S	351	$1e^{-92}$	85%
AP017147.1	<i>Vigna angularis</i>	Scaffold de ADN 2103	156	$1e^{-33}$	89%
AP016648.1	<i>Vigna angularis</i>	Scaffold de ADN 1604	156	$1e^{-33}$	89%
U32047.1	<i>Gossypium laxum</i>	ARNr 5S	152	$1e^{-33}$	90%

Para el inserto de este plasmidio, se identificaron secuencias características del gen de ARNr 5S, como las cajas A y C del promotor intragénico para la unión de la ARN polimerasa III, la secuencia del terminador de la transcripción y la cola poli A. La presencia de estas secuencias es característica de elementos denominados *Terminal-repeat Retrotransposon in Miniature* o TRIM tipo *Cassandra* reportados por Kalendar y cols. (2008). También se identificaron regiones características de retrotransposones, como el sitio de unión al partidor o PBS (Kartal y cols., 2014) y un posible sitio del tracto de polipurinas o PPT (Kalendar y cols., 2004) (Figura 15). Se destaca que el orden de las cajas A y C se asemeja a una distribución característica para este tipo de secuencia (Paule y White, 2000).



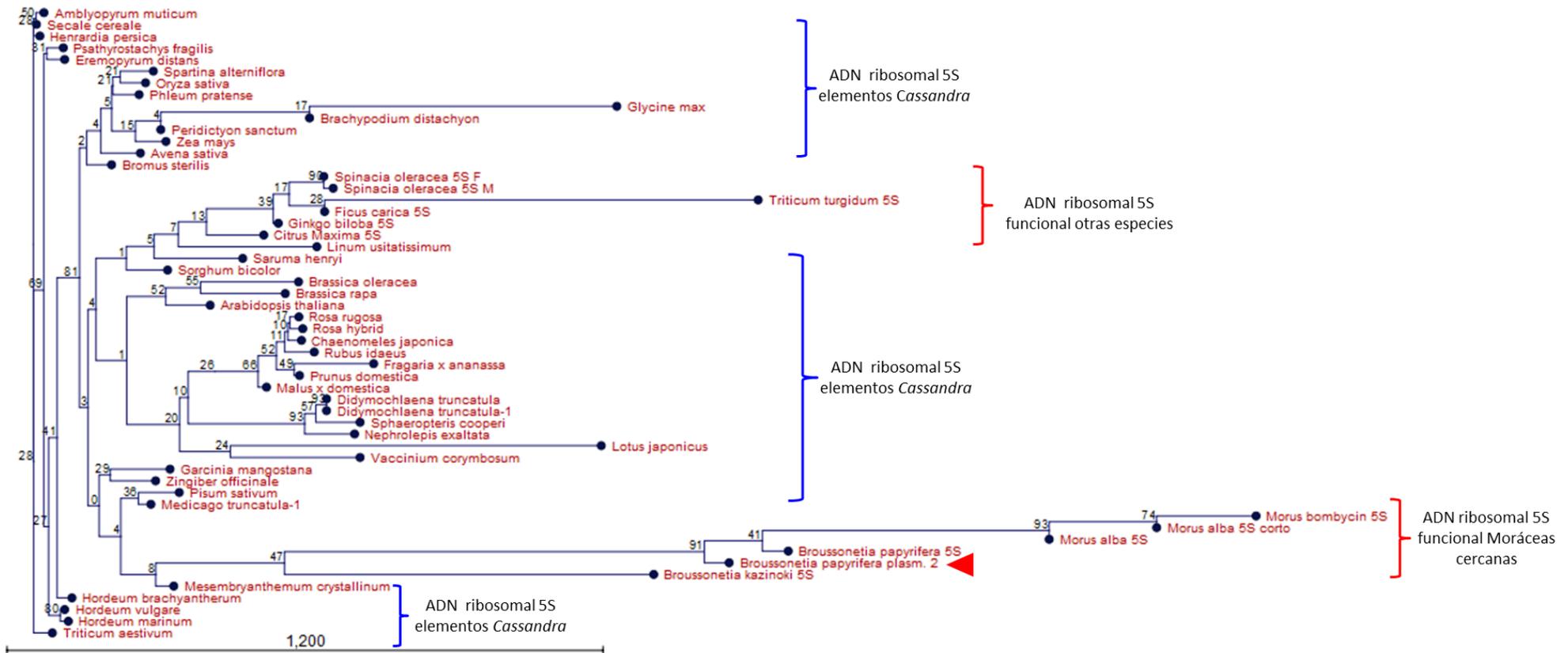
**Figura 15: Estructura del retrotransposón tipo TRIM identificado en el plasmidio 2, asociado al marcador Sukkula.** Distribución de las regiones características de ADN ribosomal 5S (cajas rojas) y de retroelementos (cajas verdes) amplificadas mediante el IRAP Sukkula (S). Se identificó la señal de terminación de la transcripción (TTTT), las regiones poliA (AAAA), los sitios de unión de la ARN polimerasa (cajas A y C del promotor intragénico), la región PBS y la posible región PPT.

Se alinearon las secuencias de ADNr de *B. papyrifera* encontradas en el plasmidio 2, llamadas Secuencia 2-A y Secuencia 2-B, mediante el programa CLC Sequence Viewer 7. Se encontró un alto porcentaje de conservación entre estas secuencias (Figura 16), corroborando que el plasmidio 2 posee dos secuencias de ADN ribosomales 5S.



**Figura 16: Alineamiento de secuencias de ADN ribosomal encontradas en el plasmidio 2.** Mediante el programa CLC Sequence Viewer 7 se alinearon las dos regiones de ADN ribosomal 5S encontradas en el plasmidio 2.

Finalmente, se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia de ARNr 5S encontrada en el clonamiento con otras secuencias de ARNr 5S descritas en retrotransposones tipo *Cassandra* y secuencias activas de ARNr 5S descritas en especies cercanas a *B. papyrifera*. En la Figura 17 se muestra un dendrograma que agrupa las secuencias tipo *Cassandra* de acuerdo al algoritmo *Neighbor-Joining*, identificándose dos grupos: uno compuesto por la secuencia clonada junto a otras pertenecientes a la familia de las Moráceas y un segundo grupo correspondiente a secuencias de ARNr 5S funcionales de otras especies.



**Figura 17: Dendrograma de secuencias ribosomales 5S.** Árbol generado con el modelo Kimura 80 y el algoritmo de agrupamiento *Neighbor-Joining* de secuencias de regiones ribosomales 5S de retroelementos *Cassandra* con secuencias 5S funcionales (indicados con un 5S) de diferentes especies. Se indica con una cabeza de flecha la secuencia 5S clonada. Dendrograma generado con el programa CLC Sequence Viewer 7.7.

## 5.4 Optimización del protocolo de PCR para los marcadores IRAP y REMAP

### 5.4.1 Optimización del protocolo de amplificación de marcadores IRAP

Como parte del objetivo 2, y con el fin de aumentar la cantidad de productos de amplificación, se evaluó incrementar el tiempo de las etapas de desnaturalización, apareamiento y la extensión final, además de aumentar el número de ciclos de 30 (sugerido por Kalendar y Schulman, 2007) a 35 (Figura 18). Los cambios efectuados al protocolo de Kalendar y Schulman se detallan en las Tablas 14 y 15. Se redujo la cantidad de ADN molde a 1,2 ng totales, debido a que no suponía un factor determinante en la amplificación de la PCR a partir de los resultados anteriores (Figura 6).

**Tabla 14: Cambios en el protocolo de PCR IRAP de Kalendar y Schulman (2007).**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	
		Kalendar y Schulman (2007)	Este trabajo
ADN (ng)	-	<b>20</b>	<b>1,2</b>
Tampón	5X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	2	2
dNTPs (mM)	25	0,2	0,2
Partidor LTR (μM)	5	0,2	0,2
Polimerasa (U/μL)	5	0,05	0,05
<b>Volumen final (μL)</b>	-	<b>20</b>	<b>20</b>

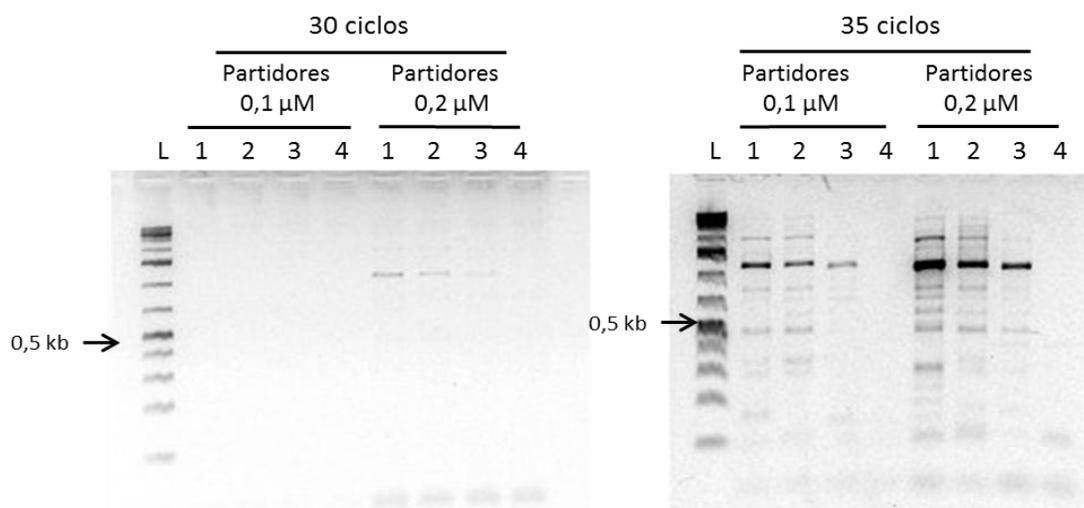
Se destaca en letra negra los cambios realizados al protocolo IRAP original.

**Tabla 15: Modificaciones al programa de amplificación IRAP de Kalendar y Schulman (2007).**

Programa de Kalendar y Schulman (2007)			Programa modificado		
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	4 min.	Desnaturalización inicial	94	4 min.
30 ciclos	Desnaturalización	94	35 ciclos	Desnaturalización	94
	Apareamiento	T <sub>a</sub>		Apareamiento	T <sub>a</sub>
	Extensión	72		Extensión	72
Extensión final	72	5 min.	Extensión final	72	<b>7 min.</b>

Comparación entre los programas propuestos por Kalendar y Schulman (izquierda) y las modificaciones realizadas (derecha). Se destacan los cambios realizados en letra negra. T<sub>a</sub>: temperatura de apareamiento para cada partidor.

La Figura 18 muestra un ejemplo del resultado del análisis de IRAP con las nuevas condiciones descritas. Se observa que, al modificar el programa de la PCR y aumentar a 35 ciclos usando la combinación de partidores Sukkula con LTR615-BARE-1, se incrementa notoriamente la cantidad de productos de amplificación.



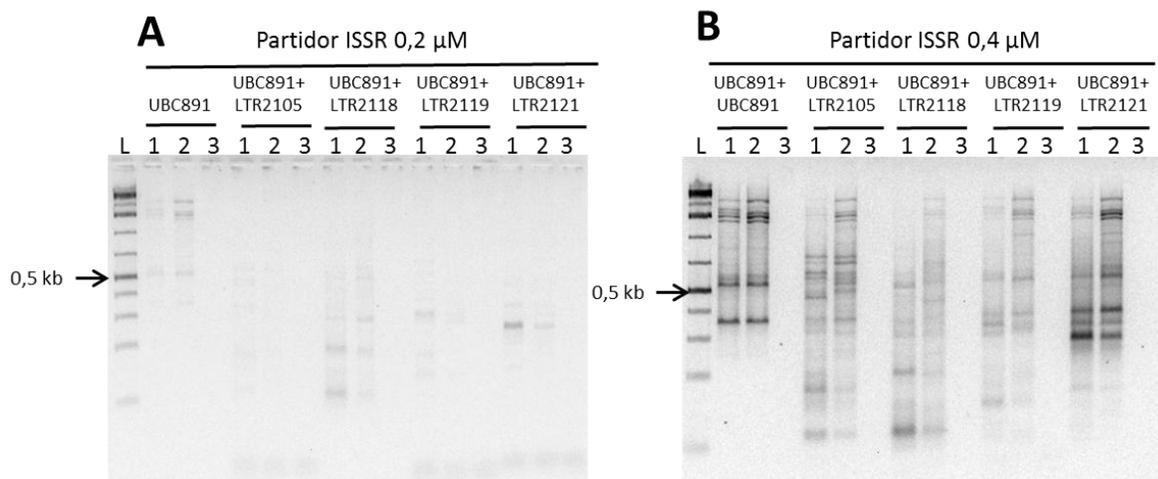
**Figura 18: Optimización del protocolo de amplificación IRAP.** Se muestran los patrones de amplificación obtenidos con los partidores IRAP Sukkula con LTR615-BARE-1 con los cambios en la concentración de partidores, el programa modificado y en el número de ciclos: 30 (izquierda) y 35 (derecha). Carril 1: muestra BQUCH137, carril 2: BQUCH169, carril 3: BQUCH234. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed.

#### 5.4.2 Optimización del protocolo de amplificación de marcadores REMAP

Para la estandarización del protocolo REMAP, se consideró usar 1,2 ng de ADN molde al igual que para el protocolo IRAP por el motivo explicado en la sección 5.2.1. Para favorecer la amplificación de bandas que correspondieran a fragmentos de retroelementos y obtener patrones con mayor cantidad de bandas, también se modificó el protocolo propuesto por Kalendar y Schulman (2007) evaluando diversos factores que afectan el perfil de bandeo obtenido. En primer lugar, se analizó el efecto de aumentar la concentración de ambos partidores, ISSR y LTR (probando dos condiciones de concentración de partidores). Una de ellas fue 0,1 μM del partidador de ISSR y 0,4 μM de partidador LTR, y la otra fue de 0,2 μM de partidador ISSR y 0,4 μM de partidador LTR.

Estos ensayos se realizaron utilizando las muestras de prueba BQUCH254 y BQUCH235. Además, las reacciones de PCR se realizaron aumentando el número de ciclos de 30 a 35.

El resultado de estos ensayos se muestra en la Figura 19. En el panel A se muestra que al reducir la concentración del partidador de ISSR a 0,1 μM se observa escasa amplificación, mientras que en el panel B, al aumentar la concentración del partidador de ISSR a 0,2 μM y mantener la concentración de partidador LTR a 0,4 μM, se observa un aumento en el número de bandas obtenidas, así como la obtención de patrones de intensidad uniforme.



**Figura 19: Optimización de la concentración de partidores REMAP UBC891 y partidores LTR2105, LTR2118, LTR2119 y LTR2121.** Se muestran los patrones de amplificación generados al emplear: **(A)** partidor ISSR 0,1  $\mu\text{M}$ , partidor LTR 0,4  $\mu\text{M}$ ; y **(B)**: partidor ISSR 0,2  $\mu\text{M}$ , partidor LTR 0,4  $\mu\text{M}$ . Carril 1: muestra BQUCH254, carril 2: BQUCH235, carril 3: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en la Tabla 16 se describen las condiciones finales de amplificación para REMAP. En la Tabla 17 se detallan las condiciones finales del programa de amplificación para REMAP.

**Tabla 16: Modificación al protocolo de PCR REMAP de Kalendar y Schulman (2007).**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	
		Kalendar y Schulman (2007)	Este trabajo
ADN (ng)	-	<b>20</b>	<b>1,2</b>
Tampón	5X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	2	2
dNTPs (mM)	25	0,2	0,2
Partidor ISSR( $\mu\text{M}$ )	5	0,2	0,2
Partidor LTR ( $\mu\text{M}$ )	5	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>
Polimerasa (U/ $\mu\text{L}$ )	5	0,05	0,05
<b>Volumen final (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	-	<b>20</b>	<b>20</b>

Se destaca en letra negrita los cambios realizados al protocolo REMAP original.

**Tabla 17: Modificaciones al programa de amplificación REMAP de Kalendar y Schulman (2007).**

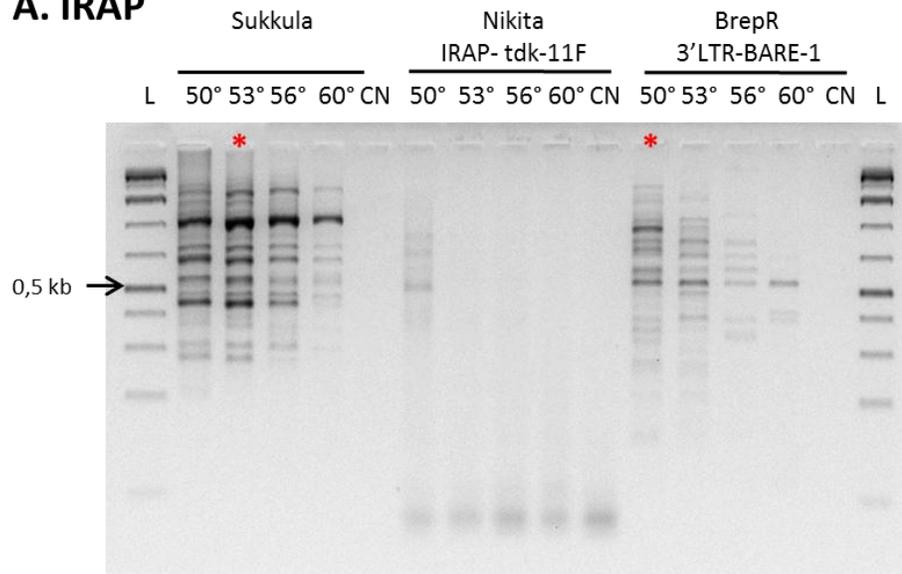
Programa de Kalendar y Schulman (2007)			Programa modificado				
Etapa		Temperatura (°C)	Tiempo	Etapa		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturación inicial		94	4 min.	Desnaturación inicial		94	4 min.
30 ciclos	Desnaturación	94	40 seg.	<b>35</b> ciclos	Desnaturación	94	<b>1 min.</b>
	Apareamiento	T <sub>a</sub>	40 seg.		Apareamiento	T <sub>a</sub>	<b>2 min.</b>
	Extensión	72	2 min.		Extensión	72	2 min.
Extensión final		72	5 min.	Extensión final		72	<b>7 min.</b>

Comparación entre los programas propuestos por Kalendar y Schulman (2007, izquierda) y las modificaciones realizadas (derecha). Se destacan los cambios realizados en letra negrita. T<sub>a</sub>: temperatura de apareamiento para cada partidior.

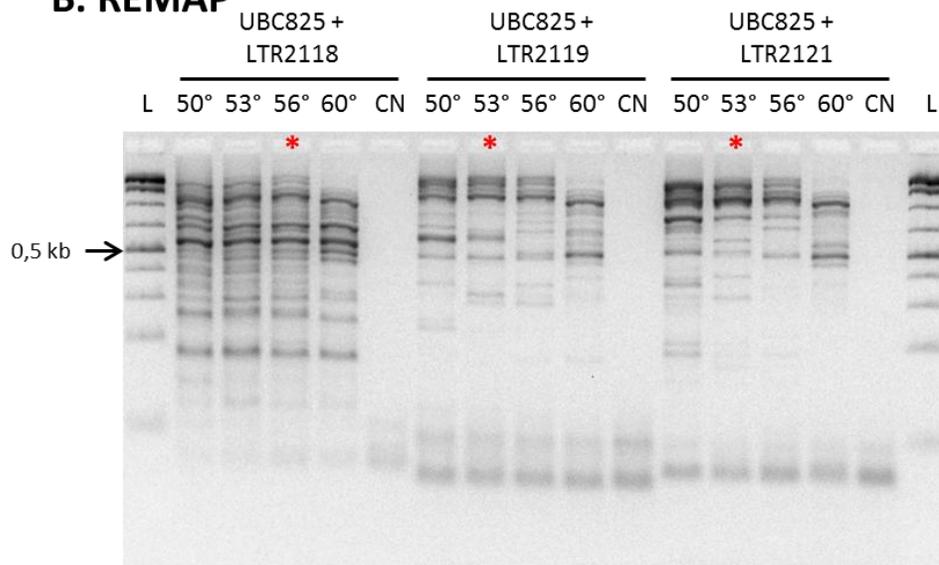
#### 5.4.3 Determinación de la temperatura de apareamiento óptima mediante PCR en gradientes

Para los partidiores IRAP y REMAP se realizaron gradientes de temperatura de apareamiento para determinar la temperatura de apareamiento óptima (T<sub>op</sub>) para cada combinación. El criterio de selección fue el mayor número de bandas presentes y los patrones de bandas más distinguibles. La gradiente de temperatura utilizada fue de 50 a 60°C, utilizando el protocolo de PCR modificado descrito previamente. La Figura 20 muestra un gel representativo de los patrones obtenidos para IRAP y REMAP y la temperatura escogida en cada caso. A partir de los resultados obtenidos del conjunto de partidiores, se definieron las temperaturas de apareamiento para cada combinación, las que se resumen en la Tabla 18.

## A. IRAP



## B. REMAP



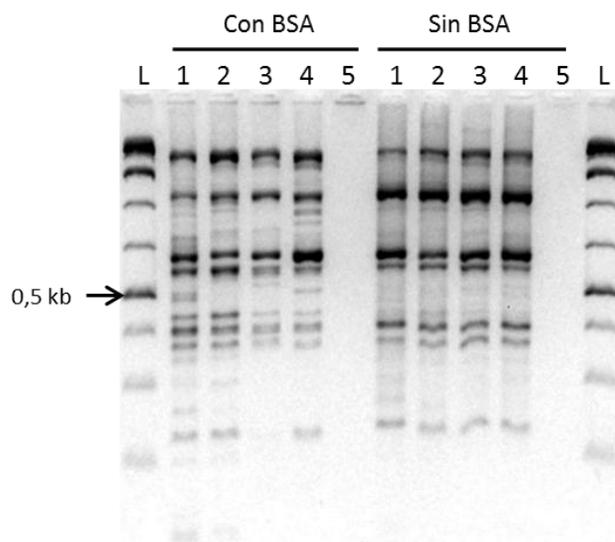
**Figura 20: Optimización de la temperatura de apareamiento en la PCR para partidores IRAP y REMAP.** Patrón de amplificación por PCR en gradiente de la muestra BQUCH235 realizados para las combinaciones de partidores: **(A)** IRAP: Sukkula, Nikita con IRAP-tdk-11F y BrepR con 3'LTR-BARE-1, y **(B)** REMAP: UBC866 con los partidores LTR2118, LRE2119 y LTR2121. Los carriles corresponden a las diferentes temperaturas del gradiente empleando. CN: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Se destacan las temperaturas escogidas con un asterisco rojo. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed.

**Tabla 18: Temperaturas de apareamiento de partidores REMAP.**

	LTR2105	LTR2118	LTR2119	LTR2121
UBC823	50 °C	53 °C		53 °C
UBC825	56 °C	56 °C	53 °C	53 °C
UBC827	53 °C	53 °C		
UBC855	53 °C	53 °C	56 °C	53 °C
UBC856	50 °C	60 °C	53 °C	50 °C
UBC866	53 °C	53 °C		
UBC888	56 °C			
UBC889	56 °C			
UBC891	57 °C			

#### 5.4.4 Prueba de amplificación con BSA

Como numerosos reportes sugieren que la albúmina de suero bovino (BSA) puede unir y bloquear inhibidores de la amplificación, aumentando el rendimiento de la PCR (Kreader, 1996; Rohland y Hofreiter, 2007), se probó si su incorporación al protocolo de amplificación tenía un efecto positivo en los perfiles obtenidos. A modo de ejemplo, la Figura 21 muestra la comparación de los patrones obtenidos al emplear BSA en una combinación de partidores de REMAP específica, UBC825 con LTR 2118. A pesar que el uso de BSA mostró un mayor número de bandas con potencial informativo, se encontró que en presencia de BSA había una menor reproducibilidad y mayor dificultad para la visualización y asignación de bandas en los patrones, por lo que no se consideró a este reactivo para los análisis posteriores.

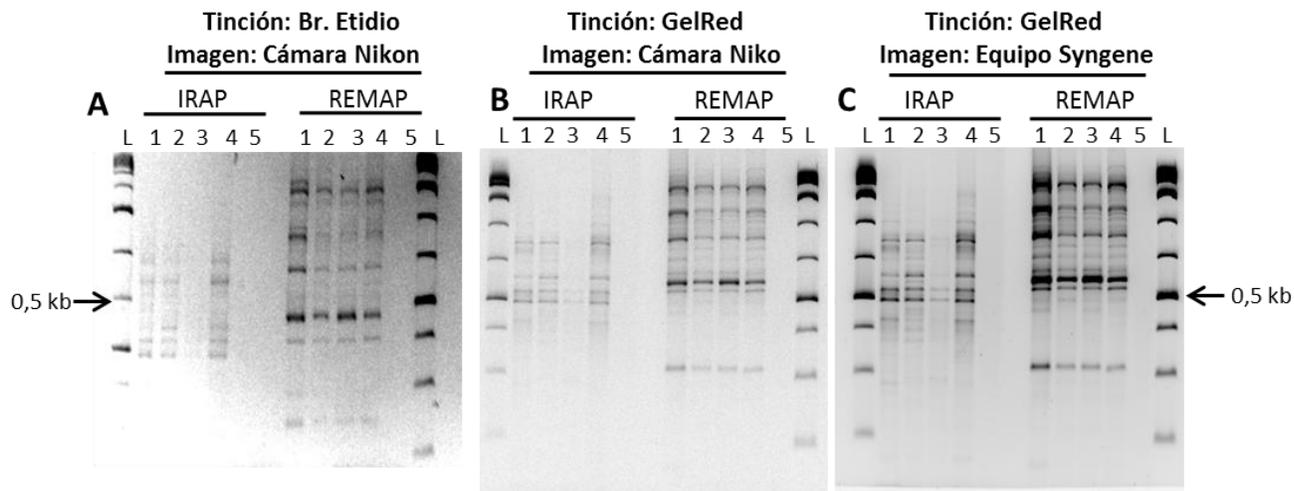


**Figura 21: Prueba de amplificación utilizando BSA.** Amplificación de la combinación de partidores REMAP UBC825 con LTR2118. Carril 1: BQUCH095 (Tonga), carril 2: BQUCH077 (Samoa), carril 3: BQUCH195 (Hawái), carril 4: BQUCH221 (Rapa Nui), carril 5: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

#### **5.4.5 Estandarización de la electroforesis en gel de agarosa y del método de tinción**

Luego de optimizar distintas condiciones de la PCR, se evaluaron también diversos factores que influyen en la electroforesis, como el porcentaje de agarosa, el tiempo y la potencia durante la corrida electroforética. Kalendar (2007) recomienda geles de agarosa de entre 1,6 – 2,0% en TBE 0,5X y una corrida electroforética inferior a 80V. Se ensayaron electroforesis en geles de agarosa a 2,0% y 2,5%, definiendo las condiciones finales de electroforesis en geles de agarosa al 2,5%, a 60V durante 4,5 horas, con las que se obtuvo la mejor resolución de las bandas en el gel (datos no mostrados).

Para la tinción de los geles se evaluó el uso de GelRed y de bromuro de etidio. Por otra parte, para la captura de imagen se comparó la resolución obtenida mediante una cámara Nikon E4300, y mediante el sistema fotodocumentador Syngene. La Figura 22 muestra una comparación de los perfiles de amplificación obtenidos para una combinación de IRAP y una de REMAP, teñidos con bromuro de etidio o GelRed, y usando el sistema de captura de imagen con cámara digital Nikon y mediante el equipo Syngene. Se observa que la tinción con bromuro de etidio no presenta una buena resolución de los patrones de bandeo, además de mostrar fluorescencia de fondo que interfiere en la lectura. Por otra parte, la tinción con GelRed presenta una imagen con fondo uniforme y las bandas se observan con mayor nitidez que con bromuro de etidio. Se favoreció el uso de GelRed además por la menor toxicidad que brinda este compuesto como agente intercalante respecto al bromuro de etidio (Quillardet y Hofnung, 1988). Al comparar los patrones obtenidos del mismo gel capturado usando la cámara digital Nikon E4300 con la imagen obtenida en el equipo Syngene, se observa que en este último sistema se puede identificar mejor las bandas más tenues y aporta una mayor resolución para el análisis posterior de las bandas. Por lo tanto, para todos los análisis posteriores se utilizó GelRed en una solución 100X como agente intercalante y las imágenes se capturaron mediante el equipo Syngene.



**Figura 22: Comparación de sistemas de tinción y de captura de imagen de perfiles de amplificación IRAP y REMAP.** Amplificaciones con una combinación de partidores IRAP (Nikita con IRAP-Tdk-11F) y una REMAP (UBC856 con LTR2119) mediante: **(A)** tinción con bromuro de etidio capturado con cámara Nikon E4300, **(B)** tinción con GelRed capturado con cámara Nikon E4300, y **(C)** tinción con GelRed capturado en el equipo Syngene. Carril 1: BQUCH095 (Tonga), carril 2: BQUCH195 (Hawái), carril 3: BQUCH234 (Islas Marquesas), carril 4: BQUCH221 (Rapa Nui). L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

### 5.5 Selección de partidores para el análisis de *B. papyrifera* de Oceanía Remota

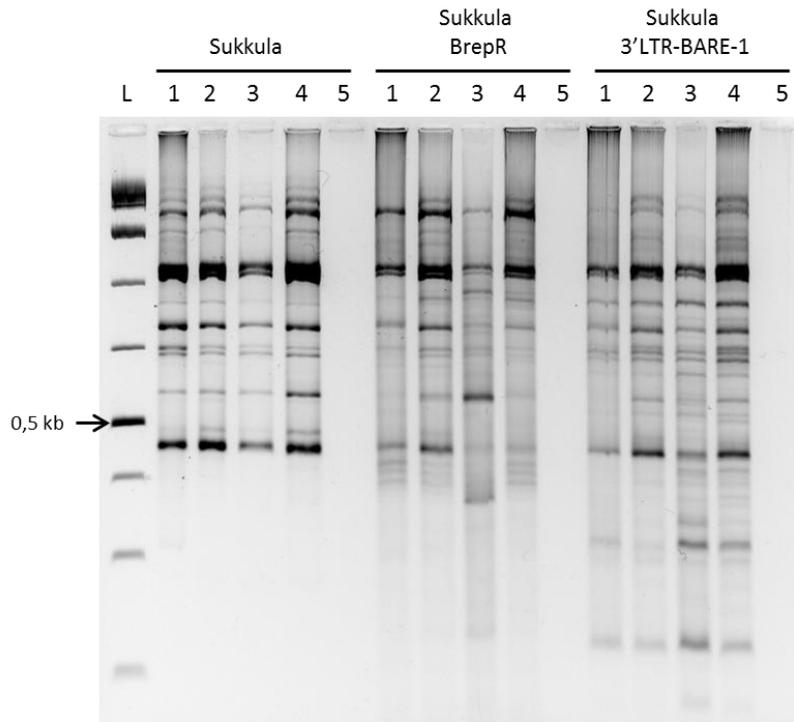
Para seleccionar aquellos partidores con potencial informativo que permitan distinguir los patrones de bandeo entre diferentes muestras de morera de papel provenientes de Oceanía Remota, se sometieron las 13 combinaciones IRAP preseleccionadas y las 22 combinaciones REMAP preseleccionadas a una amplificación por PCR de un grupo control de muestras de *B. papyrifera* provenientes de diversas islas de Oceanía Remota, indicadas en la Tabla 19. El grupo control usado se definió en base a la distancia geográfica entre las islas de Oceanía Remota: desde Tonga, una de las islas más próximas a Oceanía Cercana, a islas más remotas (Hawái, Islas Marquesas y Rapa Nui), con el propósito de registrar la mayor diferencia posible en los perfiles al usar las combinaciones de partidores preseleccionadas.

**Tabla 19: Muestras control de *B. papyrifera* de Oceanía Remota.**

País / Región	Isla / Localidad	Código
Tonga	Tongatapu	BQUCH095
E.E.U.U.	Oahu, Hawái	BQUCH195
Polinesia Francesa	Fatuhiva Otioa, Islas Marquesas	BQUCH234
Chile	Rapa Nui	BQUCH221

### 5.5.1 Selección de partidores IRAP

Las 13 combinaciones preseleccionadas de partidores de IRAP se probaron con las cuatro muestras del grupo control. Analizando los geles obtenidos, se determinó que ninguna de las combinaciones de IRAP usadas mostró diferencias evidentes entre las muestras de Oceanía Remota probadas. A modo de ejemplo, se muestran tres combinaciones en que el perfil obtenido es similar para las diferentes localidades del grupo de control (Figura 23). Dado que no se determinaron perfiles claramente distinguibles, se descartaron estas combinaciones de partidores IRAP para los posteriores análisis de esta memoria. Cabe señalar que no se consideraron como cambios de perfil aquellos casos en que se observaba la aparición de bandas de bajo peso molecular concomitantes con la desaparición de bandas de alto peso molecular en la misma muestra, debido a que estos cambios pueden ocurrir por degradación parcial del ADN (ver muestra 3 en las combinaciones de partidores Sukkula con BrepR y Sukkula con 3'LTR-BARE-1). Por lo tanto, para el análisis de diversidad genética en muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota no se considerarán marcadores IRAP.

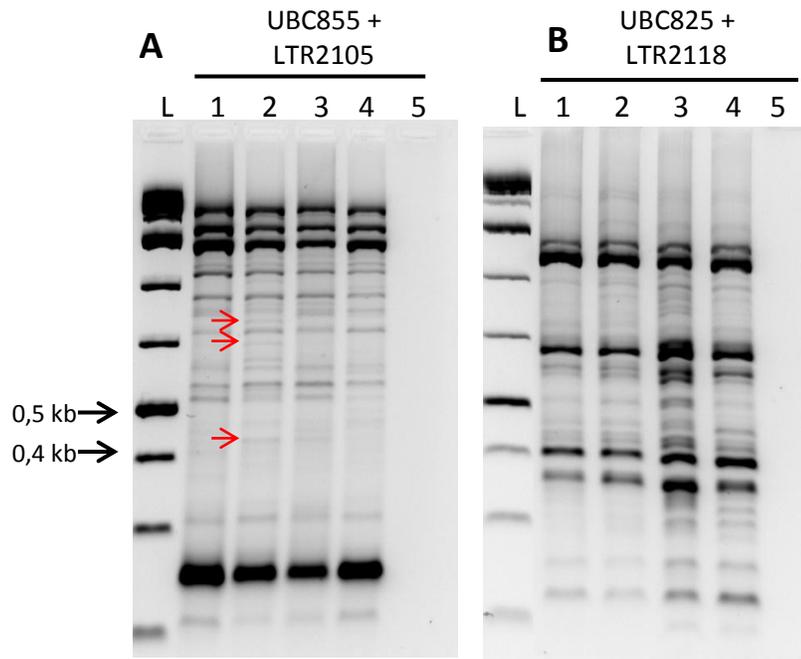


**Figura 23: Amplificación IRAP con cuatro muestras control de *B. papyrifera*.** Perfiles obtenidos al amplificar el grupo de muestras control con algunos de los partidores IRAP preseleccionados: Sukkula, Sukkula con BrepR y Sukkula con 3'LTR-BARE-1. Carril 1: BQUCH095 (Tonga), carril 2: BQUCH195 (Hawái), carril 3: BQUCH234 (Islas Marquesas), carril 4: BQUCH221 (Rapa Nui). L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

### 5.5.2 Selección de partidores REMAP

Al igual que en el caso anterior, las 22 combinaciones preseleccionadas de partidores de REMAP se probaron con las cuatro muestras del grupo control. La Figura 24 muestra un ejemplo de amplificación de REMAP, (A y B) en la que se observa la presencia de diferencias entre las muestras analizadas, marcadas con una flecha.

A pesar que varias combinaciones de partidores de REMAP mostraron perfiles distintivos, la dificultad para leer los patrones no permitió escoger algunas combinaciones para análisis posteriores. A modo de ejemplo, en la Figura 24A se muestran los perfiles obtenidos para una pareja de partidores que resultó adecuada para su análisis (UBC855 con LTR2105), en cambio la Figura 24B muestra una pareja de partidores que generó en perfil que no garantizaba una lectura confiable (UBC825 con LTR2118). Finalmente, evaluando los distintos parámetros considerados, se seleccionaron cuatro combinaciones de partidores REMAP con potencial informativo que serán empleados en el análisis de diversidad genética en muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota (Tabla 20).



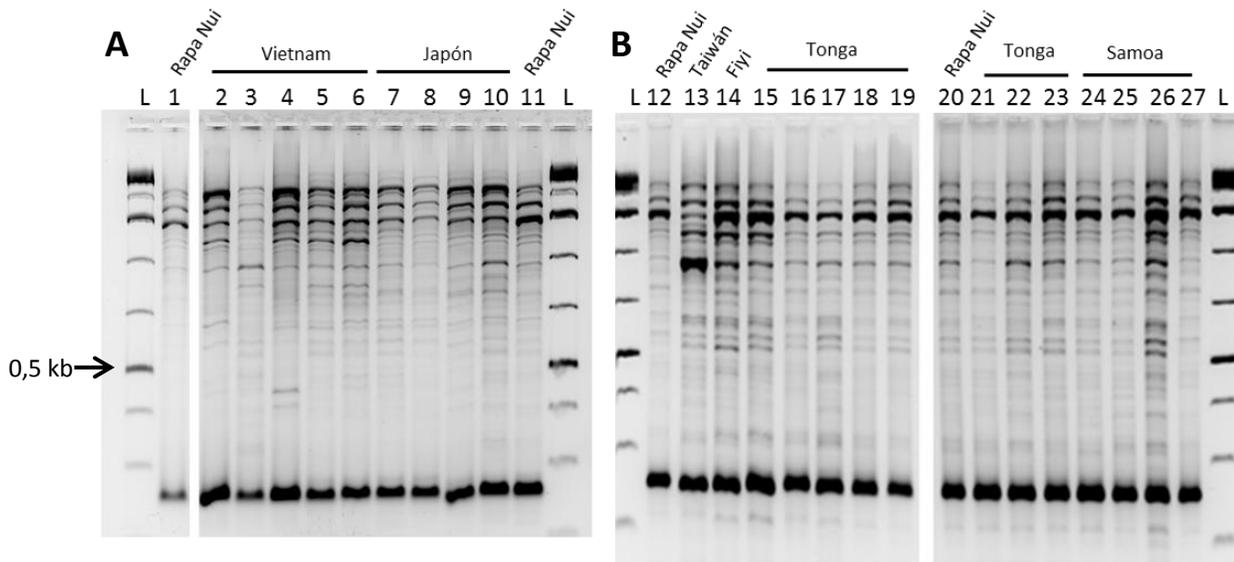
**Figura 24: Amplificación REMAP con cuatro muestras control de *B. papyrifera*.** Perfiles obtenidos al amplificar el grupo de muestras control con los partidores preseleccionados. Se indican con flechas las bandas distintivas de los distintos perfiles con los partidores (A) UBC855 con LTR2105 y (B) UBC825 con LTR2118. Carril 1: BQUCH095 (Tonga), carril 2: BQUCH195 (Hawái), carril 3: BQUCH234 (Islas Marquesas), carril 4: BQUCH221 (Rapa Nui). L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

**Tabla 20: Partidores REMAP seleccionados.**

Combinación	Código	Secuencia (5' → 3')	T <sub>op</sub>
1	UBC827	ACACACACACACACACG	53°C
	LTR2118	GTAGATAATATAGCATGGAGCAATC	
2	UBC855	ACACACACACACACACYT	50°C
	LTR2105	ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA	
3	UBC855	ACACACACACACACACYT	53°C
	LTR2118	GTAGATAATATAGCATGGAGCAATC	
4	UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	50°C
	LTR2121	ACTGGATTGATACCTTGGTTCTCAA	

### 5.6 Obtención de perfiles REMAP con muestras de *B. papyrifera* provenientes de la región nativa y de Oceanía Remota

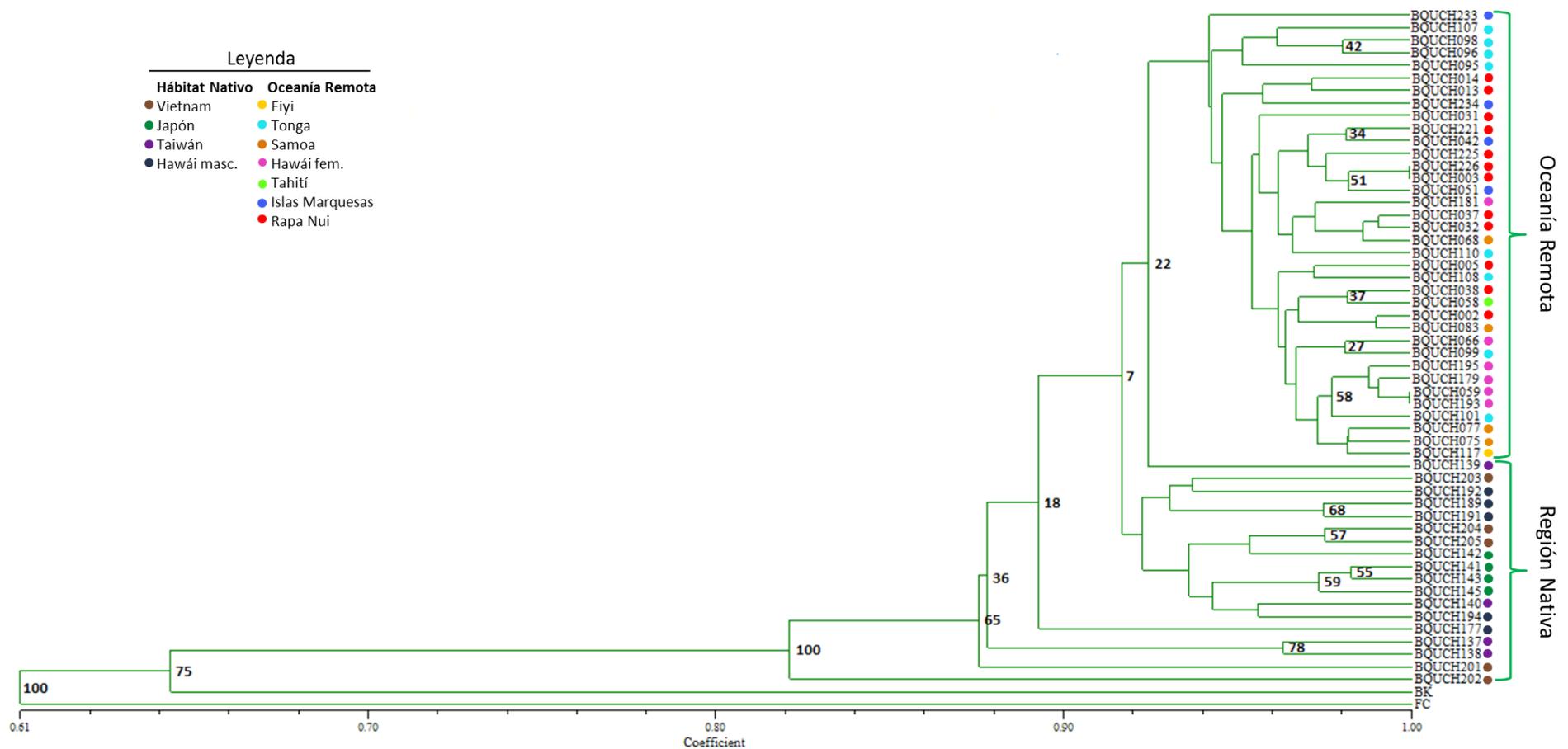
Para abordar el objetivo 3, las cuatro combinaciones de REMAP seleccionadas se probaron con un grupo de 18 muestras de *B. papyrifera* de la región nativa (Taiwán, Vietnam y Japón) y un grupo de 37 muestras de Oceanía Remota (ver Anexo 1), incluyendo como grupos externos una muestra de *Broussonetia kazinoki* y una de higuera (*Ficus carica*). La Figura 25 muestra un perfil representativo de la combinación de partidores REMAP UBC855 con LTR2105 para los dos grupos de muestras (hábitat nativo y región introducida). En cada gel se cargó tanto el estándar de tamaño molecular como una muestra control (BQUCH221, Rapa Nui) para asegurar que el patrón de bandeo sea confiable y reproducible entre los distintos geles. Los resultados señalaron algunas diferencias entre las muestras de la región nativa y el grupo de muestras de Oceanía Remota; sin embargo, se detectaron muy pocas diferencias entre las muestras de esta última región, incluso al usar las cuatro combinaciones REMAP seleccionadas.



**Figura 25: Amplificación de la combinación REMAP UBC855 con LTR2105 de muestras de *B. papyrifera* del hábitat nativo y de Oceanía Remota.** Amplificación REMAP usando los partidores UBC855 con LTR2105 con grupos de muestras de área nativa (A) y de Oceanía Remota (B). Carriles 1, 11, 12 y 20: BQUCH221 (Rapa Nui), carriles 2-6: Vietnam, carriles 7-10: Japón, carril 13: Taiwán, carril 14: Fiyi, carriles 15-19 y 21-23: Tonga, carriles 24-27: Samoa. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

A partir de los perfiles obtenidos, se generaron matrices binarias de presencia (1) o ausencia (0) de bandas polimórficas para cada marcador REMAP ensayado. Mediante el programa NTSYSpc se comparó la similitud de cada perfil utilizando el coeficiente DICE, y se agruparon los datos de la matriz por medio del algoritmo UPGMA, esquematizados en un dendrograma. Se generaron dendrogramas para cada una de las cuatro combinaciones de REMAP ensayadas (ver Anexo 3) y un dendrograma que incorpora la información de todos los marcadores (Figura 26). Los dendrogramas obtenidos para cada marcador independiente presentan agrupamientos similares al dendrograma integrado de los cuatro marcadores REMAP (Anexo 4).

En la Figura 26 se presenta el dendrograma integrado a partir de los cuatro marcadores REMAP seleccionados. Se observa que las muestras de grupos externos (*Broussonetia kazinoki* y *Ficus carica*) se separan de forma temprana de las muestras de *B. papyrifera*, con alta significancia estadística. Las muestras provenientes del hábitat nativo y de Oceanía Remota se distribuyen en dos ramas principales (llaves del dendrograma), aunque sin mayor soporte estadístico. El agrupamiento muestra que no se diferenciaron con soporte estadístico las muestras analizadas de acuerdo a los distintos orígenes geográficos dentro de Oceanía Remota; sin embargo, se observa una tendencia de agrupamiento entre muestras de algunas islas, como Rapa Nui e Islas Marquesas, que se distribuyen en la parte superior del dendrograma, mientras que las muestras de Samoa, Tahití y los individuos femeninos de Hawái también agrupan en una rama dentro del gran grupo de Oceanía Remota.



**Figura 26: Dendrograma integrado REMAP de muestras de *B. papyrifera* del hábitat nativo y de Oceanía Remota.** Dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud DICE y el algoritmo de agrupamiento UPGMA, que incorpora los análisis con los cuatro marcadores REMAP seleccionados. Se incluyeron muestras de *B. kazinoki* (BK) y *Ficus carica* (FC) como grupos externos. Se indica la localidad de cada muestra con círculos de colores.

## 6 Discusión

Esta memoria de título constituye el primer estudio de retrotransposones en la morera de papel, en el cual se planteó que mediante el análisis de marcadores basados en retrotransposones IRAP y REMAP, era posible evidenciar diversidad genética en muestras de *Broussonetia papyrifera* de Oceanía Remota que no habían podido ser detectadas con otros marcadores moleculares.

Como los marcadores basados en retrotransposones presentan un gran poder informativo en especies vegetales como trigo (Sabot y cols., 2005) y sicomoro (Saleh, 2007), entre otras (Kumar y Bennetzen, 1999; Freschotte y cols., 2002), resultó interesante evaluar marcadores moleculares de estos elementos en la morera de papel. Se escogió trabajar en particular con los marcadores IRAP y REMAP debido a la facilidad de su uso (Kalendar y Schulman, 2007).

Se caracterizaron dos tipos de posibles elementos TRIM, correspondiendo a los primeros retrotransposones descritos en esta especie, y se analizó la diversidad genética de 55 muestras de *B. papyrifera* en su área nativa y en Oceanía Remota usando cuatro marcadores REMAP, obteniendo una reducida diversidad genética entre estas muestras.

### 6.1 Caracterización de retroelementos de *B. papyrifera*

A partir de la literatura se seleccionaron nueve partidores IRAP y cuatro partidores de LTR para REMAP, que al combinarse entre sí y con partidores ISSR para REMAP, permitieron obtener 45 combinaciones IRAP y 36 combinaciones REMAP. Luego de elegir los partidores de retroelementos, fue necesario comprobar que las secuencias amplificadas efectivamente corresponden a retroelementos. Mediante el clonamiento de productos de PCR se obtuvieron cinco secuencias que podrían corresponder a dos tipos de retrotransposones. Estas secuencias presentaron regiones conservadas en retroelementos, como son las secuencias PBS y PPT (colonia 2, Figura 15). Sin embargo, además se obtuvo una buena puntuación con secuencias ribosomales 5S, lo cual inicialmente constituyó una sorpresa. Se esperaba encontrar secuencias del retrotransposón *Sukkula*; sin embargo, se encontraron inserciones de ADN ribosomal 5S en el terminal repetido del retrotransposón en miniatura (TRIM) tipo *Cassandra* (Kalendar y cols., 2008), que corresponden a retroelementos de aproximadamente 600 pb que contienen regiones características como la región PBS y el tracto polipurina, pero carecen de marcos de lectura abierto, por lo que son elementos no autónomos y requieren de otro retroelemento autónomo para movilizarse (Witte y cols., 2001). Además, se identificaron regiones características de secuencias ribosomales 5S, como los sitios A y C de unión al promotor de la ARN polimerasa III, la secuencia de terminación de la transcripción y la cola poli A. Estos motivos conservados y su disposición en el producto de PCR clonado indican que al menos una de las secuencias clonadas en esta memoria podría corresponder a elementos TRIM derivados de un retroelemento *Sukkula* que sufrió alteraciones y pérdida de función. Por otra parte, el segundo tipo de producto PCR clonado (colonias 1, 3, 4 y 5) podría también corresponder a un segundo retroelemento tipo TRIM, dado que también presenta secuencias de terminación y de poli A del gen de ADNr 5S en dos bloques del producto clonado, así como la secuencia PPT del TRIM (Figura B del Anexo 2). En este segundo

elemento, se presentaron problemas para identificar otras secuencias características de regiones ribosomales 5S y de elementos TRIM, como los sitios A y C de unión al promotor intrínseco de la ARN polimerasa III o el sitio PBS, respectivamente, encontrados en el producto de PCR obtenido a partir de una amplificación con el partidor IRAP *Sukkula*. Esta información indica que la secuencia caracterizada podría corresponder a un retroelemento aún más antiguo, debido a la menor conservación de estas regiones. Además, las colonias 1, 3, 4 y 5, si bien presentaron secuencias muy similares entre ellas, es posible observar polimorfismos de una base que las diferencian, pero además divergen significativamente cerca del extremo 3' (Anexo 2, Figura A). Esto podría sugerir que estas cinco secuencias corresponden a diferentes retroelementos derivados de *Sukkula* de un tamaño similar, de modo que al amplificar y someter los amplicones a electroforesis en gel de agarosa, migran a un tamaño relativamente similar y no es posible diferenciarlas. Este análisis se relaciona con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por A. Fuentes (2015), quien clonó productos de PCR obtenidos con un marcador de sexo desarrollado para *B. papyrifera*, obteniendo diferentes secuencias de lo que parecía un solo amplicón en geles de agarosa.

El análisis realizado en esta memoria podría significar un nuevo enfoque en los estudios de retroelementos mediante marcadores IRAP, aislando retroelementos de tamaños similares mediante clonamiento para su caracterización, en lugar de buscar diferencias en perfiles de bandeos.

El marcador IRAP que presentó la amplificación más robusta en cuanto a intensidad y número de bandas fue *Sukkula*, por lo que tiene sentido haber caracterizado elementos TRIM, posiblemente debido a la abundancia de este elemento en *B. papyrifera*. Es posible que éste se encuentre en diversas formas: como un retroelemento activo o como un derivado inactivo (LARD o TRIM). En resumen, en este trabajo se identificaron cinco secuencias que corresponderían a dos tipos de retroelementos TRIM (Figuras 13 y 15). Los resultados obtenidos propician estudios futuros para ampliar la caracterización realizada de retroelementos TRIM de *B. papyrifera*.

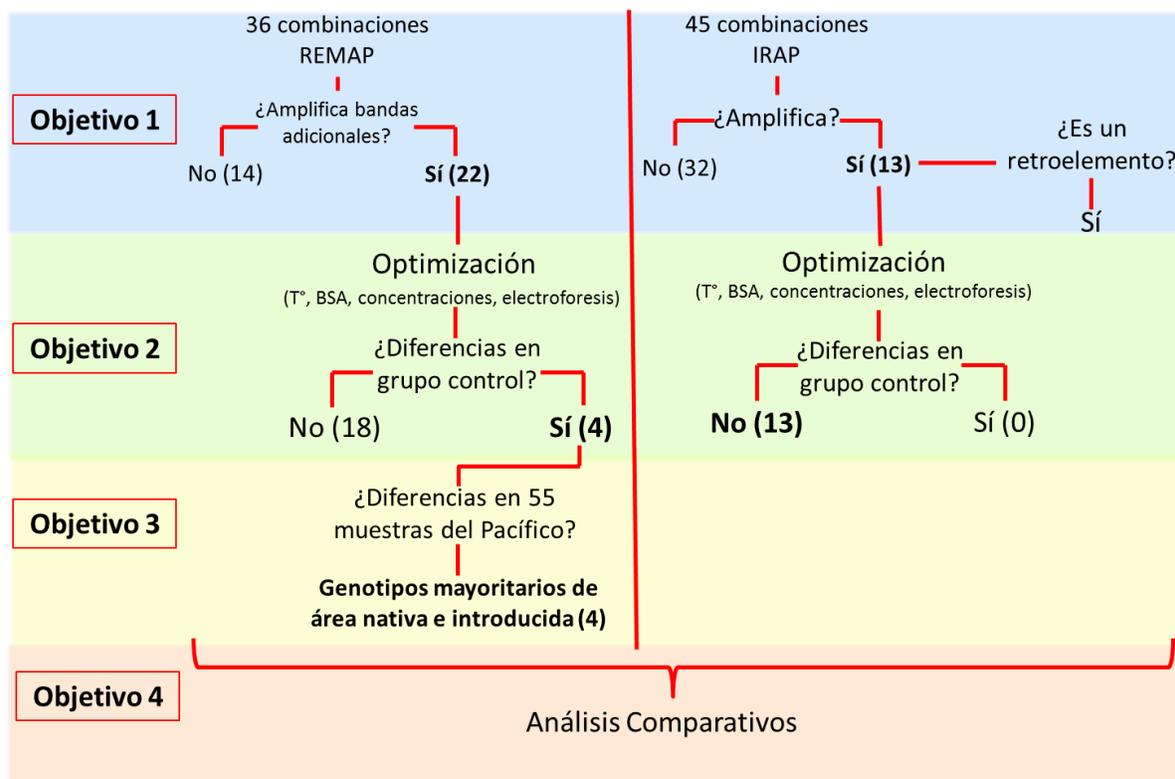
## **6.2 Optimización de protocolo IRAP y REMAP**

Durante el desarrollo de esta memoria de título se optimizaron los protocolos IRAP y REMAP para su uso en muestras de *B. papyrifera*. Se determinó que los factores más críticos del protocolo PCR establecido por Kalendar y Schulman (2007) para la obtención de perfiles de bandas adecuados fueron la concentración de partidores de retroelementos (REMAP) y el programa de amplificación, donde al aumentar el tiempo de las etapas de desnaturación y apareamiento, y el número de ciclos de amplificación se logró un incremento considerablemente del número de bandas obtenidas (Figura 18).

Otra etapa fundamental para la obtención de perfiles adecuados fue la electroforesis en gel de agarosa. Se estandarizó el voltaje y el tiempo de corrida de la electroforesis, el método de tinción, el sistema de captura de imágenes y el criterio de análisis de resultados. El conjunto de los cambios realizados permitió analizar uniformemente los amplicones obtenidos en la PCR.

### 6.3 Análisis IRAP y REMAP en muestras de *B. papyrifera* de la región nativa y de Oceanía Remota

La Figura 27 muestra un diagrama de flujo de la tabla de decisiones experimentales y resume los resultados obtenidos en la optimización y análisis mediante protocolos IRAP y REMAP, desde la preselección de los partidores escogidos desde la literatura, hasta los perfiles obtenidos con los grupos de muestras de *B. papyrifera* de regiones nativas y de Oceanía Remota.



**Figura 27: Esquema resumen de la estrategia experimental y los resultados obtenidos.** Se muestra la tabla de decisiones empleada para la selección de partidores IRAP y REMAP y los resultados obtenidos para las actividades diseñadas para cada objetivo de esta memoria.

A partir de los partidores IRAP y REMAP escogidos de la literatura, se optimizaron los protocolos de amplificación y se seleccionaron cuatro partidores REMAP que mostraron diferencias en los patrones de amplificación en un grupo reducido de muestras control de Oceanía Remota. Luego, se analizó la diversidad genética de 55 muestras de morera de papel de distintas localidades de Asia y de islas del Pacífico, representativas del hábitat nativo y del área introducida. A partir de los resultados obtenidos, se construyó un dendrograma que refleja la distribución de las muestras de acuerdo a su diversidad genética. El análisis con estos partidores logró separar las muestras en el hábitat nativo de Oceanía Remota, aunque sin soporte estadístico, de modo que la distribución entregada por el dendrograma integrado muestra tendencias de agrupamientos, pero que requieren mayor información para poder atribuirlos de forma inequívoca. Entre los marcadores REMAP utilizados, la combinación UBC855 con LTR2105 mostró la estructura más cercana al dendrograma integrado (Anexo 4, Figura D).

Para las muestras de Oceanía Remota, se observa una tendencia en la distribución de las muestras correspondientes a Polinesia Oeste (Fiyi, Samoa, y en menor medida Tonga) y las de Polinesia Este (Hawái, Islas Marquesas, Tahití y Rapa Nui), de acuerdo a la separación geográfica propuesta por Wilmhurst y cols (2011). Cabe destacar que las muestras de Tonga se encuentran distribuidas a lo largo de todas las muestras de Oceanía Remota en el dendrograma presentado, lo cual interesantemente es similar a los resultados obtenidos por G. Olivares (2016) usando marcadores de microsátélites. En ese trabajo se encontraron genotipos característicos de Tonga en muestras de islas remotas, como Hawái e Islas Marquesas, sugiriendo que Tonga podría haber sido un punto de inicio para la dispersión clonal de la morera de papel, concomitante a la expansión humana hacia Polinesia Este.

El análisis con los partidores REMAP escogidos demostró menor diversidad que la encontrada con ISSR y con marcadores de cloroplastos. *B. papyrifera* es una planta con un genoma estimado de mayor tamaño que *Morus notabilis*. Si en esta especie se han identificado más de 30.000 elementos móviles (Li y cols., 2014) y dadas las características que se les atribuyen a los marcadores de retrotransposones como herramientas de gran variabilidad (Kalendar y cols., 2011) **¿por qué fue difícil encontrar diferencias entre las distintas muestras?** Es posible que los partidores escogidos no hayan sido los más adecuados, pues a pesar de considerar un número importante de partidores de retroelementos (nueve partidores IRAP que originaron 45 combinaciones posibles, mientras que cuatro partidores de LTR junto a 9 ISSR disponibles en el laboratorio generaron 36 combinaciones REMAP), no todos los partidores de retroelementos amplificaron, ya sea porque el genoma contiene muy pocos elementos para un determinado partidore o bien porque sus sitios de unión se encuentran demasiado alejados (Kalendar y Schulman, 2007). Además, algunos partidores pueden ser poco informativos, de acuerdo a lo publicado por Bernet y cols. (2004), donde los partidores diseñados para una familia de retrotransposones pueden detectar diversidad genética mientras que otros no. Por otra parte, hay una gran cantidad de retroelementos de familias *Gypsy* y *Copia* que no se consideraron en esta memoria de título y cuyas combinaciones podrían ser más informativas que las escogidas. Sin embargo, este estudio es la primera aproximación al análisis de diversidad genética mediante marcadores basados en retrotransposones en la morera de papel. Se identificaron 35 combinaciones de partidores IRAP y REMAP que presentaron amplificación, indicando que estos retroelementos están presentes en *B. papyrifera* y que las secuencias de unión para estos partidores se encuentran próximas entre sí.

Otra observación a considerar es por qué al ensayar los partidores REMAP seleccionados con un grupo control de muestras distantes entre ellas, se identificaron diferencias, pero al ampliar el número de muestras de Oceanía Remota, estas diferencias no se encontraron en las otras islas y no resultaron informativas (Figura 24A). Esto se puede explicar debido a la calidad del ADN, uniones inespecíficas de los partidores o que las bandas obtenidas pudiesen deberse a mutaciones, como inserciones o deleciones, a lo largo de la región amplificada (Bonchev y Parisod, 2013). Otra posibilidad podría corresponder a que las diferencias encontradas no son características de cada isla y por lo tanto no se propagaron por el área introducida.

El número de retroelementos analizados es un factor importante, ya que dependiendo de su abundancia, los marcadores utilizados podrían entregar perfiles muy débiles que requerirían una optimización particular del protocolo de amplificación, o por el contrario, la existencia de una gran cantidad de retroelementos podría originar competencia por el sitio de unión de los partidores y dar como resultado una amplificación errática (posible causa de la amplificación con los partidores BrepR y 3'LTR-BARE-1 mostrada en la Figura K del Anexo 3).

Por otra parte, una nueva publicación de Ma y cols. (2015) reportó una base de datos más actualizada de *M. notabilis* (MnTEdb) enfocada en la descripción de sus elementos móviles. Este trabajo demuestra que el 43% del genoma de esta especie corresponde a elementos móviles, de los cuales sólo el 28% son elementos con LTR (10% de retroelementos *Copia*, 9% *Gypsy*, 8% LARD y 0,61% TRIM) que comprenden alrededor de 4.000 miembros. En consecuencia, se estima que hay alrededor de 90 elementos TRIM. La diferencia con el número de retroelementos reportado en la base de datos MorusDB (más de 30.000 secuencias de retroelemento *Gypsy* y *Copia*; Li y cols., 2014) respecto a la base de datos MnTEdb puede deberse a que esta última describe elementos distintivos de manera más definida que la plataforma MorusDB. Teniendo en cuenta que el número de elementos móviles es al menos un orden de magnitud menor al esperado inicialmente, se puede entender que la diversidad determinada al usar estos partidores de retroelementos fuese menor. Aun así, se encontraron cinco secuencias correspondientes a dos tipos de retroelementos que forman parte de una de las familias menos representadas en este genoma.

#### **6.4 Consideraciones al protocolo IRAP y REMAP**

Se debe considerar que un análisis óptimo basado en el uso de estos marcadores implica la obtención de perfiles de bandas legibles y de intensidades definidas: un partidore que amplifica una gran cantidad de bandas dificultará la asignación de bandas polimórficas e interferirá con la lectura de las mismas. Por otra parte, la existencia de bandas de baja intensidad dificulta una asignación inequívoca de ausencia o presencia de ésta. En la Figura 22 se muestra una amplificación deseada, donde se observan bandas suficientemente distanciadas entre sí, lo cual permite diferenciarlas con facilidad e identificar las bandas polimórficas.

La integridad del ADN de las muestras juega un rol crítico al momento del análisis mediante IRAP y REMAP, ya que incluso para la misma muestra se pueden observar diferentes grados de intensidad al amplificar con distintos marcadores. Además, la degradación de ADN se puede evidenciar en la pérdida de bandas de alto tamaño molecular y la aparición de bandas de menor tamaño, lo que podría conducir a asignaciones erradas de diversidad.

Para aumentar el potencial informativo de las técnicas de IRAP y REMAP, se podría agregar una etapa de digestión de los productos de PCR con enzimas de restricción específicas con el fin de reducir el tamaño de los fragmentos para luego analizarlos mediante electroforesis capilar (Kalendar y cols., 2011).

## 6.5 Rutas de migración en Oceanía Remota

Finalmente, es importante analizar los resultados respecto a la pregunta inicial en la que se planteó este estudio: ¿Presentan los marcadores basados en retrotransposones un aporte para dilucidar las rutas de migración por Oceanía Remota?

La colonización de Oceanía Cercana y Remota ha dado origen a múltiples preguntas sobre las rutas en el complejo proceso de migración y colonización los pueblos pre-polinésicos. Entre los modelos propuestos destacan la ruta del “tren rápido” (*Fast train*), que postula un movimiento reciente entre 5.000-4.000 años AP desde Taiwán hacia Indonesia y Nueva Guinea, llegando a la región de Melanesia (archipiélago Bismarck, Islas Salomón, Fiyi y Nueva Caledonia, entre otras), hace aproximadamente 3.000 años AP y alcanzando las islas de Oceanía Remota alrededor del 2.000 AP (Diamond, 1988). Por otra parte se encuentra el modelo de la “ribera enmarañada” (*Entangled bank*), que sugiere que las primeras poblaciones pre-polinésicas se originaron producto de la interacción genética y cultural de poblaciones del sudeste asiático y los pueblos melanésicos. (Terrell, 1986). El modelo del “bote lento” (*Slow boat*) plantea una ruta similar a la del tren rápido, pero con un mayor asentamiento en la región de Melanesia, aumentando la mezcla genética, cultural y lingüística con la población local (Oppenheimer, 2001). Por último, se encuentra el modelo de la “Triple I” (*Voyaging corridor Triple-I*) que concilia el modelo de tren rápido con el del bote lento, sugiriendo una primera etapa de **invasión** por parte de los colonizadores de habla austronésica en el sector de Melanesia, seguido de la **incorporación** de elementos culturales de los habitantes de Oceanía Cercana, e **innovación** de tecnología que les permitiese viajar hacia las islas de Oceanía Remota (Green, 1991; Addison y Matisoo-Smith, 2010). Estas teorías han surgido producto de estudios holísticos que recopilaban evidencias arqueológicas, lingüísticas y genéticas (Kirch, 2010), por lo que para comprender y establecer una respuesta unificada es necesario ampliar los estudios a estas tres áreas.

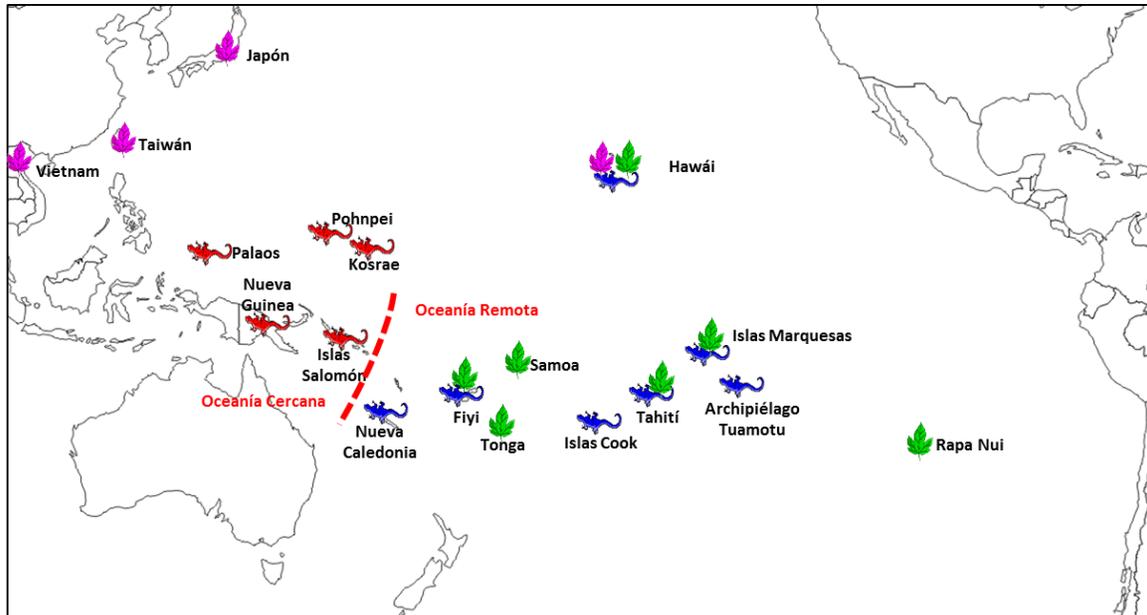
Los estudios de otros marcadores moleculares en la morera de papel han entregado información importante al respecto: el análisis de la región ribosomal ITS-1 determinó solo un polimorfismo de una base que distingue individuos asiáticos de muestras del área nativa (Seelenfreund y cols., 2010). Por otra parte, marcadores anclados en regiones de microsatélites (ISSR) y de cloroplastos no distinguen entre individuos de Oceanía Remota, pero sí entre muestras asiáticas y un grupo de muestras de Hawái, indicando una introducción asiática diferente a las de Oceanía Remota (Chang y cols., 2015; González y cols., 2015). Los haplogrupos de cloroplastos demuestran una relación directa entre Oceanía Remota y Taiwán, lo cual posiciona a Taiwán como el punto de partida de las migraciones austronésicas (Chang y cols., 2015).

Los resultados obtenidos al analizar las 55 muestras de *B. papyrifera* del área nativa e introducida con los cuatro marcadores REMAP seleccionados muestran una reducida diversidad genética y apoyan los resultados obtenidos con otros marcadores moleculares. Además, es consistente con la noción que la morera de papel es propagada de manera vegetativa en Oceanía. La baja diversidad encontrada con los marcadores ITS, ISSR y de cloroplastos es similar a la encontrada con los marcadores de retroelementos estudiados en esta memoria. En cambio, los marcadores de

microsatélites permitieron detectar diversidad genética en muestras de Oceanía Remota, demostrando mayor potencial informativo.

Los resultados de esta memoria y de los estudios con otros marcadores en la morera de papel son comparables con los resultados reportados por Austin (1999). En este trabajo, se utilizó el modelo de lagartija *Lipinia noctua*, la cual también fue una especie transportada a Oceanía Remota presumiblemente desde el Archipiélago Bismarck, encontrando baja diversidad genética en muestras de Oceanía Remota. Esta información puede relacionar los resultados obtenidos en esta memoria y con otros marcadores estudiados en *B. papyrifera* con el modelo de migración del “tren rápido” o el de la “Triple I”, ya que un movimiento humano relativamente rápido (alrededor de mil años) conllevará una reducida diversidad genética de las especies transportadas a lo largo de las islas de Oceanía Remota. Esto se ve reflejado en la Figura 28, donde tanto las muestras de *B. papyrifera* como las de *Lipinia noctua* presentaron una mayor diversidad en su hábitat nativo (Asia y Oceanía Cercana, respectivamente), mientras que en Oceanía Remota se encontró una reducida diversidad genética en ambos modelos.

Es interesante observar que en Hawái coexisten ambos genotipos descritos en esta memoria, lo cual es consistente con los resultados encontrados con otros marcadores moleculares utilizados en esta especie, como ISSR (González-Lorca y cols., 2015), el marcador de cloroplasto *ndhF-rpl32* (Chang y cols., 2015) y el marcador de sexo (Peñailillo, 2013), sugiriendo una segunda introducción asiática, diferente a la llevada a cabo por los polinesícos.



**Figura 28:** Distribución de muestras de *B. papyrifera* y *Lipinia noctua* según su genotipo mayoritario. Muestras de *B. papyrifera* y *Lipinia noctua* de su hábitat nativo (hojas violetas y lagartijas rojas) y del área introducida (hojas verdes y lagartijas azules).

## 6.6 Proyecciones del uso de retroelementos como marcadores moleculares en *B. papyrifera*

Se han desarrollado otros trabajos que estudian la dispersión de especies vegetales mediante marcadores de retroelementos, como variedades cítricas (Bretó y cols., 2001), arroz (*Oryza sativa*; Vitte y cols., 2004) y hierba Tauschii (*Aegilops tauschii*; Saeidi y cols., 2008). También se ha observado la presencia y acumulación de retrotransposones en cromosomas sexuales de plantas dioicas (presenta individuos femeninos y masculinos), tales como papaya (*Carica papaya*; VanBuren y Ming, 2013), colleja (*Silene latifolia*; Matsunaga y cols., 2002) y marihuana (*Cannabis sativa*; Sakamoto y cols., 2005), los cuales podrían influenciar la diversificación y evolución de éstos (Ellison y Bachtrog, 2013). *B. papyrifera* también es una especie dioica, por lo que este tipo de aproximaciones también se podrían desarrollar eventualmente.

Para futuros estudios con partidores IRAP y REMAP se sugiere ampliar el número de marcadores de retrotransposones, así como la variedad de familias de elementos móviles a analizar. Además, se podrían diseñar o seleccionar partidores para otras regiones del retrotransposón, como la región de la transcriptasa inversa (Guo y cols., 2006; Boronnikova y cols., 2010), de la integrasa (Bernet y cols., 2004) o en el sitio de unión al partidor (PBS) (Kalendar y cols., 2010; Andeden y cols., 2013; Mehmood y cols., 2013).

El análisis mediante marcadores de retrotransposones ofrece múltiples alternativas debido a la gran cantidad de combinaciones que se pueden hacer con estos marcadores y a que los retrotransposones han sido descritos como una importante fuente de diversidad genética en otras especies vegetales, se espera que estudios futuros profundicen el análisis de la diversificación clonal de la morera de papel en Oceanía Remota.

## 7 Conclusiones

- Se seleccionaron 13 marcadores de regiones de LTR generando 45 combinaciones de partidores IRAP y 36 combinaciones REMAP.
- Se identificaron cinco secuencias correspondientes a dos tipos de posibles retroelementos TRIM que contienen secuencias ribosomales 5S, siendo éstos los primeros retroelementos descritos en la morera de papel.
- Se montaron y optimizaron técnicas de IRAP y REMAP para el análisis de muestras de *B. papyrifera*.
- Se analizaron muestras de *B. papyrifera* provenientes de su hábitat nativo e introducidas en Oceanía Remota, utilizando cuatro marcadores REMAP seleccionados, encontrando una diversidad genética reducida, que favorece el modelo de distribución de *B. papyrifera* vegetativa o clonal, y con el modelo de distribución humana del “tren rápido” o de la “Triple I”.
- Los marcadores IRAP y REMAP escogidos resultaron poco informativos respecto a lo que se esperaba encontrar, presentando menor diversidad genética que marcadores ribosomales, ISSR, de cloroplastos y microsatélites, por lo que se rechaza la hipótesis planteada.
- Esta memoria de título constituye el primer estudio de retrotransposones en *B. papyrifera* y abre la posibilidad a estudios adicionales que determinen la utilidad de los marcadores basados en retrotransposones en el análisis de la diversificación clonal de la morera de papel en Oceanía Remota.

## 8 Referencias

- Addison D., Matisoo-Smith E. (2010). Rethinking Polynesians origins: A West-Polynesia Triple-I Model. *Archaeology in Oceania* 45 (1): 1-12.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.
- Ahns SJ., Costa J., Emanuel J. R. (1996). PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre-or post-PCR. *Nucleic Acids Research* 24(13): 2623-2625.
- Andeden EE., Baloch FS., Derya M., Kilian B., Özkan H. (2013). iPBS-Retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual Cicer species. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22(4): 453-466.
- Austin CC. (1999). Lizards took express train to Polynesia. *Nature* 397(6715): 113-114.
- Baumel A., Ainouche M., Kalendar R., Schulman AH. (2002). Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* CE Hubbard (Poaceae). *Molecular Biology and Evolution* 19(8): 1218-1227.
- Barker C. (2002). Plate 432. *Broussonetia papyrifera*. *Curtis's Botanical Magazine* 19(1): 8-18.
- Bernet GP., Mestre PF., Pina JA., Asíns MJ. (2004). Molecular discrimination of lemon cultivars. *HortScience* 39(1): 165-169.
- Bonchev G., Parisod C. (2013). Transposable elements and microevolutionary changes in natural populations. *Molecular Ecology Research* 13: 765-775.
- Boronnikova SV., Kalendar RN. (2010). Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. *Russian Journal of Genetics* 46(1): 36-42.
- Bretó MP., Ruiz C., Pina JA., Asins MJ. (2001). The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21(2): 285-293.
- Carrier G., Cunff L., Dereeoer A., Legrand D., Sabot F., Bouchez O., Audeguin L., Boursiquot JM., This P. (2012). Transposable Elements Are a Major Cause of Somatic Polymorphism in *Vitis vinifera* L. *PLoS One* 7(3): e32973.
- Chang CS., Liu HL., Moncada X., Seelenfreund A., Seelenfreund D., Chung KF. (2015). A holistic picture of Austronesian migrations revealed by phylogeography of Pacific paper mulberry. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112(44): 13537-13542.
- Cheng C., Daigen M., Hirochika H. (2006). Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Molecular Genetics and Genomics* 276(4): 378-390.
- Clark G., Petchey F., Hawkins S., Reepmeyer C., Smith I., Masse W. (2013). Distribution and extirpation of pigs in Pacific Islands: a case study from Palau. *Archaeology in Oceania* 48(3): 141-153.
- Clarke AC., Burtenshaw MK., McLenachan PA., Erickson DL., Penny D. (2006). Reconstructing the origins and dispersal of the Polynesian bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). *Molecular Biology and Evolution* 23(5): 893-900.
- Diamond J. (1988). Express train to Polynesia. *Nature* 336: 307-308.

- Dice L. R. (1945). Measures of the Amount of Ecologic Association between Species. *Ecology* 26(3): 297-302.
- Ellison CE., Bachtrog D. (2013). Dosage compensation via transposable element mediated rewiring of a regulatory network. *Science* 342(6160): 846-850.
- Feschotte C., Jiang N., Wessler SR. (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics* 3(5): 329-341.
- Fitzpatrick SM., Callaghan R. (2009). Examining dispersal mechanisms for the translocation of chicken (*Gallus gallus*) from Polynesia to South America. *Journal of Archaeological Science* 36(2): 214-223.
- Friedlaender JS., Friedlaender FR., Hodgson JA., Stoltz M., Koki G., Horvat G., Merriwether DA. (2007). Melanesian mtDNA complexity. *PLoS One* 2(2): e248.
- González-Lorca J., Rivera-Hutinel A., Moncada X., Lobos S., Seelenfreund D., Seelenfreund A. (2015). Ancient and modern introduction of *Broussonetia papyrifera* ([L.] Vent.; Moraceae) into the Pacific: genetic, geographical and historical evidence. *New Zealand Journal of Botany* 53(2): 75-89.
- Golson J. (1972). The remarkable history of indo-pacific man: Missing chapters from every world prehistory. *The Journal of Pacific History*, 7(1): 5-25.
- Green RC. (1991). The Lapita cultural complex: current evidence and proposed models. *Bulletin of the Indo-Pacific Prehistory Association* 11: 295-305.
- Guo DL., Zhang H., Luo Z. (2006). Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Science* 170(3): 528-533.
- Guo DL., Hou XG., Zhang X. (2014). A simple and efficient method to isolate LTR Sequences of plant retrotransposon. *BioMed Research International* 2014.
- Hapl V., Pavlíček A., Flegr J. (2001). Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Hagelberg E., Clegg JB. (1993). Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 252(1334): 163-170.
- Hather J., Kirch, PV. (1991). Prehistoric sweet potato (*Ipomoea batatas*) from Mangaia Island, central Polynesia. *Antiquity* 65(249): 887-893.
- Hertzberg M., Mickleson KNP., Serjeantson SW., Prior JF., Trent RJ. (1989). An Asian-specific 9-bp deletion of mitochondrial DNA is frequently found in Polynesians. *American Journal of Human Genetics* 44: 504-510.
- Heyerdahl T. (1950). The voyage of the raft Kon-Tiki. *The Geographical Journal* 115(1/3): 20-41.
- Hill AVS., Gentile B., Bonnardot JM., Roux J., Weatherall DJ., Clegg JB. (1987). Polynesian origins and affinities - Globin gene variants in Eastern Polynesia. *American Journal of Human Genetics* 40: 453-463.
- Hinkle AE. (2007). Population structure of Pacific *Cordyline fruticosa* (Laxmanniaceae) with implications for human settlement of Polynesia. *American Journal of Botany* 94(5): 828-839.

- Ho K-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: 165-174.
- Horrocks M., Nunn PD. (2007). Evidence for introduced taro (*Colocasia esculenta*) and lesser yam (*Dioscorea esculenta*) in Lapita-era (c. 3050–2500cal. yrBP) deposits from Bourewa, southwest Viti Levu Island, Fiji. *Journal of Archaeological Science* 34(5): 739-748.
- Houghton P. (1996). People of the Great Ocean: Aspects of Human Biology of the Early Pacific. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Jones E., Eager H., Gabriel S., Jóhannesdóttir F., Searle J. (2013). Genetic tracking of mice and other bioproxies to infer human history. *Trends in Genetics* 29 (5): 298-308.
- Jordan FM., Gray RD., Greenhill SJ., Mace R. (2009). Matrilocal residence is ancestral in Austronesian societies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* rspb-2009.
- Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98(5): 704-711.
- Kalendar R., Schulman A. (2007). IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1(5): 2478-2484.
- Kalendar R., Tanskanen J., Chang W., Antonius K., Sela H., Peleg O., Schulman AH. (2008). Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105(15): 5833-5838.
- Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman AH. (2010). iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics* 121(8): 1419-1430.
- Kalendar R., Flavell AJ., Ellis THN., Sjakste T., Moisy C., Schulman AH. (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity* 106: 520-530.
- Kalendar R., Schulman A. (2014). Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS. En Besse P. (Editor). *Molecular Plant Taxonomy* (242-246). Hatfileld: Springer.
- Kardolus J., Van Eck H., Van den Berg R. (1998). The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (*Solanaceae*). *Plant Systematics and Evolution*. 210: 87–103.
- Kayser M., Brauer S., Weiss G., Underhill P., Roewer L., Schiefenhövel W., Stoneking M. (2000). Melanesian origin of Polynesian Y chromosomes. *Current Biology* 10(20): 1237-1246.
- Kayser M., Brauer S., Cordaux R., Casto A., Lao O., Zhivotovsky LA., Lin AA. (2006). Melanesian and Asian origins of Polynesians: mtDNA and Y chromosome gradients across the Pacific. *Molecular Biology and Evolution* 23(11): 2234-2244.
- Kayser M., Lao O., Saar K., Brauer S., Wang X., Nürnberg P., Stoneking M. (2008). Genome-wide analysis indicates more Asian than Melanesian ancestry of Polynesians. *The American Journal of Human Genetics* 82(1): 194-198.
- Kimura Y., Tosa Y., Shimada S., Sogo R., Kusaba M., Sunaga T., Betsuyaku S., Eto Y., Nakayashiki H., Mayama S. (2001). OARE-1, a *Ty1-copia* Retrotransposon in Oat Activated by Abiotic and Biotic Stresses. *Plant Cell Physiology* 42 (12): 1345-1354.

- Kirch P. (2000). On the road of the winds: an archaeological history of the Pacific Islands before European contact. *Berkeley, CA: University of California Press.*
- Kirch P. (2010) Peopling of the Pacific: A holistic anthropological perspective. *Annual Review of Anthropology* 39: 131-148.
- Kistler L., Montenegro Á., Smith BD., Gifford JA., Green RE., Newsom LA., Shapiro B. (2014). Transoceanic drift and the domestication of African bottle gourds in the Americas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 111(8): 2937-2941.
- Kreder C. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied Environmental Microbiology* 62(3): 1102-1106.
- Kumar A., Bennetzen JL. (1999). Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics* 33(1): 479-532.
- Lebot V., Merlin M., Lindstrom L. (1997). Kava: The Pacific elixir: The definitive guide to its ethnobotany, history, and chemistry. *Inner Traditions/Bear & Co.*
- Lebot V., Trilles V., Noyer JL., Modesto J. (1998). Genetic relationships between yam (*Discorea alata*) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 499-509.
- Li T., Qi X., Zeng Q., Xiang Z., He N. (2014). MorusDB: a resource for mulberry genomics and genome biology. *Database: bau054.*
- Liao SX., Deng ZH., Cui K., Zhang CH. (2014). Genetic diversity of *Broussonetia papyrifera* populations in southwest China. *Genetic and Molecular Research*. 13 (3): 7553-7563.
- Liu Z., Fan W., Shen S. (2009). SRAP Marker in *Broussonetia papyrifera*. *Scientia Silvae Sinicae* 45(12): 54-58.
- Lodhi M., Ye GN., Weeden N., Reish B. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and Ampelopsis. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-16.
- Lum KJ., Cann RL. (1998). mtDNA and language support a common origin of Micronesians and Polynesians in Island Southeast Asia. *American Journal of Physical Anthropology* 105: 109–119.
- Ma B., Li T., Xiang Z., He N. (2015). MnTEdb, a collective resource for mulberry transposable elements. *Database* 2015: bav004.
- Matisoo-Smith E., Robins JH. (2004). Origins and dispersals of Pacific peoples: evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101(24): 9167-9172.
- Matisoo-Smith E. (2015). Ancient DNA and the human settlement of the Pacific: A review. *Journal of Human Evolution* 79: 93-104.
- Matsunaga S., Yagisawa F., Yamamoto M., Uchida W., Nakao S., Kawano, S. (2002). LTR retrotransposons in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genome* 45(4): 745-751.
- Matthews PJ. (1996). Ethnobotany and the origins of *Broussonetia papyrifera* in Polynesia: an essay on tapa prehistory. En: Davidson J., Irwin G., Leach F., Pawley A., Brown D. eds. *Oceanic culture history: essays in honour of Roger Green*. Dunedin, *New Zealand Journal of Archaeology Special Publication*: 117-132.
- Matthews PJ. (2004). Genetic diversity in taro, and the preservation of culinary knowledge. *Ethnobotany Research Applications* 2: 55–71.

- Mehmood A., Jaskani MJ., Ahmad S., Ahmad R. (2013). Evaluation of genetic diversity in open pollinated guava by iPBS primers. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 50(4): 591-597.
- Merriwether DA. (2002). A mitochondrial perspective on the peopling of the New World. *Memoirs of the California Academy of Sciences* 27: 295-310.
- Moodley Y., Linz B., Yamaoka Y., Windsor HM., Breurec S., Wu JY., Jobb G. (2009). The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science* 323(5913): 527-530.
- Olivares G. (2016). Estudio de la diversidad genética de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Herit. Ex. Vent.) en Polinesia Oeste mediante diversos marcadores moleculares. *Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica, U. de Chile*.
- Oppenheimer S., Richards M. (2001). Polynesian origins: slow boat to Melanesia? *Nature* 410(6825): 166-167.
- Page R. (1996). TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computational Application in Biosciences* 12(4): 357-358.
- Paule M., White R. (2000). Survey and Summary Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Research* 28(6): 1283-1298.
- Payacán C. (2015). Caracterización genética a partir de ADN antiguo de muestras de herbarios de *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Herit. ex Vent. del Pacífico mediante marcadores moleculares. *Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica, U. de Chile*.
- Peakall R., Smouse PE. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Peakall R., Smouse PE. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pearce SR., Harrison G., Li D., Heslop-Harrison JS., Kumar A., Flavell AJ. (1996). The *ty1-copia* group of retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. *Molecular and General Genetics* 205: 305-315.
- Peng X., Teng L., Wang X., Wang Y., Shen S. (2014). De Novo assembly of expressed transcripts and global transcriptomic analysis from seedlings of the Paper Mulberry (*Broussonetia kazinoki* x *Broussonetia papyrifera*). *PloS One* 9(5): e97487.
- Peñailillo J. (2013). Estudio de la diversidad genética de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Herit. ex Vent.) en el Pacífico mediante un marcador molecular de sexo y microsatélites. *Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica, U. de Chile*.
- Quillardet P., Hofnung M. (1988). Ethidium bromide and safety - readers suggest alternative solutions. *Trends in Genetics* 4(4): 89-90.
- Rohland N., Hofreiter M. (2007). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 42: 343-352.
- Rohlf F. (2008). NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.20. *Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY*.
- Roullier C., Kambouo R., Paofa J., McKey D., Lebot V. (2013). On the origin of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) genetic diversity in New Guinea, a secondary centre of diversity. *Heredity* 110(6): 594-604.
- Sabot F., Guyot R., Wicker T., Chantret N., Laubin B., Chalhoub B., Leroy P., Sourdille P., Bernard M. (2005). Updating of transposable element annotations from large wheat genomic

- sequences reveals diverse activities and gene associations. *Molecular Genetics and Genomics* 274(2): 119-130.
- Saeidi H., Rahiminejad MR., Heslop-Harrison JS. (2008). Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid, D-genome *Aegilops tauschii* (Triticeae, Poaceae) sub-taxa in Iran. *Annals of Botany* 101(6): 855-861.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425.
- Sakamoto K., Abe T., Matsuyama T., Yoshida S., Ohmido N., Fukui K., Sathoh S. (2005) RAPD markers encoding retrotransposable elements are linked to the male sex in *Cannabis sativa* L. *Genome* 48: 931–936.
- Sambrook J., Fritsch EF., Mariatis T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin YK., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., *et al.* (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765-768.
- SanMiguel P., Bennetzen JL. (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany* 81: 37–44.
- Seelenfreund D., Clarke AC., Oyanedel N., Piña R., Lobos S., Matisoo-Smith E. A., 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., Seelenfreund A. (2011). Molecular analysis of *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. (Magnoliophyta: Urticales) from the Pacific, based on ribosomal sequences of molecular DNA. *New Zealand Journal of Botany* 49(3): 413-420.
- Shirasu K., Schulman AH., Lahaye T., Schulze-Lefert P. (2000). A contagious 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Research* 10: 908-915.
- Singer VL., Jones LJ., Yue ST., Haugland RP. (1997). Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry* 249(2): 228-238.
- Smýkal P. (2006). Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *Journal of Applied Genetics* 47(3): 221-230.
- Sneath PHA., Sokal RR. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, *W.H. Freeman & Co.*: 573.
- Storey AA., Ramírez JM., Quiroz D., Burley DV., Addison DJ., Walter R., Matisoo-Smith E. (2007). Radiocarbon and DNA evidence for a pre-Columbian introduction of Polynesian chickens to Chile. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104(25): 10335-10339.
- Storey A., Athens J., Bryant D., Carson M., Emery K., Higham C., *et al.* (2012). Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures. *PLoS One* 7(7): e39171.

- Sun J., Liu S., Zhang C., Yu L., Bi J., Zhu F., Yang Q. (2012). Chemical Composition and Antioxidant Activities of *Broussonetia papyrifera* Fruits. *PLoS One* 7(2): e32021. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0032021>.
- Terrell J. (1988). History as a family tree, history as an entangled bank: constructing images and interpretations of prehistory in the South Pacific. *Antiquity* 62(237): 642-657.
- Teo CH., Tan SH., Ho CL., Faridah QZ., Othman YR., Heslop-Harrison JS., Kalendar R., Schulman, AH. (2005). Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana. *Journal of Plant Biology* 48(1): 96-105.
- VanBuren R., Ming R. (2013). Organelle DNA accumulation in the recently evolved papaya sex chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics* 288(5-6): 277-284.
- Villano C., Carputo D., Frusciante L., Santoro X., Aversano R. (2014). Use of SSR and retrotransposon-based markers to interpret the population structure of native grapevines from southern Italy. *Molecular Biotechnology* 56(11): 1011-1020.
- Vitte C., Ishii T., Lamy F., Brar D., Panaud O. (2004). Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 272(5): 504-511.
- Wang L., Dai C., Liu D., Liu Q. (2012). Identification of a male-specific amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker in *Broussonetia papyrifera*. *African Journal of Biotechnology* 11(33): 8196-8201.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. (2005) DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications. *CRC Press, Second Edition*: 14-17, 235-236.
- Wessler S. (1996). Plant retrotransposons: Turned on by stress. *Current Biology* 6(8): 959-961.
- Whistler WA., Elevitch CR. (2006). *Broussonetia papyrifera* (paper mulberry). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*.
- Whistler WA. (2009). Plants of the canoe people: an ethnobotanical voyage through Polynesia. *National Tropical Botanical Garden*.
- Witte CP., Le QH., Bureau T., Kumar A. (2001). Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98(24): 13778-13783.
- Yamanouchi H., Koyama A., Takyu T., Muramatsu N. (2010). Nuclear DNA amounts in diploid mulberry species (*Morus* spp.). *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 79(1): 1\_001-1\_8.
- Zerega NC., Ragone D., Motley TJ. (2004). Complex origins of breadfruit (*Artocarpus altilis*, Moraceae): implications for human migrations in Oceania. *American Journal of Botany* 91: 760-766.
- Zerega NC., Clement W., Datwyler S., Weiblen G. (2005). Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 402-416.

## 9 Anexos

### 9.1 Anexo 1: Muestras de *B. papyrifera* y especies utilizadas como grupos externos.

**Tabla I: Muestras de *B. papyrifera* de la región nativa analizadas mediante IRAP y REMAP.**

País / Región	Isla / Localidad	Código color	Muestra	Sexo	Concentración ADN (ng/μL)	Razón Abs <sub>260/280</sub>
Vietnam	Vietnam	●	BQUCH201	M	7,4	1,94
Vietnam	Vietnam	●	BQUCH202	F	307,8	1,66
Vietnam	Vietnam	●	BQUCH203	M	12,2	1,94
Vietnam	Vietnam	●	BQUCH204	M	167,1	1,95
Vietnam	Vietnam	●	BQUCH205	F	123,9	1,89
Japón	Japón	●	BQUCH141	M	28,1	2,06
Japón	Japón	●	BQUCH142	F	301,0	2,22
Japón	Japón	●	BQUCH143	M	14,3	2,10
Japón	Japón	●	BQUCH145	F	12,3	2,00
Taiwán	Taichung	●	BQUCH137	M	23,3	2,03
Taiwán	Taichung	●	BQUCH138	M	41,0	2,02
Taiwán	Distrito de Wulai	●	BQUCH139	F	61,9	2,03
Taiwán	Distrito de Wulai	●	BQUCH140	F	59,8	2,04

F: muestras femeninas, M: muestras masculinas.

**Tabla II: Muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota analizadas mediante IRAP y REMAP**

País / Región	Isla / Localidad	Código color	Muestra	Sexo	Concentración ADN (ng/μL)	Razón Abs <sub>260/280</sub>
Fiyi	Viti Levu	●	BQUCH117	F	23,5	2,07
Tonga	Tongatapu	●	BQUCH095	F	18,2	1,97
Tonga	Tongatapu	●	BQUCH096	F	6,3	2,01
Tonga	Tongatapu	●	BQUCH098	F	31,4	1,92
Tonga	Tongatapu	●	BQUCH099	F	9,7	1,94
Tonga	Tongatapu	●	BQUCH101	F	17,8	2,01
Tonga	Tongatapu	●	BQUCH107	F	14,1	2,01
Tonga	Tongatapu	●	BQUCH108	F	2,8	2,00
Tonga	Tongatapu	●	BQUCH110	F	33,2	1,82
Samoa	Upolu	●	BQUCH068	F	5,2	1,70
Samoa	Savaii	●	BQUCH075	F	25,6	2,10
Samoa	Savaii	●	BQUCH077	F	20,3	2,04
Samoa	Savaii	●	BQUCH083	F	5,9	2,01
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH059	F	14,6	1,91
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH066	F	25,5	1,94

F: muestras femeninas, M: muestras masculinas.

**Continuación Tabla II: Muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota analizadas mediante IRAP y REMAP**

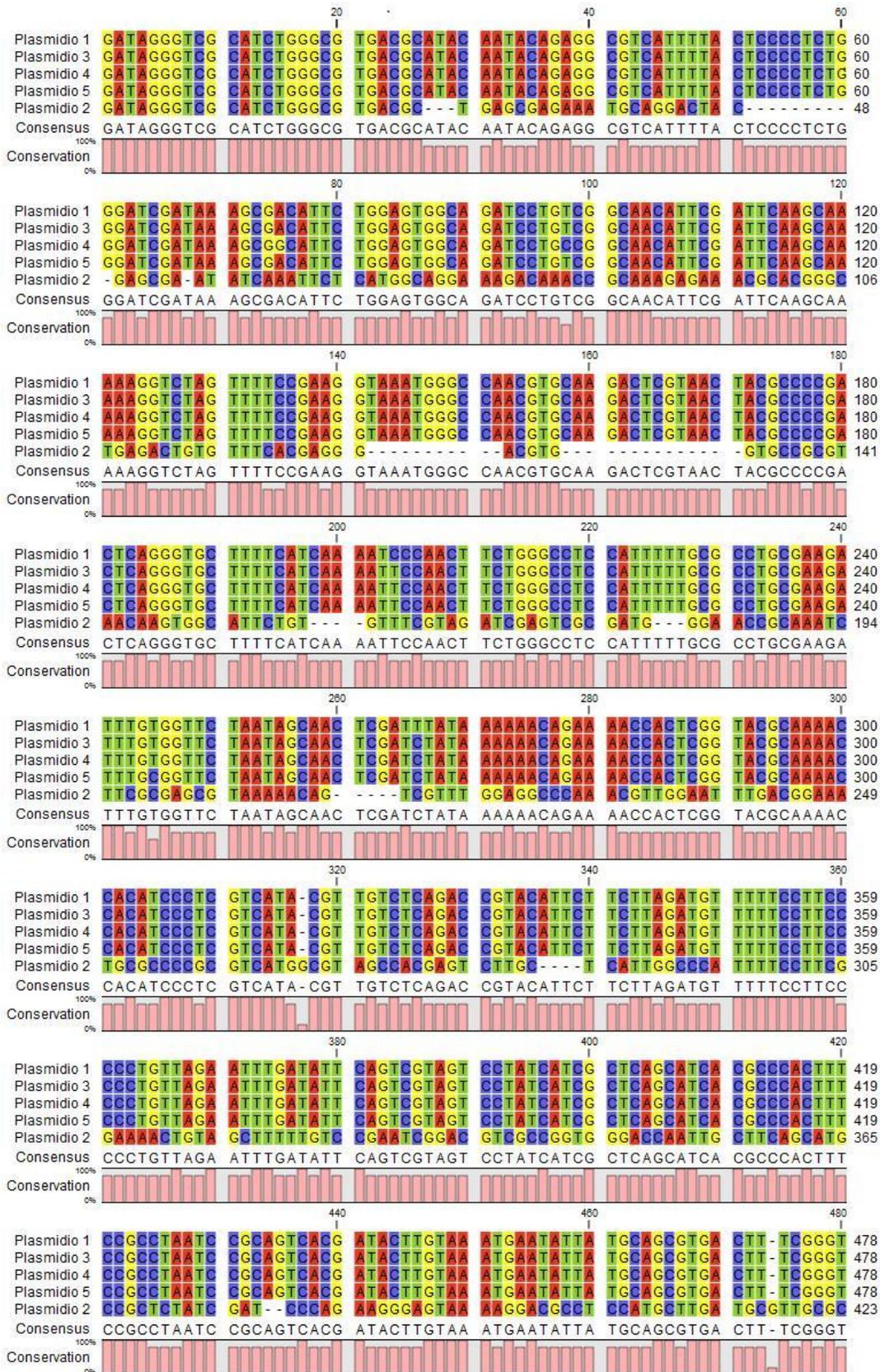
País / Región	Isla / Localidad	Código color	Muestra	Sexo	Concentración ADN (ng/μL)	Razón Abs <sub>260/280</sub>
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH179	F	37,1	1,99
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH181	F	20,9	2,05
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH193	F	34,8	2,07
E.E.U.U.	Oahu, Hawái	●	BQUCH195	F	24,5	1,72
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH177	M	246,8	2,03
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH189	M	24,2	1,98
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH191	M	7,6	2,06
E.E.U.U.	Isla grande, Hawái	●	BQUCH192	M	3,1	2,12
E.E.U.U.	Oahu, Hawái	●	BQUCH194	M	14,3	1,77
Polinesia Francesa	Tahití	●	BQUCH056	F	2,0	1,91
Polinesia Francesa	Islas Marquesas	●	BQUCH042	F	31,4	1,92
Polinesia Francesa	Islas Marquesas	●	BQUCH051	F	21,5	1,93
Polinesia Francesa	Islas Marquesas	●	BQUCH233	F	24,4	2,03
Polinesia Francesa	Islas Marquesas	●	BQUCH234	F	103,1	2,11
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH002	F	43,7	1,92
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH003	F	105,4	1,95
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH005	F	9,6	1,91
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH013	F	55,6	2,05
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH014	F	10,2	1,97
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH031	F	68,0	2,08
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH032	F	22,2	2,03
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH036	F	22,1	1,72
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH037	F	24,3	1,89
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH038	F	13,1	2,02
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH221	F	35,7	2,08
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH225	F	16,6	2,12
Chile Insular	Rapa Nui	●	BQUCH226	F	47,9	2,05

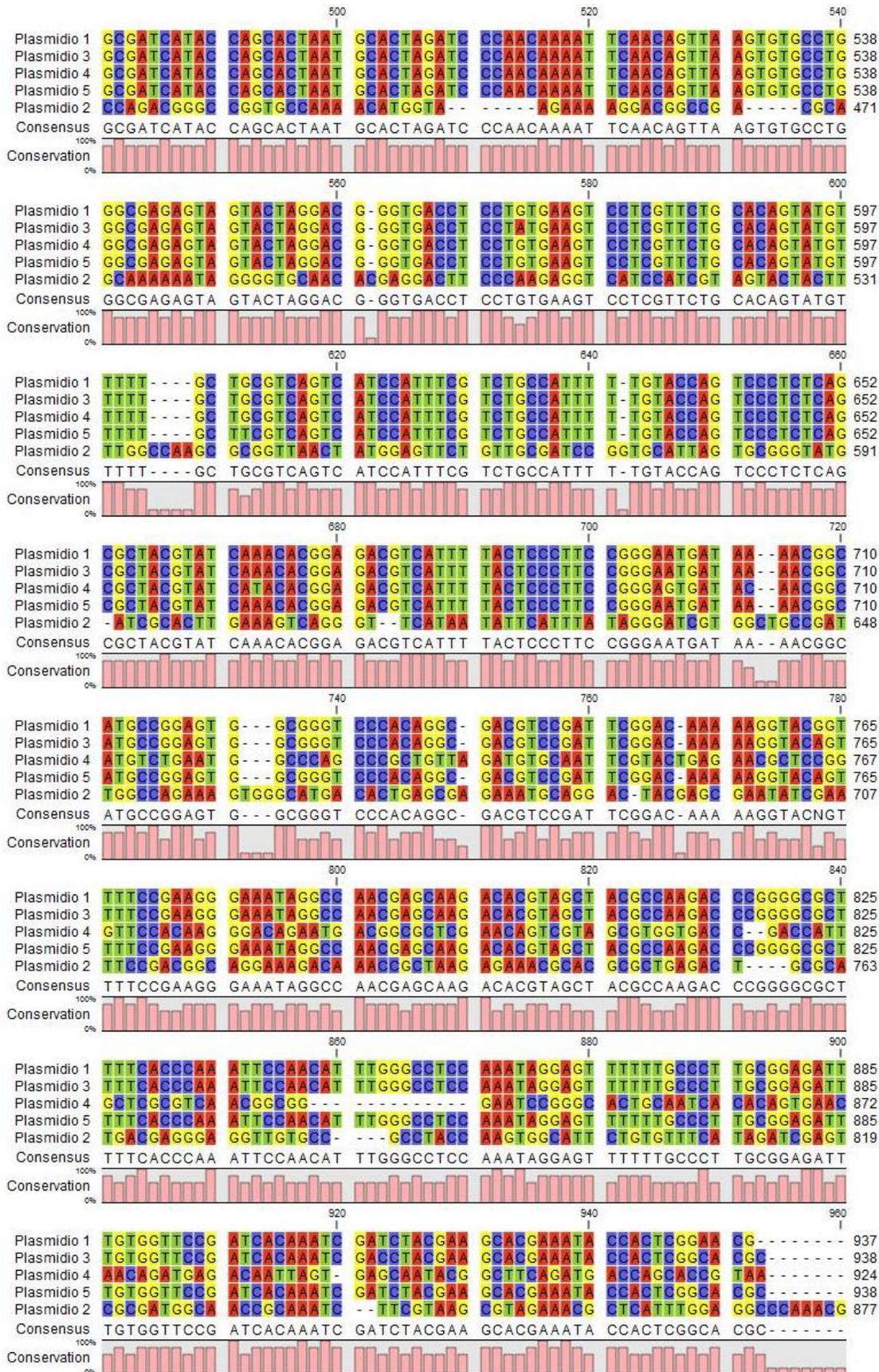
F: muestras femeninas, M: muestras masculinas.

**Tabla III: Muestras de material de prueba (*B. papyrifera*) y grupos externos usadas para análisis IRAP y REMAP.**

País	Localidad	Código	Concentración ADN (ng/μL)	Razón Abs <sub>260/280</sub>
Japón	Tokio	Z0001 ( <i>B. kazinoki</i> )	8,7	1,99
Chile Continental	Santiago	H1 ( <i>Ficus carica</i> )	8,0	1,93
Chile Continental	Santiago	BQUCH134	5,7	1,94
Chile Continental	Santiago	BQUCH235	10,52	1,91
Chile Continental	Santiago	BQUCH254	14,65	1,91

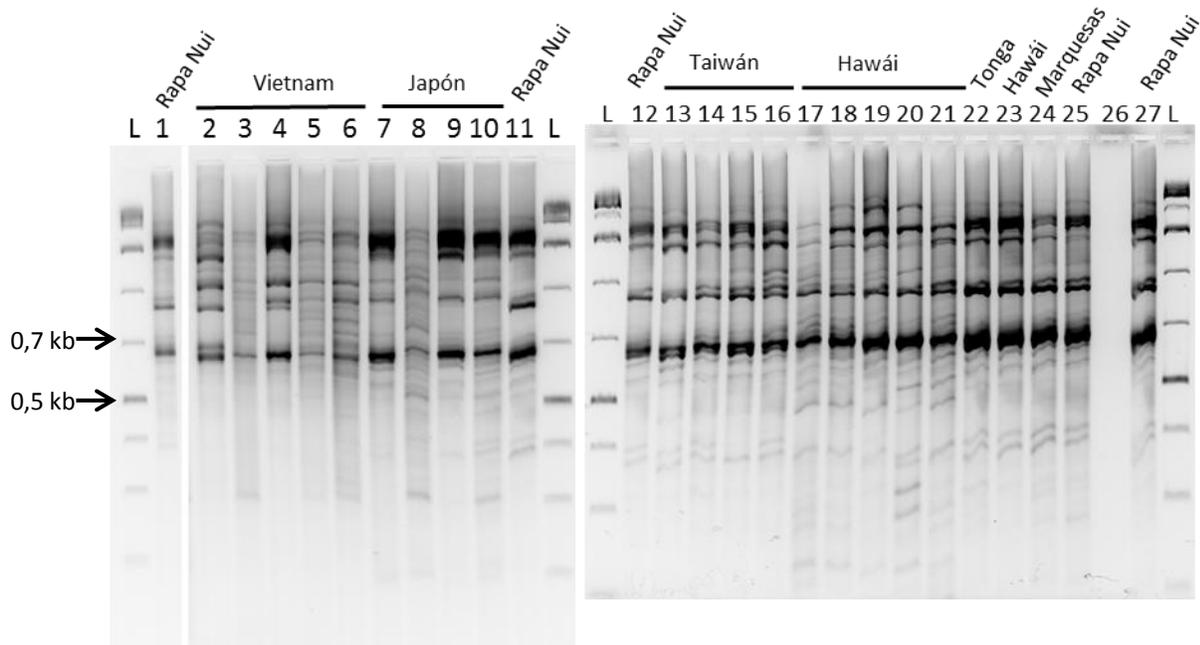
## 9.2 Anexo 2: Caracterización de retroelementos amplificados con partidores IRAP





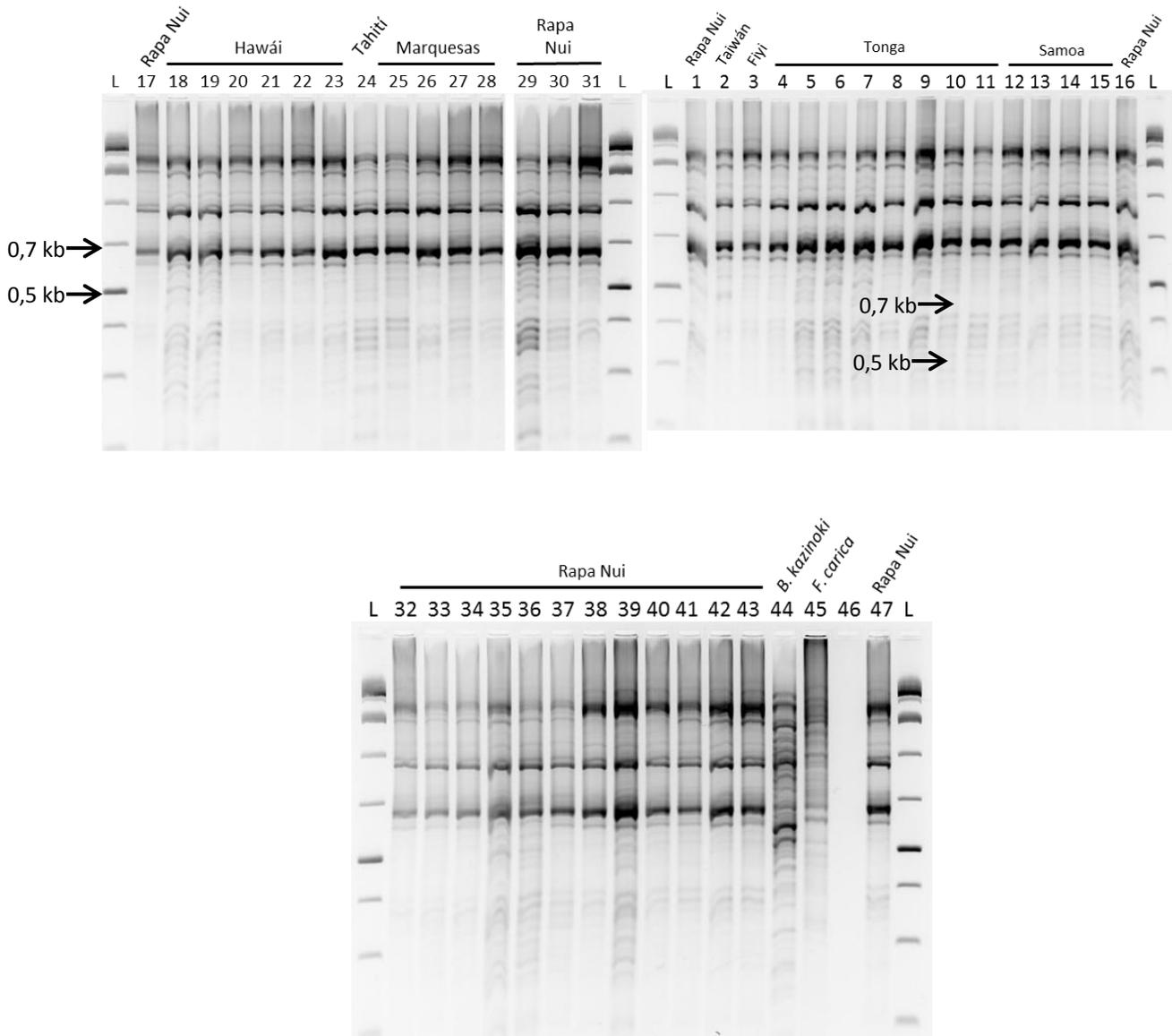


### 9.3 Anexo 3: Perfiles de amplificación con los marcadores REMAP seleccionados

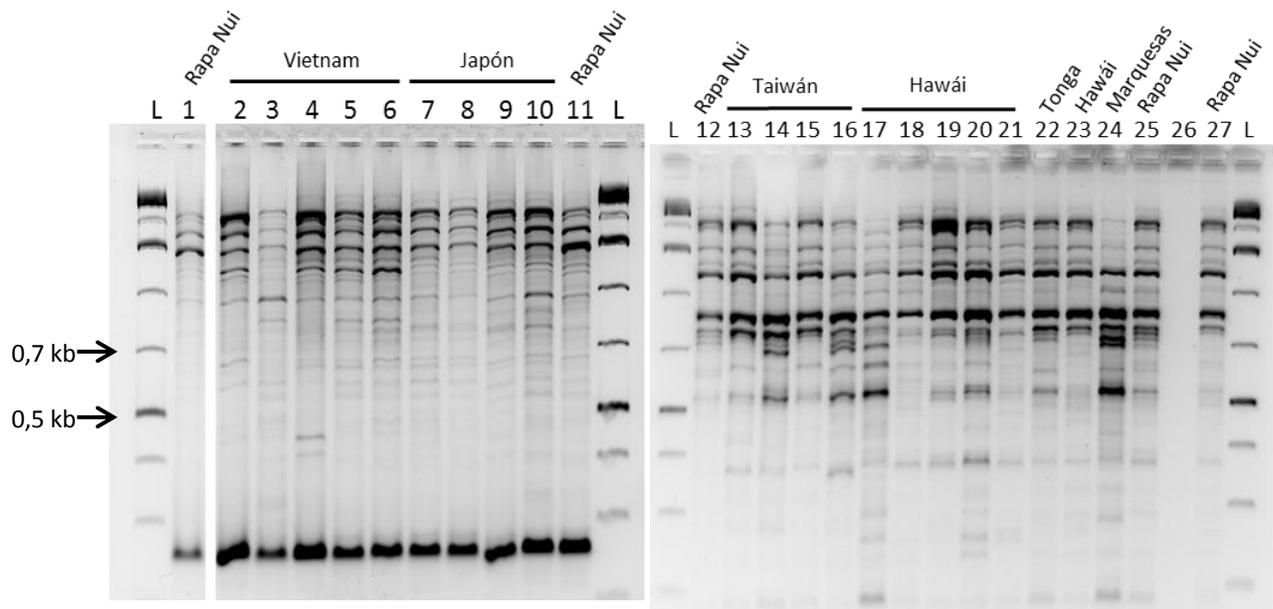


**Figura B: Amplificación REMAP de muestras de *B. papyrifera* del área nativa usando la combinación de marcadores UBC827 y LTR2118.** Carriles 1, 11, 12 y 27: muestra control BQUCH221 (Rapa Nui), carriles 2-6: Vietnam, carriles 7-10: Japón, carriles 13-16: Taiwán, carriles 17-21: Hawái (masc.), carril 22: Tonga, carril 23: Hawái (fem.), carril 24: Islas Marquesas, carril 25: Rapa Nui, carril 26: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

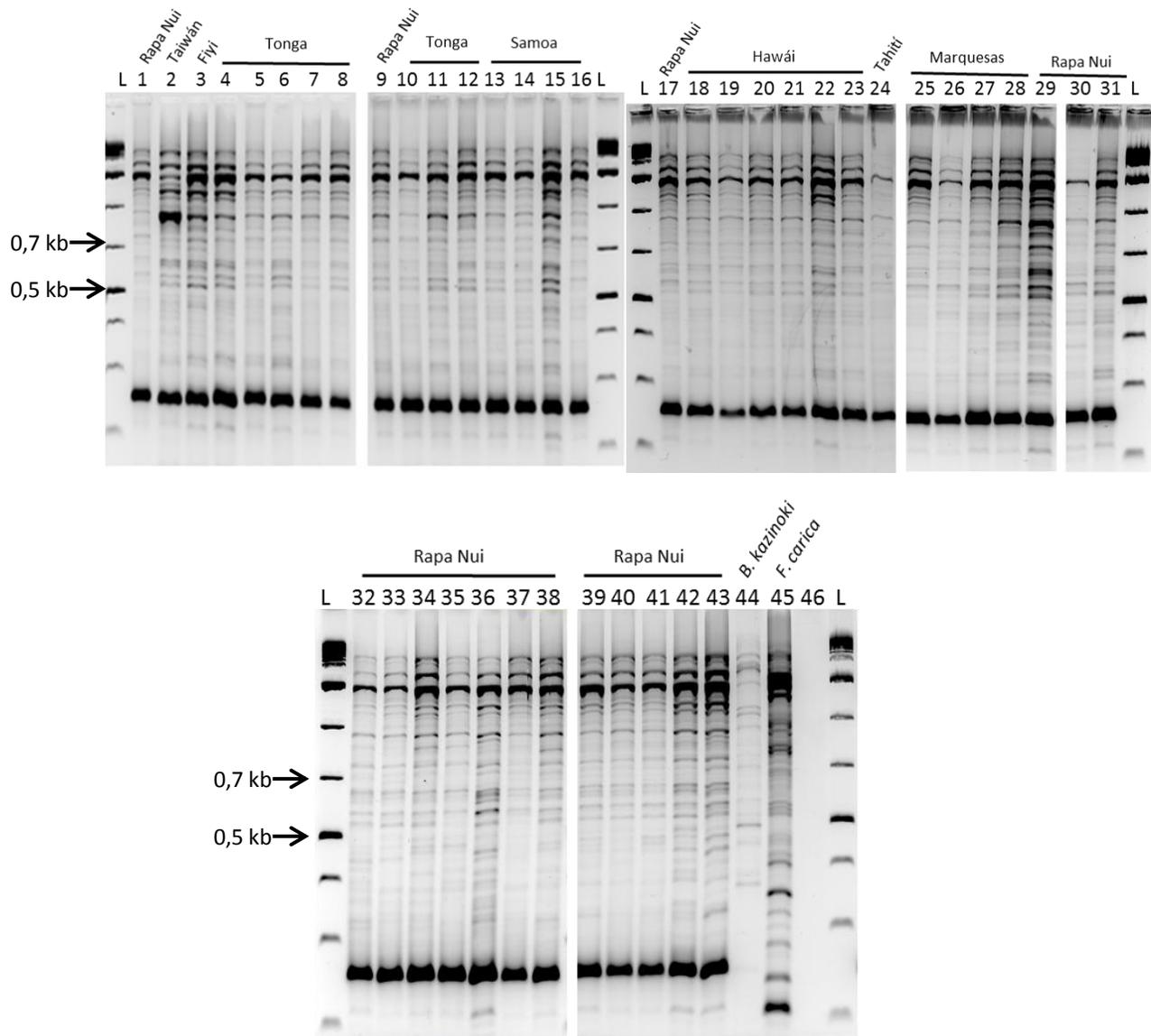
0,5 kb →



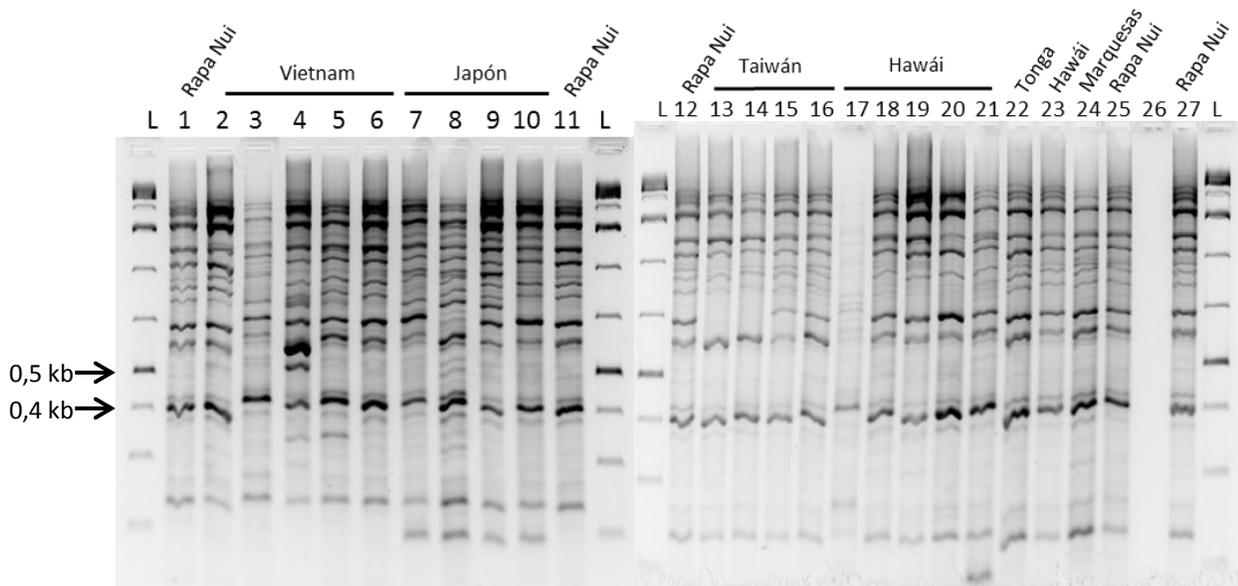
**Figura C: Amplificación REMAP de muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota usando la combinación de marcadores UBC827 y LTR2118.** Carriles 1, 16, 17, 31, 32 y 47: muestra control BQUCH221 (Rapa Nui), carril 2: Taiwán, carril 3: Fiyi, carriles 4-11: Tonga, carriles 12-15: Samoa, carriles 18-23: Hawái (fem.), carril 24: Tahiti, carriles 25-28: Islas Marquesas, carriles 29-30 y 33-43: Rapa Nui, carril 44: *B. kazinoki*, carril 45: *Ficus carica*, carril 46: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.



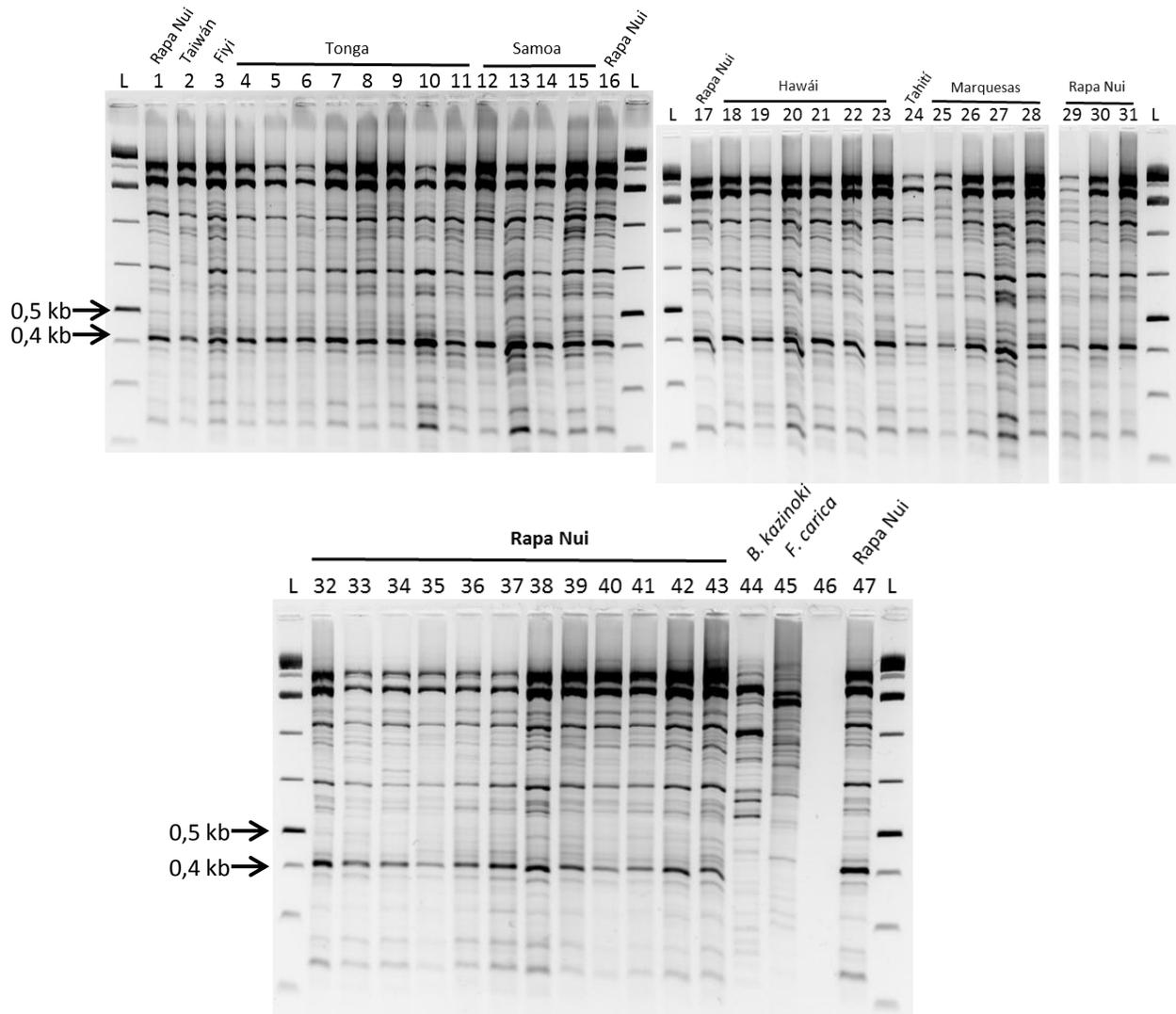
**Figura D: Amplificación REMAP de muestras de *B. papyrifera* del área nativa con la combinación de marcadores UBC855 con LTR2105.** Carriles 1, 11, 12 y 27: muestra control BQUCH221 (Rapa Nui), carriles 2-6: Vietnam, carriles 7-10: Japón, carriles 13-16: Taiwán, carriles 17-21: Hawái (masc.), carril 22: Tonga, carril 23: Hawái (fem.), carril 24: Islas Marquesas, carril 25: Rapa Nui, carril 26: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.



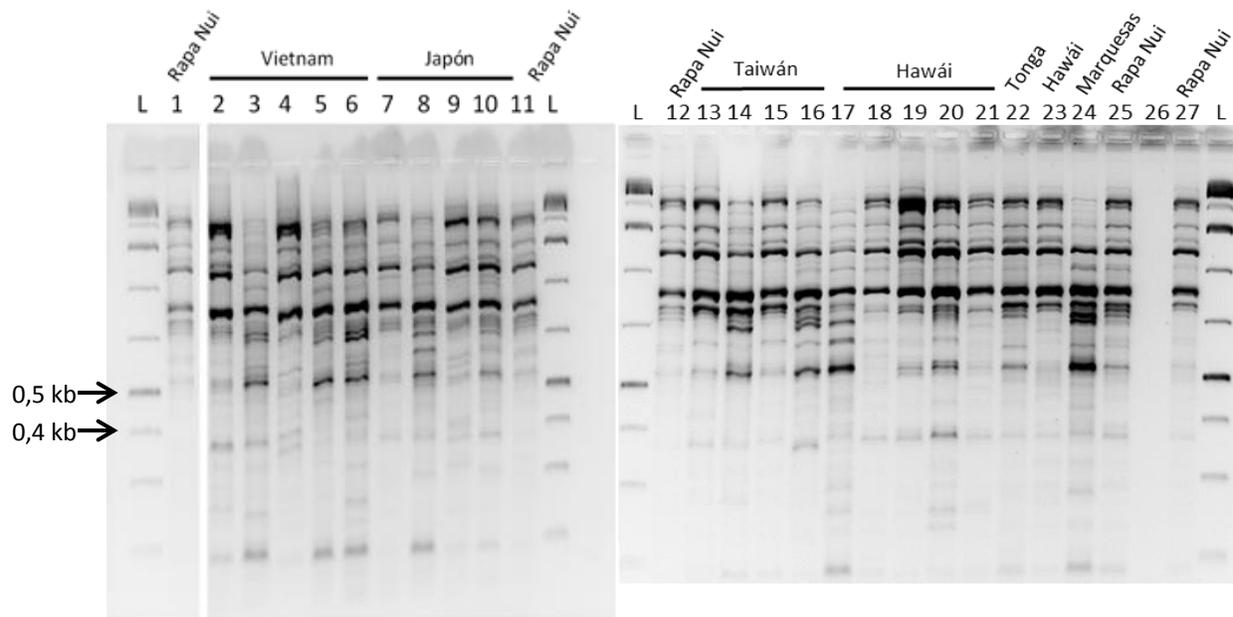
**Figura E: Amplificación REMAP de muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota con la combinación de marcadores UBC855 y LTR2105.** Carriles 1, 16, 17, 31, 32 y 43: muestra control BQUCH221 (Rapa Nui), carril 2: Taiwán, carril 3: Fiyi, carriles 4-8 y 10-12: Tonga, carriles 13-16: Samoa, carriles 18-23: Hawái (fem.), carril 24: Tahití, carriles 25-28: Islas Marquesas, carriles 29-30 y 33-43: Rapa Nui, carril 44: *B. kazinoki*, carril 45: *Ficus carica*, carril 46: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.



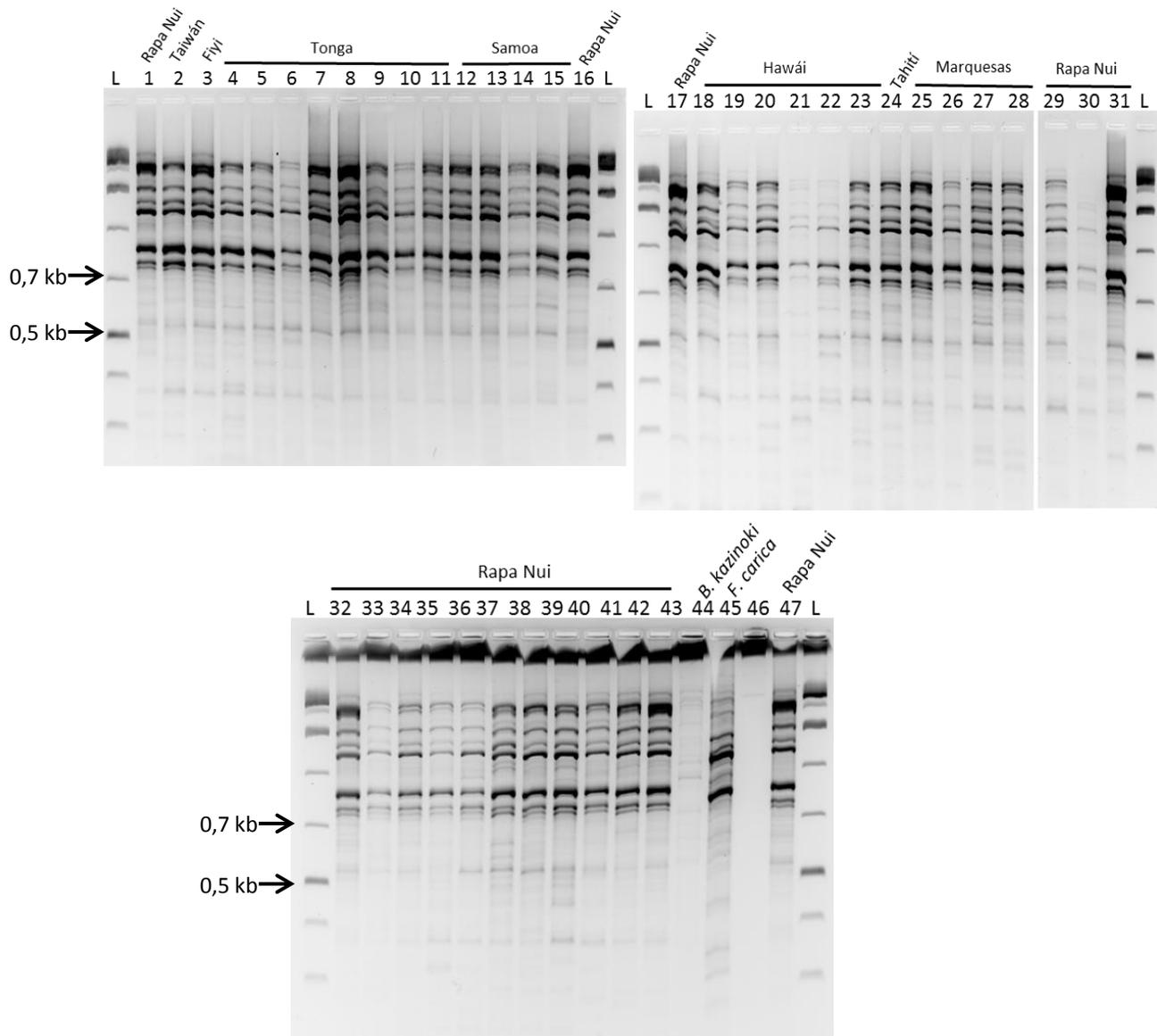
**Figura F: Amplificación REMAP con muestras de *B. papyrifera* del área nativa con la combinación de marcadores UBC855 y LTR2118.** Carriles 1, 11, 12 y 27: muestra control BQUCH221 (Rapa Nui), carriles 2-6: Vietnam, carriles 7-10: Japón, carriles 13-16: Taiwán, carriles 17-21: Hawái (masc.), carril 22: Tonga, carril 23: Hawái (fem.), carril 24: Islas Marquesas, carril 25: Rapa Nui, carril 26: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.



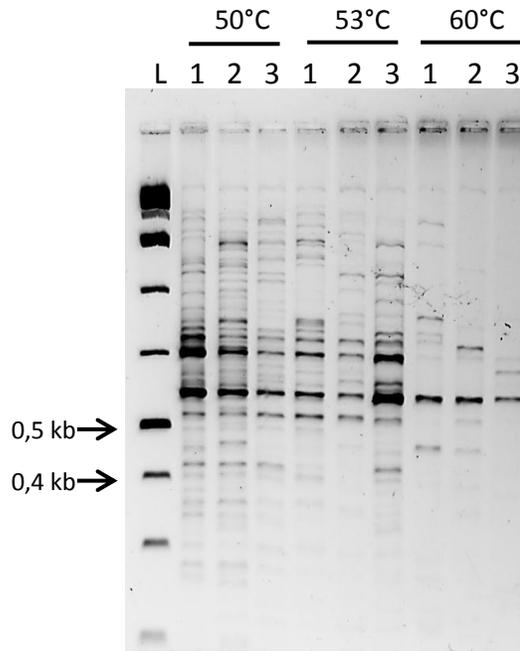
**Figura G: Amplificación REMAP con muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota con la combinación de marcadores UBC855 y LTR2118.** Carriles 1, 16, 17, 31, 32 y 47: muestra control BQUCH221 (Rapa Nui), carril 2: Taiwán, carril 3: Fiyi, carriles 4-11: Tonga, carriles 12-15: Samoa, carriles 18-23: Hawái (fem.), carril 24: Tahití, carriles 25-28: Islas Marquesas, carriles 29-30 y 33-43: Rapa Nui, carril 44: *B. kazinoki*, carril 45: *Ficus carica*, carril 46: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.



**Figura H: Amplificación REMAP con muestras de *B. papyrifera* del área nativa con la combinación de marcadores UBC866 y LTR2121.** Carriles 1, 11, 12 y 27: muestra control BQUCH221 (Rapa Nui), carriles 2-6: Vietnam, carriles 7-10: Japón, carriles 13-16: Taiwán, carriles 17-21: Hawái (masc.), carril 22: Tonga, carril 23: Hawái (fem.), carril 24: Islas Marquesas, carril 25: Rapa Nui, carril 26: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

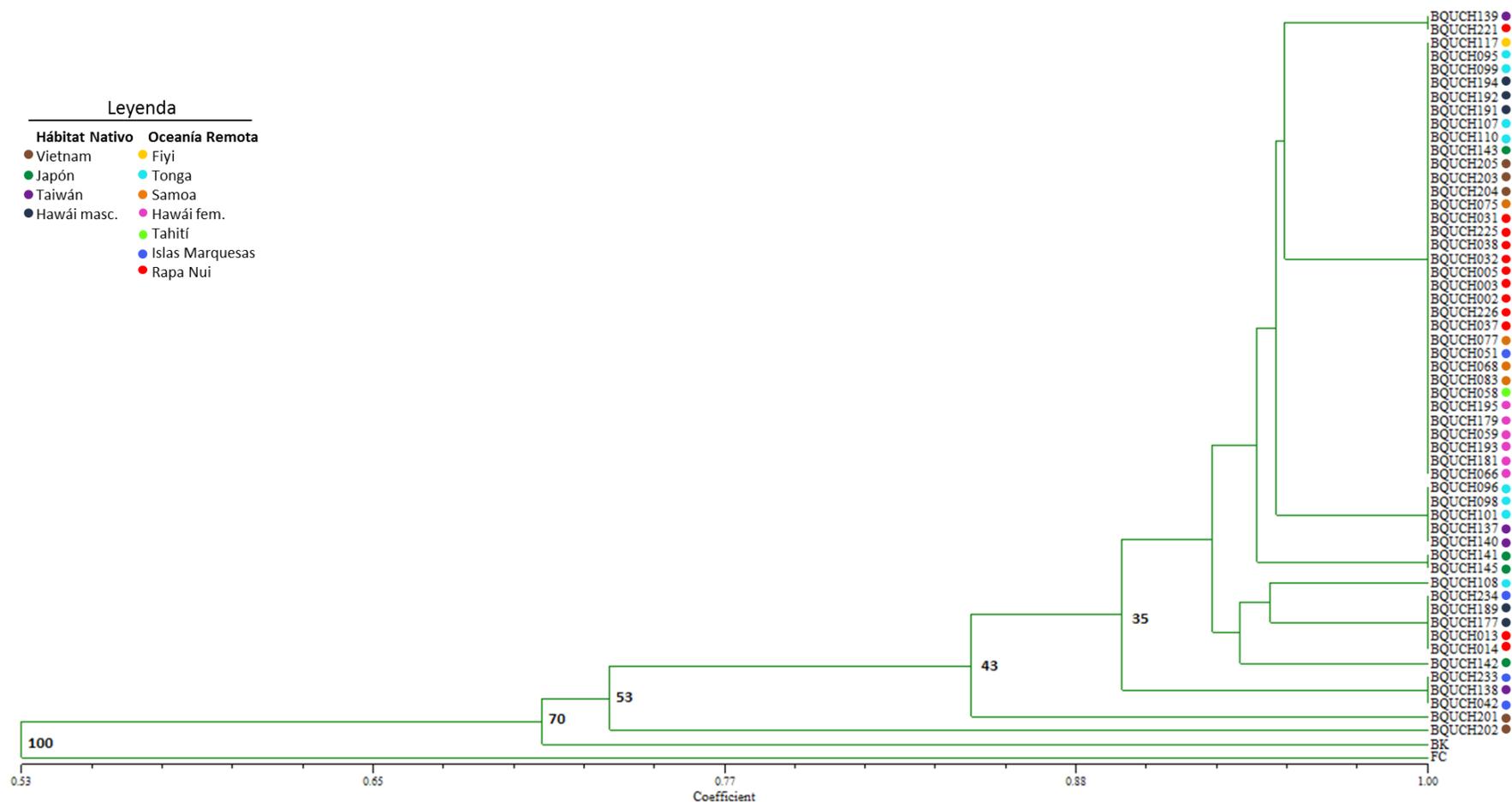


**Figura I: Amplificación REMAP con muestras de *B. papyrifera* de Oceanía Remota con la combinación de marcadores UBC866 y LTR2121.** Carriles 1, 16, 17, 31, 32 y 47: muestra control BQUCH221 (Rapa Nui), carril 2: Taiwán, carril 3: Fiyi, carriles 4-11: Tonga, carriles 12-15: Samoa, carriles 18-23: Hawái (fem.), carril 24: Tahití, carriles 25-28: Islas Marquesas, carriles 29-30 y 33-43: Rapa Nui, carril 44: *B. kazinoki*, carril 45: *Ficus carica*, carril 46: control negativo. L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

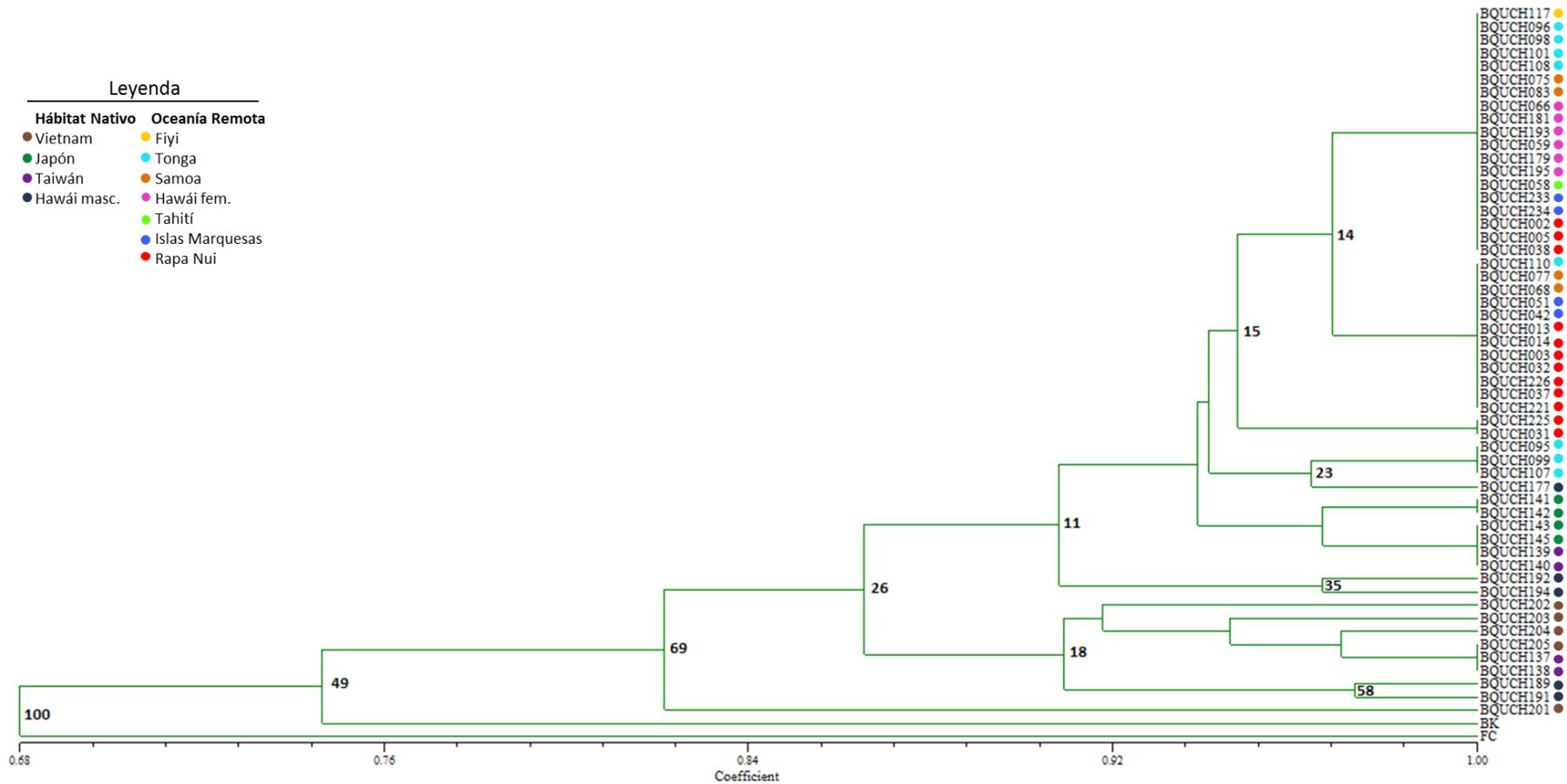


**Figura J: Amplificación mediante la combinación de marcadores IRAP BREPR con 3'LTR-BARE-1.** Amplificación a tres temperaturas de un triplicado técnico con una combinación IRAP (BrepR con 3'LTR-BARE-1) que no se consideró para el análisis, debido a la amplificación errática obtenida. Carriles 1, 2 y 3 corresponden a triplicados de la muestra BQUCH221 (Rapa Nui). L: estándar de peso molecular de ADN 1kb Plus. Gel de agarosa al 2,5% en TBE 0,5X. Tinción con GelRed y captura de imagen en Syngene. Electroforesis a 60V durante 4,5 horas.

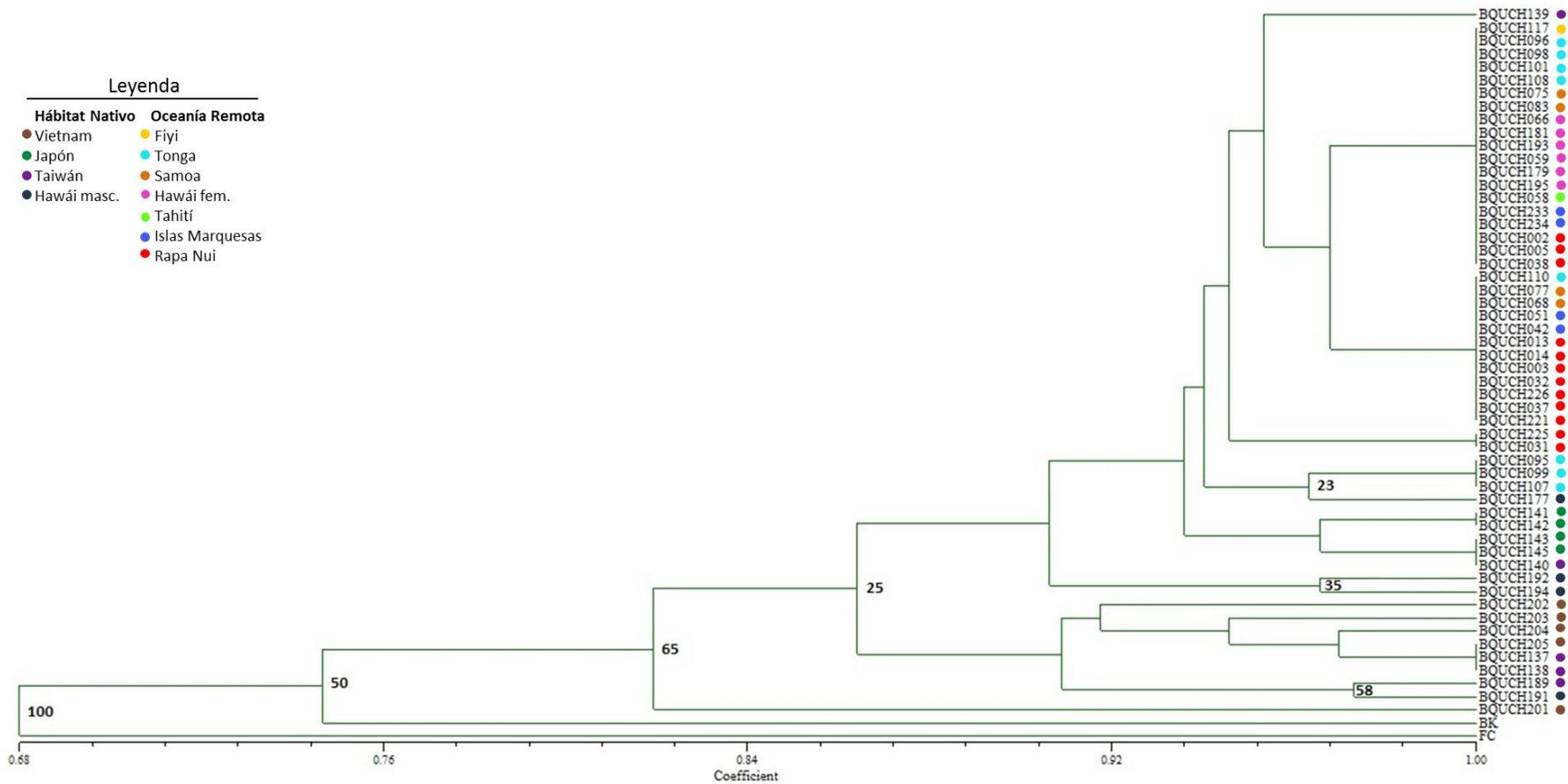
## 9.4 Anexo 4. Dendrogramas de cada marcador REMAP seleccionado analizando muestras de *B. papyrifera* de la región nativa y de Oceanía Remota



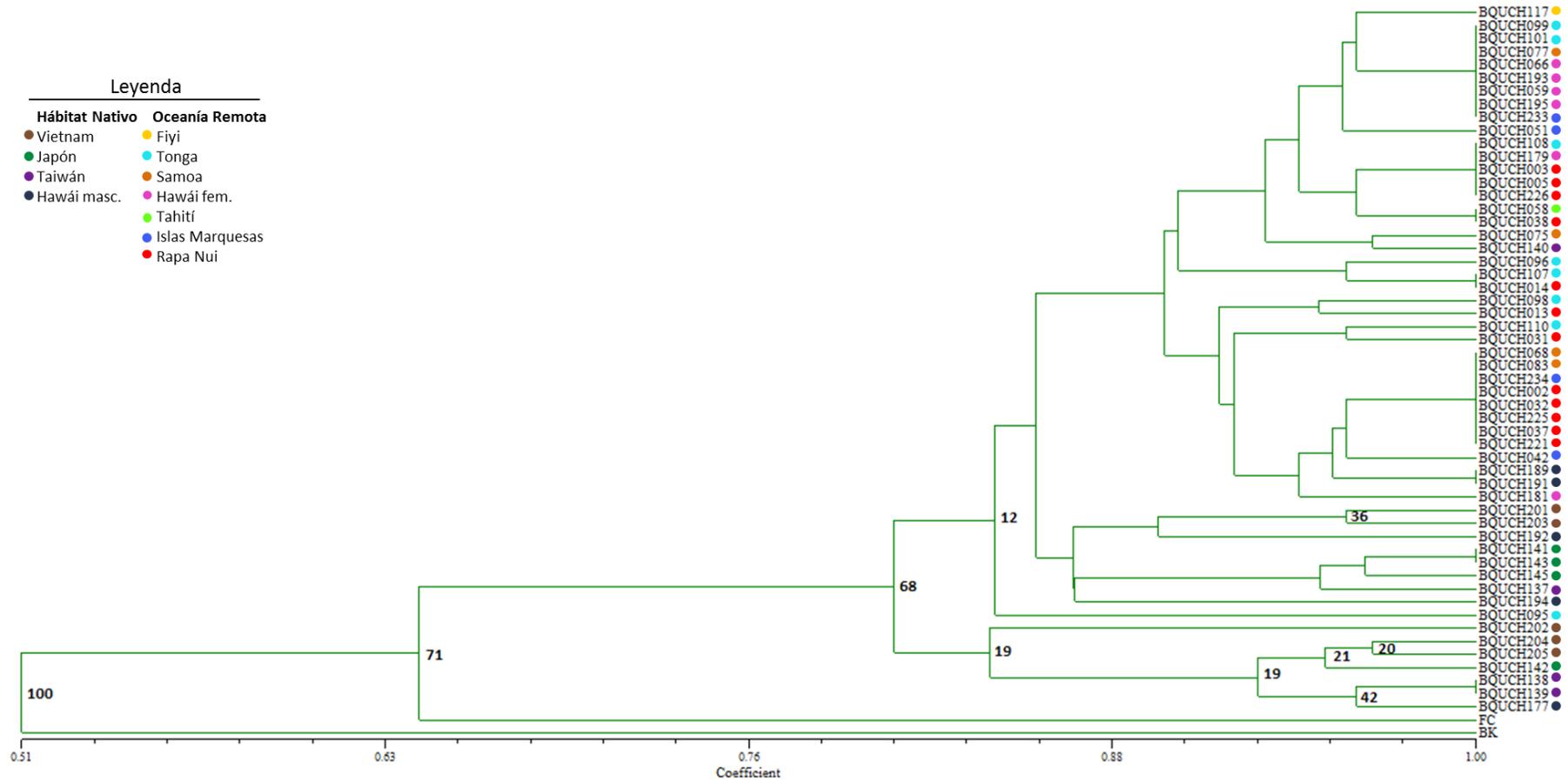
**Figura K: Dendrograma obtenido con la combinación REMAP UBC827 y LTR2118.** Se muestra el dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud DICE y el algoritmo de agrupamiento UPGMA al analizar muestras de *B. papyrifera* de regiones nativas y de Oceanía Remota mediante la combinación REMAP UBC827 y LTR2118. Se incluyeron como grupos externos *B. kazinoki* (BK) y *Ficus carica* (FC). Se indica la localidad de cada muestra con círculos de colores.



**Figura L: Dendrograma obtenido con la combinación REMAP UBC855 y LTR2105.** Se muestra el dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud DICE y el algoritmo de agrupamiento UPGMA al analizar muestras de *B. papyrifera* de regiones nativas y de Oceanía Remota mediante la combinación REMAP UBC855 y LTR2105. Se incluyeron como grupos externos *B. kazinoki* (BK) y *Ficus carica* (FC). Se indica la localidad de cada muestra con círculos de colores.



**Figura M: Dendrograma obtenido con la combinación REMAP UBC855 y LTR2118.** Se muestra el dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud DICE y el algoritmo de agrupamiento UPGMA al analizar muestras de *B. papyrifera* de regiones nativas y de Oceanía Remota mediante la combinación REMAP UBC855 y LTR2118. Se incluyeron como grupos externos *B. kazinoki* (BK) y *Ficus carica* (FC). Se indica la localidad de cada muestra con círculos de colores.



**Figura N: Dendrograma obtenido con la combinación REMAP UBC866 y LTR2121.** Se muestra el dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud DICE y el algoritmo de agrupamiento UPGMA al analizar muestras de *B. papyrifera* de regiones nativas y de Oceanía Remota mediante la combinación REMAP UBC866 y LTR2121. Se incluyeron como grupos externos *B. kazinoki* (BK) y *Ficus carica* (FC). Se indica la localidad de cada muestra con círculos de colores.

