

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## 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 presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

***JOHANY FREDDY PEÑAILILLO LAZO***

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

SANTIAGO - CHILE

ENERO 2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

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

**JOHANY FREDDY PEÑAILILLO LAZO**

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

**Directora de Tesis:**

**Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch** \_\_\_\_\_

**Directora de Tesis:**

**Ximena Moncada Rodríguez** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Carla Delporte Vergara** \_\_\_\_\_

**Dr. Sergio Lobos Camus** \_\_\_\_\_

**Dra. Lee Meisel** \_\_\_\_\_

**Universidad de Chile**  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



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 presentada en la Universidad de Chile para optar al grado de Magister en Bioquímica, área de especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico.

**Johany Freddy Peñailillo Lazo**

Directores de tesis:

Daniela Seelenfreund H.

Ximena Moncada R.

Santiago, Enero de 2014.

“El buen juicio nace de la buena inteligencia y la buena inteligencia deriva de la razón, sacada de las buenas reglas; y las buenas reglas son hijas de la buena experiencia: madre común de todas las ciencias y las artes.”

- Leonardo da Vinci

## **Lugar de realización**

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

## **Financiamiento**

Proyecto FONDECYT 1120175

Beca Parcial de Arancel  
Escuela de Graduados  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

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

### **Panel**

**Peñailillo J\***, González J\*, Piña R, Soto-Aguilar J, Payacán C, Arriaza F, Morales D, Moncada X, Lobos S, Seelenfreund D, Seelenfreund A.

Morera de papel, *Broussonetia papyrifera* (L.) (L'Herit Ex Vent.): Estudio de su dispersión por el hombre durante el poblamiento del Pacífico Oriental.

Primera Reunión Conjunta de Botánica, Ecología y Evolución (XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Botánica de Chile, XIX Reunión Anual de la Sociedad de Ecología de Chile, VI Reunión Anual de la Sociedad de Evolución de Chile)

Concepción, Chile. 6 al 9 de Octubre de 2012.

## Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a mi familia, por siempre haber estado conmigo, por su paciencia. Pero por sobre todo agradecer a mis padres, por haber creído siempre en mí y apoyarme en todos mis sueños, por alocados que parecieran, y porque siempre dieron su mejor esfuerzo por ayudarme a conseguir mis metas. Creo que sin ustedes nada de esto sería posible.

Stephanie, has sido un pilar fundamental en esta etapa, eres la personita que le ha cambiado el sentido a mi vida, por muy distintos que seamos en algunos aspectos de la vida, creo que son todas esas diferencias sumadas a nuestras coincidencias que te hacen el complemento perfecto, mi compañera. Si bien esta etapa se acaba, ahora comienza una nueva, con nuevos proyectos y lo que es mejor con nuevos desafíos. Tú que me conoces bien, sabes que son éstos los que me mueven, que le dan sentido a mi vida. Te agradezco la paciencia, porque creo que tienes mucha (no quiere decir que yo no la tenga). Dentro de todo lo que se viene a futuro me encanta este nuevo reto que asumimos juntos, él de formar una familia, tú, yo y nuestro pequeño Leonardo.

A mis amigos. Pipe y Chicho, somos algo así como los tres mosqueteros, gracias por haber estado siempre ahí y por la “cheverisidad” de esos buenos momentos. Pali y Javy, mis amigas, muchas gracias por esas largas conversaciones, por esos trabajos en grupo y por el apoyo. No dejo de mencionar a Andreas, Crosis, Ale, Ely y disculpen si olvido a alguien.

A mis directoras de tesis, Daniela y Ximena, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por su paciencia al revisar mis escritos, pero creo que finalmente algo aprendí. Por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis, porque creyeron en mí y se encargaron de darme todo lo necesario para cumplir plenamente con los objetivos que nos planteamos.

También a Andrea por ser un pilar fundamental en este proyecto de investigación.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular, fue un agrado y un orgullo trabajar con ustedes, quien más que nosotros trabaja y juega PES en el laboratorio. A las personas del laboratorio de Microbiología por haberme acogido durante mi último periodo en la Universidad, creo que son todo lo que alguien espera de un equipo de trabajo. A mis amigos del Laboratorio de Biotecnología, Rocío y Cristian.

A Gioconda Peralta del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por su buen trabajo, dedicación y buena voluntad.

A mi comisión, por haberme encausado y ayudado a recuperar las ganas de asumir un desafío, creo que estos días no existen muchos, pero ustedes me dieron uno y creo que es gracias a sus exigencias que mi tesis se convirtió en esto. Le agradezco especialmente a Sergio Lobos por haber sido un gran apoyo y haberme ayudado en todo lo que estuvo a su alcance.

Muchas gracias a todos.

## Índice General

Índice General .....	i
Índice de Figuras .....	v
Índice de Tablas.....	vii
Abreviaturas .....	viii
Resumen .....	ix
Summary .....	xii
1 Introducción .....	1
1.1 Marcadores moleculares genéticos y sus usos .....	1
1.2 Poblamiento humano de la polinesia .....	2
1.3 <i>Broussonetia papyrifera</i> (L.) L'Herit. ex Vent. ....	6
1.3.1 Clasificación taxonómica.....	6
1.3.2 Caracterización botánica y etnobotánica.....	7
1.4 Análisis genético mediante marcadores moleculares.....	10
1.5 Análisis genéticos previos de <i>B. Papyrifera</i> .....	13
1.6 Marcador molecular para la determinación de sexo en <i>B. papyrifera</i> .....	14
1.7 Microsatélites.....	14
2 Hipótesis .....	17
3 Objetivos.....	17
3.1 Objetivo General .....	17
3.2 Objetivos Específicos .....	17
4 Materiales y Metodologías .....	18
4.1 Materiales .....	18
4.1.1 Reactivos e insumos generales.....	18
4.1.2 Soluciones y Amortiguadores.....	19
4.1.3 Material Biológico - Tejido foliar de <i>Broussonetia papyrifera</i> .....	19
4.2 Metodologías .....	21
4.2.1 Desarrollo de un banco de ADN genómico de individuos de <i>B. papyrifera</i> .....	21

4.2.1.1 Extracción de ADN.....	21
4.2.1.2 Análisis de integridad de ADN.....	22
4.2.1.3 Análisis de concentración y pureza de ADN por espectrofotometría .....	22
4.2.1.4 Análisis de concentración de ADN por fluorescencia .....	22
4.2.1.5 Preparación de las diluciones de ADN para reacciones de PCR .....	23
4.2.2 Descripción de la distribución de <i>B. papyrifera</i> según sexo en las islas del Pacífico usando un marcador molecular de sexo.....	23
4.2.2.1 Desarrollo del método Male Marker (MM) .....	23
4.2.2.1.1 Diseño de partidores y prueba de partidores.....	23
4.2.2.1.2 Diseño y optimización de un PCR dúplex: Método Male Marker versión 1 (MM.v1) .....	24
4.2.2.1.3 Secuenciación de amplicones MMF – MMRL .....	25
4.2.2.1.4 Análisis de secuencias .....	25
4.2.2.1.5 Rediseño de partidores .....	25
4.2.2.1.6 Prueba de partidores rediseñados.....	26
4.2.2.1.7 Diseño y optimización de un nuevo PCR dúplex: Método Male Marker versión 2 (MM.v2) .....	26
4.2.2.2 Determinación del sexo de las muestras de <i>B. papyrifera</i> del banco genómico.....	27
<b>4.2.3 Caracterización de la diversidad genética de <i>B. papyrifera</i> en las islas de la Polinesia usando SSR específicos .....</b>	<b>27</b>
4.2.3.1 Desarrollo de marcadores Bropap .....	27
4.2.3.2 Preselección de marcadores de SSR .....	30
4.2.3.2.1 Preselección de marcadores SSR Bropap.....	30
4.2.3.2.2 Preselección de marcadores de SSR Bro.....	30
4.2.3.2.2.1 Amplificación de marcadores de SSR por PCR para geles de agarosa y poliacrilamida .....	31
4.2.3.2.2.2 Electroforesis en geles de Agarosa .....	32
4.2.3.2.2.3 Electroforesis en geles de Poliacrilamida .....	32

4.2.3.3 Amplificación de marcadores de SSR por PCR para EC.....	33
4.2.3.4 Análisis de amplicones por Electroforesis capilar (EC) .....	35
4.2.3.5 Análisis de diversidad genética .....	35
<b>4.2.4 Estudio de la relación entre la diversidad genética y localización geográfica de los individuos de <i>B. papyrifera</i> analizados.....</b>	<b>36</b>
4.2.4.1 Análisis de estructura de poblaciones .....	36
4.2.4.1.1 Análisis de distancia genética y construcción de Dendrogramas .....	36
4.2.4.1.2 Análisis bayesiano de estructura de poblaciones .....	36
4.2.4.2 Análisis de coordenadas principales (PCoA) .....	37
4.2.4.3 Análisis de distancia geográfica v/s distancia genética .....	37
<b>5 Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Desarrollo de un banco de ADN genómico de individuos de <i>B. papyrifera</i>.....</b>	<b>38</b>
5.1.1 Extracción y determinación de integridad de ADN.....	38
5.1.2 Medición de las concentraciones de ADN.....	39
5.1.2.1 Espectrofotometría: concentración y pureza .....	39
5.1.2.2 Fluorescencia .....	40
5.1.3 Amplificabilidad del banco genómico.....	41
<b>5.2 Descripción de la distribución por sexo de <i>B. papyrifera</i> en las islas del Pacífico usando un marcador molecular de sexo.....</b>	<b>44</b>
5.2.1 Prueba de la pareja de partidores MMF – MMRL .....	45
5.2.2 Prueba de la pareja de partidores MMF – MMRS .....	45
5.2.3 Diseño de una PCR Dúplex .....	47
5.2.4 Optimización de la PCR dúplex mediante un gradiente de temperatura.....	48
5.2.5 Análisis de la región de unión al partidador MMRS en individuos femeninos.....	50
5.2.6 Rediseño del partidador MMRS .....	51
5.2.7 Prueba de partidores rediseñados .....	52
5.2.8 Optimización de un nuevo método Male Marker versión 2 (MM.v2) .....	54
5.2.9 Distribución de sexo de <i>B. papyrifera</i> según el marcador Male Marker.....	56

<b>5.3 Caracterización de la diversidad genética de <i>B. papyrifera</i> en las islas de la Polinesia usando marcadores de SSR específicos .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3.1 Preselección de los marcadores Bropap .....</b>	<b>60</b>
<b>5.3.2 Preselección de los marcadores Bro .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.3 Análisis de marcadores preseleccionados.....</b>	<b>63</b>
<b>5.3.4 Selección de datos para el análisis estadístico .....</b>	<b>65</b>
<b>5.3.5 Análisis de la diversidad genética.....</b>	<b>66</b>
<b>5.4 Estudio de la relación entre la diversidad genética y localización geográfica de los individuos de <i>B. papyrifera</i> analizados.....</b>	<b>70</b>
<b>5.4.1 Distribución de sexo vs Localización geográfica .....</b>	<b>70</b>
<b>5.4.2 Diversidad genética vs Localización geográfica .....</b>	<b>71</b>
5.4.2.1 Análisis de distancia genética .....	71
5.4.2.2 Análisis bayesiano de estructura de poblaciones .....	73
5.4.2.3 Distancia geográfica v/s distancia genética .....	74
5.4.2.4 Análisis de coordenadas principales .....	75
<b>6 Discusión .....</b>	<b>77</b>
<b>6.1 Banco de ADN genómico .....</b>	<b>77</b>
<b>6.2 Determinación del sexo de <i>B. papyrifera</i> en Polinesia .....</b>	<b>80</b>
<b>6.3 Genotipificación de individuos de <i>B. papyrifera</i> por SSR.....</b>	<b>83</b>
<b>6.4 Análisis de distancia genética vs distancia geográfica .....</b>	<b>86</b>
<b>7 Conclusiones .....</b>	<b>92</b>
<b>8 Bibliografía .....</b>	<b>94</b>
<b>9 Anexos .....</b>	<b>103</b>
<b>Anexo 1. Secuencia del marcador molecular masculino de <i>B. papyrifera</i>. .....</b>	<b>103</b>
<b>Anexo 2. Tabla I. Detalle del banco genómico .....</b>	<b>104</b>
<b>Anexo 3. Curvas de calibración utilizadas en la cuantificación con Picogreen. ....</b>	<b>110</b>
<b>Anexo 4. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación.....</b>	<b>112</b>
<b>Anexo 5. Tabla III. Detalle del análisis de diversidad genética.....</b>	<b>121</b>
<b>Anexo 6. Tabla IV. Detalle análisis multilocus.....</b>	<b>125</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.1. Mapa de poblamiento general de la Polinesia .....	3
Figura 1.2. Imágenes foliares y del fruto de <i>B. papyrifera</i> .....	8
Figura 1.3. Mapa de distribución sexual de <i>B. papyrifera</i> según Matthews (1996).....	10
Figura 4.2.1. Esquema de amplificación de microsatélites utilizando la marcación con la cola M13 .....	34
Figura 5.1.1. Perfil electroforético de ADN genómico de muestras de <i>B. papyrifera</i> .....	39
Figura 5.1.2. Ejemplo de Curva de calibración utilizada en la cuantificación de ADN con Picogreen. ....	41
Figura 5.1.3. Análisis de amplificación con el marcador ITS1 .....	42
Figura 5.2.1. Amplificación con la pareja de partidores MMF – MMRL.....	45
Figura 5.2.2. Amplificación diferencial según sexo con la pareja de partidores MMF – MMRS .....	46
Figura 5.2.3. Diseño experimental del método Male Marker .....	48
Figura 5.2.4. Optimización de la PCR dúplex del método de Male Marker.....	49
Figura 5.2.5. Amplificación con el método Male Marker a una temperatura de apareamiento de 61°C.....	49
Figura 5.2.6. Alineamientos de la región de apareamiento del partidor MMRS .....	50
Figura 5.2.7. Esquema de apareamiento de los partidores diseñados para reemplazar al MMRS .....	52
Figura 5.2.8. Comparación de los patrones de amplificación de las parejas de partidores MMF-MMRS, MMF-MMRS18, MMF-FMRS18.....	53
Figura 5.2.9. Análisis de sexo con el método MM.v2 .....	55
Figura 5.2.10. Resumen de la distribución por sexo mediante el método Male Marker por localidad .....	57
Figura 5.3.1. Perfiles genotípicos de los loci Bro03 y Bro04 en electroforesis en gel de PAA al 6%.....	62

<b>Figura 5.3.2. Comparación de los electroferogramas de los Loci Bropap_16591 y Bropap_02801.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 5.4.1. Distribución de sexos de <i>B. papyrifera</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 5.4.2. Dendrogramas de poblaciones.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 5.4.3. Análisis de estructura de poblaciones .....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 5.4.4 Test de Mantel: distancia geográfica v/s distancia genética .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 5.4.5. Análisis de coordenadas principales .....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 6.1. Mapa del modelo de poblamiento Triple – I para Polinesia Oeste.....</b>	<b>90</b>

## Índice de Tablas

Tabla 4.1.1. Número de muestras por localidad .....	19
Tabla 4.2.1. Resumen del informe final de Ecogenics (36 loci de SSR) .....	28
Tabla 4.2.2. Marcadores Bro .....	30
Tabla 4.2.3. Secuencias M13 utilizadas para cada marcador SSR.....	35
Tabla 5.2.1. Partidores diseñados para la región del marcador masculino .....	44
Tabla 5.2.2. Partidores diseñados para el reemplazo del partidor MMRS.....	52
Tabla 5.3.1. Muestras que conforman el grupo de prueba de genotipificación para el análisis mediante SSR .....	60
Tabla 5.3.2. Marcadores Bro pap preseleccionados (10 loci de SSR).....	61
Tabla 5.3.3. Resumen de información obtenida preliminarmente para los SSR Bro .....	63
Tabla 5.3.4. Resumen de los alelos identificados por SSR .....	66
Tabla 5.3.5. Resumen del análisis de diversidad genética en Asia .....	68
Tabla 5.3.6. Resumen del análisis de diversidad genética en Polinesia.....	68
Tabla 5.3.7. Significancias del análisis de cuellos de botella genéticos según los modelos IAM y SMM .....	69
Tabla I. Detalle del banco genómico.....	104
Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación .....	112
Tabla III. Detalle del análisis de diversidad genética .....	121
Tabla IV. Detalle análisis multilocus .....	125

## Abreviaturas

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
SCAR:	<u>S</u> equence <u>C</u> haracterized <u>A</u> mplified <u>R</u> egion
CTAB:	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTPs:	desoxirribonucleótidos
EC:	Electroforesis capilar
IAM:	<u>I</u> nfinite <u>A</u> lleles <u>M</u> odel
ITS:	<u>I</u> nternal <u>T</u> ranscribed <u>S</u> pacers
NJ:	<u>N</u> eighbor <u>J</u> oining
pb:	pares de bases
PCoA:	<u>P</u> roincipal <u>C</u> oordinates <u>A</u> nalysis
PCR:	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
Rnasa A:	Ribonucleasa A
SSR:	<u>S</u> hort <u>S</u> equence <u>R</u> epeat o <u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>R</u> epeat
SMM:	<u>S</u> teppwise <u>M</u> utation <u>M</u> odel

## Resumen

El poblamiento de la Polinesia corresponde al último proceso de colonización humana del planeta en tierras inhabitadas. Éste es un tema de gran interés debido a que aún existen interrogantes, como por ejemplo: ¿Hubo uno o más eventos colonizadores? y ¿Cuáles fueron las rutas seguidas por los viajeros? Las primeras investigaciones fueron abordadas mediante técnicas arqueológicas y lingüísticas, siendo posteriormente complementadas con el uso de marcadores moleculares. Muchos estudios de poblamiento humano mediante marcadores moleculares están orientados al estudio del ADN humano de poblaciones actuales, sin embargo, en Polinesia las poblaciones fueron severamente diezmadas producto del contacto europeo y los habitantes actuales no necesariamente son representativos de las poblaciones originales. Por esta razón se han buscado alternativas al análisis de muestras humanas, como es el estudio de especies comensales asociadas al hombre. Entre estas especies se encuentra *Broussonetia papyrifera*, una especie vegetal nativa de Asia, que fue introducida en la Polinesia por los grupos colonizadores dada su importancia como materia prima para la fabricación de textiles.

En base a estos antecedentes, se plantea la siguiente hipótesis: “El estudio de polimorfismos genéticos mediante marcadores moleculares de sexo y SSR en individuos de *Broussonetia papyrifera* provenientes de Asia y distintas islas del Pacífico, permite identificar el sexo de los individuos, así como también identificar poblaciones genéticamente diferentes, que proporcionen información para dilucidar rutas de dispersión por acción antrópica para la comprensión del proceso de colonización de Oceanía Remota”.

Los análisis con marcadores moleculares se realizaron con el material genético de un banco de ADN genómico, el cual fue construido durante el desarrollo de esta tesis. Este banco genómico se desarrolló a partir de muestras foliares contemporáneas de 191 individuos diferentes de *B. papyrifera*, provenientes de 3 países de Asia y 9 islas o grupos de islas, comprendiendo numerosas localidades de Polinesia.

Los análisis de la identificación del sexo de las muestras del banco genómico, se realizaron tras la implementación de un método de análisis para la caracterización del sexo de los individuos de *B. papyrifera*. El diseño de este método incluyó un marcador SCAR desarrollado en esta tesis, el cual identifica a individuos de sexo masculino. Los análisis de identificación de sexo mostraron la presencia exclusiva de individuos femeninos en la totalidad de las localidades de la Polinesia, excepto en Hawái, donde se observó la presencia de individuos de ambos sexos, en una proporción similar a la observada en las localidades asiáticas analizadas. Estos resultados sugieren una historia de colonización o dispersión diferente y más compleja para Hawái, que de las demás localidades analizadas de la Polinesia.

La genotipificación de los individuos de Polinesia se realizó con marcadores de microsatélites específicos para *B. papyrifera*, la mayoría desarrollados en el marco de este trabajo. Se seleccionó una batería de 14 marcadores SSR que se aplicó a los individuos de Asia y Polinesia. En Asia se encontró gran diversidad genética (96,6%), en cambio hay una baja diversidad genética (20,5%) entre las muestras polinésicas analizadas. A pesar de encontrar una diversidad genética reducida, se logró identificar poblaciones diferentes al interior de la Polinesia, demostrando la validez de la hipótesis de este estudio.

El análisis de las poblaciones identificadas mediante la genotipificación sirvió para establecer relaciones entre éstas, las cuales permitieron inferir probables rutas de dispersión y poblamiento. Se identificó a la población de Taiwán como posible ancestro de las poblaciones polinésicas, lo cual es concordante con datos de la literatura. Se encontró que las poblaciones provenientes de Polinesia occidental se diferencian de las de Polinesia oriental. Además los individuos de *B. papyrifera* masculinos encontrados en Hawái presentan una gran distancia genética con las restantes poblaciones polinésicas, sugiriendo un segundo proceso de colonización, sin descartar migraciones en periodos históricos.

En resumen, se identificó diversidad genética en poblaciones de *B. papyrifera* actuales, procedentes de las islas de la Polinesia, validando el uso de los marcadores moleculares propuestos. Aún más importante, es que esta investigación reafirma la

utilización de *B. papyrifera* como un buen modelo comensal para el estudio del poblamiento humano de la Polinesia.

## Summary

### **Study of the genetic diversity of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Herit. Ex Vent.) in the Pacific using sex and microsatellite molecular markers.**

The settlement of Polynesia was the last process of human colonization of unhabited lands. This is a topic of great interest as there are still questions such as: Were there one or more colonization events? and What were the routes taken by early settlers? Research in this area was initially addressed by archaeological and linguistic techniques, and later supplemented by the use of molecular markers. At first, molecular marker analyses were oriented towards the study of contemporary human populations. However, due to European contact, populations were severely depleted and the current inhabitants are not necessarily representative of the original populations. For this reason, alternatives to the analysis of human samples, as is the study of commensal species associated with man, have been used. Among these species is *Broussonetia papyrifera*, a native plant from Asia that was introduced into Polynesia by the early colonizing groups, as a raw material for the manufacture of textiles.

Based on this context, the following hypothesis is proposed: "The study of genetic polymorphisms using molecular markers of gender and SSR in individuals of *Broussonetia papyrifera* from Asia and various Pacific islands identifies the sex of individuals and genetically distinct populations, and provides information to propose possible dispersal routes by human action for understanding the process of colonization of Remote Oceania".

The molecular marker analyses were performed with the genetic material of a genomic DNA bank, which was built during this thesis. This genomic DNA bank was developed from contemporary leaf samples of 191 individuals of *B. papyrifera*, from three Asian countries and nine islands or island groups in Polynesia.

Analyses of sex identification were conducted after the implementation of an accurate method for determining the sex of *B. papyrifera* individuals. The design included

a SCAR marker developed in this thesis, which identifies male individuals. Results of sex identification showed the exclusive presence of female individuals in all localities in Polynesia, except in Hawaii, where the presence of individuals of both sexes were observed in a similar proportions, as observed in the Asian locations analyzed in this work. These results suggest a different and more complex dispersal history for *B. papyrifera* in Hawaii, compared to all other Polynesian locations analyzed.

*B. papyrifera* microsatellite markers were developed within the scope of this project, and were used in conjunction with other specific SSR markers. Genotyping was performed with a set of 14 SSR markers of samples from the Asian and Polynesian regions. Asian samples exhibited high genetic diversity (96,6%), while low genetic diversity (20,5%) was detected among the Polynesian samples. Nonetheless, different populations within Polynesia were identified, providing positive evidence for the hypothesis of this study.

Relationships derived from the genotyping analysis of the identified populations, allowed inferring possible dispersal routes of during human settlement. We identified the population of Taiwan as a possible ancestor of the Polynesian samples, which is consistent with the literature. We found that populations from western Polynesia differ from those of Eastern Polynesia. Furthermore, the male individuals of *B. papyrifera* found in Hawaii are genetically distant from the other Polynesian populations, suggesting a second process of colonization or migration, which may have occurred even during historical periods.

To summarize, genetic diversity was identified in contemporary *B. papyrifera* populations from the islands of Polynesia, validating the use of the proposed molecular markers. Even more importantly, this research strengthens the use of *B. papyrifera* as a commensal model for the study of human settlement of Polynesia.

# 1 Introducción

## 1.1 Marcadores moleculares genéticos y sus usos

Los marcadores moleculares genéticos surgen como una solución a la necesidad de métodos de detección generales, estables y detectables en todos los tejidos, independientes del metabolismo, diferenciación y estado del desarrollo del organismo en estudio (Agarwal y cols., 2008). Tienen como función identificar una región polimórfica del genoma, que corresponden a secuencias con variaciones en su secuencia nucleotídica, las cuales están presentes en más del 1% de la población (Andersen y Lübberstedt, 2003). En muchos casos estas secuencias no tienen una función biológica conocida (Semagn y cols., 2006). Los marcadores moleculares genéticos son ampliamente utilizados en la actualidad en el diagnóstico y detección temprana de patologías, en la identificación de patógenos, en la identificación de individuos, en la selección de cultivos e incluso en la arqueología para el análisis de muestras históricas de origen biológico. En la arqueología han adquirido gran importancia, constituyendo una herramienta complementaria para reconstruir la historia de los hallazgos arqueológicos, debido que permiten identificar variantes polimórficas propias de una población.

Los marcadores moleculares genéticos permiten el análisis de restos arqueológicos, proporcionando en algunos casos la información suficiente o complementaria para reconstruir procesos, tales como rutas de migración (Sacks y cols., 2013). Existen numerosos estudios al respecto, por ejemplo, se han utilizado marcadores moleculares para establecer el origen de los humanos modernos y sus rutas de poblamiento (Reed y Tishkoff, 2006; Underhill y cols., 2000). El principal argumento para este tipo de estudios es que la dispersión de una población deja marcas en el genoma que persisten en el tiempo, y que son detectables mediante este tipo de marcadores. De esta manera la búsqueda de estos polimorfismos, típicos de cada población, y la identificación de su distribución a través del tiempo y el espacio permiten describir los cambios históricos en la distribución y la demografía de una especie (Underhill y Kivisild, 2007).

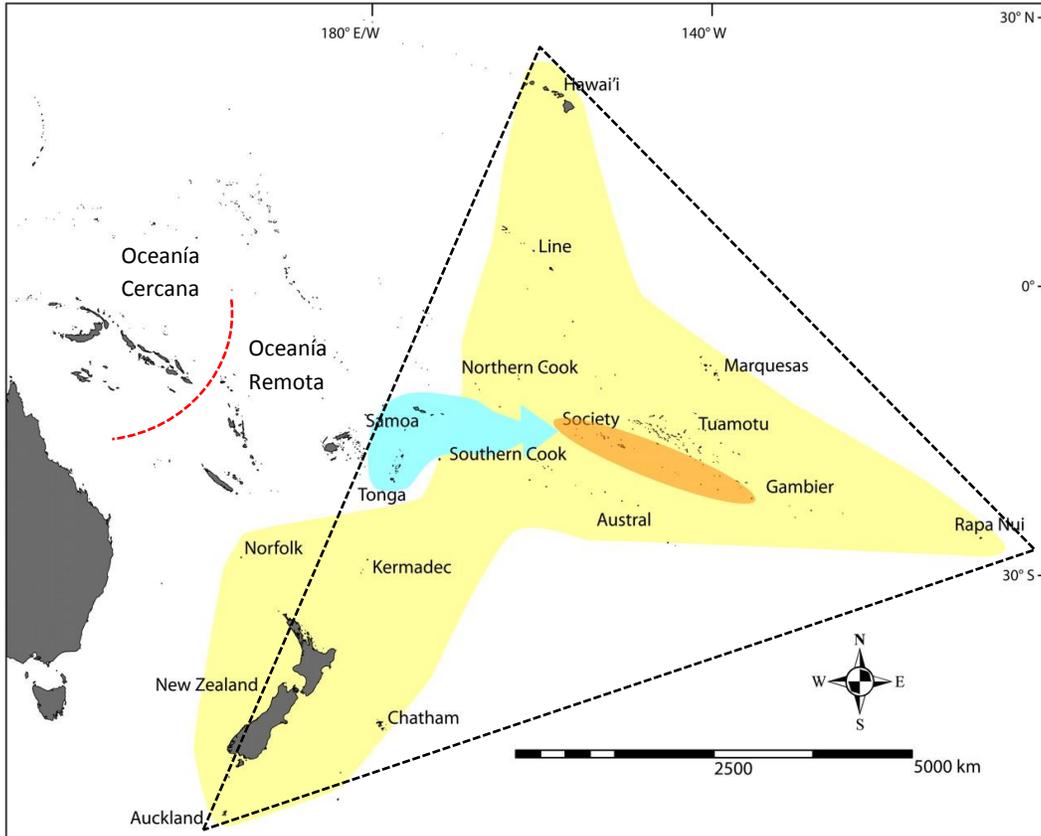
Estudios desarrollados en ADNmt (ADN mitocondrial) indican que el hombre moderno proviene de un linaje materno africano de unos pocos individuos, que se estima

vivió entre 100.000 – 200.000 años AP (antes del presente), la así llamada Eva mitocondrial (Cann y cols., 1987). Otros estudios en el cromosoma Y indican que nuestro ancestro común masculino más reciente vivió en África hace 59.000 años (Underhill y cols., 2000). De esta manera, ambas líneas de investigación apoyan la teoría de un origen africano y posterior expansión desde este continente (Hagelberg, 2003). La salida del hombre moderno desde África dio origen a los primeros asentamientos en Asia hace aproximadamente 90.000 años AP, la posterior colonización de Oceanía Cercana de 60.000 – 40.000 años AP, Europa (30.000 – 40.000 años AP), América (>20.000 años AP) y finalmente la colonización de Oceanía Remota (4.000 – 1.000 años AP) (Forster y Matsumura, 2005; Kirch, 2010). Este último proceso migratorio es de gran interés producto de la extensión y condiciones del territorio, así como también por el contacto pre-colombino que pudieron tener estos pueblos con los indígenas sudamericanos (Storey y cols., 2007; Matisoo-Smith y Ramírez, 2010).

## **1.2 Poblamiento humano de la polinesia**

La colonización de las islas del Océano Pacífico comprende uno de los procesos migratorios más grandes de la historia humana, y como en todo proceso histórico existen interrogantes al respecto, como por ejemplo: **¿Cuáles fueron las rutas seguidas por los viajeros?** y **¿Hubo un único evento colonizador o múltiples contactos?** Los primeros enfoques para responder estas interrogantes fueron arqueológicos y lingüísticos, y durante los últimos años se han complementado desde el área de la biología molecular utilizando diversos marcadores moleculares (Hurles y cols., 2003; Soares y cols., 2011).

La historia humana de Oceanía ocurrió mediante dos grandes procesos que se encuentran ilustrados en la **Figura 1.1**: (i) la colonización de Oceanía Cercana (60.000 – 40.000 años AP), iniciada con una de las más antiguas migraciones fuera de África, y (ii) la colonización de Oceanía Remota (4.000 – 1.000 años AP), la última expansión conocida en territorios inhabitados del planeta (Friedlaender y cols., 2008; Kayser, 2010; Kirch, 2010).



**Figura 1.1. Mapa de poblamiento general de la Polinesia.**

La línea discontinua de color rojo marca el límite entre Oceanía Cercana y Oceanía Remota. En el mapa se ilustra el proceso de colonización de la Polinesia (marcada con un triángulo negro) desde las islas de Polinesia Oeste (marcadas en azul) a Polinesia Este en dos etapas: primero fueron colonizadas las islas de Polinesia Central (marcadas en naranja), seguidas por el proceso de colonización de las islas más remotas de Polinesia (marcadas en amarillo).

\* Figura adaptada de Wilmshurst y cols. (2010).

Los antecedentes más antiguos sobre asentamientos en Oceanía Cercana provienen del análisis de hallazgos arqueológicos fechados por medio de  $^{14}\text{C}$ . Según estos datos, el arribo de los primeros seres humanos a Oceanía Cercana habría ocurrido durante el Pleistoceno, período en el cual bajaron los niveles del mar uniendo las tierras de Australia y Nueva Guinea, dando origen al supercontinente Sahul. Posteriormente, el segundo impulso colonizador, que llegaría a Oceanía Remota, habría ocurrido alrededor de 4.000 – 3.500 años AP y se relaciona con la denominada “Cultura Lapita” (Wilmshurst y cols., 2010). Ésta habría tenido su origen en las islas orientales del sudeste asiático en el área conocida como “Oceanía Cercana”, que engloba el territorio insular desde el

Archipiélago de Bismarck a las islas Solomon y se extiende hasta Samoa y Tonga (Polinesia Oeste, **Figura 1.1**). Se estima que la cultura Lapita tuvo su origen hace 6.000 – 5.000 años atrás, y se caracteriza no sólo por tener una identidad lingüística, sino también por su cerámica y notable desarrollo de tecnologías de navegación, lo que habría facilitado la colonización de las islas más remotas. La colonización de las islas más alejadas de Polinesia Central como Nueva Zelanda, Hawaii e Isla de Pascua ocurrió alrededor de 1000 años AP (Kirch, 2010; Petchey y cols., 2011).

Los estudios realizados en ADN humano contemporáneo para trazar las rutas migratorias en Oceanía Remota no han entregado resultados concluyentes, debido a que la población original de Oceanía fue diezmada después del contacto europeo, especialmente durante el siglo XIX debido a traslados forzados, esclavitud y la viruela (Hurles y cols., 2003). Por esta razón se han buscado estrategias alternativas para dilucidar las posibles rutas de los pueblos colonizadores de Oceanía Remota, tales como el estudio de especies comensales (Matisoo-Smith y cols., 1998). El comensalismo se refiere a la relación entre individuos de dos especies en la cual una obtiene algún beneficio de la otra, con un efecto neutro (sin daño ni beneficio) para la segunda especie involucrada.

Las migraciones requerían de una compleja organización en los grupos colonizadores para asegurar el éxito de los asentamientos en las nuevas islas; por esta razón era necesario el transporte consciente de especies animales y vegetales consideradas críticas para la supervivencia del grupo, así como también para la reproducción de su cultura. Este tipo de estrategia migratoria, la cual se denomina “transporte de paisajes”, produjo la dispersión de diversas especies comensales por Oceanía y Polinesia (Kirch, 2000).

Los modelos comensales han sido ampliamente utilizados para entender las interacciones y migraciones en el Pacífico durante la Prehistoria. El análisis de especies comensales mediante marcadores moleculares permite determinar variantes genéticas presentes en cada isla y compararlas con aquellas de las localidades de origen, lo cual permite modelar patrones de dispersión de la especie comensal, y de esta manera inferir un modelo de migración humana. A través del estudio de ADN (antiguo y moderno) de la

flora y fauna que fue transportada intencionalmente a la Polinesia, los arqueólogos complementan información biológica, lingüística y arqueológica, utilizando el denominado enfoque de triangulación de Kirch y Green (2001), que permite una mirada integral del problema. Los estudios de especies comensales no sólo revelan patrones de migración y asentamiento, sino también entregan información adicional respecto de distintas actividades humanas, tales como rutas de intercambio y prácticas agrícolas.

Las especies transportadas por los primeros colonizadores en el Pacífico incluyen diversos animales, tales como rata (Barnes y cols., 2006; Matisoo-Smith y Robins, 2004), gallina (Storey y cols., 2007), cerdo (Larson y cols., 2007), lagarto (Austin, 1999), caracol de tierra (Lee y cols., 2007) y plantas como por ejemplo, el árbol del pan (Zerega y cols., 2004), calabaza (Clarke y cols., 2006), ti (Hinkle, 2007), camote (Lebot y cols. 1998), taro (Caillon y cols., 2006) y banana (Kennedy, 2008), entre otras. Cada especie aporta una historia particular: algunas de estas especies fueron introducidas en el Pacífico más de una vez. Los datos para la rata de la Polinesia (*Rattus exulans*) muestran al menos dos introducciones desde Asia (Matisoo-Smith y Robins, 2004), los estudios en perro (*Canis familiaris*) han revelado dos linajes mitocondriales caninos en Oceanía Remota, y en calabaza (*Lagenaria siceraria*) aportan evidencia de un origen dual asiático y americano para las poblaciones de esta especie presentes en el Pacífico (Clarke y cols., 2006). Estos datos apoyarían la teoría de la colonización de Polinesia en al menos dos etapas, así como también el contacto con América (Kirch, 2010; Petchey y cols., 2011).

La etnobotánica, disciplina que estudia la interacción entre grupos humanos y su entorno vegetal, ha sido de gran utilidad en la investigación sobre el origen del cultivo de plantas en Oceanía y su relación con las migraciones de los pueblos polinésicos (Matthews, 1996). Los estudios botánicos indican que se cultivaban centenares de especies en el sudeste asiático cuando se iniciaron estas migraciones hacia Oceanía Remota (Matthews, 2007). A partir de este gran número de especies sólo relativamente pocas (menos de 100) alcanzaron Oceanía Remota.

Las principales especies vegetales cultivadas en Oceanía entre Vanuatu, Islas Gambier y Hawái tienen la característica común de que todas ellas se reproducen

vegetativamente. Se postula que esta propiedad influenció su selección por parte de los pueblos polinésicos, debido a que de esta manera se aseguraba el mantenimiento de los cultivos en las nuevas tierras, de manera independiente de la polinización y la producción de semillas. Se estima que se introdujeron alrededor de 70 especies vegetales por acción antrópica en la Polinesia, aproximadamente 20 en Isla de Pascua y sólo 6 en Nueva Zelanda. Ejemplos de estas especies vegetales son el taro (*Colocasia esculenta*) y la kava (*Piper methysticum*), entre otras; en kava se ha observado una baja diversidad genética, la que se debería a su domesticación hace aproximadamente 3.000 años, fecha basada en hallazgos arqueológicos (Lebot y cols., 1997).

Una de las especies vegetales introducidas y que podría ser muy útil como un modelo comensal es *Broussonetia papyrifera*, debido a que se encuentra ampliamente distribuida en la Polinesia (Seelenfreund y cols., 2010). Su estudio presenta una arista particular, pues es una de las pocas especies no comestibles introducidas y su uso como fuente de fibra textil podría aportar una historia diferente. Algunos criterios para escoger a *B. papyrifera* como modelo para este estudio son:

- Posee un origen exclusivamente asiático
- Su dispersión en Oceanía Remota es exclusivamente antrópica
- No existe la posibilidad de dispersión natural entre islas
- Actualmente se encuentra en la mayoría de las islas
- Tiene una gran importancia cultural histórica
- No existen especies nativas o introducidas emparentadas en Oceanía Remota

### **1.3 *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Herit. ex Vent.**

#### **1.3.1 Clasificación taxonómica**

*B. papyrifera* o morera de papel, como es conocida comúnmente, es una especie vegetal nativa del sudeste asiático. Recibe su epíteto específico de *papyrifera* debido a su utilización en la fabricación de papel. En 1753 fue clasificada en el género *Morus* por Linnaeus y posteriormente fue cuestionada su clasificación por Pierre Broussonet, quien

observó que sus frutos eran claramente diferentes a los de las especies del género *Morus*. A raíz de esto Lamarck propone un nuevo género, al cual llama *Papyrius*, pero L'Héritier de Brutelle también plantea un nuevo género, *Broussonetia* en honor a Broussonet, estableciéndose finalmente éste como el definitivo (Barker, 2002). La clasificación taxonómica actual de esta especie es:

- Clase: Equisetopsida
- Subclase: Magnoliidae
- Superorden: Rosanae
- Orden: Rosales
- Familia: Moraceae
- Género: *Broussonetia*
- Especie: *B. papyrifera*
- Sus sinonimias son *Papyrius papyrifera* (L.) Kuntze, *Morus papyrifera* L.

Estudios realizados en ADN nuclear y de cloroplasto apoyan la hipótesis del origen de la familia de las Moráceas en el Supercontinente Gondwana, atribuyendo su extensa distribución y diversificación a la vicarianza producida por su subdivisión en los actuales continentes. Esta familia está compuesta por 5 tribus y un total de 37 géneros diferentes. *B. papyrifera* pertenece a la tribu Moreae Gaudich y al género *Broussonetia* (Zerega y cols., 2005).

### 1.3.2 Caracterización botánica y etnobotánica

*B. papyrifera* es una planta diploide ( $n=13$ ) (Ohri y Kumar, 1986) y dioica, es decir, que posee flores masculinas y femeninas en individuos diferentes, razón por la que requiere individuos masculinos y femeninos a una distancia determinada para mantener una reproducción sexual (Ainsworth, 2000). La **Figura 1.2** muestra una flor masculina (**A**) que corresponde a una espiga de color amarillo verdoso, una flor femenina (**B**) de forma globular, vellosa, de color azulado, y el fruto (**C**) de color rojizo anaranjado, compuesto de

frutos pequeños y carnosos reunidos en una infrutescencia globosa (sorosis), llamada generalmente mora. El genoma de *B. papyrifera* no se ha secuenciado aún. Se ha estimado su valor C mediante citometría de flujo, calculándose un tamaño aproximado de 500 Mpb (Yamanouchi y cols., 2010).



**Figura 1.2. Imágenes foliares y del fruto de *B. papyrifera*.**

- A. Inflorescencia masculina.
- B. Inflorescencia femenina.
- C. Fruto de *B. papyrifera*.

*B. papyrifera* es utilizada en Asia principalmente para la elaboración manual de papel de alta calidad (Ewins, 1987), y además como planta medicinal, forraje y leña (Whistler y Elevitch, 2006). Popularmente ha sido utilizada para tratar infecciones microbianas, menorragia, impotencia, entre otros. Sus usos como planta medicinal han sido respaldados por diversos estudios farmacológicos:

- Inhibidor de la aromatasa: dos nuevos compuestos aislados de *B. papyrifera*, 3'-[ $\gamma$ -hydroxymethyl-(E)- $\gamma$ -methylallyl]-2,4,2',4'-tetrahydrochalcone-11'-O-coumarate y (2S)-2',4'-dihydroxy-2''-(1-hydroxy-1-methylethyl)dihydrofuro[2,3-h]flavanone, mostraron una potencia inhibitoria entre 60 – 10 veces superior a aminoglutetimida (Lee y cols., 2001), un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer de mama.
- Actividad antimicrobiana: se ha observado que el compuesto papyriflavonol A (PapA), aislado de *B. papyrifera*, presenta una fuerte actividad antibacteriana y antifúngica. Su actividad antibiótica fue observada a dosis mayores que antibióticos comerciales, sin embargo presenta una acción de amplio espectro, por lo que podría ser utilizada contra patógenos resistentes. Su acción antifúngica es mediada por su capacidad para

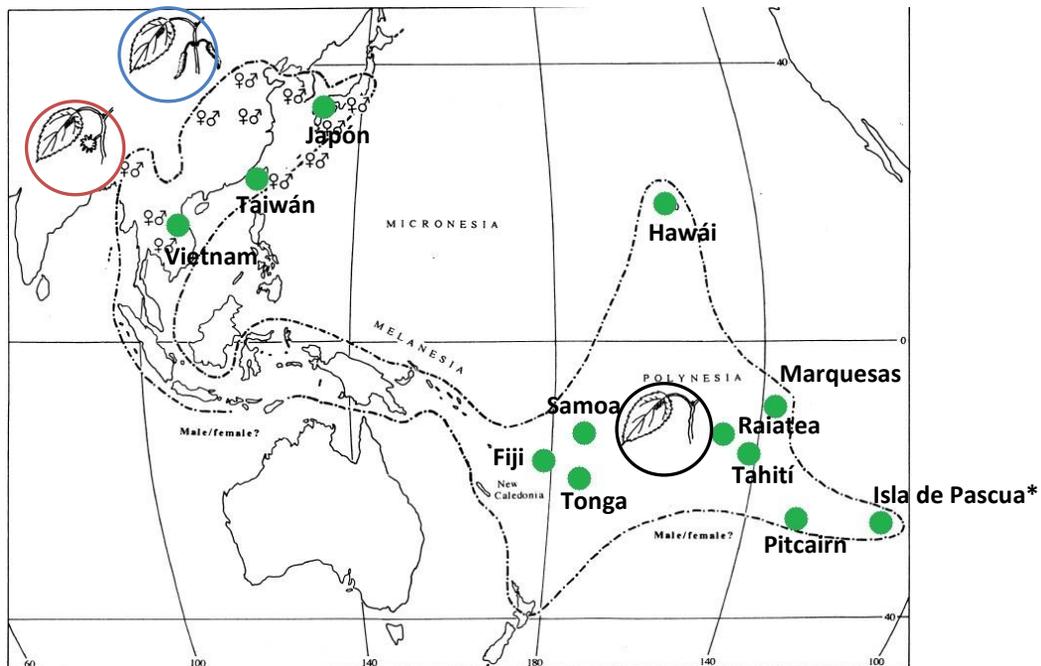
romper la integridad de la membrana plasmática. Además presenta una menor actividad hemolítica que otros agentes antifúngicos, como anfotericina B (Sohn y cols., 2010).

- Acción antioxidante: brousochalcona A (BCA), un compuesto aislado de *B. papyrifera*, muestra una disminución en la producción de óxido nítrico en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos. Su efecto es mediado por una disminución en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (Cheng y cols., 2001).
- Efecto hipoglicemiante: dos nuevos compuestos aislados de *B. papyrifera*, 8-(1,1-dimethylallyl)-5'-(3-methylbut-2-enyl)-3',4',5,7-tetrahydroxyflavonol y 3'-(3-methylbut-2-enyl)-3',4',7-trihydroxyflavane, inhiben a la enzima proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B). Esta enzima juega un rol importante en la desfosforilación del receptor activado de insulina, atenuando su actividad tirosina quinasa (Chen y cols., 2002).

En Polinesia no se tiene antecedentes de su uso como planta medicinal, sin embargo es de suma importancia debido a que la fibra de su corteza era y sigue siendo utilizada en la fabricación de textiles conocidos como tapa (también llamados kapa en Hawaii o mahute en Isla de Pascua). Los textiles mencionados, antiguamente tenían importancia como tela para vestimenta, pero actualmente los textiles de tapa tienen principalmente un uso ceremonial y son un símbolo de riqueza (Seelenfreund y cols., 2010).

Aunque *B. papyrifera* se reproduce sexualmente en su hábitat nativo (también lo hace de manera asexual o vegetativa). Matthews (1996) plantea que los individuos de *B. papyrifera* presentes en Polinesia puedan corresponder a clones de individuos de un único sexo, sin embargo, debido a la ausencia de floración en esta zona, él deja la interrogante de cuál sería el sexo de los individuos presentes en la esta región (**Figura 1.3**). Otro autor propone que las plantas transportadas al Pacífico fueron todas clones de plantas masculinas, transportados como brotes de raíces (hijuelos), prácticas propias de un cultivo de propagación vegetativa (Whistler y Elevitch, 2006). Sin embargo, según observaciones

recientes en Isla de Pascua, se encontraron especímenes femeninos de *B. papyrifera* con presencia de flores (Seelenfreund y cols., 2010). Estos hallazgos contradicen los datos publicados anteriormente, que postulan que todos los especímenes de la Polinesia correspondían a clones masculinos. Por ende, conocer la verdadera distribución sexual de esta especie en Polinesia es del mayor interés para determinar sus posibles patrones de dispersión. Por otra parte, la presencia o no de ambos sexos podría ser indicativo de la diversidad genética que se encuentra en la región de Polinesia.



**Figura 1.3. Mapa de distribución sexual de *B. papyrifera* según Matthews (1996).**

En los círculos se encuentran representadas las propuestas de distribución de sexo de *B. papyrifera* planteadas por Matthews. Ambos sexos en el hábitat nativo, el círculo rojo muestra a un individuo de sexo femenino y el círculo azul a un individuo de sexo masculino. Individuos de sexo desconocido en la Polinesia, el círculo negro destaca a un individuo de sexo desconocido sin flores.

Las marcas verdes representan las localidades de las que se dispone de muestras foliares de *B. papyrifera* para el desarrollo de esta tesis.

\* Se observó presencia de flores femeninas en Isla de Pascua (Seelenfreund y cols., 2010).

#### 1.4 Análisis genético mediante marcadores moleculares

Si bien no hay un marcador universal para todos los usos, sí se puede definir uno o varios marcadores adecuados para cada aplicación. Los distintos marcadores difieren

entre sí en cuanto a características como abundancia genómica, nivel de polimorfismo detectado, especificidad de locus, reproducibilidad, requerimientos de la técnica y costo (Agarwal y cols., 2008).

Al momento de elegir un marcador molecular se deben considerar múltiples variables: (i) el nivel de discriminación deseado, ya sea a nivel de género, entre especies o entre individuos de una misma especie, (ii) la reproducibilidad, dado que algunas técnicas son más robustas y reproducibles que otras, (iii) el tiempo disponible para el proyecto (si bien existen técnicas rápidas de realizar como ensayos de isoenzimas o RAPD, otras requieren más tiempo), (iv) la experticia, debido a que en algunos casos se requiere complementar con otras técnicas como clonamiento y/o secuenciación, y finalmente (v) los problemas propios de la muestra, como por ejemplo la cantidad y el estado del ADN (Weising, 2005).

Los marcadores moleculares se clasifican en dos categorías, según si son basados en hibridación o PCR (Semagn y cols., 2006). Entre los métodos basados en PCR existen técnicas útiles para el análisis de especies en las cuales no se dispone de información previa de su genoma, que son denominados marcadores anónimos. Algunas de estas técnicas son:

- **Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD):** la base de esta técnica consiste en la amplificación de ADN genómico utilizando sólo un partidor pequeño (generalmente de 10 nucleótidos) seleccionado de manera aleatoria. Se compara el patrón de bandeo de diferentes muestras en geles de agarosa (Welsh y McClelland, 1990; Williams y cols., 1990).
- **Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP):** esta técnica se basa en la amplificación de secuencias desconocidas generadas mediante la digestión con dos enzimas de restricción diferentes a las que se unen secuencias adaptadoras para partidores conocidos; se compara el patrón de bandeo en geles de acrilamida (Vos y cols., 1995).

- **Inter Simple Sequences Repeat (**ISSR**):** este tipo de marcadores permite detectar las variaciones polimórficas entre dos regiones de microsatélite o SSR. El análisis se realiza mediante amplificación y comparación de bandeo en geles de poliacrilamida o de agarosa (Weising, 2005).

Cuando se conocen secuencias del genoma de la especie de interés se utiliza otro tipo de marcadores, entre los que destacan algunos con un alto poder de discriminación entre individuos de una misma especie:

- **Sequences Characterized Amplified Region (**SCAR**):** corresponden a un fragmento de locus único y genéticamente definido que se amplifica utilizando primarios específicos para una secuencia conocida previamente, la cual amplificará o no dependiendo de la presencia de polimorfismos en las regiones de unión de los primarios. Derivan del clonamiento y secuenciación de un fragmento obtenido por RAPD o AFLP (Paran y Michelmore, 1993).
- **Microsatélites o Simple Sequences Repeats (**SSR**):** esta técnica se basa en la identificación de secuencias simples repetidas de 1 a 6 nucleótidos. Se realiza una comparación del número de repeticiones de la secuencia entre distintas muestras. Los microsatélites se encuentran tanto en el ADN nuclear, como en el ADN de cloroplasto. El análisis consiste en una comparación del patrón de bandeo en geles de poliacrilamida o mediante electroforesis capilar (Powell y cols., 1996; Kalia y cols., 2010).
- **Internal Transcribed Spacers (**ITS**):** este tipo de marcadores se basa en la comparación de las variantes polimórficas que se encuentran en las regiones espaciadoras de ADNr. El análisis se realiza mediante amplificación y posterior secuenciación (Coleman, 2003).
- **Single Nucleotide Polymorphism (**SNP**):** corresponde a variaciones nucleotídicas de tan sólo una base, siendo los polimorfismos más abundantes en el genoma. Pueden

ser detectados mediante técnicas de hibridación, cambios en la secuencia de corte de una enzima de restricción o secuenciación (Agarwal y cols., 2008).

### **1.5 Análisis genéticos previos de *B. papyrifera***

Son reducidos los estudios de esta especie publicados en revistas de corriente principal, aunque existen diversos estudios en China. Ho y Chang (2008) analizaron la diversidad genética entre individuos de Taiwán mediante ISSR. Al comparar individuos de *B. papyrifera* entre distintas cuencas se encontró diversidad genética, sin embargo no se observaron variaciones marcadas entre individuos de una misma cuenca.

Con anterioridad en nuestro laboratorio se analizaron diferentes muestras de *B. papyrifera* recolectadas en Oceanía Remota y Taiwán mediante ITS1 e ITS2; el estudio mostró diversidad genética sólo en la región ITS1 (Seelenfreund y cols., 2011). Los resultados del análisis evidenciaron una diversidad limitada entre las muestras de Taiwán, pero no mostraron diversidad alguna entre las muestras provenientes de las islas de la Polinesia. La presencia de diversidad en Taiwán puede ser explicada considerando que esta isla es parte del hábitat nativo de la planta. Por otra parte la falta de diversidad encontrada en las muestras de las islas de la Polinesia se explica debido a la particular historia de dispersión de esta especie en el Pacífico, el sistema de cultivo vegetativo y el tiempo transcurrido, el cual es considerado reducido para la aparición de nuevas mutaciones (Seelenfreund y cols., 2011).

El uso de nuevos marcadores moleculares diseñados específicamente para *B. papyrifera*, podría detectar diversidad genética en los individuos presentes en las islas del Pacífico, permitiéndonos inferir rutas de dispersión de manera más detallada (Seelenfreund y cols., 2011). Para este fin, en esta tesis se propone utilizar un marcador para la determinación de sexo y marcadores de microsatélites (SSR), específicos para *B. papyrifera*.

## **1.6 Marcador molecular para la determinación de sexo en *B. papyrifera***

En la base de datos de NCBI se depositó una secuencia para el reconocimiento de especímenes masculinos de *B. papyrifera*, obtenida mediante AFLP (GenBank HQ202152.1, ver **Anexo 1**). La información referente a esta secuencia fue publicada recientemente (Lianjun y cols., 2012). En este trabajo los autores desarrollaron un marcador Sequence Tagged Site (STS) a partir de la secuencia obtenida por AFLP con el fin de diferenciar el sexo de *B. papyrifera* durante la etapa de plántula, debido a las diferencias en el valor económico y medicinal que tienen plantas masculinas y femeninas de esta especie en Asia.

La presencia de individuos de ambos sexos en la Polinesia potencialmente daría cabida a una mayor diversidad genética en la zona, en comparación a la que existiría según la teoría de la presencia exclusiva de individuos de un solo sexo con reproducción exclusivamente clonal, donde la diversidad genética sería reducida. Por esta razón, es de gran interés conocer la distribución de sexo de *B. papyrifera* en las islas de la Polinesia. En forma simultánea, la presencia o ausencia de ambos sexos en las distintas islas podría aportar información para establecer un patrón de dispersión de la especie en Polinesia.

## **1.7 Microsatélites**

Otro marcador de interés son los microsatélites o SSR, que corresponden a repeticiones en tándem de secuencias cortas de ADN. Los microsatélites son marcadores codominantes y elementos frecuentes en todos los genomas eucariontes. Presentan un alto nivel de polimorfismos y son de fácil detección por PCR, y de interpretación relativamente simple. Entre los usos más comunes para este tipo de secuencias están los tests de paternidad y estudios forenses, y la genotipificación de variedades y razas para la agricultura e industria pecuaria (Powell, 1996; Kalia y cols., 2010). Sumando a estas cualidades, los SSR se escogieron debido a que son de gran utilidad para detectar

diversidad genética entre individuos de una misma especie en poblaciones de baja diversidad genética (Arnaud-Haond y cols., 2005).

En la literatura no se han publicado marcadores de SSR para *B. papyrifera*, pero sí se han descrito 16 loci de SSR para especies del género *Morus* (Zhao y cols., 2004; Aggarwal y cols., 2004) y 37 para especies del género *Ficus* (Khadari y cols., 2001; Giraldo y cols., 2005; Ahmed y cols., 2007), ambos géneros estrechamente emparentadas con *B. papyrifera*. La literatura describe la transferibilidad de algunos de estos marcadores entre miembros de la familia de las Moráceas. Por ejemplo, se probó exitosamente la transferibilidad de marcadores de *Ficus* a *Morus* (Giraldo y cols., 2005), lo que se podría ser explicado por una relativa conservación de estos loci entre diferentes especies de esta familia. En nuestro laboratorio se han probado algunos marcadores SSR de *Morus* en *B. papyrifera* con relativo éxito.

En esta tesis se ensayarán nuevos marcadores de SSR específicos para *B. papyrifera* que se desarrollaron en la empresa Ecogenics (Suiza); éstos corresponden a 36 marcadores de SSR. El desarrollo de estos marcadores se basa en una combinación de protocolos de enriquecimiento y secuenciación en plataforma 454. Además se probarán otros 13 marcadores desarrollados en Taiwán. Una selección de estos marcadores se utilizará para establecer las relaciones genéticas entre las muestras de distintas islas, determinando distancias genéticas para establecer un patrón de dispersión.

Al desconocer el genoma de *B. papyrifera* no es posible calcular el número total de secuencias de SSR presentes. Sin embargo, en estudios sobre SSR en plantas con genoma conocido, se determinó que en promedio existen 358 secuencias de SSR por Mpb, con un rango de 191 a 668 SSR/Mpb (Sonah y cols., 2011). Según el tamaño estimado del genoma de esta especie (500 Mpb), se calcula un número aproximado de 179.000 regiones de SSR. Para un estudio de diversidad genética se necesita, sin embargo, sólo un reducido número de loci para diferenciar individuos. Se considera que no es necesario abarcar el total de SSR identificados. Por ejemplo, en estudios en vides, una especie con un genoma de tamaño similar (483 Mpb), se determinó que es posible identificar las distintas variedades de vides cultivadas mediante el estudio de sólo 6 loci (This y cols., 2004).

Considerando el interés por responder las interrogantes formuladas respecto a la colonización de la Polinesia, proponemos que *B. papyrifera* es un buen modelo comensal para resolver esta pregunta. Para ello es necesario detectar diversidad genética entre ejemplares de esta especie provenientes de las distintas islas del Pacífico y particularmente de Polinesia, lo cual se facilitará con el uso de marcadores moleculares específicos para *B. papyrifera*.

En base a lo anterior se plantea la siguiente interrogante, **¿Es posible determinar una ruta de dispersión de *B. papyrifera* en las islas de la Polinesia utilizando un marcador de sexo? ¿Es posible identificar distintas poblaciones de *B. papyrifera* entre individuos de las islas de Oceanía Remota mediante el uso de marcadores de SSR específicos?**

## 2 Hipótesis

El estudio de polimorfismos genéticos mediante marcadores moleculares de sexo y SSR en individuos de *Broussonetia papyrifera* provenientes de Asia y distintas islas del Pacífico, permite identificar el sexo de los individuos, así como también identificar poblaciones genéticamente diferentes, que proporcionen información para dilucidar rutas de dispersión por acción antrópica para la comprensión del proceso de colonización de Oceanía Remota.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Caracterizar la diversidad genética de *B. papyrifera* provenientes de Asia y distintas islas del Pacífico utilizando dos tipos de marcadores, un marcador SCAR de sexo y marcadores microsatélites (SSR), para determinar patrones de dispersión de esta especie vegetal por acción de los colonizadores polinésicos.

### 3.2 Objetivos Específicos

1. Desarrollar un banco de ADN genómico de individuos de *B. papyrifera* provenientes de Asia y de distintas islas del Pacífico.
2. Describir la distribución por sexo de *B. papyrifera* en las islas del Pacífico usando un marcador molecular de sexo.
3. Caracterizar la diversidad genética de *B. papyrifera* en las islas de la Polinesia usando SSR específicos.
4. Estudiar la relación entre la diversidad genética y localización geográfica de los individuos de *B. papyrifera* analizados.

## 4 Materiales y Metodologías

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Reactivos e insumos generales

**Baker's Analyzed (Center Valley, Pennsylvania, EE.UU.):** Tiosulfato de Sodio.

**Bioplus (Dublin, Ohio, EE.UU.):** Bis-acrilamida.

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

**Fermelo Biotec (Santiago, Chile):** Agarosa Lafken p.a.

**Life Technologies (Carlsbad, California, EE.UU.):** Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Cat# P7589).

**Merck (Darmstadt, Alemania):** Cloroformo p.a., Etanol p.a., 2-Propanol p.a., Ácido Acético p.a., Formaldehido p.a., Sílica Gel, Acrilamida, TEMED (tetrametiletilendiamina).

**Promega® (Madison, Wisconsin, EE.UU.):** DNA polimerasa GoTaq, MgCl<sub>2</sub> 25mM, tampón Green GoTaq Flexi 5X, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), estándar de peso molecular de ADN 100 bp, estándar de peso molecular de ADN λ/HindIII.

**Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.):** CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), Silano A-174, Persulfato de Amonio.

**USBiological (Swampscott, Massachussets, EE.UU.):** Tris-Base, EDTA, ácido bórico, urea, RNasa A (Cat# R2011).

**Thermo Scientific (Pittsburgh, Pensilvania, EE.UU.):** Tampón de carga 6X, Estándar de peso molecular de ADN 1 Kb Plus.

**Winkler (Santiago, Chile):** Nitrato de plata, carbonato de calcio.

#### 4.1.2 Soluciones y Amortiguadores

**Cloroformo:** Alcohol isoamílico (24:1, v/v)

**Cloruro de sodio 5M**

**Etanol 70%**

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

**Tampón TBE 5X:** 445 mM Tris, 445 mM ácido bórico, 12,5 mM EDTA, ajustado a pH 8,4.

#### 4.1.3 Material Biológico - Tejido foliar de *Broussonetia papyrifera*

Se utilizaron 193 muestras foliares de *B. papyrifera* provenientes de distintas islas de Oceanía Remota y también de Asia insular y del sudeste asiático. Las localidades y el número de muestras por localidad se indican en la **Tabla 4.1.1**.

**Tabla 4.1.1. Número de muestras por localidad**

	Localidad	Nº muestras
Polinesia	Isla de Pascua	62
	Marquesas	14
	Tahití	2
	Hawái	38
	Pitcairn	2
	Raiatea	1
	Samoa	20
	Tonga	19
	Fiji	4
Hábitat Nativo	Taiwán	20
	Japón	5
	Vietnam	5
	Santiago	1
	<b>Total</b>	<b>193</b>

\* La localización geográfica de las muestras foliares puede ser observada en la **Figura 1.3**.

En el grupo de muestras taiwanesas se incluyen 4 muestras foliares de *B. papyrifera* de sexo conocido (sexadas en terreno por presencia de flores), 2 masculinas (BQUCH0137 y BQUCH00138) y 2 femeninas (BQUCH0139 y BQUCH0140), gentileza del Dr. K-F. Chung, Universidad Nacional de Taiwán. Estas 4 muestras fueron denominadas “grupo control de sexo”.

Las muestras foliares recolectadas previas al inicio de esta tesis (Julio de 2012) se almacenan a -20°C. Las muestras recolectadas durante el desarrollo de esta tesis se deshidrataron con sílica gel y almacenan a temperatura ambiente según Nisar y cols. (2010).

## 4.2 Metodologías

### 4.2.1 Desarrollo de un banco de ADN genómico de individuos de *B. papyrifera*.

#### 4.2.1.1 Extracción de ADN

Las muestras del banco genómico se prepararon utilizando un método de extracción de ADN descrito para vides (Lodhi y cols., 1994), con algunas modificaciones. Básicamente, estas modificaciones corresponden al aumento de la concentración de  $\beta$ -mercaptoetanol de 0,1% a 1% y la eliminación del uso de PVP del tampón de extracción.

El método de extracción consistió en homogeneizar un trozo de tejido vegetal de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> con 700  $\mu$ L del tampón de extracción (el  $\beta$ -mercaptoetanol se agregó al momento de utilizar el tampón) en un mortero previamente autoclavado. El homogeneizado se transfirió a un tubo de centrifuga de 2 mL y se incubó a 65°C durante 25 minutos. Posteriormente, el tubo con el homogeneizado se enfrió a temperatura ambiente y se realizó la extracción agregando 600  $\mu$ L de cloroformo – alcohol isoamílico 24:1. Para favorecer la extracción, la mezcla fue agitada suavemente por inversión para formar una emulsión, la cual se centrifugó a 6000 rpm (centrifuga Heraeus Biofuge Pico) durante 15 minutos a temperatura ambiente, para generar la separación de las fases. Se transfirió un volumen de 450  $\mu$ L de la fase acuosa a un nuevo tubo de centrifuga de 1,6 mL, al cual se le añadieron 225  $\mu$ L de NaCl 5M y 900  $\mu$ L de etanol absoluto a -20°C, se mezcló suavemente por inversión y se dejó a 4°C durante toda la noche.

A continuación, se realizaron 2 centrifugaciones consecutivas, 3000 rpm x 3 minutos y 6000 rpm x 3 minutos, a 4°C (Centrifuga Hettich Mikro 22R). El sobrenadante se descartó y la pella obtenida se lavó con 500  $\mu$ L de etanol 76% a 4°C. Para eliminar el etanol del lavado se centrifugó a 6000 rpm x 5 minutos a 4°C (Centrifuga Hettich Mikro 22R), el sobrenadante se descartó y los restos de etanol fueron evaporados a 60°C x 5 minutos (Concentrador Savant SpeedVac®). Finalmente la pella de ADN se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua<sub>dd</sub> + 1  $\mu$ L de RNAsa 10  $\mu$ g/ $\mu$ L y se incubó a 37°C durante 40 minutos. Las soluciones de ADN se almacenaron a -20°C.

#### **4.2.1.2 Análisis de integridad de ADN**

La integridad del ADN genómico de cada muestra se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X. Las muestras se cargaron en el gel utilizando una mezcla que contenía 5  $\mu\text{L}$  de ADN genómico, 1  $\mu\text{L}$  de gel red 100X y 1  $\mu\text{L}$  de tampón de carga 6X. En todos los geles se incluyó la carga de un bolsillo con 2  $\mu\text{L}$  de estándar de peso molecular  $\lambda$ /HindIII con 1  $\mu\text{L}$  de gel red. La electroforesis se realizó a 95V durante 45 minutos o hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) (MD-20 UV, Wealtec).

#### **4.2.1.3 Análisis de concentración y pureza de ADN por espectrofotometría**

La concentración de ADN se determinó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm. Se estimó su pureza usando la razón de absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron con los equipos Nanodrop® y Synergy H1.

#### **4.2.1.4 Análisis de concentración de ADN por fluorescencia**

La concentración de ADN se determinó utilizando Picogreen (Ahn y cols., 1996; Singer y cols., 1997). La medición se realizó con el equipo Synergy Mx, a una longitud de excitación de 485 nm y una longitud de emisión de 538 nm. Las mediciones se realizaron en placas Nunc negras de 96 pocillos con fondo plano (Cat. #237108). En cada pocillo se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de una dilución de ADN genómico 1:200 en tampón TE 1X preparado con agua estéril. Posteriormente a cada pocillo se le añadió 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:200 de Picogreen, también diluido en tampón TE 1X preparado con agua estéril.

La concentración de ADN de las muestras se determinó construyendo una curva de calibración con los siguientes puntos: 1000 ng/ $\mu\text{L}$ , 800 ng/ $\mu\text{L}$ , 500 ng/ $\mu\text{L}$ , 50 ng/ $\mu\text{L}$ , 5 ng/ $\mu\text{L}$  y 0 ng/ $\mu\text{L}$ . Todas las mediciones se realizaron en duplicado.

#### **4.2.1.5 Preparación de las diluciones de ADN para reacciones de PCR**

Con los resultados obtenidos en la medición de concentración de ADN genómico por espectrofotometría se realizaron diluciones de trabajo a 10 ng/μL para ser utilizadas en las reacciones de PCR. Con las cuantificaciones obtenidas por la medición de concentración por fluorescencia, se realizaron diluciones de trabajo a 0,6 ng/μL. Las diluciones de trabajo se mantuvieron a 4°C durante el desarrollo de los experimentos.

#### **4.2.2 Descripción de la distribución de *B. papyrifera* según sexo en las islas del Pacífico usando un marcador molecular de sexo.**

##### **4.2.2.1 Desarrollo del método Male Marker (MM)**

###### **4.2.2.1.1 Diseño de partidores y prueba de partidores**

A partir de la secuencia HQ202152.1 (**Anexo 1**) se diseñaron tres partidores mediante el software proporcionado por IDT (<http://www.idtdna.com/pages/products/dna-rna>) (**Tabla 5.2.1**).

Los partidores diseñados se probaron amplificando las cuatro muestras del grupo control de sexo. Las amplificaciones se realizaron en un volumen total de 20 μL, compuesto por 2 μL de ADN genómico 10 ng/uL, 4 μL de tampón de PCR 5X, 2 μL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,5 μL de solución de dNTPs 25 mM c/u, 1 μL del partidador sentido MMF 5 μM (5 pmoles), 1 μL del partidador antisentido, MMRL o MMRS, 5 μM (5 pmoles), 0,8 μL de ADN polimerasa GoTaq 5U/μL (4U). El programa de amplificación consistió de una desnaturación inicial a 94°C x 5 minutos, seguida de 32 ciclos a 94°C x 1 minuto (desnaturación), 53°C x 1 minuto (apareamiento) y 72°C x 1 minuto (elongación), finalizando con una extensión final a 72°C x 7 minutos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores TC-512 (Techne) y PCR System 2700 (GeneAmp®). En todas las reacciones se incluyó un control negativo de amplificación (agua).

Los amplicones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X. Se cargó en cada bolsillo del gel una mezcla que contenía 5  $\mu$ L de producto de PCR y 1  $\mu$ L de Gel Red 100x. En todos los geles se incluyó un bolsillo con 2  $\mu$ L de estándar de peso molecular 100 pb o 1 kb Plus y 1  $\mu$ L de Gel Red 100X. La corrida se realizó a 95V hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. Los amplicones se visualizaron en un transiluminador UV ( $\lambda = 312$  nm) (MD-20 UV, Wealtec).

#### **4.2.2.1.2 Diseño y optimización de un PCR dúplex: Método Male Marker versión 1 (MM.v1)**

El PCR dúplex se diseñó utilizando los tres partidores de la sección anterior para formar 2 parejas de partidores. La amplificación de este PCR dúplex se basó en el protocolo de la sección **4.2.2.1.1** con algunas optimizaciones. Básicamente, estas optimizaciones consistieron en ajustar las concentraciones de partidores y la temperatura de apareamiento. La temperatura de apareamiento se ajustó utilizando un gradiente entre 53 - 66°C.

Luego de la optimización, las amplificaciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ L, compuesto por 2  $\mu$ L de ADN genómico 10 ng/ $\mu$ L, 4  $\mu$ L de tampón de PCR 5X, 2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,5  $\mu$ L de solución de dNTPs 25 mM c/u, 2  $\mu$ L del partidador sentido MMF 5  $\mu$ M (10 pmoles), 1  $\mu$ L de cada partidador antisentido, MMRS y MMF, (5 pmoles de cada uno), 0,8  $\mu$ L de ADN polimerasa GoTaq 5U/ $\mu$ L (4U). El programa de amplificación consistió de una desnaturación inicial a 94°C x 5 minutos, seguida de 32 ciclos a 94°C x 1 minuto (desnaturación), 61°C x 1 minuto (apareamiento) y 72°C x 1 minuto (elongación), finalizando con una extensión final a 72°C x 7 minutos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores TC-512 (Techne) y PCR System 2700 (GeneAmp®). En todas las reacciones se incluyó un control positivo de sexo masculino (BQUCH0137), un control positivo de sexo femenino (BQUCH0139) y un control negativo de amplificación (agua).

Los amplicones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X, de acuerdo a lo señalado previamente (sección **4.2.2.1.1**).

#### **4.2.2.1.3 Secuenciación de amplicones MMF - MMRL**

Se amplificaron individuos masculinos y femeninos con la pareja de partidores MMF – MMRL. Estos amplicones fueron purificados con el Kit de purificación de ADN de Zymo Research, según las indicaciones del fabricante. Posteriormente se prepararon los amplicones para su envío a secuenciación eliminando el eluyente, mediante evaporación durante 10 minutos a 60°C en un concentrador (Savant SpeedVac®).

Los servicios de secuenciación se contrataron a la empresa coreana MacroGen (<http://www.macrogen.com/eng/>). Los partidores necesarios para la secuenciaciones (MMF y MMRL) se suministraron por nuestro laboratorio, cumpliendo con las condiciones solicitadas por MacroGen, un volumen de 25 µL a una concentración de 10 pmoles/µL.

#### **4.2.2.1.4 Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas se analizaron con el software CLC MAIN WORKBENCH (<http://www.clcbio.com/products/clc-main-workbench/>), mediante el algoritmo de alineamiento MUSCLE.

#### **4.2.2.1.5 Rediseño de partidores**

Se diseñaron nuevos partidores para la amplificación de la región Male Marker, tomando como base las diferencias polimórficas observadas en el alineamiento de secuencias de individuos masculinos y femeninos. Se utilizó el software PrimerSelect de Lasergene para diseñar y evaluar los partidores. El detalle de los partidores diseñados se indica en la **Tabla 5.2.2**.

#### **4.2.2.1.6 Prueba de partidores rediseñados**

Los partidores rediseñados se probaron amplificando las 4 muestras del grupo control de sexo. Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu\text{L}$ , compuesto por 2  $\mu\text{L}$  de ADN genómico 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$  de tampón de PCR 5X, 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0,2  $\mu\text{L}$  de solución de dNTPs 25 mM c/u, 0,8  $\mu\text{L}$  del partidador diseñado (MM o FM) 5  $\mu\text{M}$  (4 pmoles), 0,8  $\mu\text{L}$  de partidador sentido (MMF) o antisentido (MMRL) (4 pmoles de cada uno) según fuese necesario, y 0,2  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa GoTaq 5U/ $\mu\text{L}$  (1U). El programa de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 94°C x 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C x 1 minuto (desnaturalización), 55°C x 1 minuto (apareamiento) y 72°C x 1 minuto (elongación), finalizando con una extensión final a 72°C x 7 minutos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores TC-512 (Techne) y PCR System 2700 (GeneAmp®). En todas las reacciones se incluyó un control negativo de amplificación (agua). Los amplicones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón 0,5X, de acuerdo a lo señalado previamente (sección 4.2.2.1.1).

#### **4.2.2.1.7 Diseño y optimización de un nuevo PCR dúplex: Método Male Marker versión 2 (MM.v2)**

La optimización del método Male Marker versión 2 se realizó sobre el protocolo de prueba de los partidores rediseñados (sección 4.2.2.1.6), amplificando las 4 muestras del grupo control de sexo. La optimización se centró en la optimización de las concentraciones de los partidores y en el tiempo de elongación.

Finalmente, las amplificaciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu\text{L}$ , compuesto por 2  $\mu\text{L}$  de ADN genómico 0,6  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$  de tampón de PCR 5X, 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de solución de dNTPs 25 mM c/u, 1,1  $\mu\text{L}$  del partidador sentido MMF 5  $\mu\text{M}$  (5,5 pmoles), 0,8  $\mu\text{L}$  de partidador antisentido MMRS18 5  $\mu\text{M}$  (4 pmoles), 0,3  $\mu\text{L}$  de partidador antisentido MMRL 5  $\mu\text{M}$  (1,5 pmoles), 0,2  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa GoTaq 5U/ $\mu\text{L}$  (1U). El programa de amplificación consiste de una desnaturalización inicial a 94°C x 5 minutos,

seguida de 30 ciclos a 94°C x 1 minuto (desnaturación), 55°C x 1 minuto (apareamiento) y 72°C x 45 segundos (elongación), finalizando con una extensión final a 72°C x 7 minutos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores TC-512 (Techne) y PCR System 2700 (GeneAmp®). En todas las reacciones se incluyó un control positivo de sexo masculino (BQUCH0137), un control positivo de sexo femenino (BQUCH0139) y un control negativo de amplificación (Agua). Los amplicones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X, de acuerdo a lo señalado previamente (sección 4.2.2.1.1).

#### **4.2.2.2 Determinación del sexo de las muestras de *B. papyrifera* del banco genómico.**

La determinación del sexo de las muestras del banco genómico se realizó utilizando el MM.v1 en duplicado. Los resultados obtenidos por este método fueron corroborados utilizando el MM.v2.

#### **4.2.3 Caracterización de la diversidad genética de *B. papyrifera* en las islas de la Polinesia usando SSR específicos.**

##### **4.2.3.1 Desarrollo de marcadores Bropap**

Se solicitó el desarrollo de 36 marcadores de microsatélites a la empresa suiza Ecogenics ([www.ecogenics.ch](http://www.ecogenics.ch)). Estos marcadores se desarrollaron a partir del ADN genómico de 10 individuos, correspondientes a genotipos diferentes seleccionados en nuestro laboratorio utilizando distintos marcadores moleculares.

Ecogenics probó los 36 marcadores desarrollados que denominamos Bropap; para esto amplificó los loci con el ADN de 7 de los 10 individuos seleccionados por nuestro laboratorio. Los resultados del informe final enviado por Ecogenics están resumidos en la **Tabla 4.2.1.**

**Tabla 4.2.1. Resumen del informe final de Ecogenics (36 loci de SSR)**

Na: número de alelos, Go: genotipos observados, MA: muestras amplificadas.

Locus	Motivo repetido	Rango de tamaño (pb)	Na	Go	MA	Secuencia de partidores
Bropap_01292	(TTCC) <sub>10</sub>	162-182	3	3	4/7	PS: 5' - AAATCTCTTAACCAACATAGAAATGG - 3'
						PA: 5' - TCACCATTGAGTAGATGCTATGTG - 3'
Bropap_01931	(AC) <sub>16</sub>	185-301	3	2	5/7	PS: 5' - GGCATCGTTTTGACTGTTGG - 3'
						PA: 5' - GCAGTGAGGTAAGGCCAG - 3'
Bropap_02075	(TAG) <sub>8</sub>	242-248	2	2	5/7	PS: 5' - GGTGGTGATGCAGAACATGC - 3'
						PA: 5' - TTTCCCTCGCGTCAAGATCG - 3'
Bropap_02214	(GA) <sub>19</sub>	230-252	5	3	5/7	PS: 5' - CGGAAGAGAGAGATTACAACTAGC - 3'
						PA: 5' - ACTTGACCATTCTAAGCAAGACC - 3'
Bropap_02359	(AGA) <sub>8</sub>	175-178	2	3	6/7	PS: 5' - ATTTGTTGCTGCCAAGGTC - 3'
						PA: 5' - TTCGCTCCCTCCCTATTGC - 3'
Bropap_02386	(GAT) <sub>7</sub>	140	1	1	7/7	PS: 5' - GGATAGGTTGGAGGAGGGAAC - 3'
						PA: 5' - GGTGATTCATCATACTCTCCAC - 3'
Bropap_02560	(AC) <sub>15</sub>	180-198	3	3	5/7	PS: 5' - CATGTGGGACCCTGAAAACC - 3'
						PA: 5' - AGAAGCCGTCTTACTGGGAG - 3'
Bropap_02801	(AC) <sub>11</sub>	137-171	7	6	7/7	PS: 5' - GACATCTCATAAAATGTTAAATCCAG - 3'
						PA: 5' - AATTGCCCTGTAGCATTCCG - 3'
Bropap_03017	(CT) <sub>15</sub>	-	-	-	0/7	PS: 5' - AAGATGATGCAAGTGGCGTG - 3'
						PA: 5' - AAAAAATTAGGTGCGACGTGGC - 3'
Bropap_03147	(GT) <sub>11</sub>	198-200	2	3	5/7	PS: 5' - CAGACTAGGTTGACCGCAAG - 3'
						PA: 5' - CACGTTTTGAACCTGGGAGC - 3'
Bropap_03926	(CT) <sub>12</sub>	-	-	-	0/7	PS: 5' - CCGCAATCCCAAGACAGAAC - 3'
						PA: 5' - ATCCCTCCTCATTTGGTCG - 3'
Bropap_04622	(AC) <sub>12</sub>	149-153	2	2	4/7	PS: 5' - CTTTGCCATTCCACGAAAAC - 3'
						PA: 5' - AGGGGTTTGTAGATCATGGGG - 3'
Bropap_06819	(TG) <sub>12</sub>	-	-	-	0/7	PS: 5' - AGTTTGTACTAGTTTTTACCAGC - 3'
						PA: 5' - TCGTGCCGTTCGTAGAGAC - 3'
Bropap_07697	(AC) <sub>13</sub>	238-240	2	3	5/7	PS: 5' - GGTGCATCGCTGATTTTTGC - 3'
						PA: 5' - CCTGCCAAATACACCAACCG - 3'
Bropap_08038	(CT) <sub>13</sub>	-	-	-	0/7	PS: 5' - TGTTTAGGGACTGTTACTCTCG - 3'
						PA: 5' - ATTTAGGGGTAGTCAGGGCG - 3'
Bropap_10305	(AAT) <sub>7</sub>	111-117	3	2	5/7	PS: 5' - AGGTTACGTCACATTTCCG - 3'
						PA: 5' - CTATGGGTGAACAGACCCCC - 3'
Bropap_11602	(AG) <sub>12</sub>	-	-	-	0/7	PS: 5' - AGAGAGAAAATGCCTTGTGTAGAG - 3'
						PA: 5' - ATTATGATGGCTCCCCTCGC - 3'

**Continuación. Tabla 4.2.1. Resumen del informe final de Ecogenics (36 loci de SSR)**

Na: número de alelos, Go: genotipos observados, MA: muestras amplificadas.

Locus	Motivo repetido	Rango de tamaño (pb)	Na	Go	MA	Secuencia de partidores
Bropap_15123	(GA) <sub>15</sub>	155-167	2	2	5/7	PS: 5' - TTACGTTTCTCCCACGTCC - 3'
						PA: 5' - CGCCATTACAAAGTAAACTGCC - 3'
Bropap_16434	(AT) <sub>13</sub>	74-82	4	4	6/7	PS: 5' - TTCCAGATCAGCCTTTCGAG - 3'
						PA: 5' - AGTGATGAGTCGACCAACCG - 3'
Bropap_16591	(AG) <sub>17</sub>	71-89	7	5	7/7	PS: 5' - CCTCCTCTACATAACAGGCAG - 3'
						PA: 5' - TCGCGATCTGTAGCCTTCG - 3'
Bropap_17909	(ATT) <sub>7</sub>	140	1	1	5/7	PS: 5' - TGTATTATCTGCACTAAGGATGGC - 3'
						PA: 5' - AAATGGATGGTGCCCAAAGC - 3'
Bropap_20558	(TAT) <sub>7</sub>	218-222	2	3	5/7	PS: 5' - TCCACCATCCAACGATGAAG - 3'
						PA: 5' - GGGCTAAACTACCTTGTCGG - 3'
Bropap_20939	(AG) <sub>13</sub>	124-144	3	3	7/7	PS: 5' - GACACATGCACTCACAATGC - 3'
						PA: 5' - GGGGCGATGAAAGACTTGAG - 3'
Bropap_21091	(AC) <sub>22</sub>	166-187	5	4	5/7	PS: 5' - TGCTAGTTTGGTTTAAGACAGG - 3'
						PA: 5' - CAAGGGACAACAGCAATGAAAG - 3'
Bropap_22348	(TC) <sub>12</sub>	114-116	2	2	7/7	PS: 5' - CCTCCAAGCACCTTTTAGGC - 3'
						PA: 5' - CGTACGTTGAACAAAATGGACAC - 3'
Bropap_23758	(AGA) <sub>7</sub>	203-209	3	3	7/7	PS: 5' - CGTCATTTTGCCTTGCCCTC - 3'
						PA: 5' - AACAAACCACCCAAGATGCC - 3'
Bropap_23810	(GA) <sub>12</sub>	164-176	5	3	5/7	PS: 5' - AAAATGCCTCGCCATTGACC - 3'
						PA: 5' - CCCACCAAACCTCGAAAACC - 3'
Bropap_25247	(TTC) <sub>7</sub>	108	1	1	7/7	PS: 5' - TGATTTCCGTAGCTCCCCAG - 3'
						PA: 5' - CGGAACAAAGAAGGACATCGG - 3'
Bropap_25336	(TG) <sub>16</sub>	189-195	3	2	2/7	PS: 5' - ACAACAAGTCAACAGAAACCTC - 3'
						PA: 5' - ATAGTCAAGCCCTTCGGTGG - 3'
Bropap_25444	(GA) <sub>14</sub>	172-186	6	5	5/7	PS: 5' - TCACACTTACACACGGAGGG - 3'
						PA: 5' - GGTACGTAATCCCACCACC - 3'
Bropap_26773	(TC) <sub>13</sub>	177-195	4	4	6/7	PS: 5' - CCTGCATCTGACACCAAGTC - 3'
						PA: 5' - ATTGCTCTCTTGAGGGGTGG - 3'
Bropap_26985	(TG) <sub>12</sub>	176-190	4	4	7/7	PS: 5' - AGAATCACCCTCTCCCTTGG - 3'
						PA: 5' - TGGTTTGCTTCATTCAAAAAGTG - 3'
Bropap_28508	(GA) <sub>14</sub>	-	-	-	0/7	PS: 5' - GCGACATTTGAAACCAACGC - 3'
						PA: 5' - TTCTCTTACCAGACACGGC - 3'
Bropap_30248	(GA) <sub>14</sub>	95-152	6	4	5/7	PS: 5' - AGAGCAGGGCAAGCAATATC - 3'
						PA: 5' - GGTCATCCATTTGTCTGAACCTC - 3'

### Continuación. Tabla 4.2.1. Resumen del informe final de Ecogenics (36 loci de SSR)

Na: número de alelos, Go: genotipos observados, MA: muestras amplificadas.

Locus	Motivo repetido	Rango de tamaño (pb)	Na	Go	MA	Secuencia de partidores
Bropap_30288	(GA) <sub>14</sub>	-	-	-	0/7	PS: 5' - GCTGTCTCTTATAACTATTTTTGCATC - 3'
						PA: 5' - ACGTTAGAAACATACCCAACCAAG - 3'
Bropap_30352	(AG) <sub>16</sub>	-	-	-	0/7	PS: 5' - GGCTGAGCTTCATCACAAATAC - 3'
						PA: 5' - AAGAACCGCCCACTCAAAC - 3'

#### 4.2.3.2 Preselección de marcadores de SSR

##### 4.2.3.2.1 Preselección de marcadores SSR Bropap

En base a los resultados presentados en el informe final de Ecogenics, se preseleccionaron 10 marcadores SSR tomando en consideración el número de alelos y genotipos observados (Tabla 4.2.1).

##### 4.2.3.2.2 Preselección de marcadores de SSR Bro

Estos marcadores fueron proporcionados gentilmente por el Dr. K-F. Chung, Universidad Nacional de Taiwán. La información proporcionada de estos marcadores se presenta en la Tabla 4.2.2.

**Tabla 4.2.2. Marcadores Bro**

Locus	Motivo repetido	Secuencia de partidores
Bro01	(AAG) <sub>5</sub>	PS: 5' - GCTAGCAGAATCACATCATGC - 3'
		PA: 5' - TCCATTGTGCATTTTTACGG - 3'
Bro02	(GAA) <sub>7</sub>	PS: 5' - CTGGCTTTTCGTTTTGAGGA - 3'
		PA: 5' - GACCTTTGTCCGCTGAAATC - 3'
Bro03	(TC) <sub>3</sub> TAT(TC) <sub>5</sub>	PS: 5' - ATAGAGGCCTTGGGGTTCAC - 3'
		PA: 5' - AGCAGTCGTACCTTGTCGTC - 3'
Bro04	(GA) <sub>9</sub>	PS: 5' - CTCTCGACGACGACGATCT - 3'
		PA: 5' - ACCGCCATTGGAAGCTGA - 3'
Bro06	(TC) <sub>4</sub> (CT) <sub>6</sub>	PS: 5' - CGATGACGCAAGCACAGTTA - 3'
		PA: 5' - TTCCTAAACTTCGAGAATCTCACT - 3'
Bro07	(TC) <sub>22</sub>	PS: 5' - GCTTTCTGTACCCCCAAATG - 3'
		PA: 5' - TTCTTAGCTCGAGGGCGTA - 3'

#### Continuación. Tabla 4.2.2. Marcadores Bro

Locus	Motivo repetido	Secuencia de partidores
Bro08	(TC) <sub>17</sub>	PS: 5' - TAGACCCACCTCCCAAACAG - 3'
		PA: 5' - ATTCGGAGGCATCTGAGAGA - 3'
Bro09	(CTT) <sub>5</sub>	PS: 5' - GACAATGCCTGCACATGAGT - 3'
		PA: 5' - ATGTCCTTAACGGGTGCAAT - 3'
Bro10	(TTC) <sub>6</sub>	PS: 5' - TTGCAATGCATTAAGAAAAACA - 3'
		PA: 5' - GGCAGATTTTCCACCACAAC - 3'
Bro11	(GA) <sub>29</sub>	PS: 5' - CCGCAAAGTCGAAAAGAAAT - 3'
		PA: 5' - CCTCCTTTCCTTGTACCA - 3'
Bro13	(GA) <sub>9</sub>	PS: 5' - AGAGAGGGACAACATCAACGA - 3'
		PA: 5' - TGGTCTGTGACCCATTTCTTC - 3'
Bro14	(GA) <sub>10</sub>	PS: 5' - GCTTAGAACCGCTTGACGAG - 3'
		PA: 5' - TACGCACCTGTGCTGGTAA - 3'
Bro15	(CAA) <sub>10</sub>	PS: 5' - CCGTAGCGATCTCCAGAAA - 3'
		PA: 5' - AAAGAAATGGCGGAAATGTG - 3'

#### 4.2.3.2.2.1 Amplificación de marcadores de SSR por PCR para geles de agarosa y poliacrilamida

Las amplificaciones se realizaron en un volumen total de 20 µL, compuesto por 2 µL de ADN genómico 10 ng/µL, 4 µL de tampón de PCR 5X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,2 µL de solución de dNTPs 25 mM c/u, 1 µL de cada partidor 5 µM (5 pmoles de cada partidor) y 0,8 µL de ADN polimerasa GoTaq 5U/µL (4U). El programa de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 94°C x 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C x 1 minuto, 55°C x 1 minuto y 72°C x 1 minuto, finalizando con una extensión final a 72°C x 7 minutos (termocicladores Techne TC-512 y GeneAmp® PCR System 2700). En todas las reacciones se incluyó un control negativo de amplificación (Agua).

#### **4.2.3.2.2 Electroforesis en geles de Agarosa**

Los amplicones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X, de acuerdo a lo señalado previamente (sección **4.2.2.1.1**).

#### **4.2.3.2.3 Electroforesis en geles de Poliacrilamida**

Los amplicones se desnaturaron agregando un volumen de tampón de carga (formamida 95%, xilencianol 1 mg/mL y EDTA 10 mM pH 8,0), calentando durante 5 minutos a 95°C y poniendo de inmediato en hielo antes de cargar. Se cargaron 3 µL de cada muestra en un gel de poliacrilamida y se realizó una electroforesis en cámara de secuenciación (Vertical Gel Electrophoresis System S2001, Life Technologies) durante aproximadamente dos horas utilizando una potencia de 90W, 50 mA, en tampón TBE 0,5X. La electroforesis se realizó cuidando que el gel se mantuviera a una temperatura media de 50°C. Antes de cargar las muestras, el gel se precalentó a 50°C.

Los geles de poliacrilamida se prepararon con acrilamida/bisacrilamida (19:1) al 6% final de acrilamida, en tampón TBE 0,5X con urea 7,5 M y utilizando vidrios de 35 x 45 cm. Los vidrios que se utilizaron se lavaron con agua y etanol. Un vidrio fue cubierto con 500 µL de Repel-silano ES y el otro se cubrió con 1 mL de etanol que contenía 3 µL de Silane A-174 y 5 µL de ácido acético al 10%. Una vez secos los vidrios, las superficies tratadas se enfrentaron cara a cara con un sistema de apretadores y separadores, además de una peineta de dientes de tiburón invertida. La mezcla de polimerización contenía 70 mL de solución de acrilamida-urea al 6% a la que se agregó 163 µL de persulfato de amonio al 10% y 88 µL de TEMED para polimerizar.

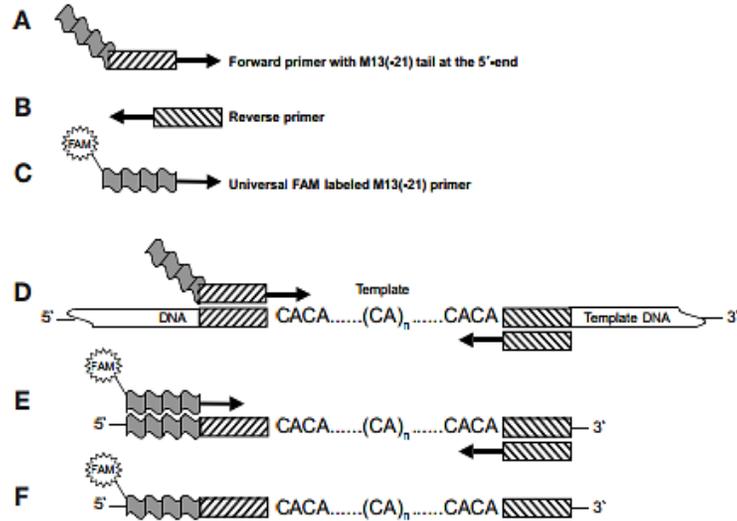
Los fragmentos de ADN separados se tiñeron con nitrato de plata, siguiendo el protocolo Silver Sequencing System (Promega). Para ello, el vidrio que llevaba adherido el gel de poliacrilamida se incubó en 2 L de ácido acético 10% durante 30 minutos. Tras lavar con agua destilada, el vidrio con el gel se incubó durante 40 minutos en 2 L de solución de nitrato de plata 1 g/L que contenía 3 mL de formaldehído y luego se reveló con 1 L de

solución de carbonato de sodio 30 g/L con un cristal de tiosulfato de sodio y 1,5 mL de formaldehído. El revelado se prolongó durante 2 a 3 minutos, hasta que las bandas se contrastaron lo suficiente en relación al fondo.

Los fragmentos teñidos en el gel de poliacrilamida fueron escaneados para guardar un registro. Se determinó el tamaño de los alelos de microsatélites con la ayuda de un estándar de ADN.

#### **4.2.3.3 Amplificación de marcadores de SSR por PCR para EC**

Las amplificaciones para EC se realizaron utilizando el método de marcaje universal descrito por Schuelke (2000). El método utiliza tres partidores, siendo dos de ellos partidores sentido y uno anti-sentido. Uno de los partidores sentido consiste en el partidador de interés ligado a una secuencia universal M13 (cola M13) en su región 5'. El otro partidador sentido corresponde a la misma secuencia M13 (cola M13) marcada con un fluorocromo en el extremo 5'. De esta manera los amplicones generados por la pareja M13/sentido y antisentido sirven para anclar un nuevo partidador sentido que correspondería a la cola M13 marcada en el extremo 5', generándose así un amplicón marcado con un fluorocromo. En la **Figura 4.2.1** se presenta un esquema de la metodología descrita.



**Figura 4.2.1. Esquema de amplificación de microsatélites utilizando la marcación con la cola M13.**

- A. Partidor sentido con secuencia universal M13 en el extremo 5' (M13/sentido).
- B. Partidor antisentido.
- C. Cola M13 (M13) marcada con fluorocromo en el extremo 5'.
- D. Primeros ciclos de amplificación con el M13/sentido (A) y el partidor antisentido (B).
- E. El amplicón producido en los primeros ciclos de amplificación (D) sirve como templado a los ciclos posteriores con la cola M13 marcada como partidor (C) y el partidor antisentido (B).
- F. En la última etapa se obtiene un amplicón marcado con fluorocromo en la región 5', el cual se analiza posteriormente mediante electroforesis capilar (Schuelke, 2000).

Las amplificaciones se realizaron utilizando un volumen de reacción de 20  $\mu\text{L}$ , compuesto por 2  $\mu\text{L}$  de ADN genómico 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$  de tampón de PCR 5X, 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0,2  $\mu\text{L}$  de solución de dNTPs 25 mM c/u, 0,16  $\mu\text{L}$  de partidor sentido-con cola 5  $\mu\text{M}$  (0,8 pmoles), 0,64  $\mu\text{L}$  de partidor antisentido (2,4 pmoles), 0,64  $\mu\text{L}$  de colaM13 marcada con fluoróforo (2,4 pmoles), y 0,2  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa GoTaq 5U/ $\mu\text{L}$  (1U). El programa de amplificación consiste de una desnaturalización inicial a 95°C x 15 minutos, una etapa de 30 ciclos a 95°C x 30 segundos, [temperatura de apareamiento] x 45 segundos y 72°C x 45 segundos, a 72°C x 7 minutos, otra etapa de 8 ciclos a 95°C de 30 segundos, 55°C x 45 segundos y 72°C x 45 segundos, finalizando con una extensión final a 72°C x 30 minutos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores TC-512 (Techne) y PCR System 2700 (GeneAmp®). En todas las reacciones se incluyó un control negativo de amplificación (agua).

Todos los loci fueron amplificados con una temperatura de apareamiento de 56°C, excepto los loci Bro08, Bropap\_20558, Bropap\_02214, Bropap\_23758 y Bropap\_25444 que fueron amplificados usando una temperatura de apareamiento de 55°C.

Las amplificaciones fueron confirmadas por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X, de acuerdo a lo señalado previamente (sección 4.2.2.1.1). Las colas M13 utilizadas para cada grupo de marcadores SSR se detallan en la **Tabla 4.2.3**.

**Tabla 4.2.3. Secuencias M13 utilizadas para cada marcador SSR**

Marcadores SSR	Secuencia M13
Bropap	5'- TGTAACGACGGCCAGT -3'
Bro	5'- CACGACGTTGTAACGAC -3'

\*Ambas colas M13 se enviaron a sintetizar con fluorocromos 6-Fam y Ned.

#### 4.2.3.4 Análisis de amplicones por Electroforesis capilar (EC)

Los análisis por EC se contrataron al Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los electroferogramas se visualizaron con el software Peak Scanner™ v1.0 de Life Technologies, y el tamaño de los alelos se registró en tablas Excel para su posterior análisis informático.

#### 4.2.3.5 Análisis de diversidad genética

Los análisis informáticos de la diversidad genética se realizaron con GenAEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Este software se utilizó para calcular el número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), el análisis de coincidencias multilocus para datos codominantes, el análisis de coincidencias multilocus por locus para un incremento en la combinación de los 14 loci y el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Las significancias estadísticas para las desviaciones del EHW en el análisis multilocus fueron calculadas con Genepop 3.4 (Rousset, 2008).

Los potenciales cuellos de botella para las poblaciones estudiadas fueron evaluados con el programa Bottleneck aplicando el test de Wilcoxon (Cornuet y Luikartt, 1996; Piry y cols., 1999) según los modelos mutacionales AIM y SMM.

#### **4.2.4 Estudio de la relación entre la diversidad genética y localización geográfica de los individuos de *B. papyrifera* analizados.**

##### **4.2.4.1 Análisis de estructura de poblaciones**

###### **4.2.4.1.1 Análisis de distancia genética y construcción de dendrogramas**

Las matrices de distancia genética y los dendrogramas se calcularon utilizando el software Populations 1.2.31 (<http://bioinformatics.org/populations/>).

Las distancias genéticas de las poblaciones se calcularon utilizando los coeficientes de distancia genética de Cavalli-Sforza (1967) y de Goldstein (1995). Ambas matrices de distancia genética se utilizaron para confeccionar dendrogramas mediante el algoritmo de agrupamiento Neighbour-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987).

###### **4.2.4.1.2 Análisis bayesiano de estructura de poblaciones**

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

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

El valor K real estimado se calculó a partir de los valores de  $\Delta K$  (Evanno y cols., 2005), que corresponden a la razón de cambio del valor del logaritmo de la probabilidad de los datos [ $\ln \Pr(X/K)$ ]. El valor K real estimado obtenido fue comprobado en una

segunda corrida, esta vez utilizando un rango de simulaciones entre 1 – 8, corriendo el programa con un número de iteraciones para MCMC y *burnin* de 750.000 y 500.000, respectivamente. Cada valor K se calculó de 20 corridas independientes.

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

El análisis de coordenadas principales (Abdi y cols., 2012) se realizó con GenAEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012), utilizando una matriz de distancia genética calculada con un coeficiente de distancia genética genotípico – codominante.

#### **4.2.4.3 Análisis de distancia geográfica v/s distancia genética**

El análisis de distancia geográfica v/s distancia genética se realizó con GenAEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Este software se utilizó para comparar una matriz de distancia geográfica y otra matriz de distancia genética mediante un test de Mantel (Mantel, 1967). Ambas matrices también fueron construidas con GenAEx 6.5.

La matriz de distancia geográfica se calculó a partir de las latitudes y longitudes de cada localidad. Estas coordenadas fueron obtenidas utilizando Google Earth 7.1.1.1888 (<http://www.google.es/intl/es/earth/index.html>).

La matriz de distancia genética se calculó utilizando un coeficiente de distancia genética genotípico – codominante (Peakall y Smouse, 2012). El test de Mantel se realizó usando 9.999 permutaciones.

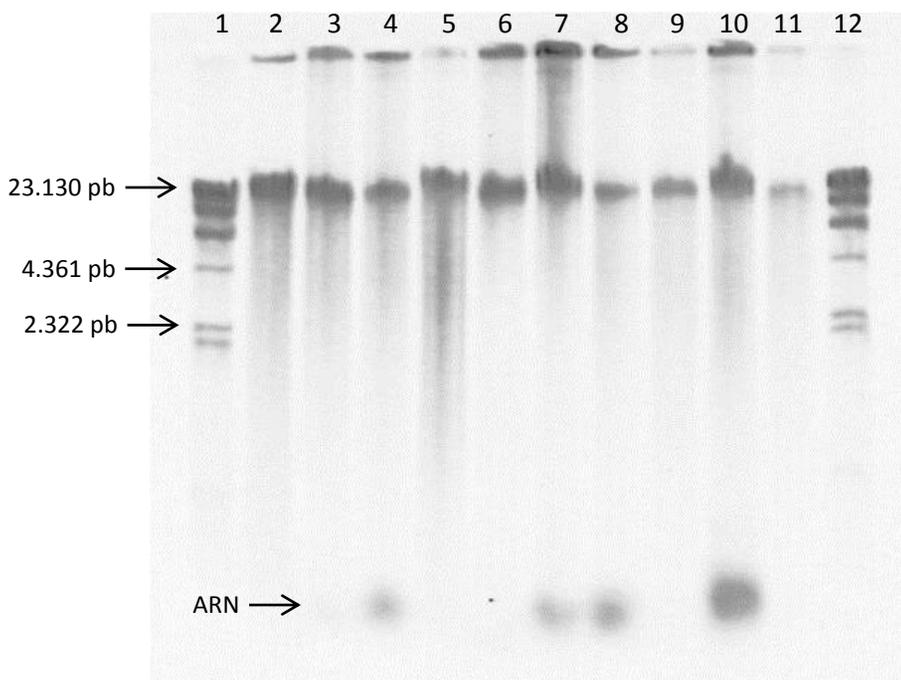
## 5 Resultados

### 5.1 Desarrollo de un banco de ADN genómico de individuos de *B. papyrifera*.

Se construyó un banco genómico compuesto por 193 muestras de ADN, cuya concentración, pureza y grado integridad se presentan en la **Tabla I** del **Anexo 2**. El banco genómico se construyó utilizando muestras foliares de *B. papyrifera* provenientes de distintas islas de Oceanía Remota en el Pacífico, y también de Asia, que corresponde al hábitat nativo de esta especie.

#### 5.1.1 Extracción y determinación de integridad de ADN

Las muestras del banco genómico se prepararon utilizando un método de extracción de ADN descrito para vides (Lodhi y cols., 1994), con las variaciones respecto al protocolo original descritas en materiales y métodos. Ambas modificaciones se adoptaron en nuestro laboratorio para esta especie, previas al desarrollo de esta tesis. A modo de ejemplo, en la **Figura 5.1.1** se muestran algunas preparaciones de ADN genómico en las que se aprecia la presencia de una banda de ADN de alto peso molecular, mayor a 23 Kb, en todas las muestras. Se observa además poco chorreo, lo que indicaría un bajo grado de degradación de ADN en las muestras. La flecha muestra la presencia de ARN en 4 muestras.



**Figura 5.1.1. Perfil electroforético de ADN genómico de muestras de *B. papyrifera*.**

Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Carril 1: estándar de ADN  $\lambda$ /Hind III, carril 2: BQUCH0152 (Isla de Pascua), carril 3: BQUCH0100 (Tonga), carril 4: BQUCH0115 (Fiji), carril 5: BQUCH0064 (Hawái), carril 6: BQUCH0138 (Taiwán), carril 7: BQUCH0140 (Taiwán), carril 8: BQUCH0134 (Santiago), carril 9: BQUCH0141 (Japón), carril 10: BQUCH0144 (Japón), carril 11: BQUCH0045 (Islas Marquesas), carril 12: Estándar de ADN  $\lambda$ /Hind III.

Se observó presencia de una banda genómica en el 87 % de las muestras. Así como también se observó presencia de RNA en el 42% de las preparaciones.

## 5.1.2 Medición de las concentraciones de ADN

### 5.1.2.1 Espectrofotometría: concentración y pureza

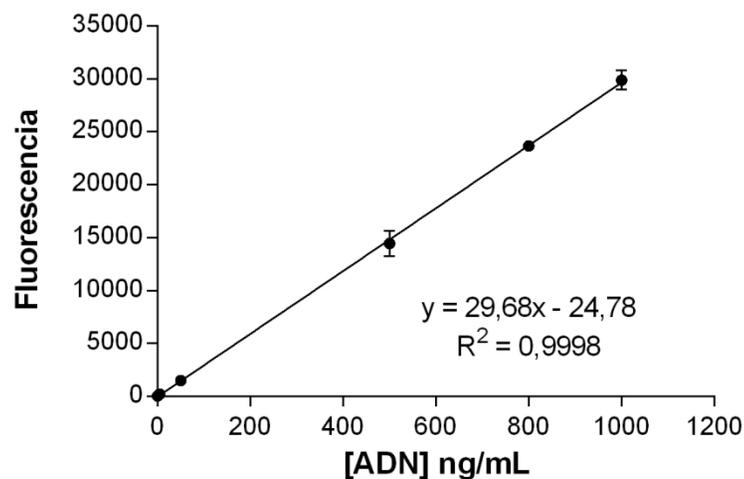
Las concentraciones de ADN de las muestras se determinaron inicialmente mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm. Se estimó su pureza mediante la razón de absorbancias a 260 nm y 280 nm. El 51,8% de las muestras mostró una absorbancia en el rango de 1,8 – 2,0, mientras que el 42,6% de las muestras obtuvo absorbancias mayores a 2,0 y el otro 5,6% restante menor a 1,8. Los resultados obtenidos para cada muestra se detallan en la **Tabla I** del **Anexo 2**.

### 5.1.2.2 Fluorescencia

Las concentraciones de ADN genómico también fueron cuantificadas utilizando el colorante fluorescente Picogreen. Este es un método de cuantificación ultra-sensible, de alta afinidad por el ADN de doble hebra, el cual no presenta un aumento significativo en la determinación de la concentración en presencia de contaminantes como RNA, polisacáridos o polifenoles, como sí ocurre en la cuantificación por métodos espectrofotométricos (Ahn y cols., 1996; Singer y cols., 1997). En la **Figura 5.1.2** se muestra una de las curvas de calibración utilizada en la determinación de la concentración por fluorescencia, la totalidad de las curvas de calibración utilizadas se detallan en el **Anexo 3**.

Al comparar las mediciones de concentración realizadas con ambos métodos, observamos que el 87,5% de las muestras presentan cuantificaciones espectrofotométricas entre 2,5 – 50 veces mayores a las mediciones registradas usando Picogreen. El otro 12,5% presenta diferencias mayores a 50 veces. Esta variación puede deberse principalmente a la presencia excesiva de ARN, polisacáridos y polifenoles que se co-extrajeran durante la extracción de ADN. Razones similares a las observadas nos fueron informadas por Ecogenics al enviar los ADN genómicos necesarios para el desarrollo de marcadores microsatélites.

Con las mediciones obtenidas por fluorescencia se realizaron diluciones de 0,6 ng/ $\mu$ L de ADN genómico para las reacciones de amplificación. Este valor se calculó como la dilución de ADN genómico necesaria para generar una amplificación equivalente a las amplificaciones de PCR donde se había utilizado como sustrato diluciones de ADN 10 ng/ $\mu$ L, preparadas en base a mediciones de espectrofotometría. Las amplificaciones usadas para esta comparación fueron aquellas en las cuales se observó bandas, fácilmente perceptibles al ojo, en geles de agarosa donde se cargaron 5  $\mu$ L del producto de la amplificación por PCR. En el caso de las muestras BQUCH0050, BQUCH0078 y BQUCH126, que tenían concentraciones menores a 0,6 ng/ $\mu$ L, no se realizaron diluciones y se trabajó directamente a partir del material de extracción.

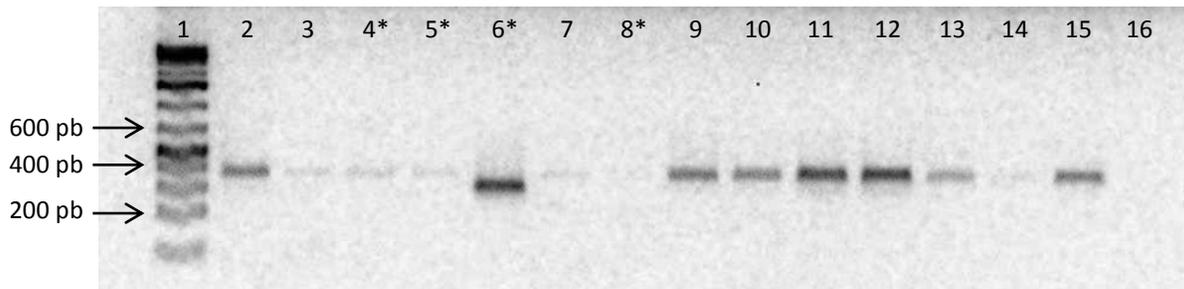


**Figura 5.1.2. Ejemplo de curva de calibración utilizada en la cuantificación de ADN con Picogreen.**

Curva de calibración utilizada en la medición de concentración por fluorescencia.

### 5.1.3 Amplificabilidad del banco genómico

Se consideró como criterio de funcionalidad del banco genómico el que las muestras fueran amplificables. Para ello se probó amplificando cada una de las muestras con el marcador específico para *B. papyrifera* MM.v1, en reacciones de PCR descritas en la sección 5.2.4. Con este marcador amplificaron 189 de las 193 muestras del banco genómico (97,9%). Las cuatro muestras que no mostraron amplificación (BQUCH0040, BQUCH0050, BQUCH0053, BQUCH0078) fueron analizadas con el marcador ITS1. También se analizaron otras 9 muestras con este marcador (ITS1), las que presentaban una débil amplificación que hacía difícil su interpretación con el marcador MM.v1. En la **Figura 5.1.3** se presenta la amplificación del ADN de estas 13 muestras con ITS1.



**Figura 5.1.3. Análisis de amplificación con el marcador ITS1.**

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Carril 1: Estándar de ADN, carril 2: control positivo, carril 3: BQUCH0009, carril 4: BQUCH0040, carril 5: BQUCH0050, carril 6: BQUCH0053, carril 7: BQUCH0069, carril 8: BQUCH0078, carril 9: BQUCH0108, carril 10: BQUCH0114, carril 11: BQUCH0115, carril 12: BQUCH0116, carril 13: BQUCH0170, carril 14: BQUCH0178, carril 15: BQUCH0183, carril 16: Control negativo de amplificación.

\*Muestras que no amplificaron con el marcador MM.v1.

Como se observa en la **Figura 5.1.3**, 12 de las 13 muestras analizadas sí amplificaron utilizando el marcador ITS1. En cambio, la muestra BQUCH0078 (carril 8) tampoco amplificó con este segundo marcador.

La muestra BQUCH0053 no amplificó con el marcador MM.v1, sin embargo con ITS1 mostró una intensa amplificación, aunque generando un amplicón de un tamaño ligeramente menor al de las otras muestras de *B. papyrifera* (carril 6, **Figura 5.1.3**). Este amplicón fue secuenciado y se buscaron secuencias homólogas en BLAST, encontrando 88% de identidad con regiones ITS1 de 7 especies del género *Citrus*, por los que esta muestra fue excluida de todos los análisis.

La muestra BQUCH0078 tampoco amplificó con ITS1 (carril 8). La cuantificación de ADN por fluorescencia indicó un valor cercano a 0 y en el gel de integridad no se observó banda genómica ni rastros de degradación. Probablemente esta extracción de ADN tuvo un bajo rendimiento por el deterioro de la muestra, ya que correspondía a una muestra almacenada desde noviembre de 2008 a -20°C. Esta muestra también fue descartada de los estudios genéticos posteriores.

Las otras dos muestras, BQUCH0040 y BQUCH0050, presentaron una débil amplificación con el marcador de ITS1, que fue atribuida a diluciones de ADN genómico de trabajo menores a las esperadas. Éstas muestras sí fueron utilizadas en los ensayos

posteriores, pero con diluciones de ADN genómico realizadas a partir de las mediciones hechas por fluorescencia. Se utilizó este mismo criterio para las otras nueve muestras que presentaban una débil amplificación con el marcador MM.v1.

En resumen, el banco genómico constituido inicialmente por 193 muestras, luego de este análisis, quedo conformado por 191 muestras de ADN de *B. papyrifera* de alta pureza y funcionalidad comprobada según los criterios descritos. Las muestras BQUCH0053 y BQUCH0078, si bien se presentan en la **Tabla I** del banco genómico, quedaron descartadas para los análisis posteriores, por no corresponder a la especie en el caso de BQUCH0053, y por no tener una concentración de ADN cuantificable, en el caso de BQUCH0078.

## 5.2 Descripción de la distribución por sexo de *B. papyrifera* en las islas del Pacífico usando un marcador molecular de sexo.

Es de interés determinar el sexo de individuos de *B. papyrifera* de la Polinesia, porque se desconoce su distribución por sexo en esta zona y porque la presencia de uno o ambos sexos en las distintas islas podría tener incidencia en la potencial diversidad genética de esta planta. Con este objetivo, se desarrolló un método para la identificación del sexo de las muestras del banco genómico, utilizando como base la secuencia HQ202152.1 (**Anexo 1**), depositada en GenBank por los autores Lianjun y cols. como un marcador masculino de *B. papyrifera*. Esta secuencia de STS fue obtenida a partir de AFLP, y posteriormente publicada por Lianjun y cols. (2012).

A partir de la secuencia descrita, en esta tesis se diseñaron tres partidores mediante un software específico (IDT, <http://www.idtdna.com/pages/products/dna-rna>) (**Tabla 5.2.1**). Estos partidores corresponden a un partidor sentido o *Forward* (MMF) y a dos partidores antisentido o *Reverse* (MMRS y MMRL). La pareja de partidores MMF - MMRL genera un amplicón de 425 pb, mientras la pareja MMF - MMRS genera un amplicón de menor tamaño (271 pb).

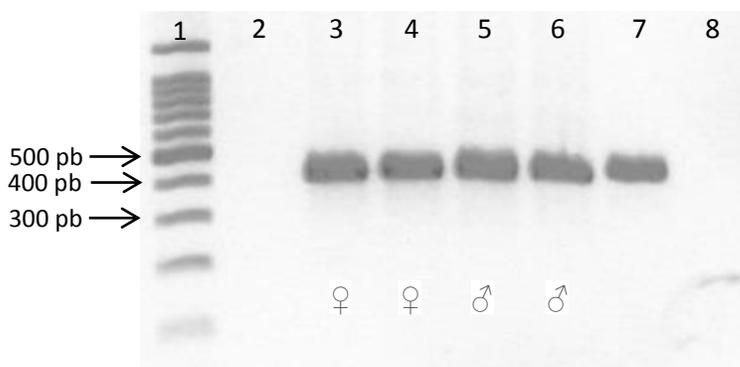
**Tabla 5.2.1. Partidores diseñados para la región del marcador masculino.**

Partidor	Secuencia 5' – 3'
Sentido (MMF)	AGC CCT TTG GAT CGC GAC TTA GAA
Antisentido (MMRS)	TGT CAA CGT CAT CAT CGT CGT CGT
Antisentido (MMRL)	CTG GAC AAG ACC AAC TTT GAA TCC G

Con el fin de ensayar la utilidad de los partidores diseñados para la determinación de sexo en *B. papyrifera*, se utilizaron 4 muestras sexadas fenotípicamente (dos masculinas y dos femeninas) provenientes de Taiwán (ver grupo control de sexo en materiales y métodos, **sección 4.1.3**). Las condiciones de amplificación ensayadas se detallan en la **sección 4.2.2.1.1** de materiales y métodos. Inicialmente se realizaron amplificaciones independientes con cada pareja de partidores, como se detalla a continuación.

### 5.2.1 Prueba de la pareja de partidores MMF – MMRL

La PCR con la pareja MMF – MMRL presentó amplificación de un fragmento de menos de 500 pb (**Figura 5.2.1**), de acuerdo a lo esperado. Esta amplificación se considera específica, pues no amplifica ADN de *Morus alba* ni *Broussonetia kazinoki*, especies cercanamente relacionadas, como se muestra en el carril 2 para *M. alba*. Otros resultados obtenidos en el laboratorio confirman que este marcador es especie-específico (resultados no publicados, A. Fuentes). Por el contrario, todas las muestras de *B. papyrifera* presentan amplificación, independiente del sexo.



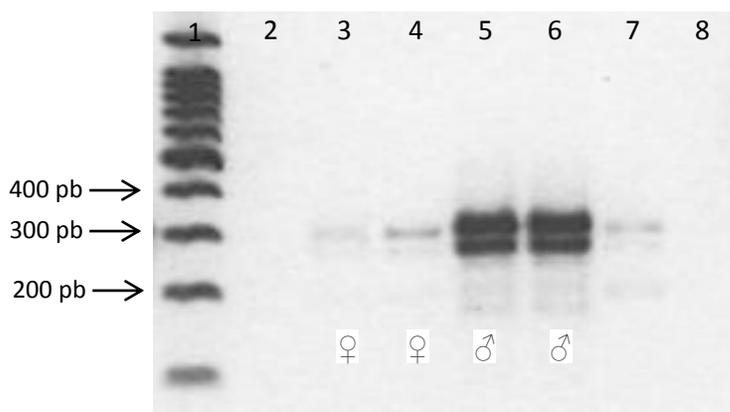
**Figura 5.2.1. Amplificación con la pareja de partidores MMF – MMRL.**

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Carril 1: Estándar de ADN 100pb, carril 2: *Morus alba*, carril 3: BQUCH0140 (Taiwán ♀), carril 4: BQUCH0139 (Taiwán ♀), carril 5: BQUCH0138 (Taiwán ♂), carril 6: BQUCH0137 (Taiwán ♂), carril 7: BQUCH0001 (Isla de Pascua), carril 8: control negativo de amplificación (H<sub>2</sub>O).

### 5.2.2 Prueba de la pareja de partidores MMF - MMRS

La PCR utilizando la pareja MMF – MMRS presentó amplificación de un fragmento de alrededor de 300 pb (**Figura 5.2.2**), también de acuerdo a lo esperado. Sin embargo, se observó una amplificación diferencial entre las muestras masculinas y femeninas (**Figura 5.2.2**). Los resultados obtenidos sugieren además que esta amplificación es específica para

*B. papyrifera*, pues nuevamente no se detectó amplificación en una muestra de ADN de *M. alba* (carril 2).



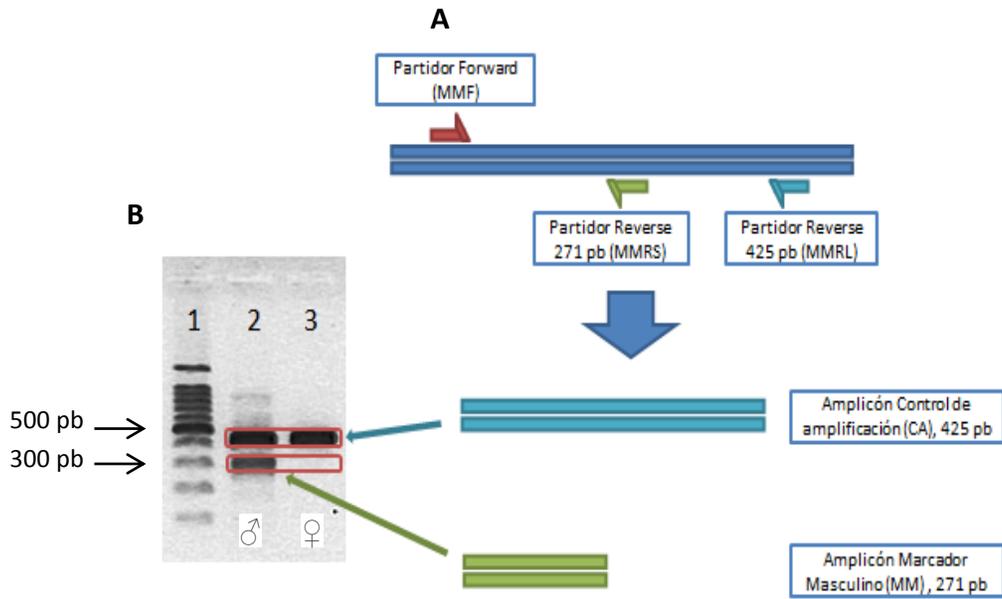
**Figura 5.2.2. Amplificación diferencial según sexo con la pareja de partidores MMF – MMRS.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. Carril 1: Estándar de ADN 100pb, carril 2: *Morus alba*, carril 3: BQUCH0140 (Taiwán ♀), carril 4: BQUCH0139 (Taiwán ♀), carril 5: BQUCH0138 (Taiwán ♂), carril 6: BQUCH0137 (Taiwán ♂), carril 7: BQUCH0001 (Isla de Pascua), carril 8: control negativo de amplificación (H<sub>2</sub>O).

En la **Figura 5.2.2** se observa que los individuos de sexo masculino (carriles 5 y 6) presentan una amplificación intensa, mientras que los individuos de sexo femenino (carriles 3 y 4) presentan bandas de tamaño similar, pero de menor intensidad. Según este análisis, una muestra de *B. papyrifera* proveniente de Isla de Pascua, escogida al azar, parece corresponder a un individuo femenino (carril 7). En este ensayo, la amplificación observada en individuos femeninos es de mucho menor intensidad que en los individuos masculinos. Con el fin de eliminar una posible ambigüedad en la interpretación de los resultados, se decidió optimizar las condiciones de la PCR para desarrollar un ensayo en el cual las muestras de ADN de especímenes femeninos no presenten amplificación.

### 5.2.3 Diseño de una PCR Dúplex

La estrategia del PCR dúplex correspondía a una amplificación que discrimine individuos femeninos de masculinos y al mismo tiempo un control de amplificación asociado. Para esto, se diseñó una metodología de PCR dúplex (que denominamos “método Male Marker”) utilizando de manera simultánea las dos parejas de partidores. En esta PCR-dúplex, el amplicón MMF – MMRL corresponde a un control de amplificación, mientras que el amplicón MMF – MMRS identifica la presencia de individuos masculinos. El control de reacción permite obtener un amplicón para todos los individuos, lo cual es especialmente importante para las muestras femeninas de *B. papyrifera*, dado que esta PCR se ha diseñado para que los individuos femeninos no presenten amplificación con el marcador masculino (MMF – MMRS). Por lo tanto, la inclusión de un control de amplificación es indispensable para la identificación certera de individuos femeninos.

En la **Figura 5.2.3** se muestra un esquema del diseño de la PCR dúplex, en el cual el amplicón de mayor tamaño (425 pb) corresponde al control de amplificación, mientras la presencia de la banda de menor tamaño (271 pb) identifica a los individuos de sexo masculino.



**Figura 5.2.3. Diseño experimental del método Male Marker.**

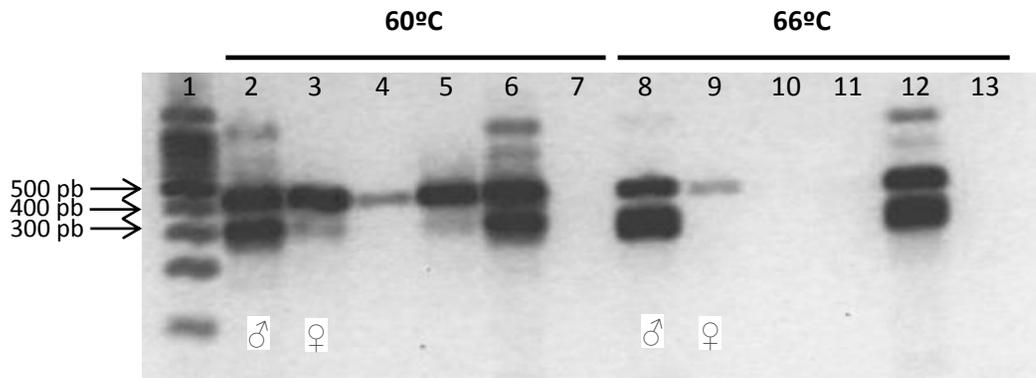
**A.** Esquema de la reacción de PCR-dúplex con partidores y amplicones generados.

**B.** Gel de agarosa al 2%. Carril 1: Estándar de ADN 100 pb, carril 2: BQUCH0137 (♂), carril 3: BQUCH0139 (♀).

#### 5.2.4 Optimización de la PCR dúplex mediante un gradiente de temperatura

Con el fin de eliminar totalmente la banda de 271 pb del amplicón MMF – MMRS en los individuos de sexo femenino, se optimizaron los parámetros de la PCR. Para ello se realizaron reacciones de PCR-dúplex con un gradiente de temperaturas de 53 a 66°C.

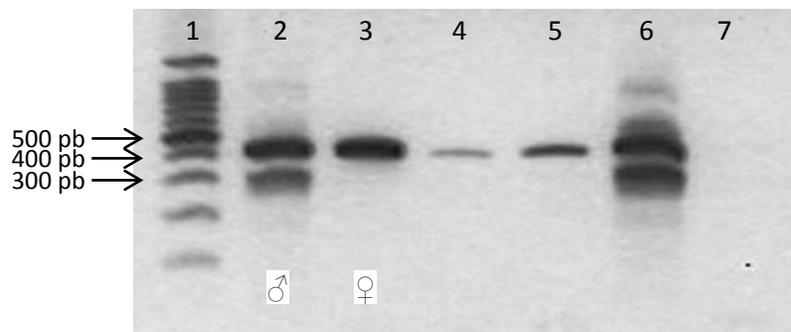
En la **Figura 5.2.4** se comparan amplificaciones a 60 y 66°C usando muestras sexadas (BQUCH0137 (♂), BQUCH0139 (♀)) y muestras de la colección genómica. A 60°C se observa una menor amplificación del fragmento de 271 pb en individuos femeninos. A 66°C se mantiene la amplificación de la banda de 271 pb sólo en individuos masculinos, sin embargo en algunos individuos se pierde incluso la amplificación de los fragmentos de control de amplificación.



**Figura 5.2.4. Optimización de la PCR dúplex del método de Male Marker.**

Carril 1: Estándar de ADN 100 pb. Carriles 2-7 ampliificaciones a 60°C (carril 2: BQUCH0137 (♂), carril 3: BQUCH0139 (♀), carril 4: BQUCH0134, carril 5: BQUCH0001, carril 6: BQUCH0130, carril 7: control de amplificación (H<sub>2</sub>O)). Carriles 8-13 ampliificaciones a 66°C (carril 8: BQUCH0137 (♂), carril 9: BQUCH0139 (♀), carril 10: BQUCH0134, carril 11: BQUCH0001, carril 12: BQUCH0130, carril 13: control negativo de amplificación (H<sub>2</sub>O)).

Con el fin de optimizar la reacción de PCR dúplex se hizo un barrido entre 61 y 65°C. En este barrido se observó que la temperatura de apareamiento óptima para este protocolo correspondía a 61°C. En la **Figura 5.2.5** se observa amplificación con la pareja MMF – MMRL en todas las muestras (Control de amplificación) y la presencia de un segundo amplicón con la pareja MMF – MMRS sólo en los individuos masculinos. Se debe notar que la banda del control de amplificación resulta de mayor intensidad que la banda para discriminar individuos masculinos.



**Figura 5.2.5. Amplificación con el método Male Marker a una temperatura de apareamiento de 61°C.**

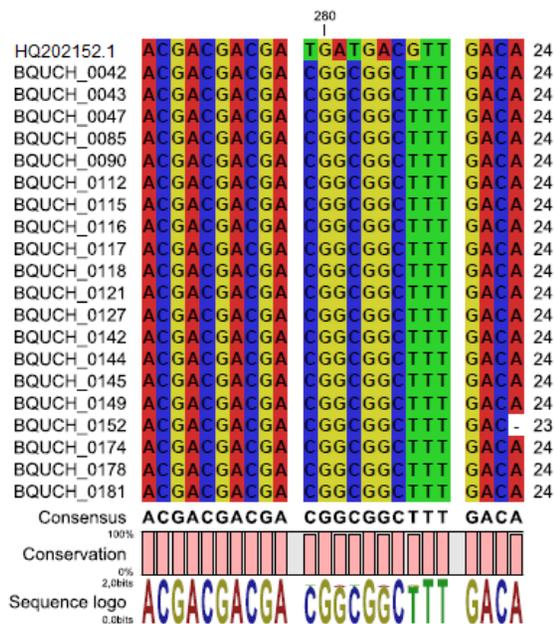
Carril 1: Estándar de ADN 100 pb, carril 2: BQUCH0137 (♂), carril 3: BQUCH0139 (♀), carril 4: BQUCH0134, carril 5: BQUCH0001, carril 6: BQUCH0130, carril 7: control negativo de amplificación (H<sub>2</sub>O).

Las condiciones de amplificación para el método Male Marker versión 1 (MM.v1) finalmente definidas se detallan en la sección de materiales y métodos.

### 5.2.5 Análisis de la región de unión al partidor MMRS en individuos femeninos

Se investigaron las diferencias a nivel de secuencia que daban cuenta de la eficiencia diferencial en la amplificación de las muestras de individuos masculinos y femeninos con la pareja de partidores MMF – MMRS. Con este fin, se enviaron a secuenciar a Macrogen, amplicones de 20 individuos femeninos, de distintas localidades, utilizando la pareja MMF – MMRL. Se eligió el amplicón de la pareja MMF – MMRL debido a que contiene la secuencia de apareamiento del partidor MMRS.

En la **Figura 5.2.6** se muestra un alineamiento de 20 individuos de una secuencia de 24 pb, que corresponde a la región de unión del partidor MMRS. En el alineamiento se incluye la secuencia masculina de referencia HQ202152.1.



**Figura 5.2.6. Alineamientos de la región de apareamiento del partidor MMRS.**

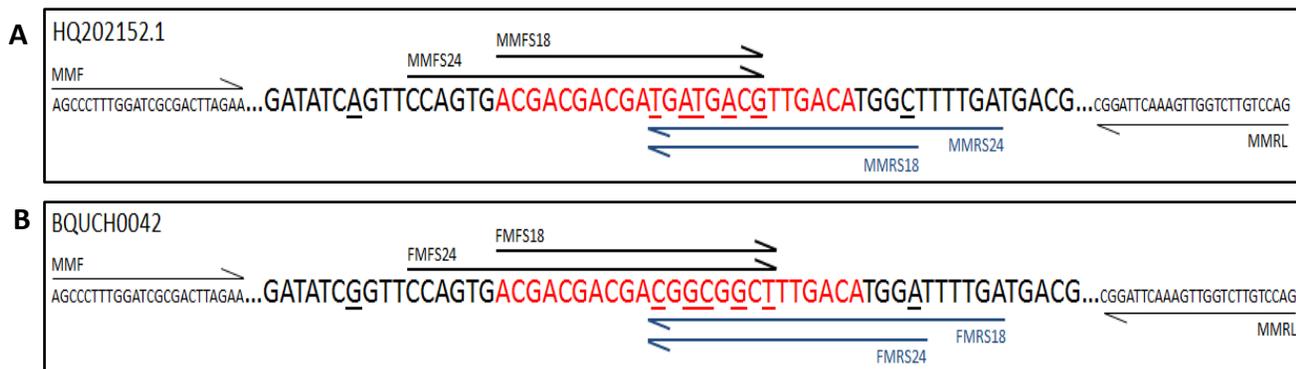
Alineamiento de la región de unión al partidor MMRS en distintas muestras de islas del Pacífico y la región de unión al partidor de la secuencia HQ202152.1.

Los resultados de la secuenciación indican que las secuencias de los 20 individuos femeninos analizados presentan cinco cambios puntuales de una base en la región de apareamiento del partidor MMRS con respecto a la secuencia HQ202152.1. Esto podría explicar el menor apareamiento del partidor MMRS en las muestras de sexo femenino, y dar cuenta de la diferencia encontrada en la eficiencia de la reacción de amplificación. También explicaría por qué a mayores temperaturas no hay amplificación de esta secuencia en individuos femeninos.

### **5.2.6 Rediseño del partidor MMRS**

Los resultados de la sección anterior indicaron la presencia de 5 cambios de nucleótidos concentrados en la región central de apareamiento del partidor MMRS en individuos femeninos respecto a la secuencia HQ202152.1. En base a estas observaciones, se propuso que un rediseño del partidor MMRS podría aumentar su especificidad, actuando como un marcador SCAR, independiente de la temperatura.

Los cambios propuestos al partidor MMRS consistieron en diseñar un nuevo partidor que también apareara con la secuencia masculina HQ202152.1, pero en esta ocasión desplazando la región de apareamiento, ubicando la zona de los 5 cambios nucleotídicos respecto a la secuencia encontrada en individuos femeninos al extremo 3' del partidor. También se sugirió reducir su tamaño a 18 pb para aumentar el porcentaje de bases desapareadas en los individuos de sexo femenino. Los partidores fueron diseñados en versiones sentido y antisentido, considerando utilizar como pareja de amplificación los partidores MMRL y MMF, respectivamente. Para ambos partidores, también se diseñaron versiones de 24 pb por si se perdía la especificidad en las versiones de 18 pb. Además, se diseñaron 4 partidores adicionales siguiendo la misma lógica, pero en esta ocasión orientados a aparearse con la secuencia nucleotídica encontrada en individuos femeninos, con el objetivo de obtener también un marcador femenino (FM). La **Figura 5.2.7** muestra un esquema con la ubicación de los partidores en la zona de apareamiento. Las secuencias de los partidores diseñados se muestran en la **Tabla 5.2.2**.



**Figura 5.2.7. Esquema de apareamiento de los partidores diseñados para reemplazar al MMRS.**

En rojo se muestra la región de apareamiento con el partidior MMRS. Se subrayan los cambios nucleotídicos entre ambas secuencias, masculina y femenina respectivamente.

**A.** Ubicación de los partidores diseñados para aparear con la secuencia masculina sobre la secuencia de referencia masculina HQ202152.1.

**B.** Ubicación de los partidores diseñados para aparear con la secuencia femenina sobre la secuencia de la muestra BQUCH0042, obtenida por secuenciación.

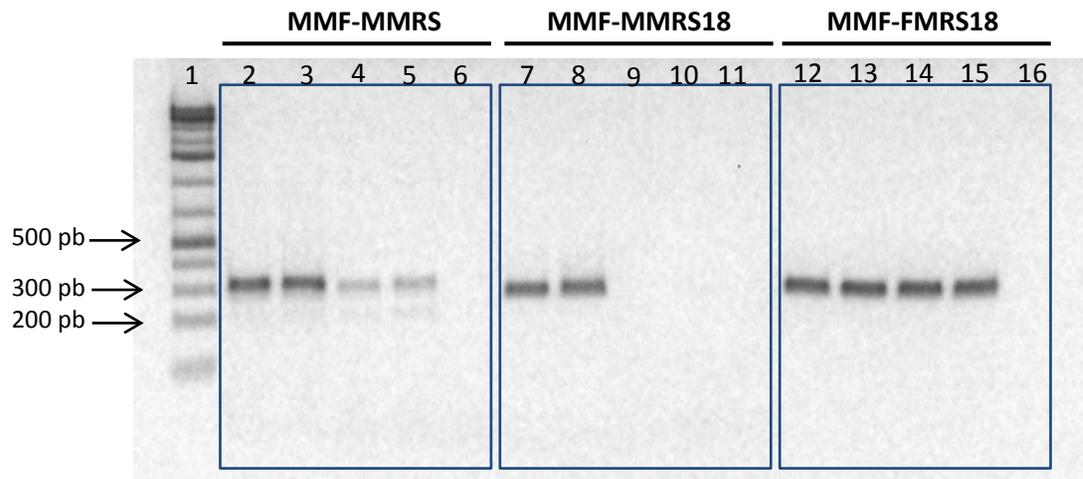
**Tabla 5.2.2. Partidores diseñados para el reemplazo del partidior MMRS**

Partidior	Mer	Secuencia 5' - 3'
MMF <b>S</b> 18 (Sentido)	18	ACG ACG ACG ATG ATG ACG
MMF <b>S</b> 24 (Sentido)	24	CCA GTG ACG ACG ACG ATG ATG ACG
MMR <b>S</b> 18 (Antisentido)	18	GCC ATG TCA ACG TCA TCA
MMR <b>S</b> 24 (Antisentido)	24	TCA AAA GCC ATG TCA ACG TCA TCA
FMF <b>S</b> 18 (Sentido)	18	ACG ACG ACG ACG GCG GCT
FMF <b>S</b> 24 (Sentido)	24	CCA GTG ACG ACG ACG ACG GCG GCT
FMR <b>S</b> 18 (Antisentido)	18	TCC ATG TCA AAG CCG CCG
FMR <b>S</b> 24 (Antisentido)	24	TCA AAA TCC ATG TCA AAG CCG CCG

\*MM: marcador masculino, FM: marcador femenino, F: partidior sentido, R: partidior antisentido.

### 5.2.7 Prueba de partidores rediseñados

Las amplificaciones de PCR para probar los partidores rediseñados se realizaron de acuerdo al protocolo de la **sección 4.2.2.1.6**, usando como control las cuatro muestras del grupo control de sexo. En la **Figura 5.2.8** se muestra la comparación de los patrones de amplificación generados por las parejas de partidores MMF – MMRS, MMF – MMRS18 y MMF – FMRS18.



**Figura 5.2.8. Comparación de los patrones de amplificación de las parejas de partidores MMF-MMRS, MMF-MMRS18, MMF-FMRS18.**

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. Carril 1: Estándar de ADN 1Kb plus, carriles 2-6 amplificaciones con la pareja MMF-MMRS (carril 2: BQUCH0137 (Taiwán ♂), carril 3: BQUCH0138 (Taiwán ♂) carril 4: BQUCH0139 (Taiwán ♀), carril 5: BQUCH0140 (Taiwán ♀), carril 6: control de amplificación (H<sub>2</sub>O)), carriles 7-11 amplificaciones con la pareja MMF-MMRS18 (carril 7: BQUCH0137 (Taiwán ♂), carril 8: BQUCH0138 (Taiwán ♂) carril 9: BQUCH0139 (Taiwán ♀), carril 10: BQUCH0140 (Taiwán ♀), carril 11: control de amplificación (H<sub>2</sub>O)), carriles 12-16 amplificaciones con la pareja MMF-FMRS18 (carril 12: BQUCH0137 (Taiwán ♂), carril 13: BQUCH0138 (Taiwán ♂) carril 14: BQUCH0139 (Taiwán ♀), carril 15: BQUCH0140 (Taiwán ♀), carril 16: control negativo de amplificación (H<sub>2</sub>O)).

Las amplificaciones de PCR generadas por las tres parejas de partidores comparadas presentaron amplicones de un fragmento de alrededor de 300 pb (**Figura 5.2.8**), de acuerdo a lo esperado. En la imagen también observamos que el nuevo partidor antisentido MMRS18 diseñado para aparearse selectivamente con individuos masculinos genera amplificación sólo en individuos de este sexo, a una temperatura en que el partidor MMRS aún presenta una leve amplificación en individuos femeninos. El mismo comportamiento fue observado con su versión de 24 pb (MMRS24, datos no mostrados). Por otro lado, nuestro partidor FMRS18 diseñado para aparear sólo con individuos femeninos muestra un grado de amplificación similar entre individuos masculinos y femeninos.

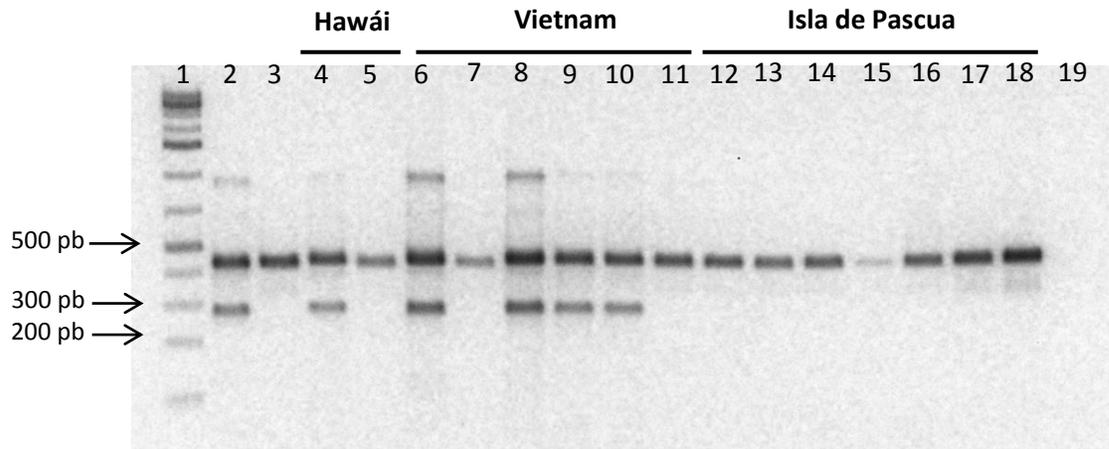
Las amplificaciones con los partidores sentido diseñados para el marcador masculino (MMFS18 y MMFS24) presentaron bandas inespecíficas. Sin embargo, el partidor MMFS18 presenta un patrón característico para individuos masculinos (datos no

mostrados). El partidador MMFS24 no muestra diferencias en la amplificación de individuos masculinos y femeninos, al igual que todos los partidores diseñados para el marcador femenino (datos no mostrados).

#### **5.2.8 Optimización de un nuevo método Male Marker versión 2 (MM.v2)**

Con el fin de obtener un balance entre la banda amplificada para el control de amplificación y la banda que discrimina los individuos masculinos, se optimizó un nuevo protocolo dúplex de amplificación sobre la base del protocolo utilizado para probar los partidores rediseñados. La optimización se trabajó sobre las concentraciones de partidores y el tiempo de elongación en la PCR. Se definieron finalmente como óptimas las condiciones indicadas en el protocolo de la sección de materiales y métodos (**sección 4.2.2.1.7**).

En las amplificaciones con el método MM.v2 se utilizaron las diluciones de ADN genómico a 0,6 ng/ $\mu$ L. Estas diluciones se prepararon en base a las cuantificaciones de ADN con el colorante fluorescente Picogreen, con el objetivo de normalizar las diluciones respecto a su contenido real de ADN y obtener amplificaciones de similar intensidad en todos los casos. A modo de ejemplo, en la **Figura 5.2.9** se muestran los resultados obtenidos en 16 muestras utilizando el método MM.v2.



**Figura 5.2.9. Análisis de sexo con el método MM.v2**

Carril 1: Estándar de ADN 1Kb, carril 2: BQUCH0137 (control ♂), carril 3: BQUCH0139 (control ♀), carril 4: BQUCH0194, carril 5: BQUCH0195, carril 6: BQUCH0201, carril 7: BQUCH0202, carril 8: BQUCH0203, carril 9: BQUCH0204, carril 10: BQUCH0204d, carril 11: BQUCH0205, carril 12: BQUCH0208, carril 13: BQUCH0208d, carril 14: BQUCH0209, carril 15: BQUCH0210, carril 16: BQUCH0211, carril 17: BQUCH0212, carril 18: BQUCH0213, carril 19: control negativo de amplificación (H<sub>2</sub>O).

Desde el punto de vista funcional, en la **Figura 5.2.9** se observa un amplicón de alrededor de 300 pb para el control masculino y para otras cinco muestras, que corresponde al tamaño esperado. Según el análisis estas muestras corresponderían a individuos de sexo masculino. Asimismo se observa una banda de alrededor de 500 pb para todas las muestras, la cual correspondería al amplicón “control de amplificación”, banda que también es del tamaño esperado. Se observa un nivel de amplificación similar para ambas bandas en los individuos masculinos, cumpliendo con el objetivo de la optimización.

El análisis es muy reproducible, lo cual se prueba con el resultado de las muestras analizadas en los carriles 10 y 13 (BQUCH0204d y BQUCH0208d), que corresponden a duplicados biológicos de las muestras en los carriles 9 y 12, respectivamente.

En cuanto a la distribución de sexo, en la **Figura 5.2.9** se observa presencia de individuos masculinos y femeninos en las muestras de Hawái y Vietnam. También observamos exclusivamente individuos femeninos en la Isla de Pascua, lo cual es representativo del resto de las islas de la Polinesia, excepto Hawái, según nuestros

análisis. El nuevo método MM.v2 se aplicó sobre la totalidad del banco genómico con el objetivo de comparar con los resultados obtenidos previamente con el MM.v1.

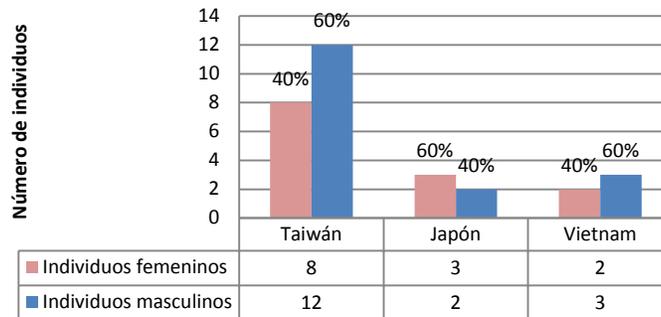
### **5.2.9 Distribución de sexo de *B. papyrifera* según el marcador Male Marker**

El análisis de la distribución de sexo se realizó utilizando las versiones MM.v1 y MM.v2. Una vez determinada la reproducibilidad del método se analizaron las 191 muestras del banco genómico, con el fin de determinar el sexo de todos los ejemplares. A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos del análisis de todas las muestras con el marcador de sexo. Se ilustra la distribución de *B. papyrifera* por sexo en cada isla (**Figura 5.2.10**). La información detallada de cada muestra se presenta en la **Tabla I del Anexo 2**.

Los resultados obtenidos con el método MM.v2 fueron consistentes con los resultados del método MM.v1, con la excepción de la muestra BQUCH0126. En el caso de esta muestra, en el primer análisis de MM.v1, dio un débil patrón femenino, y en su replicado no amplificó. Al realizar la corroboración por MM.v2, la muestra resultó ser masculina. Esta discordancia pudo deberse a una mala interpretación del resultado durante el análisis con el método MM.v1 debido a la débil amplificación que presentó esta muestra en el primer análisis, y a la no amplificación durante el replicado. Dado que el MMv2 es un método optimizado, se determinó finalmente que el sexo de esta muestra es masculino. También se logró amplificar dos muestras que no amplificaron con el método MM.v1. Estas muestras corresponden a la BQUCH0040 y la BQUCH0050, las cuales finalmente fueron identificadas como individuos femeninos.

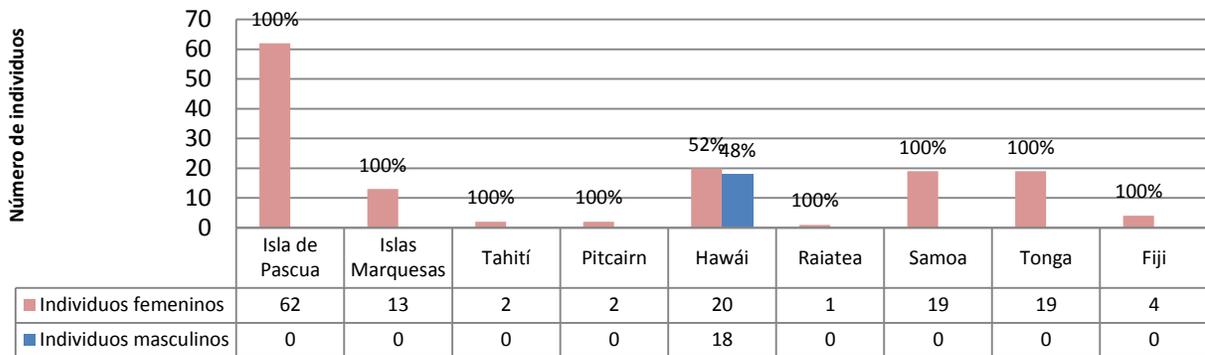
**A**

**Distribución de sexo de *B. papyrifera* en Asia**



**B**

**Distribución de sexo de *B. papyrifera* en Polinesia**



**Figura 5.2.10. Resumen de la distribución por sexo mediante el método Male Marker por localidad.**

**A.** Se muestran los resultados para la distribución de sexo en las 3 localidades asiáticas estudiadas.

**B.** Se muestran los resultados obtenidos para las islas de la Polinesia estudiadas.

En el hábitat nativo de esta especie, se debería encontrar individuos de ambos sexos en una proporción cercana al 50%, lo que es confirmado con los resultados experimentales de esta tesis. Los individuos de Taiwán, Japón y Vietnam presentan proporciones de 40-60%, 60-40% y 40-60%, respectivamente, entre individuos femeninos y masculinos. Por otra parte, los resultados indican que en las islas de Oceanía Remota el sexo de la población de *B. papyrifera* es femenino en todas las islas analizadas, a excepción de Hawái. La distribución por sexo encontrada en Hawái, de un 52-48% entre

individuos femeninos y masculinos, podría sugerir una historia diferente respecto a la introducción de *B. papyrifera* en esta isla. Estos resultados se correlacionan con otros resultados preliminares realizados en nuestro laboratorio con un marcador de cloroplasto (región inter-génica *ndhF* - *rpl16*), el cual mostró diferencias genotípicas entre Hawái y el resto de Polinesia (resultados no mostrados).

En resumen, se desarrolló un método de PCR dúplex para la identificación del sexo de las muestras de *B. papyrifera* y de esta manera se determinó su distribución por sexo en muestras provenientes de diversas islas de la Polinesia y de su hábitat nativo.

### 5.3 Caracterización de la diversidad genética de *B. papyrifera* en las islas de la Polinesia usando marcadores de SSR específicos.

*B. papyrifera* es una especie diploide, a la que se atribuye una baja variabilidad genética en el sector de Polinesia, producto de su propagación vegetativa en esta zona (Seelenfreund y cols., 2011). Por esta razón se propone un análisis utilizando marcadores de SSR, los cuales han mostrado óptimos resultados en poblaciones de estas características (Arnaud-Haond y cols., 2005).

Este trabajo se realizó sobre un conjunto de 49 marcadores de microsatélites específicos para *B. papyrifera*, los cuales son clasificados como:

- Marcadores Bropap: corresponden a 36 marcadores de microsatélites enviados a desarrollar a la empresa suiza Ecogenics ([www.ecogenics.ch](http://www.ecogenics.ch)) en el marco del proyecto Fondecyt 1120175. Estos marcadores se desarrollaron a partir del ADN genómico de 10 individuos con genotipos diferentes, seleccionados en nuestro laboratorio con la ayuda de diversos marcadores moleculares. Estas 10 muestras corresponden a una muestra masculina y una femenina de Taiwán y otras dos muestras, también masculina y femenina, de Japón, determinadas por el método Male Marker. También incluimos una muestra masculina de Hawái; al momento de la selección ésta era la única muestra masculina identificada en la región de Polinesia. Por análisis de ITS seleccionamos la muestra de Santiago (de origen asiático), que presenta un genotipo distinto al encontrado en Polinesia. Las otras 4 muestras provienen de distintas islas de Polinesia, y fueron seleccionadas debido a que nuestro análisis por SSR tiene como finalidad encontrar diferencia en el interior de esta zona, lo cual no se había logrado con otros marcadores.

Ecogenics hizo análisis preliminares de estos 36 marcadores con ADN de siete de los 10 genotipos enviados.

- Marcadores Bro: corresponden a 13 marcadores de microsatélites desarrollados en Taiwán (gentilmente enviados por el Dr. K.-F. Chung, Universidad Nacional de Taiwán)

que ampliaron el conjunto de SSR disponibles a un total de 49 marcadores para el estudio.

En nuestro laboratorio se realizaron ensayos preliminares de SSR para seleccionar los mejores marcadores para la genotipificación del banco genómico. Para estos ensayos se utilizaron las siete muestras de ADN analizadas por Ecogenics más la muestra BQUCH0035, procedente de Isla de Pascua, conformando un grupo de ocho muestras (grupo de prueba de genotipificación, ver **Tabla 5.3.1**).

**Tabla 5.3.1. Muestras que conforman el grupo de prueba de genotipificación para el análisis mediante SSR.**

Muestra	Localidad
BQUCH0035	Isla de Pascua
BQUCH0045*	Marquesas
BQUCH0064*	Hawái
BQUCH0100*	Tonga
BQUCH0115*	Fiji
BQUCH0138*	Taiwán ♂
BQUCH0140*	Taiwán ♀
BQUCH0141*	Japón

\* Muestras utilizadas por Ecogenics en el análisis preliminar de los 36 marcadores desarrollados

Con este grupo se ensayó una preselección de loci de SSR a partir de los 49 loci iniciales, utilizando dos criterios: a) selección de loci que presentaban mayor número de alelos y b) discriminación entre los distintos genotipos.

### 5.3.1 Preselección de los marcadores Bropap

La empresa Ecogenics envió un informe final, el cual se resume en la **Tabla 4.2.1** de la sección de materiales y métodos. En este informe se presentó un perfil preliminar de electroforesis capilar para los 36 marcadores, ensayados en siete de las muestras del grupo de prueba de genotipificación. Estos datos sirvieron de base para la preselección de

10 marcadores (**Tabla 5.3.2**). Estos marcadores se seleccionaron según la cantidad de alelos que presentaban y por la presencia de distintos genotipos.

**Tabla 5.3.2. Marcadores Bropap preseleccionados (10 loci de SSR)**

Locus	Motivo repetido	Rango de tamaño (pb)	Na	Go	MA
Bropap_02214	(GA) <sub>19</sub>	230-252	5	3	5/7
Bropap_02801	(AC) <sub>11</sub>	137-171	7	6	7/7
Bropap_16591	(AG) <sub>17</sub>	71-89	7	5	7/7
Bropap_20558	(TAT) <sub>7</sub>	218-222	2	3	5/7
Bropap_20939	(AG) <sub>13</sub>	124-144	3	3	7/7
Bropap_23758	(AGA) <sub>7</sub>	203-209	3	3	7/7
Bropap_25444	(GA) <sub>14</sub>	172-186	6	5	5/7
Bropap_26773	(TC) <sub>13</sub>	177-195	4	4	6/7
Bropap_26985	(TG) <sub>12</sub>	176-190	4	4	7/7
Bropap_30248	(GA) <sub>14</sub>	95-152	6	4	5/7

\* Na: número de alelos, Go: genotipos observados, MA: muestras amplificadas.

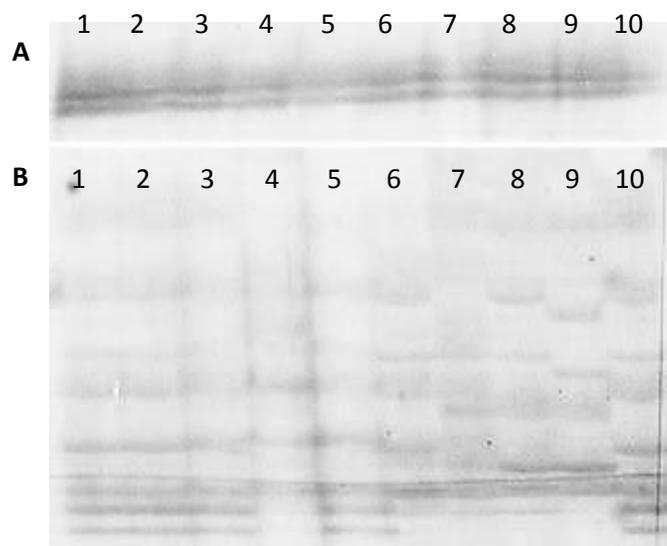
### 5.3.2 Preselección de los marcadores Bro

La información proporcionada por el Dr. K.-F. Chung para los 13 marcadores facilitados correspondía a los motivos repetidos y la secuencia de sus partidores. Desconocíamos una estimación de número y tamaño de los alelos (**Tabla 4.2.2**, materiales y métodos).

Para estimar la riqueza alélica de cada marcador en nuestros individuos y determinar sus correspondientes tamaños se realizó un primer barrido con las muestras del grupo de prueba. Para esto, se realizaron reacciones de PCR para cada marcador, que fueron evaluadas en geles de agarosa al 1,5%. Se observó amplificación en 10 de los 13 marcadores. Para los 3 marcadores que no amplificaron (Bro01, Bro11, Bro14) se modificó la temperatura de apareamiento, sin embargo, no se lograron resultados satisfactorios, por lo que se eliminaron del estudio.

Los amplicones generados por 8 de los 10 marcadores con los que se continuó el estudio, se analizaron por electroforesis en geles de secuenciación de poliacrilamida (PAA)

al 6% en condiciones desnaturalantes revelados mediante tinción con nitrato de plata. A modo de ejemplo, en la **Figura 5.3.1** se observan los perfiles de los marcadores Bro03 y Bro04. El SSR Bro03 fue descartado para el análisis genotípico debido a que presentaba un perfil monomórfico. El SSR Bro04 a su vez, muestra preliminarmente siete genotipos diferentes para las 10 muestras ensayadas. Este marcador fue preseleccionado para el primer barrido por electroforesis capilar, pese a que mostraba varios alelos en cada muestra, esperando que los electroferogramas fueran de más fácil interpretación.



**Figura 5.3.1. Perfiles genotípicos de los loci Bro03 y Bro04 en electroforesis en gel de PAA al 6%.**

**A.** Locus Bro03. Carril 1: BQUCH0152 (Isla de Pascua), carril 2: BQUCH0100 (Tonga), carril 3: BQUCH0115 (Fiji), carril 4: BQUCH0064 (Hawái), carril 5: BQUCH0138 (Taiwán), carril 6: BQUCH0140 (Taiwán), carril 7: BQUCH0134AA (Santiago), carril 8: BQUCH0141 (Japón), carril 9: BQUCH0144 (Japón), carril 10: BQUCH0045 (Islas Marquesas).

**B.** Locus Bro04. Carril 1: BQUCH0152 (Isla de Pascua), carril 2: BQUCH0100 (Tonga), carril 3: BQUCH0115 (Fiji), carril 4: BQUCH0064 (Hawái), carril 5: BQUCH0138 (Taiwán), carril 6: BQUCH0140 (Taiwán), carril 7: BQUCH0134AA (Santiago), carril 8: BQUCH0141 (Japón), carril 9: BQUCH0144 (Japón), carril 10: BQUCH0045 (Islas Marquesas).

Finalmente, de los ocho loci analizados por PAA, tres presentaron un patrón monomórfico, por lo cual fueron descartados, y cinco loci presentaron un patrón polimórfico (**Tabla 5.3.3**). Estos cinco loci fueron preseleccionados y se agregaron directamente los marcadores Bro13 y Bro15 (**Tabla 5.3.3**), que no habían sido analizados previamente por PAA.

**Tabla 5.3.3. Resumen de información obtenida preliminarmente para los SSR Bro**

Locus	Motivo repetido	Rango de tamaño (pb)	Patrón
*Bro02	(GAA) <sub>7</sub>	200-230	Polimórfico
Bro03	(TC) <sub>3</sub> TAT(TC) <sub>5</sub>	140-150	Monomórfico
*Bro04	(GA) <sub>9</sub>	170-230	Polimórfico
Bro06	(TC) <sub>4</sub> (CT) <sub>6</sub>	220-280	Monomórfico
*Bro07	(TC) <sub>22</sub>	200-250	Polimórfico
*Bro08	(TC) <sub>17</sub>	200-250	Polimórfico
Bro09	(CTT) <sub>5</sub>	200-250	Monomórfico
*Bro10	(TTC) <sub>6</sub>	200-230	Polimórfico
*Bro13	(GA) <sub>10</sub>	-	-
*Bro15	(CAA) <sub>10</sub>	-	-

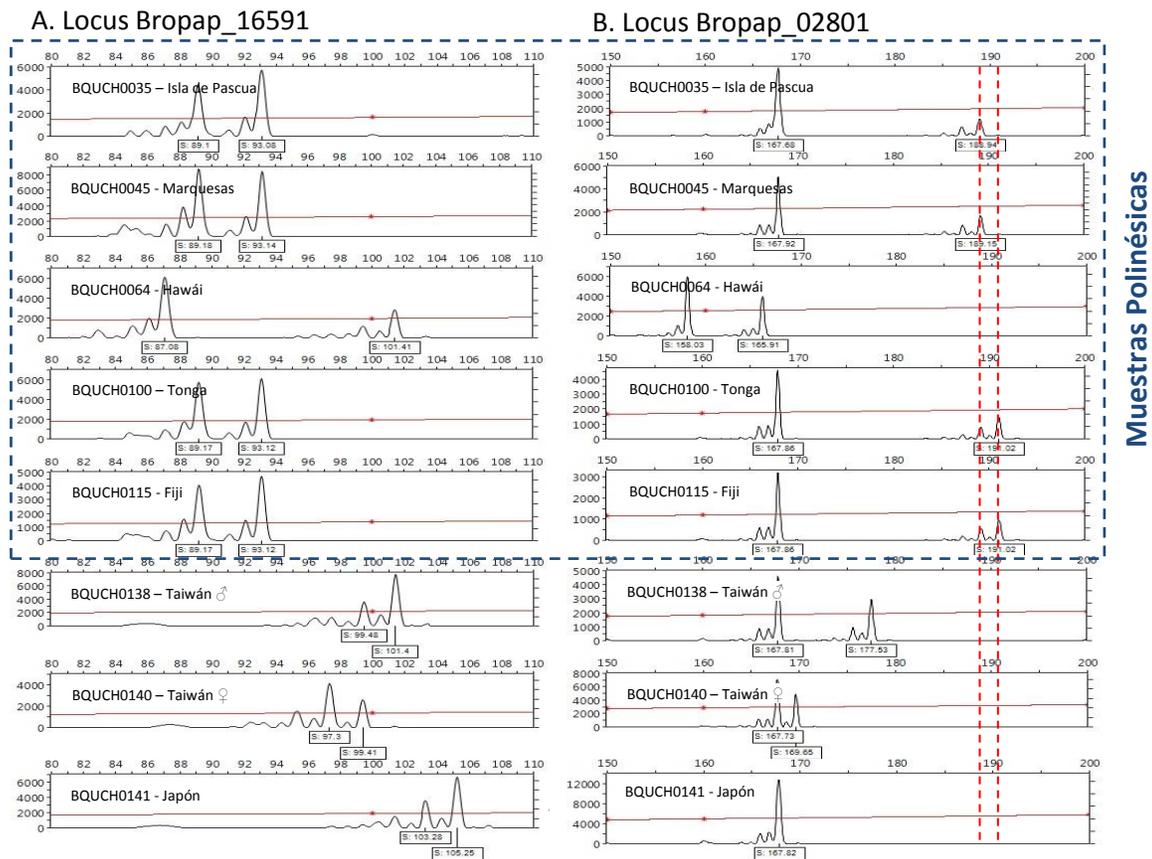
\* Marcadores Bro preseleccionados

### 5.3.3 Análisis de marcadores preseleccionados

El análisis de los 17 marcadores preseleccionados (10 loci Bropap y 7 loci Bro), con las ocho muestras del grupo de prueba de genotipificación se realizó en dos etapas. Primero se amplificaron las muestras con un método de PCR para electroforesis capilar (EC), el cual utiliza un sistema de marcaje universal (Schuelke, 2000) y una posterior separación de los amplicones por EC.

En base a los resultados obtenidos en los primeros ensayos de prueba, se procedió a seleccionar los loci que se utilizarían para el análisis de todas las muestras del banco genómico. Como se mencionó anteriormente, son de interés los SSR que presenten el mayor número de alelos posibles, que permitan una interpretación sin ambigüedades y que diferencien entre los diferentes genotipos.

A modo de ejemplo, en la **Figura 5.3.2** se observan los electroferogramas para cada muestra del grupo de prueba de genotipificación utilizando los marcadores Bropap\_16591 y Bropap\_02801. Se aprecian señales o picos fáciles de asignar para las ocho muestras analizadas.



**Figura 5.3.2. Comparación de los electroferogramas de los Loci Bropap\_16591 y Bropap\_02801.**

Se observa la presencia de diferentes alelos y genotipos para las ocho muestras del grupo de prueba de genotipificación en ambos loci.

**A.** El locus Bropap\_16591 diferencia 5 genotipos distintos.

**B.** El locus Bropap\_02801 distingue 6 genotipos diferentes.

En la **Figura 5.3.2** se observa un patrón diferente para cada muestra proveniente del hábitat nativo de la especie y también para la muestra de Hawái en ambos loci. Además el locus Bropap\_16591 muestra un patrón distintivo para el resto de Polinesia, mientras el locus Bropap\_02801 incluso identifica dos genotipos distintos en las muestras de esta región. Por lo tanto, ambos marcadores cumplen con los requisitos que buscamos en la selección de marcadores SSR para la genotipificación.

Después de este primer barrido se eliminaron del estudio los marcadores Bro02 y Bro04. El marcador Bro02 se descartó por ser de naturaleza monomórfica para las muestras del grupo de prueba de genotipificación. El marcador Bro04 se eliminó por presentar múltiples alelos de difícil análisis e interpretación (datos no mostrados). Este resultado es coherente con lo obtenido en los geles de PAA (ver **Figura 5.3.1B**).

Finalmente, se utilizaron los 15 loci seleccionados para genotipificar las 191 muestras del banco genómico. El detalle del tamaño de los alelos identificados en cada individuo se especifica en la **Tabla III del Anexo 5**.

#### **5.3.4 Selección de datos para el análisis estadístico**

Para los análisis estadísticos de la genotipificación se excluyó el locus Bropap\_23578 debido a que no presentó amplificación para 15 muestras. Al mismo tiempo este locus mostraba un comportamiento monomórfico en todas las muestras de Polinesia en las que sí amplificó, excepto en la muestra BQUCH0040 de Marquesas, lo que podría explicarse como una mutación somática. Por otra parte, se excluyeron del análisis nueve muestras por no presentar amplificación en uno o varios de los 14 loci finales a analizar. Se eliminaron también del estudio las muestras BQUCH0063 y BQUCH0134, procedentes de Raiatea y Santiago de Chile respectivamente, por ser muestras únicas de cada localidad. El detalle de los loci y las muestras excluidas se indican en la **Tabla III del Anexo 5**.

De esta manera, el análisis estadístico se realizó utilizando la información reunida con 14 loci sobre 180 muestras de nuestro banco genómico.

### 5.3.5 Análisis de la diversidad genética

Se identificó un total de 168 alelos en el análisis. En la región asiática se encontraron 151 alelos diferentes en 29 individuos analizados, mientras que en Polinesia se encontraron sólo 63 alelos diferentes en un total de 151 individuos. De estos alelos, 17 fueron exclusivos de la región de Polinesia, de los cuales 11 fueron exclusivos de la población hawaiana. El resumen de los alelos identificados por cada marcador se indica en la **Tabla 5.3.4**.

**Tabla 5.3.4. Resumen de los alelos identificados por SSR**

Locus		Rango de tamaño alélico (pb)	Número de alelos observados				
			Total	Polinesia	Asia	Compartidos	AEP
1	Bropap_02801	158-191	9	6	7	4	2
2	Bropap_16591	62-107	12	5	12	5	0
3	Bropap_20939	140-194	12	3	10	1	2
4	Bropap_20558	236-242	5	3	5	3	0
5	Bropap_02214	239-274	17	9	15	7	2
6	Bropap_25444	176-244	22	6	19	3	3
7	Bropap_26773	197-233	11	4	9	2	2
8	Bropap_26985	196-209	5	3	5	3	0
9	Bropap_30248	102-175	21	5	20	4	1
10	Bro07	200-293	17	4	16	3	1
11	Bro08	205-239	17	6	15	4	2
12	Bro10	206-212	6	2	6	2	0
13	Bro13	239-245	6	3	6	3	0
14	Bro15	166-240	8	4	6	2	2
<b>Total</b>			168	63	151	46	17
<b>Promedio por Locus</b>			12	4,5	10,8	3,3	

\* AEP = Alelos Exclusivos de Polinesia.

Mediante un análisis de coincidencias multilocus para datos codominantes realizado con GenAlEx, se identificaron en total 59 genotipos diferentes en las 180 muestras de estudio. En la región asiática se diferenciaron 28 genotipos para los 29 individuos estudiados (96,6 %), con dos muestras no diferenciadas que comparten un

genotipo. Ambas son provenientes de Taiwán y fueron enviadas por una misma persona; ignoramos si éstas provienen de un mismo individuo o corresponden a clones.

En la zona de Polinesia se identificaron 31 genotipos en las 151 muestras (20,5 %). Los ejemplares de Fiji tienen el mismo genotipo, que es compartido con uno de los siete genotipos encontrados en las muestras de Tonga. A su vez las muestras de Hawái también comparten dos genotipos con ejemplares de Tonga. Los ejemplares procedentes de Marquesas comparten sus tres genotipos, uno con Tahití, otro con Hawái y el tercero con Isla de Pascua. Este corresponde al genotipo mayoritario encontrado en Isla de Pascua.

Se realizó un análisis de coincidencias multilocus por locus para un incremento en la combinación de los 14 loci utilizados mediante GenAEx, donde se pone a prueba la capacidad de diferenciación del conjunto de 14 loci de microsatélites analizados. En la **Tabla IV del Anexo 6**, observamos que utilizando solamente los datos obtenidos de los marcadores Bro08, Bropap\_02214 y Bropap\_30248 se diferencian todos los genotipos encontrados en la región asiática, excepto las dos muestras taiwanesas mencionadas anteriormente. Esta observación no cambia al agregar al análisis los datos de los otros 11 marcadores de microsatélites, pese al alto porcentaje de loci polimórficos encontrados en las muestras asiáticas también con estos 11 marcadores.

En las tres poblaciones de la región asiática se observó un ligero desequilibrio del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), estadísticamente significativo según el análisis multilocus, por déficit de heterocigosidad para las poblaciones de Taiwán y Vietnam. Los valores del coeficiente de endogamia se estimaron en 0,138 para Taiwán y en 0,182 para Vietnam. Por otro lado, la población de Japón mostró un EHW, con un coeficiente de endogamia de -0,024 (**Tabla 5.4.2**).

En Polinesia, nuestra región de interés, las poblaciones de *B. papyrifera* en las distintas islas mostraron un notorio desequilibrio en el EHW, producto de un exceso de heterocigosidad estadísticamente significativo en todas las islas, excepto en Hawái donde se observó un ligero desequilibrio de HWE, también estadísticamente significativo. En base a los valores de heterocigosidades se calculó el coeficiente de endogamia ( $F$ ) para

todas las islas. En Hawái se encontró un coeficiente de endogamia de -0,068, mientras el resto de las islas de Polinesia se obtuvieron valores entre -0,751 y -1,000.

En las **Tabla 5.3.5** y **Tabla 5.3.6** se muestra un resumen de los resultados obtenidos en el análisis de diversidad genética con los 14 loci en cada población. El detalle de cada locus por población se muestra en la **Tabla V** del **Anexo 6**.

**Tabla 5.3.5. Resumen del análisis de diversidad genética en Asia**

Locus	Localidad	<i>N</i>	<i>Go</i>	<i>PLP</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	<i>p</i> multilocus
todos los loci	Taiwán	19	18	100,00%	7,429 ± 0,998	3,883 ± 0,639	0,556 ± 0,043	0,656 ± 0,046	0,138 ± 0,043	0,000
	Japón	5	5	71,43%	2,071 ± 0,267	1,602 ± 0,164	0,300 ± 0,072	0,296 ± 0,063	-0,024 ± 0,089	0,255
	Vietnam	5	5	100,00%	4,571 ± 0,488	3,396 ± 0,498	0,543 ± 0,085	0,636 ± 0,043	0,182 ± 0,120	0,000

*N*: tamaño de muestra, *Go*: genotipos observados, *PLP*: porcentaje de loci polimórficos, *Na*: número de alelos, *Ne*: número de alelos efectivos, *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada, *F*: coeficiente de endogamia.

**Tabla 5.3.6. Resumen del análisis de diversidad genética en Polinesia**

Locus	Localidad	<i>N</i>	<i>Go</i>	<i>PLP</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	<i>p</i> multilocus
todos los loci	Isla de Pascua	60	6	64,29%	2,071 ± 0,322	1,723 ± 0,159	0,643 ± 0,133	0,337 ± 0,070	-0,919 ± 0,040	0,000
	Marquesas	12	3	64,29%	1,857 ± 0,231	1,727 ± 0,160	0,643 ± 0,133	0,338 ± 0,071	-0,919 ± 0,044	0,000
	Tahití	2	2	64,29%	1,929 ± 0,245	1,881 ± 0,231	0,643 ± 0,133	0,357 ± 0,076	-0,837 ± 0,068	0,039
	Pitcairn	2	1	64,29%	1,643 ± 0,133	1,643 ± 0,133	0,643 ± 0,133	0,321 ± 0,066	-1,000 ± 0,000	0,026
	Hawái	37	13	100,00%	3,929 ± 0,355	3,015 ± 0,284	0,676 ± 0,085	0,631 ± 0,032	-0,068 ± 0,127	0,000
	Samoa	17	4	71,43%	1,857 ± 0,177	1,700 ± 0,144	0,643 ± 0,133	0,339 ± 0,066	-0,751 ± 0,167	0,000
	Tonga	18	7	78,57%	2,143 ± 0,275	1,697 ± 0,140	0,655 ± 0,129	0,342 ± 0,065	-0,784 ± 0,100	0,000
	Fiji	3	1	64,29%	1,643 ± 0,133	1,643 ± 0,133	0,643 ± 0,133	0,321 ± 0,066	-1,000 ± 0,000	0,000

*N*: tamaño de muestra, *Go*: genotipos observados, *PLP*: porcentaje de loci polimórficos, *Na*: número de alelos, *Ne*: número de alelos efectivos, *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada, *F*: coeficiente de endogamia.

La probabilidad de encontrar cuellos de botella genéticos en las poblaciones estudiadas fue analizada con el programa Bottleneck (Cornuet y Luikartt, 1996; Piry y cols., 1999), aplicando el test de Wilcoxon para los modelos mutacionales IAM y SMM. Según la literatura, el test de Wilcoxon es la mejor opción para calcular cuellos de botella cuando se utiliza un número de loci menores a 20 (Piry y cols., 1999), como ocurre en este estudio.

La presencia de cuellos de botella fue estadísticamente significativa para todas las islas de la Polinesia según los modelos de AIM (modelo mutacional de alelos infinitos, según su sigla en inglés) y SMM (modelo mutacional por pasos, según su sigla en inglés), sin embargo el análisis en Tonga sólo fue estadísticamente significativo según el modelo IAM (**Tabla 5.3.7**). Este análisis no se realizó en las poblaciones de Tahití y Pitcairn debido al bajo número de muestras. En las localidades de la región asiática, como era de esperar, no se observaron cuellos de botella.

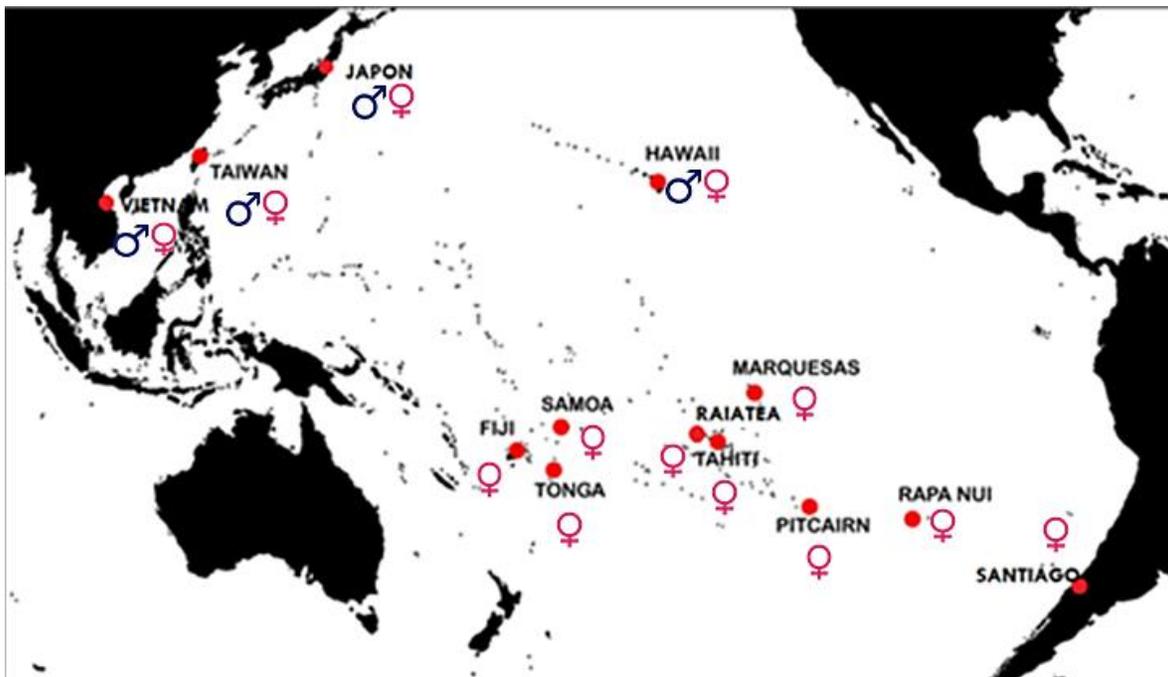
**Tabla 5.3.7. Significancias del análisis de cuellos de botella genéticos según los modelos IAM y SMM.**

Población	Test de Wilcoxon	
	IAM	SMM
Taiwán	0.54163	0.17261
Japón	0.69531	0.76953
Vietnam	0.71484	0.19373
Isla de Pascua	0.00195	0.00977
Marquesas	0.00195	0.00195
Hawái	0.00006	0.00116
Samoa	0.00195	0.00488
Tonga	0.01221	0.27832
Fiji	0.00195	0.00195

## 5.4 Estudio de la relación entre la diversidad genética y localización geográfica de los individuos de *B. papyrifera* analizados.

### 5.4.1 Distribución de sexo *versus* localización geográfica

La distribución por sexo no es la misma en el hábitat nativo que en la zona de Oceanía Remota, mientras en el hábitat nativo observamos la presencia de individuos de ambos sexos, en Polinesia sólo se observan individuos de sexo femenino. La excepción la constituyen las muestras de Hawái, entre las cuales se observaron individuos de ambos sexos (**Figura 5.4.1**). Las observaciones en Hawái podrían sugerir un origen distinto de estas muestras a las del resto de la Polinesia, apuntando a un pulso migratorio adicional muy diferente o una introducción reciente.



**Figura 5.4.1. Distribución de sexos de *B. papyrifera*.**

En el mapa se observa la presencia de uno o ambos sexos en las distintas localidades estudiadas.

## 5.4.2.- Diversidad genética *versus* localización geográfica

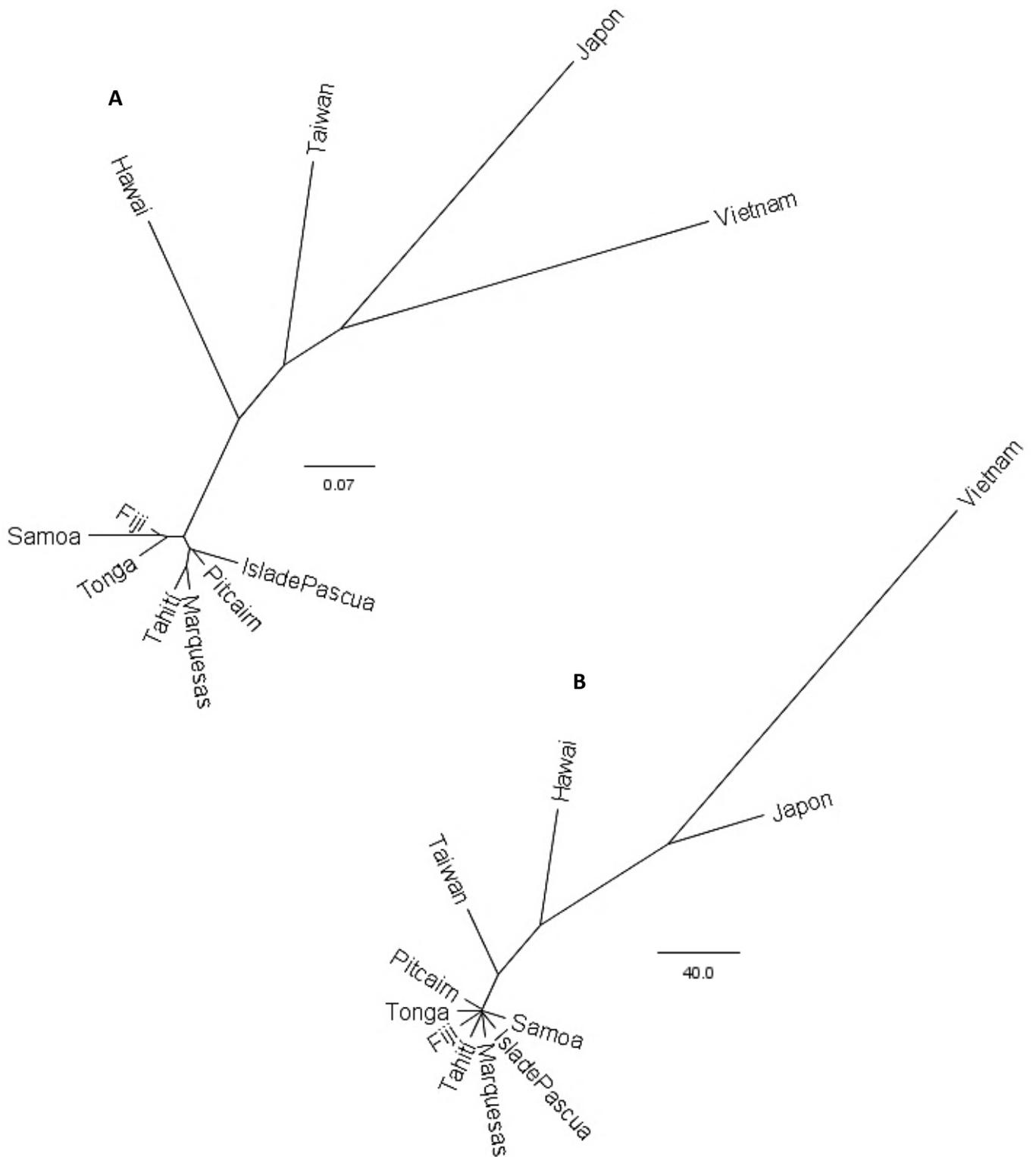
### 5.4.2.1 Análisis de distancia genética

Las distancias genéticas de las poblaciones se calcularon utilizando dos coeficientes, uno para cada modelo de mutación. Se utilizó el coeficiente de Cavalli-Sforza (1967), basado en el modelo IAM (modelo mutacional de alelos infinitos, según su sigla en inglés) y el coeficiente de Goldstein (1995), que asume el modelo SMM (modelo mutacional de un paso, según su sigla en inglés). Ambas matrices de distancia genética fueron utilizadas para obtener dendrogramas mediante el algoritmo de agrupamiento Neighbour Joining (NJ) (**Figura 5.4.2**).

Los dos dendrogramas obtenidos coinciden en un cercano agrupamiento entre las poblaciones de *B. papyrifera* de las islas de Polinesia, excepto Hawái. También, ambos modelos proponen que la población asiática genéticamente más cercana a las poblaciones polinésicas correspondería a Taiwán.

Topológicamente el dendrograma construido con la matriz de distancia de Cavalli-Sforza (**Figura 5.4.2A**) muestra una mayor resolución en el agrupamiento de las islas de Polinesia. Este dendrograma muestra dos grupos, uno compuesto por las poblaciones de las islas de Samoa, Tonga y Fiji, y otro grupo compuesto por las poblaciones de las islas de Tahití, Marquesas, Pitcairn e Isla de Pascua.

Sin embargo, ambos modelos excluyen a Hawái del agrupamiento polinésico. El dendrograma construido con Cavalli-Sforza lo sitúa como genéticamente más cercano al grupo de Polinesia que Taiwán. Por otra parte el dendrograma construido con la matriz de Goldstein (**Figura 5.4.2B**) agrupa a la población de Hawái genéticamente más lejana al resto de la Polinesia que Taiwán.



**Figura 5.4.2. Dendrogramas de poblaciones**

**A.** Dendrograma utilizando el agrupamiento Neighbour-Joining sobre una matriz de distancia genética de Cavalli-Sforza.

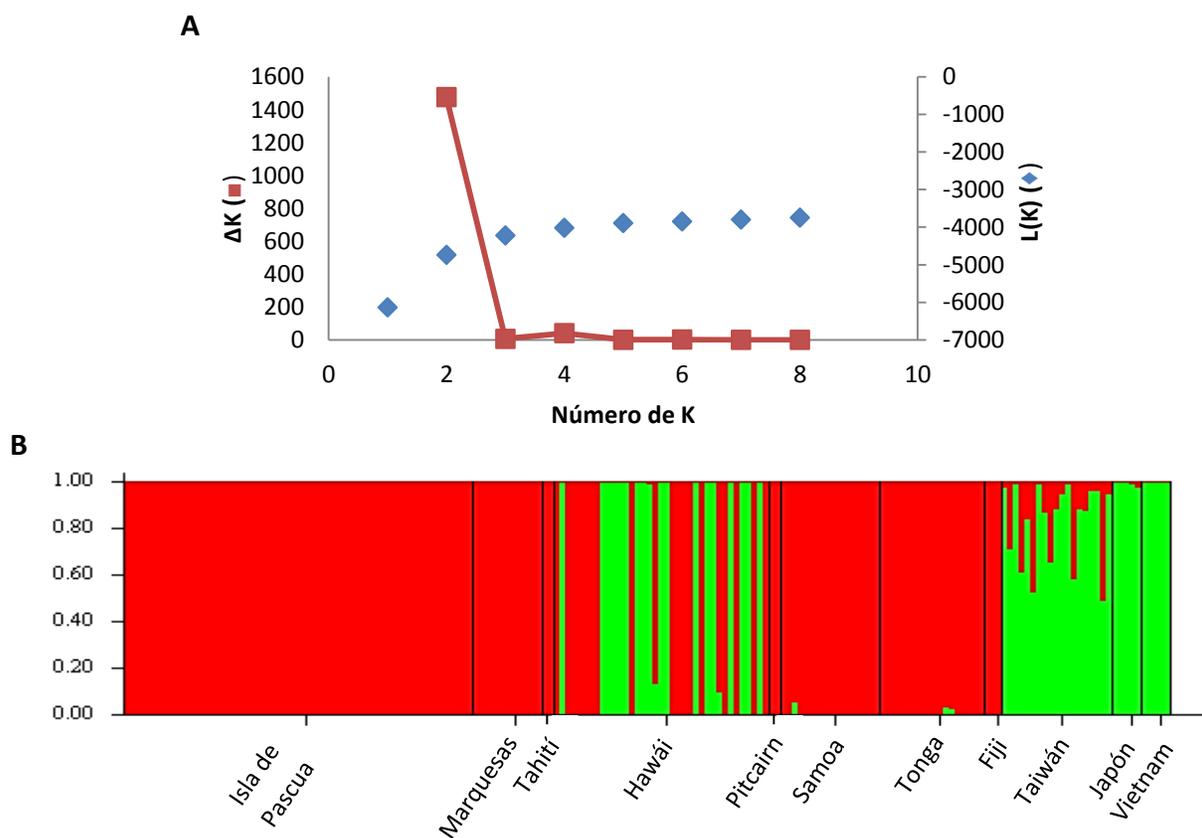
**B.** Dendrograma utilizando el agrupamiento Neighbour-Joining sobre una matriz de distancia genética de Goldstein.

#### 5.4.2.2 Análisis bayesiano de estructura de poblaciones

Se calculó el número real estimado de conglomerados genéticos (K) en el grupo de estudio con Structure, utilizando un análisis bayesiano según el modelo de mezclas. Este modelo simula que los individuos tienen múltiples orígenes poblacionales, calculando su proporción de pertenencia a cada conglomerado genético. Se identificaron dos conglomerados genéticos con este análisis (**Figura 5.4.3A**).

Luego de comparar la distribución de los conglomerados genéticos en las poblaciones de cada isla (**Figura 5.4.3B**), observamos la repartición de un conglomerado genético mayoritariamente en Polinesia (color rojo), mientras el segundo conglomerado se encuentra mayoritariamente en la región asiática (color verde). Sin embargo, Taiwán y Hawái presentan la coexistencia de ambos conglomerados genéticos.

Según este resultado, Taiwán sería la población asiática con mayor similitud genética a la de las islas de Polinesia. Esto también explicaría el agrupamiento cercano de Taiwán con las islas de Polinesia en los dendrogramas NJ. Esta población contiene individuos que poseen una mezcla de ambos conglomerados genéticos. Por otra parte, la población de Hawái contiene individuos de ambos conglomerados genéticos, sin embargo no existe mezcla significativa de los conglomerados dentro de un mismo individuo.



**Figura 5.4.3. Análisis de estructura de poblaciones.**

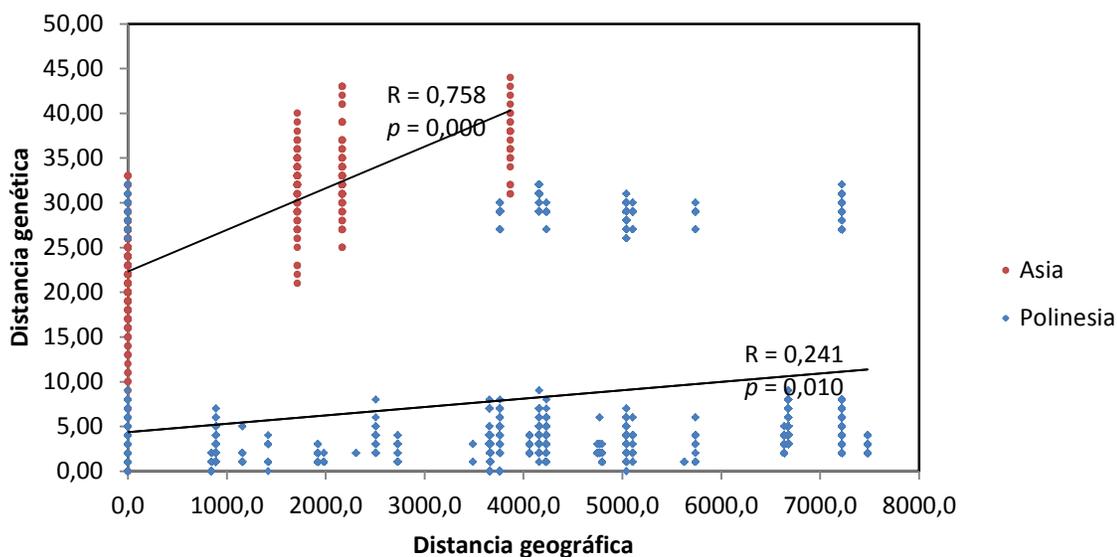
**A.** Estimación del valor K real estimado sobre 20 replicaciones para cada valor K evaluado.

**B.** Gráfico de barras de las distribuciones de los conglomerados genéticos identificados. Las líneas negras separan las muestras de las distintas localidades, mientras que los colores rojo y verde son utilizados para resaltar las dos poblaciones genéticas identificadas en el grupo de estudio.

### 5.4.2.3 Distancia geográfica v/s distancia genética

La relación entre la distancia geográfica y distancia genética se analizó comparando una matriz de distancia geográfica y una matriz de distancia genética con el test de Mantel. El test de Mantel se realizó por separado en la región asiática y la región polinésica. En la **Figura 5.4.4** se comparan ambos análisis.

En la región asiática se observa un claro aumento de la diversidad genética con la distancia. Sin embargo, en la región de Polinesia no se observa una variación de la diversidad genética con la distancia.



**Figura 5.4.4 Test de Mantel: distancia geográfica v/s distancia genética**

Se observan las comparaciones superpuestas entre las matrices de distancia geográfica y distancia genética para las muestras de Asia y Polinesia.

#### 5.4.2.4 Análisis de coordenadas principales

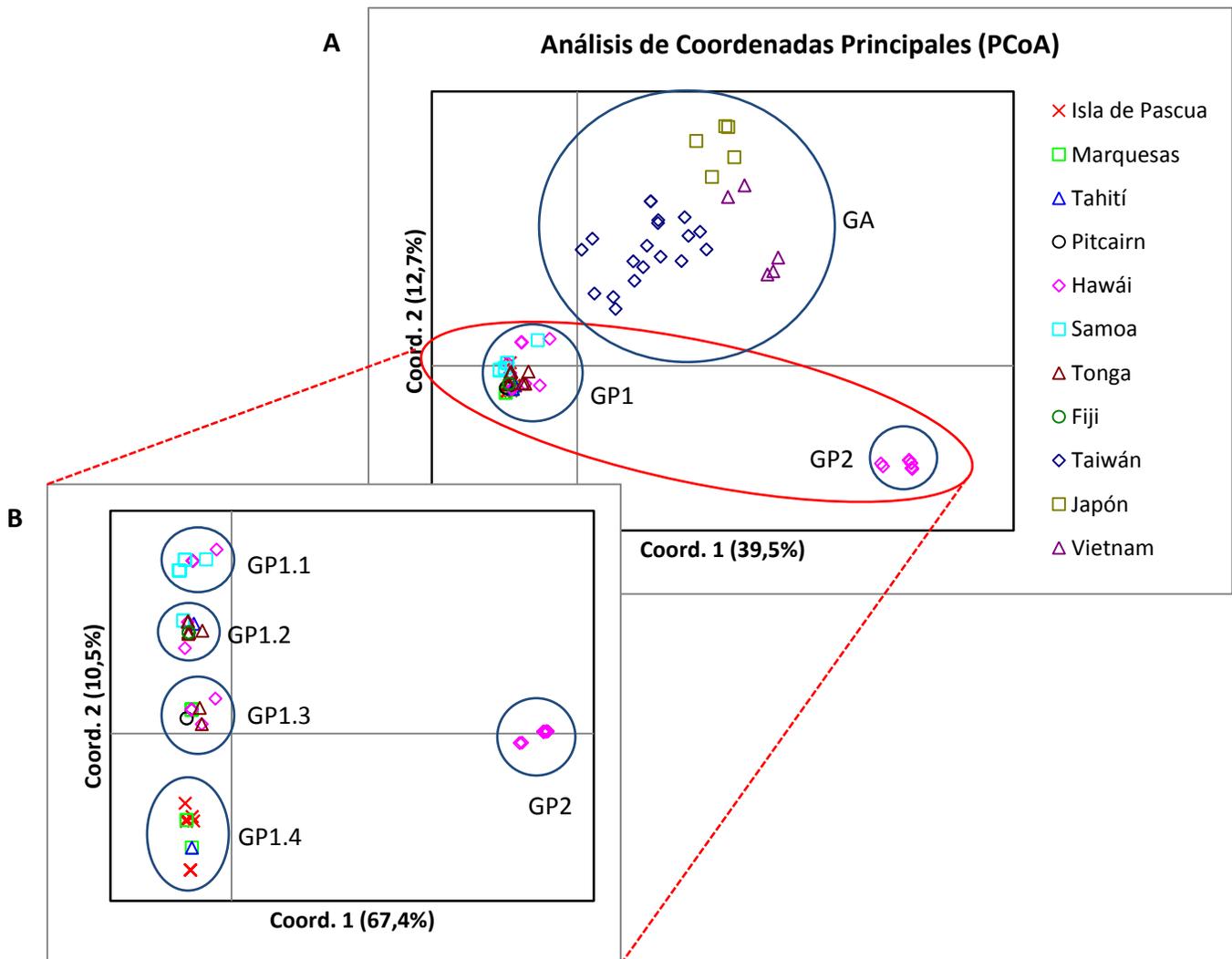
El análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizó para examinar espacialmente las variaciones entre individuos. Este análisis mostró el ordenamiento de las muestras de estudio en tres grupos, un grupo asiático (GA) y dos grupos polinésicos (GP1 y GP2), como se muestra en la **Figura 5.4.5A**.

El grupo GA muestra una gran distribución espacial y se subdivide claramente en las tres localidades asiáticas que se incluyeron en el estudio (Taiwán, Japón y Vietnam).

El grupo GP1 contiene casi la totalidad de las muestras polinésicas. Especialmente este grupo es muy cercano a la zona taiwanesa del grupo GA. Por otra parte, el grupo GP2 contiene algunas muestras de Hawái y espacialmente agrupa muy distante de los otros dos grupos. En este grupo están contenidas sólo las muestras masculinas identificadas en Hawái.

Se realizó un segundo PCoA (**Figura 5.4.5B**) excluyendo las muestras de la región asiática. En éste se observa la presencia de cinco grupos. El grupo GP1 del PCoA anterior

en esta ocasión se dividió en cuatro grupos (GPA1.1, GPA1.2, GPA1.3, GPA1.4), mientras las muestras masculinas de Hawái nuevamente agruparon juntas (GPA2), y muy distantes del resto de las muestras de Polinesia. El grupo GPA1.1 corresponde a ejemplares de Samoa y muestras femeninas de Hawái. El grupo GPA1.2 incluye a ejemplares de Samoa, Tonga, Fiji, Tahití y muestras femeninas de Hawái. El grupo GPA1.3 reúne a las muestras de Tonga, Pitcairn, Marquesas y también muestras femeninas de Hawái. Finalmente, el grupo GPA1.4 corresponde a las localidades del este del Pacífico como Marquesas, Tahití e Isla de Pascua.



**Figura 5.4.5. Análisis de coordenadas principales**

A. Análisis de coordenadas principales con la todas las muestras de estudio.

B. Análisis de coordenadas principales solo con la muestras de Polinesia.

## 6 Discusión

Esta tesis se planteó con el objetivo de encontrar diversidad genética en las poblaciones de *B. papyrifera* en las islas de la Polinesia. El estudio de diversidad genética de esta especie en la región de Polinesia nos podría ayudar a establecer relaciones genéticas y geográficas entre las poblaciones de las islas, las cuales nos permitirían inferir posibles rutas de dispersión por acción antrópica durante el proceso de colonización de las islas de Oceanía Remota.

Algunos autores han propuesto que las poblaciones de *B. papyrifera* en la Polinesia corresponderían a clones de uno o varios individuos introducidos a esta región durante el proceso de colonización. Por esta razón la diversidad genética de esta especie en la región de Polinesia sería reducida (Matthews, 1996; Whistler y Elevitch, 2006). Utilizando los marcadores ITS1 e ITS2 en análisis previos de nuestro laboratorio, no se identificó diversidad genética en el interior de la Polinesia (Seelenfreund y cols., 2011), confirmando en una primera instancia las propuestas de estos autores. En base a estas evidencias, en esta tesis las herramientas de búsqueda propuestas correspondieron a un marcador de sexo y marcadores de microsatélites. Se propuso el uso de un marcador de sexo, debido a que el sexo de los individuos de la Polinesia era una interrogante, y la presencia de uno o ambos géneros podría jugar un rol importante en la diversidad genética existente en la región (Matthews, 1996). Se propuso el uso de marcadores de microsatélites ya que según la literatura, estos marcadores han permitido la diferenciación de poblaciones estrechamente emparentadas (Moncada y cols., 2006; Arnaud-Haond y cols., 2005)

### 6.1 Banco de ADN genómico

Esta tesis comenzó con la construcción de un banco de ADN genómico de muestras de *B. papyrifera*, provenientes de la Polinesia, nuestra zona de interés, y de la región asiática. Estas últimas se incluyeron para identificar genotipos ancestrales de las poblaciones polinésicas.

El banco genómico está formado por 191 preparaciones de ADN genómico de muy buena calidad, la cual se evaluó por mediciones de concentración, pureza, integridad y amplificabilidad. La concentración de ADN y su amplificabilidad constituyeron los criterios de mayor importancia para esta tesis.

La cuantificación correcta de la concentración de ADN es de gran relevancia pues permite la preparación de diluciones de trabajo a una misma concentración para todas las muestras. De esta manera, se utilizan cantidades de templado equivalentes en todas las reacciones de amplificación por PCR, con el fin de obtener un rendimiento de amplificación similar en todos los casos. Los rendimientos de amplificación similares permiten una mejor interpretación y comparación de los patrones de bandas en geles de agarosa, como es el caso del método Male Marker. Para los marcadores SSR, obtener un rendimiento de amplificaciones equivalentes facilita la estandarización de los análisis por electroforesis capilar, disminuyendo la probabilidad de muestras sobrecargadas o indetectables.

La primera cuantificación de concentración se realizó por espectrofotometría. Los resultados obtenidos en las amplificaciones no siempre fueron equivalentes para todas las muestras, ya que en algunas preparaciones los geles de agarosa mostraron diferentes rendimientos de amplificación, complicando la interpretación; incluso en algunos casos puntuales la amplificación fue muy difícil de detectar. Estos resultados sugerían que las mediciones espectrofotométricas estaban distorsionadas por la presencia de impurezas co-extraídas junto al ADN genómico, como por ejemplo, polifenoles, polisacáridos y/o ARN.

La presencia de impurezas se hacía evidente en la ligera coloración café de algunas preparaciones de ADN genómico, sin embargo, debido a la cantidad de metabolitos secundarios en las hojas de esta especie, y al protocolo de extracción de ADN utilizado, era difícil obtener preparaciones de ADN genómico libre de metabolitos secundarios. Esto se veía corroborado por la obtención de razones de absorbancia 260/280 mayores a 2,0 en 42,6% de las muestras, así como menores a 1,8 en 5,6%. También en los geles de agarosa para el análisis de integridad era posible observar la presencia de ARN en algunas

preparaciones. Además, la presencia de desviaciones por exceso en las mediciones de concentración, o sobrequantificación, finalmente fueron confirmadas por los informes de Ecogenics, quienes nos comentaron que las concentraciones de los ADN's enviados para el desarrollo de marcadores de SSR, eran aproximadamente 10 veces menores a las que nosotros habíamos informado. Por esta razón, se decidió la incorporación de un método alternativo de cuantificación de ADN.

La concentración de las muestras fue medida por segunda vez utilizando un colorante fluorescente, Picogreen (Ahn y cols., 1996; Singer y cols., 1997). Este compuesto corresponde a un intercalante fluorescente de alta afinidad por el ADN de doble hebra, altamente sensible, cuya señal no es alterada por la presencia de impurezas. Se considera que las cuantificaciones por este método representan mejor las concentraciones reales de las muestras. En nuestro caso, las concentraciones medidas efectivamente eran mucho menores a las estimadas mediante espectrofotometría. En general las concentraciones medidas con Picogreen fueron entre 2,5 y 50 veces menores a las medidas mediante espectrofotometría; sin embargo un 12,5% de las muestras mostró diferencias entre los dos métodos incluso mayores a 50 veces. En estos casos, es probable que la presencia de impurezas se haya sumado un bajo rendimiento en las extracciones de ADN. Al repetir las amplificaciones utilizando como templado diluciones de ADN genómico medidos con Picogreen, mostraron rendimientos de amplificaciones similares en la gran mayoría de las muestra (185 de las 191 muestras probadas con el método MM.v2).

Algunas propuestas para eliminar o reducir la presencia de impurezas en las preparaciones de ADN genómico podrían ser las siguientes: la presencia de polifenoles y polisacáridos podría reducirse incluyendo PVPP a la extracción de ADN y/o aumentando la concentración de NaCl durante la precipitación del ADN genómico con etanol (Sahu y cols., 2012; Varma y cols., 2007), y también se podría eliminar la presencia de ARN aumentando tanto la cantidad de RNAsa utilizada como también los tiempos de incubación con ésta.

Para nuestro trabajo, el criterio de calidad más importante corresponde a la prueba de funcionalidad, la cual corresponde a la amplificabilidad de la muestra, dado que

el banco genómico es la fuente de templado para la amplificación con diversos marcadores moleculares. La amplificabilidad del banco genómico durante el desarrollo de esta tesis resultó ser un 100% para el método MM.v2 y un 95,29% para la batería de 14 marcadores de SSR utilizada.

La integridad del ADN genómico no es un factor determinante para la amplificación de los marcadores moleculares utilizados en esta tesis, debido a que todos éstos generan amplicones de tamaños menores a los 450 pb. Sin embargo, el 83,6% de las preparaciones de ADN presentaron una banda de ADN genómico de alto peso molecular, mayor a los 23 Kb. Este es un dato importante, dado que el banco genómico construido también es útil como fuente de templado para el análisis con otros marcadores tales como ISSR, ITS1 y de varias regiones de cloroplasto. Con todos ellos se logró una muy buena amplificabilidad, incluso con los marcadores ISSR, que se caracterizan por requerir ADN de muy buena calidad.

En resumen, el banco genómico desarrollado en esta tesis demostró ser una buena fuente de material genético para la aplicación de los marcadores de sexo y SSRs, así como de diversas otras técnicas utilizadas en el laboratorio, demostrando su utilidad y cumpliendo cabalmente con su objetivo.

## **6.2 Determinación del sexo de *B. papyrifera* en Polinesia**

Durante el desarrollo de esta tesis se diseñó un método para la identificación del sexo de los individuos de *B. papyrifera*, que se denominó “método *Male Marker*”. Este método incluye un marcador para la identificación de individuos masculinos (SCAR) y un control de amplificación. Este control de amplificación facilita la correcta identificación de individuos femeninos, dado que reduce la posibilidad de falsos negativos.

Este método se desarrolló en dos etapas durante el transcurso de esta tesis. En una primera versión (MM.v1) el marcador masculino utilizado no diferenciaba entre ambos sexos de manera absoluta, sino que generaba una intensa amplificación en individuos masculinos y una leve amplificación en individuos femeninos. En una segunda etapa del

método (MM.v2) se desarrolló un marcador masculino tipo SCAR, que fue diseñado a partir de las diferencias nucleotídicas entre individuos masculinos y femeninos detectadas en la región de apareamiento del partidor. Este SCAR identifica individuos masculinos al aparearse con una secuencia de nucleótidos específica. El método MM.v2 además fue optimizado para obtener una amplificación similar entre el amplicón de control de amplificación y el amplicón de identificación de sexo masculino.

Durante el diseño del marcador SCAR utilizado en el MM.v2 también se probó el diseño de un partidor dirigido a aparear con la secuencia nucleotídica encontrada en individuos femeninos. Sin embargo, el patrón de amplificación fue el mismo en individuos masculinos y femeninos. Este resultado sugiere que el locus amplificado para identificar individuos masculinos está presente sólo en individuos de este sexo, mientras las secuencias que identificábamos en ejemplares femeninos estarían presentes en individuos de ambos sexos.

Los métodos MM.v1 y MM.v2 fueron optimizados utilizando las cuatro muestras del grupo de control de sexo. Además en el banco genómico también se contaba con tres muestras de Hawái y una de Isla de Pascua que estaban previamente sexadas debido a la presencia de flores. El análisis con ambos métodos confirmó el sexo predeterminado fenotípicamente en las cuatro muestras. De esta manera, el método Male Marker desarrollado comprobó a nivel molecular el sexo de ocho muestras de sexo conocido (por sus características fenotípicas) con un 100% de eficiencia. A partir de estos resultados, se concluye que el método desarrollado es confiable para la determinación de sexo en esta especie.

Ambos métodos fueron aplicados sobre la totalidad del banco genómico, mostrando los mismos resultados para todas las muestras, a excepción de tres. Una muestra fue la BQUCH0126, la cual fue determinada como femenina según el MM.v1 y como masculina con el MM.v2. El resultado del MM.v1 pudo deberse a una interpretación errónea producto de la amplificación deficiente, dado que el MM.v2 mostró una clara presencia de ambas bandas (datos no mostrados), correspondiente a un patrón masculino. Las otras dos muestras fueron BQUCH0040 y BQUCH0050, las cuales

amplificaron sólo con el MM.v2. Ambas diferencias son atribuidas a que el MM.v2 es un método optimizado y que utiliza como fuente de templado diluciones de ADN genómico realizadas a partir de las mediciones hechas por fluorescencia. Las diluciones de ADN realizadas a partir de las mediciones con fluorescencia se utilizaron sólo en el MM.v2, debido a que este método de cuantificación fue implementado en el laboratorio con posterioridad al término de los análisis con el MM.v1.

Los resultados del análisis de distribución de sexo indicaron la presencia de ambos sexos en las tres localidades de la región asiática en proporciones cercanas al 50%, la cual es una distribución esperada para una especie en su hábitat nativo. En Polinesia se encontró presencia sólo de individuos femeninos en todas las islas analizadas, excepto Hawái. La presencia de individuos femeninos de *B. papyrifera* en casi la totalidad de las islas analizadas sugiere un proceso de selección por parte de los colonizadores, así como tampoco podemos descartar la posibilidad de una introducción única por parte de éstos. Sin embargo, en Hawái se observó la presencia de ambos sexos en una proporción similar a la encontrada en el hábitat nativo. Estas observaciones sugieren una o más introducciones exclusivas a esta isla, las que podrían ser antiguas o modernas. No es posible descartar posibles reintroducciones en tiempos históricos luego del contacto europeo.

La presencia de individuos masculinos exclusivamente en Hawái, podría deberse a algún viaje de colonizadores polinésicos realizado directamente desde Asia a Hawái o por pulsos migratorios originados en el sector de Micronesia. Según la literatura no existen modelos que relacionen a Hawái con los pueblos nativos del área de Micronesia. Por esta razón, sería muy interesante conocer la distribución de sexos de *B. papyrifera* en islas de esta zona que se sabe fueron colonizadas por pueblos nativos del sudeste asiático como los son las Islas Marshall y las Islas Marianas. Lamentablemente desconocemos si actualmente se encuentra *B. papyrifera* en las islas mencionadas.

La presencia de individuos masculinos podría explicarse debido a introducciones en tiempos históricos relativamente recientes por parte de la población china y/o japonesa llevada a Hawái, para trabajar en las plantaciones de caña de azúcar entre los años 1850 –

1900. Es importante mencionar también la introducción de población china a Tahití para trabajar en los campos de algodón, alrededor de 1865. Sin embargo, en Tahití no hemos detectado la presencia de individuos masculinos, lo que en parte puede deberse al bajo número de muestras (2) que tenemos de esta zona.

Finalmente, con este objetivo se concluye que se diseñó exitosamente un partidoro SCAR para la identificación de individuos masculinos. Este marcador ha sido la herramienta para identificar la distribución de sexo de *B. papyrifera* en nueve islas de Polinesia. En tres de estas islas nuestros resultados corresponderían a datos preliminares, debido al bajo número de muestras disponibles (dos de Tahití, dos de Pitcairn y una de Raiatea). Probablemente, la presencia de individuos masculinos exclusivamente en Hawái sea una excepción, debido a su lejanía y su ubicación en uno de los vértices de la Polinesia. Esto podría haber permitido la llegada de migrantes directo desde Asia, lo cual explica la ausencia de individuos masculinos en el resto de la región de la Polinesia. En este momento no podemos definir el origen de los ejemplares masculino de *B. papyrifera* encontrados en Hawái, sin embargo sí podemos afirmar que la selección probablemente responde a criterios culturales diferentes a los de los colonizadores polinésicos de las otras islas de la Polinesia, incluyendo a Hawái. Esta es una interrogante abierta a futuras investigaciones.

La presencia exclusiva de individuos femeninos en casi la totalidad de Polinesia, abre la posibilidad de que las poblaciones de *B. papyrifera* existentes en esta región puedan corresponder a clones de uno o varios individuos introducidos durante el inicio del proceso de colonización. Este resultado podría sugerir una baja diversidad genética en la región.

### **6.3 Genotipificación de individuos de *B. papyrifera* por SSR**

Durante esta tesis se contrató el desarrollo de 36 marcadores SSR específicos para *B. papyrifera*, de modo de disponer de un conjunto de 49 marcadores SSR para realizar la genotipificación de nuestra especie de interés. Estos marcadores fueron evaluados,

seleccionando finalmente 15 para nuestra genotipificación. Tras realizar las amplificaciones seleccionamos los datos de 14 SSRs, eliminando el marcador Bropap\_23571 debido a que presentó problemas de amplificación y además un comportamiento monomórfico en casi la totalidad de Polinesia. Sólo en una muestra de Marquesas (BQUCH0040) mostró un patrón alélico distinto, el cual podría atribuirse a una mutación somática.

El análisis estadístico se realizó con la información generada a partir de estos 14 marcadores SSR sobre un total de 180 muestras. Se incluyeron las muestras de Fiji, Tahití, y Pitcairn dada su importancia en el contexto geográfico, pese a que sólo disponíamos de menos de cinco ejemplares. En el caso de Fiji, este análisis puede considerarse preliminar. Para la Isla de Pitcairn es difícil obtener más muestras dado su carácter extremadamente remoto. En Tahití existen muy pocos ejemplares por lo que probablemente no se podría aumentar el número de muestras a analizar.

Nuestro análisis identificó 28 genotipos distintos para las 29 muestras de Asia, con un genotipo compartidos por dos muestras taiwanesas. La probabilidad de identidad (PI) calculada para nuestra batería de 14 marcadores SSR en las tres poblaciones asiáticas indicó valores de  $4,2 \times 10^{-13}$  para Taiwán,  $1,0 \times 10^{-4}$  para Japón y  $4,6 \times 10^{-12}$  para Vietnam. La alta probabilidad de identificación en Taiwán es de suma importancia para nosotros debido a que los antecedentes arqueológicos indican a esta isla como el origen ancestral de los pueblos colonizadores de Polinesia. La probabilidad de identidad encontrada en Taiwán sustenta la posibilidad de que ambas muestras que compartieron genotipo puedan provenir del mismo individuo, o que hayan sido recolectadas en un mismo lugar y correspondan a clones producto de la reproducción vegetativa también presente en el hábitat nativo de esta especie.

En Polinesia se identificó un total de 31 genotipos distintos para las 151 muestras, sugiriendo la presencia de una baja diversidad genética. La probabilidad de identificación para Hawái fue de un  $6 \times 10^{-11}$ , mientras para el resto de las islas de Polinesia fue en promedio de un  $7,7 \times 10^{-5}$  (datos no mostrados). La baja probabilidad de identidad en Polinesia se debe al bajo número de alelos encontrados en esta región. Estos resultados

sugerirían una baja diversidad genética y una población clonal preponderante en la región de Polinesia.

Las poblaciones de Taiwán y Vietnam mostraron un ligero desequilibrio de Hardy-Weinberg con un déficit de heterocigosidad estadísticamente significativo, lo cual se vio reflejado en un aumento en el coeficiente de endogamia con valores de 0,138 para Taiwán y de 0,182 para Vietnam. Estos valores indican una ligera desviación en el EHW, el que podría explicarse por un pequeño porcentaje de reproducción entre individuos emparentados producto del aislamiento de las poblaciones, o bien a errores en el muestreo, no siendo éste representativo de la totalidad de la población. Por otra parte, la población de Japón mostró un EHW al probar ambas hipótesis, exceso y déficit de heterocigosidad. Estos resultados, sumados a la presencia de individuos masculinos y femeninos en la zona, sugerirían un comportamiento dentro de los límites normales de una población.

Todas las poblaciones de *B. papyrifera* de Polinesia mostraron un marcado desequilibrio de Hardy-Weinberg por exceso de heterocigosidad, el cual fue estadísticamente significativo en todos los casos; sin embargo Hawái presentó un ligero desequilibrio. Para Hawái se calculó un coeficiente de endogamia de -0,068, mientras el resto de las islas de Polinesia se calculó entre -0,751 y -1,000. Generalmente un coeficiente de endogamia menor a cero, producto del exceso de heterocigosidad, sugieren que la población ha sufrido un cuello de botella reciente. Cabe recordar que el concepto de EHW está definido para poblaciones con reproducción sexual, por lo que es necesario considerar las limitaciones de este modelo en el estudio de una especie que presenta reproducción vegetativa. Es muy probable que durante el proceso de colonización de la Polinesia hayan llegado muy pocos individuos de *B. papyrifera* a cada isla produciéndose cuellos de botella, los cuales se mantienen hasta la actualidad debido a la ausencia de individuos masculinos y por ende la falta de reproducción sexual que favorecería la recuperación de este cuello de botella. La evaluación según los modelos de IAM y SMM sugiere cuellos de botella actuales en todas las poblaciones de *B. papyrifera* de las islas de la Polinesia, excepto en Tonga donde el cuello de botella sólo fue identificado según el

modelo AIM. Esta diferencia encontrada en Tonga podría explicarse por la hipotética llegada de una mayor diversidad genética a esta isla, debido a que esta fue una de las primeras localidades en ser colonizadas. Además en Tonga se reconocen al menos tres variedades de *B. papyrifera* a diferencia de otras islas de la Polinesia (Matthews, 1996).

#### **6.4 Análisis de distancia genética vs distancia geográfica**

Los análisis de distancia genética utilizando el coeficiente de Cavalli-Sforza y posteriores agrupamientos NJ mostraron la separación de Polinesia en Oeste y Este. Hawái queda fuera de este agrupamiento, a una posición bastante alejada. En ambos modelos la población asiática más cercana corresponde a Taiwán, que en el modelo SMM incluso agrupa más cercano a Polinesia que Hawái. Si bien ambos modelos en esencia muestran un agrupamiento similar, la matriz de Cavalli-Sforza logra una topología más resolutive dentro de Polinesia, probablemente al asignar un mayor peso estadístico a las diferencias encontradas. En el caso de Goldstein las diferencias encontradas no deben ser consideradas lo suficientemente grandes por el test para lograr una mayor resolución.

Esta separación entre Polinesia Oeste y Este coincidiría con el proceso de poblamiento de la región. Los datos arqueológicos indican un primer pulso migratorio hasta la región Oeste de Polinesia, y un segundo movimiento migratorio que se inicia en esta zona y que culmina en el poblamiento de toda la región Este de la Polinesia (Hurles y cols., 2003).

El agrupamiento de Hawái alejado de Polinesia puede deberse principalmente a la llegada de otros grupos colonizadores, de distinto origen, y que no tuvieron contacto con el resto de la Polinesia. La presencia de individuos masculinos exclusivamente en Hawái confirma esta hipótesis. Una posibilidad podría ser un contacto desde el sector de Micronesia.

Mediante el análisis de estructura poblacional bayesiano de mezclas realizado con Structure, se identificó dos claros conglomerados genéticos en el grupo de estudio. Estos podrían ser definidos como un conglomerado asiático y un conglomerado polinésico. La

mayoría de las localidades resultaron ser homogéneas en cuando a la presencia de los distintos conglomerados genéticos, excepto Taiwán y Hawái, donde se encontró la coexistencia de ambos conglomerados genéticos. En Taiwán se identificó varios individuos que presentan mezclas de ambos conglomerados genéticos en su genoma. Estos resultados sugieren a Taiwán como un posible ancestro de las poblaciones polinésicas. Estas observaciones son concordantes con los antecedentes lingüísticos y arqueológicos que sitúan a Taiwán como centro de origen de los pueblos colonizadores de la Polinesia. En Hawái estos conglomerados están presentes por separado en los individuos, lo que sugeriría la ausencia de reproducción sexual, a pesar de estar presentes individuos de ambos sexos. Una explicación de este hecho podría ser que las flores masculinas y femeninas se produzcan en temporalidades diferentes impidiendo la polinización (A. Seelenfreund, comentario personal). Probablemente ocurrieron al menos dos introducciones de *B. papyrifera* en esta isla.

Según el test de Mantel no se observa una directa relación entre la distancia genética y la distancia geográfica en la región de Polinesia. Esto es consistente con el número de genotipos encontrados en esta región y con la reducida variabilidad encontrada entre ellos, sugiriendo que durante el proceso de colonización de Polinesia se introdujeron unos pocos individuos de *B. papyrifera*.

El análisis de coordenadas principales mostró el agrupamiento de las muestras de la Polinesia (a excepción de las muestras masculinas de Hawái), indicando una gran cercanía genética. Nuevamente se observa relación entre las muestras de Taiwán y las de Polinesia. Este análisis dividió espacialmente las muestras femeninas y masculinas de Hawái, mostrando una gran diferencia genética entre ellas, lo que sugeriría un origen distinto para las los individuos femeninos y masculinos de esta isla. Probablemente las muestras femeninas de Hawái tienen el mismo origen que las muestras del resto de Polinesia, consistente con los resultados de Structure. En cambio, las muestras masculinas podrían tener un origen diferente, polinésico o no. Carecemos de antecedentes para establecer el periodo de esta segunda introducción. Es importante señalar que aparentemente no hay reproducción sexual en Hawái a pesar de estar presentes ambos

sexos; pues de haberla, en el análisis mediante componentes principales se esperaría encontrar muestras con características distintas a los dos grupos identificados.

Los ejemplares masculinos de Hawái muestran una gran lejanía con el resto de Polinesia, agrupando incluso más cercanos a Vietnam. Una posible explicación es que en tiempos históricos se llevaron trabajadores asiáticos a Hawái (Siglo XIX). Actualmente no contamos con muestras de *B. papyrifera* de China para evaluar esa posibilidad.

En el análisis de PCoA de las muestras de la Polinesia, los individuos mostraron una gran cercanía espacial, sin embargo fue posible dividirlos en cuatro grupos. Nuevamente se observa un marcado agrupamiento que distingue entre Polinesia Oeste y Este. Con el análisis de PCoA se observa una mejor resolución entre las islas:

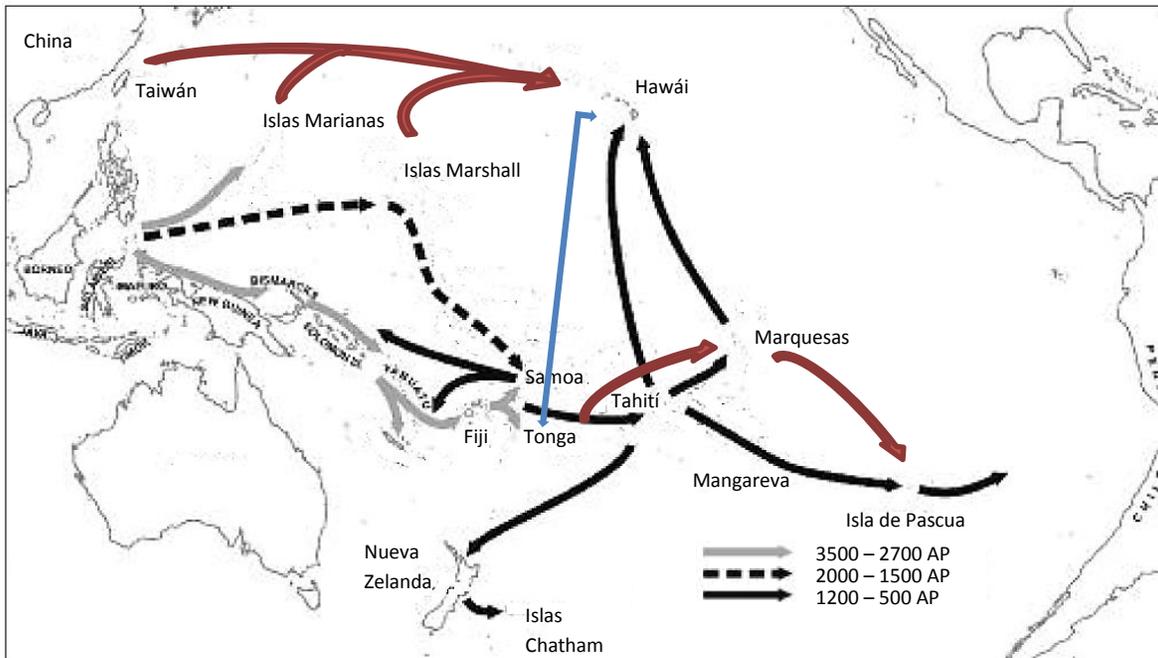
Las muestras de Isla de Pascua se agrupan sólo en el grupo GP4 junto a algunas muestras de Marquesas y Tahití, lo cual se correlaciona con datos arqueológicos que sugieren que el poblamiento de Isla de Pascua provino de Marquesas y Mangareva (Kirch, 2010). Esta relación entre muestras de Marquesas e Isla de Pascua se da principalmente debido a que Isla de Pascua comparte su genotipo mayoritario con ejemplares del archipiélago de las Marquesas. La evidencia arqueológica no establece una relación entre Isla de Pascua y Tahití, pero probablemente Tahití haya tenido contacto con Mangareva debido a que se encuentran relativamente cercanas (1570 Km). Mangareva es una de las islas más probables como el origen del poblamiento de Isla de Pascua, pues los estudios lingüísticos indican que ambos idiomas tienen un 80% de similitud (Green y Weisler, 2002). Se hace necesario contar con muestras de Mangareva para contrastar estos resultados, sin embargo, *B. papyrifera* se extinguió localmente en esta isla. La única alternativa disponible sería el análisis de muestras de herbario procedentes de esta localidad. En Isla de Pascua se encontraron genotipos que no están presentes en otras islas, los cuales podrían provenir de Mangareva u otra isla de la cual no tenemos muestras, como también podrían corresponder a mutaciones somáticas.

Las investigaciones arqueológicas sugieren que el poblamiento de Hawái se originó desde el archipiélago de las Marquesas (Matisoo-Smith y cols., 1998). Otros autores proponen una segunda ruta proveniente de Tahití. Nuestros análisis de las muestras

femeninas de *B. papyrifera* de Hawái muestran similitud con las plantas de ambas localidades; se encontró incluso un genotipo que es común a muestras provenientes de las Marquesas. También muestran una cercanía espacial con las muestras de Polinesia Oeste, incluso comparte dos genotipos con Tonga lo cual podría indicar otros movimientos migratorios o la existencia de rutas de intercambio con esta región.

Según datos arqueológicos las Islas Marquesas fueron colonizadas por colonizadores polinésicos provenientes de Samoa y Tonga (Rolett, 1993). Nuestros resultados confirman la relación con Tonga. Por otra parte, algunas muestras de *B. papyrifera* de las Marquesas presentan el mismo genotipo con individuos analizados provenientes de Tahití, lo cual sugeriría algún tipo de contacto.

Los procesos de colonización de las islas de la Polinesia Occidental son de gran interés, pues corresponden a la zona de origen de la cultura polinésica. Un resultado llamativo fue que numerosas muestras provenientes de Samoa agruparon junto a las de Hawái en el grupo GP1.1 (**Figura 5.4.5**). De acuerdo al análisis de coordenadas principales, este grupo también presenta menos distancia respecto de las muestras de Taiwán que el resto de los ejemplares de la Polinesia. Estos resultados son coherentes con la variación al modelo de Triple I (Green, 1991) planteado por Adisson y Matisoo-Smith (2010), denominado Triple I para Polinesia Oeste. En base a los resultados obtenidos se plantea un modelo de poblamiento inferido a partir de los análisis mediante SSR. En la **Figura 6.1** se muestran las distintas alternativas sumadas a la propuesta del modelo Triple I para Polinesia Oeste.



**Figura 6.1. Mapa del modelo de poblamiento Triple – I para Polinesia Oeste.**

Las líneas rojizas esquematizan posibles rutas de dispersión inferidas en este trabajo. Las líneas azules esquematizan posibles rutas de intercambio. Todas las líneas negras corresponden al modelo propuesto por Addison y Matisoo-Smith (2010).

Los resultados obtenidos comprueban nuestra hipótesis, pues se logró identificar poblaciones genéticamente distintas en el interior de Polinesia. Sin embargo, la diversidad genética entre estas poblaciones es muy reducida, razón por la cual no se detectó en trabajos anteriores con otros marcadores, tales como ITS (Seelenfreund y cols., 2011). Esto concuerda con observaciones de otros trabajos que describen a los marcadores SSR como apropiados para el análisis de poblaciones con diversidad genética reducida (Moncada y cols., 2006).

Finalmente, los marcadores moleculares de sexo y microsatélites desarrollados en el marco de esta tesis permiten detectar variabilidad genética entre ejemplares contemporáneos de *B. papyrifera* provenientes del hábitat nativo y de distintas islas de Oceanía Remota. En consecuencia, este trabajo permite afirmar que esta planta puede ser considerada un modelo comensal para inferir posibles rutas de poblamiento humano en la vasta región del Pacífico que comprende a la Polinesia.

A futuro será de gran interés complementar y contrastar la visión contemporánea de la distribución de las variaciones genéticas de *B. papyrifera* encontradas en Polinesia durante el desarrollo de esta tesis. Por esta razón, es de interés el análisis de *B. papyrifera* de otras islas no incluidas en este trabajo, como las islas Australes, para tener una visión más completa sobre el proceso de poblamiento de Polinesia. También sería de gran utilidad aumentar el número de muestras de las islas en que aún está presente esta planta, y donde tenemos un bajo número de muestras, como es el caso de Fiji. Asimismo es necesario incluir en el análisis un número mayor de muestras provenientes de Asia continental, especialmente de localidades chinas para esclarecer el origen de los individuos masculinos de *B. papyrifera* encontrados en Hawái. Desde otra perspectiva, sería muy interesante comparar los resultados de esta tesis con una visión más antigua, como podría ser a través del análisis de muestras de herbarios y piezas de tapa etnográficas. Ambos materiales podrían ayudar a completar este puzzle desde diferentes miradas. Si bien las muestras de herbario y textiles se recolectaron post-contacto europeo, éstas nos permitirían reconstruir la historia de *B. papyrifera* en islas donde se ha extinguido localmente, como es el caso de Mangareva. Por otra parte el análisis de tapa antigua nos podría aportar una visión previa al contacto europeo.

## 7 Conclusiones

- Se desarrolló un banco genómico de muy buena calidad, evaluado según criterios de integridad, concentración, pureza y amplificabilidad. Este banco genómico está compuesto por el ADN genómico de 191 individuos distintos de *B. papyrifera* provenientes de tres países de Asia y nueve islas de Polinesia.
- Se desarrolló un marcador SCAR para la identificación de individuos de sexo masculino de *B. papyrifera*. Con este marcador se diseñó un método certero para la identificación del sexo de individuos de *B. papyrifera*. Se determinó el sexo de la totalidad de las muestras del banco genómico, encontrándose una distribución de sexos similar al 50% en las localidades del hábitat nativo. En Polinesia se encontraron sólo individuos de sexo femenino, con excepción de Hawái, donde se identificaron individuos de ambos sexos, con una distribución similar a la del hábitat nativo de *B. papyrifera*, sugiriendo un patrón de dispersión más complejo que en el resto de Polinesia. Estos resultados contradicen la propuesta de Whistler y Elevitch (2006) sobre la presencia exclusiva de clones masculinos de *B. papyrifera* en la Polinesia.
- Se evaluó un total de 49 marcadores SSR específicos para *B. papyrifera*, a partir de los cuales se utilizaron 15 marcadores de SSR para la genotipificación de las muestras del banco genómico. Se realizaron análisis de diversidad genética con los datos de 14 marcadores SSR sobre 180 muestras del banco genómico encontrándose una alta diversidad genética en las tres localidades de Asia, y una baja diversidad genética en las nueve localidades de Polinesia.
- El análisis estadístico de los datos de la genotipificación mediante marcadores SSR diferenció poblaciones de Polinesia oriental de poblaciones de Polinesia occidental. Las diferencias encontradas permiten inferir posibles rutas de dispersión, al encontrar subpoblaciones de *B. papyrifera* asociadas a distintas regiones de Polinesia, apoyando antecedentes propuestos por otros autores, así como también aportando nuevos datos al proceso de colonización de la Polinesia.

Además, los resultados sugieren que Taiwán fue centro de origen de los colonizadores polinésicos, al igual que otros antecedentes.

- Esta tesis confirma a *B. papyrifera* como un buen modelo comensal para el estudio de la colonización de la Polinesia.

## 8 Bibliografía

- Abdi H., Williams L., Valentin D. (2012). Multiple factor analysis: principal component analysis for multitable and multiblock data sets. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 5:149–179.
- Addison D., Matisoo-Smith E. (2010). Rethinking Polynesian origins: a West-Polynesia Triple-I Model. *Archeology in Oceania*, 45:1-12.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27:617-631.
- Aggarwal R., Udaykumar D., Hendre P., Sarkar A., Singh L. (2004). Isolation and characterization of six novel microsatellite markers for mulberry (*Morus indica*). *Molecular Ecology Notes*, 4:477–479.
- Ahmed S., Dawson D., Compton S., Gilmartin P. (2007). Characterization of microsatellite loci in the African fig *Ficus sycomorus* L. (Moraceae). *Molecular Ecology Notes*, 7:1175–1177.
- Ahn S. J., Costa J., Emanuel J. R. (1996). PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24:2623–2625.
- Andersen J., Lübberstedt T. (2003). Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*, 8:554-560.
- Ainsworth, C. (2000). Boys and Girls Come Out to Play: The Molecular Biology of Dioecious Plants. *Annals of Botany*, 86:211-221.
- Arnaud-Haond S., Alberto F., Teixeira S., Procaccini G., Serrao A., Duarte C. (2005). Assessing Genetics Diversity in Clonal Organism: Low Diversity or Low Resolution? Combining Power and Cost Efficiency in Selecting Markers. *Journal of Heredity*, 96:434-440.
- Austin C. (1999). Lizards took express train to Polynesia. *Nature*, 397:113-114.
- Barker C. (2002). Plate 432 *Broussonetia papyrifera*. *Curtis's Botanical Magazine*, 19:8–18.

- Barnes S. S., Matisoo-Smith E., Hunta T.L. (2006). Ancient DNA of the Pacific rat (*Rattus exulans*) from Rapa Nui (Easter Island). *Journal of Archaeological Science*, 33:1536-1540.
- Caillon S., Quero-Garcia J., Lescure J., Lebot V. (2006). Nature of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) genetic diversity prevalent in a Pacific Ocean island, Vanua Lava, Vanuatu. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53:1273-1289.
- Cann R., Stoneking M., Wilson A. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325:31-36.
- Cavalli-Sforza L., Edwards A. (1967). Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19:233-257.
- Chen R., Hu L., An T., Li J., Shen Q. (2002). Natural PTP1B Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12:3387-3390.
- Cheng Z., Lin Ch., Hwang T., Teng Ch. (2001). Brousochalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 61:939-946.
- Clarke A. C., Burtenshaw M.K., McLenachan P.A., Erickson D.L., Penny D. (2006). Reconstructing the origins and dispersal of the Polynesian bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). *Molecular Biology and Evolution*, 23:893-900.
- Coleman A. W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19:370-375.
- Cornuet J., Luikart G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144:2001-2014.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.
- Ewins R. (1987). Barkcloth and the origin of paper. Conference Papers, 1st National Paper Conference. Hobart, *Papermakers of Australia*, pp.11-15.

- Forster P., Matsumara S. (2005). Did early humans go north or south? *Science*, 308:965-966.
- Friedlaender J. S., Friedlaender F. R., Reed F. A., Kidd K. K., Kidd J. R., Chambers G. K, Lea R. A., Loo J., Koki G., Hodgson J. A., Merriwether D. A., Weber J. L. (2008). The Genetic Structure of Pacific Islanders. *Plos Genetics*, 4:173-190.
- Giraldo E., Viruel M., López-Corrales M., Hormaza J. (2005). Characterisation and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80:217–224.
- Goldstein D., Linares A., Cavalli-Sforza L., Feldman M. (1995). An evaluation of genetics distances for uses with microsatellite loci. *Genetics*, 139:463-471.
- Green R. (1991). The Lapita Culture complex: current evidence and proposed models. *Bulletin of the Indo-Pacific Prehistory Association*, 11:295-305.
- Green R., Weisler M. 2002. The Mangarevan Sequence and Dating of the Geographic Expansion into Southeast Polynesia. *Asian Perspectives*, 41:213-41.
- Hagelberg E. (2003). Recombination or mutation rate heterogeneity? Implications for Mitochondrial Eve. *Trends in Genetics*, 19:84-90.
- Hinkle A. E. (2007). Population structure of Pacific *Cordyline fruticosa* (*Laxmanniaceae*) with implications for human settlement of Polynesia. *American Journal of Botany*, 95:828-839.
- Ho K. Y., Chang J. K. (2006). Relationship between Population Genetic Structure and Riparian Habitats of *Broussonetia papyrifera* Vent. on the Western Taiwan. *Experimental Forest Study*, 20:165-174.
- Holsinger K., Weir B. (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics* 10:639-650.
- Hurles M., Matisoo-Smith E., Gray R., Penny D. (2003). Untangling Oceanic settlement: the edge of the knowable. *Trends in Ecology and Evolution*, 18:531-540)
- Hurles M., Maund E., Nicholson J., Bosch E., Renfrew C., Sykes B., Jobling M. (2003). Native American Y chromosome in Polynesia: The Genetics Impact of the Polynesian Slave Trade. *The American Society of Human Genetics*, 72:1282-1287.

- Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A. K. (2010). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177:309-334.
- Kayser M. (2010). The Human Genetics History of Oceania: Near and Remote Views of Dispersal. *Current Biology*, 20:R194-R201.
- Kennedy J. (2008). Pacific Bananas: Complex Origins, Multiple Dispersals? *Asian Perspectives*, 47:75-94.
- Khadari B., Hochu I., Santoni S., Kjellberg F. (2001). Identification and characterization of microsatellite loci in the common fig (*Ficus carica* L.) and representative species of the genus *Ficus*. *Molecular Ecology Notes*, 1:191-193.
- 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., Green R. (2001). *Hawaiki, ancestral Polynesia. An essay in historical anthropology*. Cambridge. UK: Cambridge University Press.
- Kirch P. (2010). Peopling of the Pacific: A Holistic Anthropological Perspective. *Annual Reviews of Anthropology*, 39:131-148.
- Larson G., Cucchi T., Fujita M., Matisoo-Smith E., Robins J., Anderson A., Rolett B., Spriggs M., Dolman G., Kim T. H., Thuy N. T., Randi E., Doherty M., Due R. A., Bollt R., Djubiantono T., Griffin B., Intoh M., Keane E., Kirch P., Li K. T., Morwood M., Pedriña L. M., Piper P. J., Rabett R. J., Shooter P., Van den Bergh G., West E., Wickler S., Yuan J., Cooper A., Dobney K. (2007). Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania. *Proceedings of the National Academy of Science*, 144:4834-4839.
- Lee D., Bhat K., Fong H., Farnsworth N., Pezzuto J., Kinghorn A. (2001). Aromatase Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Journal of Natural Products*, 64:1286-1293.
- Lee T., Burch J., Coote T., Fontaine B., Gargominy O., Pearce-Kelly P., O' Foighil D. (2007). Prehistoric inter-archipelago trading of Polynesian tree snails leaves a conservation legacy. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences*, 274:2907-2914.

- Lebot V., Merlin M.D., Lindstrom L. (1997). Kava-the Pacific elixir: the definitive guide to its ethnobotany, history, and chemistry. *Inner Traditions / Bear & Company*.
- Lebot V., Trilles V., Noyer J., Modesto J. (1998). Genetic relationships between yam (*Discorea alata*) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45:499-509.
- Lianjun W., Changbo D., Degao L., Qingchang L. (2012). Identification of male-specific amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker in *Broussonetia papyrifera*. *African Journal of Biotechnology*, 11:8196-8201.
- Lodhi, M. A., Guang-Ning Y., Norman F. W., Bruce I. R. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12:6-13.
- Mantel N. (1967). The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research*, 27; 209-220.
- Matisoo-Smith E., Roberts R., Irwin G., Allen J., Penny D, Lambert D. (1998). Patterns of prehistoric human mobility in Polynesia indicated by mtDNA from the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95:15145-15150
- Matisoo-Smith E., Robins J. H. (2004). Origins and dispersals of Pacific peoples: Evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101:9167-9172.
- Matisoo-Smith E., Ramírez J. M. (2010). Human Skeletal Evidence of Polynesian Presence in South America? Metric Analyses of Six Crania from Mocha Island, Chile. *Journal of Pacific Archaeology*, 1:76-88.
- Matthews P. (1996). Ethnobotany, and the origins of *Broussonetia papyrifera* in Polynesia: an essay on tapa Prehistory. *New Zealand Journal of Archaeology*, 117-132.
- Matthews P. (2007). Plant Trails in Oceania. In K. R. Howe (Ed.), *Vaka Moana: Voyages of the Ancestors: The Discovery and Settlement of the Pacific*, pp. 94-95. Honolulu: University of Hawaii Press.
- Moncada X., Frédérique P., Merdinoglu D., Hinrichsen P. (2006). Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers. *Genome*, 49:1459-1472.

- Nisar M., Iram S., Akhtar Y., Majeed A., Ismail S., Lin F. (2010). AFLP Based Analysis of Genetic Diversity in Buffle Grass. *World Applied Sciences Journal*, 10:560-567.
- Ohri D., Kumar A. (1986). Nuclear DNA amounts in some tropical hardwoods. *Caryologia*, 39:303–307.
- Paran I., Michelmore R. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85:985-993.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28:2537-2539.
- Piry S., Luikart G., Cornuet J. (1999). BOTTLENECK: A program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity*, 90:502-503.
- Petchey F., Spriggs M., Leach F., Seed M., Sand C., Pietruszewsky M., Anderson K. (2011). Testing the human factor: radiocarbon dating the first peoples of the South Pacific. *Journal of Archaeological Science*, 38:29-44.
- Powell W., Machray G., Provan J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1:215-222.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.
- Reed F., Tishkoff S. (2006). African human diversity, origins and migrations. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16:597–605
- Rolett B. (1993). Marquesan prehistory and the origins of East Polynesian culture. *Journal de la Société des océanistes*, 96:29-47.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- Sacks B., Brown S., Stephens D., Pedersen N. C., Wu J, Berry O. (2013). Y chromosome analysis of dingoes and Southeast Asian village dogs suggests a Neolithic

- continental expansion from Southeast Asia followed by multiple Austronesian dispersals. *Molecular Biology and Evolution*, 30:1103-1118.
- Sahu S K., Thangaraj M., Kathiresan K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012:1-6.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Schuelke M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18:233-234.
- Seelenfreund D., Clarke A. C., Oyanedel N., Piña R., Lobos S., Matisoo-Smith E. Seelenfreund A. (2010). Paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) as a commensal model for human mobility in Oceania: anthropological, botanical and genetics considerations. *New Zealand Journal of Botany*, 48:231-247.
- Seelenfreund D., Piña R., Ho K., Lobos S., Moncada X. (2011). Molecular analysis of *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. (Magnoliophyta: Urticales) from the Pacific, based on ribosomal sequences on nuclear DNA. *New Zealand Journal of Botany*, 48:413-420.
- Semagn, K. Bjørnstad A., Ndjioudjop M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5:2540-2568.
- Singer V., Jones L., Yue S., Haugland R. (1997). Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *Analytical Biochemistry*, 249:228–238.
- Soares P., Rito T., Trejaut., Mormina M., Hill C., Tinkler-Hundal E., Braid M., Clarke D., Loo J., Thomson N., Denham T., Donohue M., Macaulay V., Marie L., Oppenheimer S., Richards M. (2011). Ancient voyaging and Polynesian origins. *The American Journal of Human Genetics*, 88:239-247.
- Sohn H., Chong-Suk K., Kun-Ho S. (2010). Fungicidal Effect of Prenylated Flavonol, Papyriflavonol A, isolated from *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. against *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:1397-1402.

- Sonah H., Deshmukh R., Sharma A., Singh V., Gupta D., Gacche R., Rana J., Singh N., Sharma T. (2011). Genome-Wide Distribution and Organization of Microsatellites in Plants: An Insight into Marker Development in *Brachypodium*. *PLoSOne*, 6:1-9.
- Storey A. A., Ramírez J. M., Quiroz D., Burley D. V., Addison D. J., Walter R., Anderson A. J., Hunt T. L., Athens J. S., Huynen L., Matisoo-Smith E. A. (2007). Radiocarbon and DNA evidence for a pre-Columbian introduction of polynesian chickens to Chile. *Proceedings of the National Academy of Science*, 104:10335-10339.
- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibáñez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhães R., Meredith C., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. (2004). Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1448-1458.
- Underhill P., Shen P., Lin A., Jin L., Passarino G., Yang W., Kauffman E., Bonn -Tamir B., Bertranpetit J., Francalacci P., Ibrahim M., Jenkins T., Kidd J. R., Mehdi S., Seielstad M., Wells R. S., Piazza A., Davis R., Feldman M., Cavalli-Sforza L., Oefner P. (2000). Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nature Genetics*, 26:358-361.
- Underhill P., Kivisild T. (2007). Use of Y Chromosome and Mitochondrial DNA Population Structure in Tracing Human Migrations. *Annual Review of Genetics*, 41:539-564.
- Varma A., Padh H., Shrivastava N. (2007). Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*, 2:386-392.
- Vos P, Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M, Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414.
- Weising, K. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. Boca Raton: CCR Press.
- Welsh J., McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218.

- Whistler W., Elevitch C. R. (2006). *Traditional Trees of Pacific Islands: Their Culture, Environment, and Use*. Holualoa, Hawaii: Permanent Agriculture Resources.
- Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J., Tingey S. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- Wilmshurst J. M., Hunt T. L., Lipo C. P., Anderson A. J. (2010). High-precision radiocarbon dating shows recent and rapid initial human colonization of East Polynesia. *Proceedings of the National Academy of Science*, 108:1815-1820.
- Yamanouchi H., Koyama A., Takyu T., Muramatsu N. (2010). Nuclear DNA amounts in diploid mulberry species (*Morus* spp.). *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 79:1-8.
- Zerega N. J., Ragone D., Motley T. J. (2004). Complex origins of breadfruit (*Artocarpus altilis*, *Moraceae*): implications for human migrations in Oceania. *American Journal of Botany*, 91:760-766.
- Zerega N. J., Clement W., Datwyler S., Weiblen G. (2005). Biogeography and divergence times in the mulberry family (*Moraceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37:402-416.
- Zhaoa W., Miao X., Jia S., Pana Y., Huang Y. (2004). Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. *Plant Science*, 168:519–525.

## 9 Anexos

### Anexo 1. Secuencia del marcador molecular masculino de *B. papyrifera*.

```
1   gactgcgtag caattcactc aagccctttg gatcgcgact tagaagcaaa tctccgaagc
61  cccagttctt cgccaatagc tcttcgctga gtgatctctg aactcttagg gagttacaag
121 tgttggaccg atttgggcag ccgggaactc cgtcatcaag gcccgtaacc gtggatctaa
181 aaagccgttc aataacgacg acgacgactt ctatggctac aaggattccg acggcagcga
241 tatcgactat gatatcagtt ccagtgcgca cgacgatgat gacgttgaca tggcttttga
301 tgacgacgac gaggaggacg ttggcaagaa agggaagaag agaaagtaaa agaatttgaa
361 tatcatcatc gttatttgac cattgttttg ggaaatgtta tttggtctct gttttccgga
421 ttcaaagttg gtcttgcca gtctttgttc ttgattacag ttactcagga ctcatc
```

## Anexo 2. Tabla I. Detalle del banco genómico.

**DO:** densidad óptica; **PG:** Picogreen; **Detalle:** G: presencia de banda genómica, g: leve presencia de banda genómica, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: gran presencia de RNA, r: leve presencia de RNA, NSO: no se observa. Todas las extracciones de ADN fueron resuspendidas en un volumen final de 100 µL.

Código	Localidad	Fecha Extracción	[ADN] ng/µL, DO	[ADN] ng/µL, PG	DO/PG	260 nm / 280 nm	Detalle	Sexo	Volumen de ADN utilizando	Volumen de ADN disponible
BQUCH0001	I. Pascua	11/11/2011	136,6	14,6	9,3	1,92	g	Femenino	21,7	78,3
BQUCH0002	I. Pascua	31/07/2012	302,0	43,7	6,9	1,92	GR	Femenino	12,3	87,7
BQUCH0003	I. Pascua	31/07/2012	662,5	105,4	6,3	1,95	G	Femenino	8,3	91,7
BQUCH0004	I. Pascua	31/07/2012	186,6	8,1	23,1	2,07	g	Femenino	19,4	80,6
BQUCH0005	I. Pascua	11/11/2011	142,0	9,6	14,9	1,91	G	Femenino	22,2	77,8
BQUCH0006	I. Pascua	31/07/2012	508,2	51,7	9,8	2,01	gD	Femenino	9,5	90,5
BQUCH0007	I. Pascua	11/11/2011	83,6	8,4	10,0	1,88	D	Femenino	32,5	67,5
BQUCH0009	I. Pascua	11/11/2011	1281,6	117,9	10,9	2,08	D	Femenino	6,8	93,2
BQUCH0010	I. Pascua	31/07/2012	327,7	29,5	11,1	2,04	gDr	Femenino	12,1	87,9
BQUCH0011	I. Pascua	30/07/2012	448,7	37,8	11,9	2,03	D	Femenino	10,3	89,7
BQUCH0012	I. Pascua	03/10/2011	365,2	49,8	7,3	1,91	gDr	Femenino	11,1	88,9
BQUCH0013	I. Pascua	30/07/2012	354,2	55,6	6,4	2,05	GD	Femenino	11,2	88,8
BQUCH0014	I. Pascua	11/11/2011	111,7	10,2	11,0	1,97	G	Femenino	25,9	74,1
BQUCH0015	I. Pascua	31/07/2012	148,3	15,7	9,4	1,92	G	Femenino	20,4	79,6
BQUCH0023	I. Pascua	11/11/2011	235,8	14,2	16,6	1,95	G	Femenino	15,6	84,4
BQUCH0024	I. Pascua	31/07/2012	231,9	14,2	16,3	2,00	GD	Femenino	15,7	84,3
BQUCH0027	I. Pascua	11/11/2011	247,2	11,1	22,3	1,97	G	Femenino	15,8	84,2
BQUCH0028	I. Pascua	31/07/2012	171,3	15,0	11,4	2,02	G	Femenino	18,7	81,3
BQUCH0029	I. Pascua	31/07/2012	246,3	15,3	16,1	2,01	GDr	Femenino	15,1	84,9
BQUCH0030	I. Pascua	31/07/2012	322,8	43,2	7,5	1,88	G	Femenino	11,9	88,1
BQUCH0031	I. Pascua	31/07/2012	820,9	68,0	12,1	2,08	Gr	Femenino	7,9	92,1
BQUCH0032	I. Pascua	30/07/2012	267,6	22,2	12,1	2,03	g	Femenino	13,8	86,2
BQUCH0033	I. Pascua	07/10/2011	97,6	4,6	21,2	1,95	d	Femenino	32,0	68,0
BQUCH0035	I. Pascua	21/09/2011	391,4	58,8	6,7	2,04	G	Femenino	10,6	89,4
BQUCH0036	I. Pascua	25/11/2011	327,4	22,1	14,8	1,72	G	Femenino	12,5	87,5
BQUCH0037	I. Pascua	25/11/2011	317,0	24,3	13,0	1,89	G	Femenino	12,5	87,5
BQUCH0038	I. Pascua	11/11/2011	200,0	13,1	15,2	2,02	Gr	Femenino	17,3	82,7
BQUCH0040	Marquesas	23/07/2012	201,2	9,5	21,1	1,99	D	Femenino	18,1	81,9
BQUCH0041	Marquesas	23/07/2012	156,8	12,9	12,2	1,93	G	Femenino	20,1	79,9
BQUCH0042	Marquesas	23/07/2012	313,1	31,4	10,0	1,92	Gr	Femenino	12,3	87,7
BQUCH0043	Marquesas	23/07/2012	162,7	8,1	20,1	1,98	g	Femenino	21,0	79,0
BQUCH0045	Marquesas	23/07/2012	258,6	34,7	7,5	1,94	G	Femenino	13,6	86,4
BQUCH0046	Marquesas	27/09/2011	176,8	22,0	8,0	1,80	G	Femenino	17,7	82,3

### Continuación. Tabla I. Detalle del banco genómico.

**DO:** densidad óptica; **PG:** Picogreen; **Detalle:** G: presencia de banda genómica, g: leve presencia de banda genómica, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: gran presencia de RNA, r: leve presencia de RNA, NSO: no se observa. Todas las extracciones de ADN fueron resuspendidas en un volumen final de 100 µL.

Código	Localidad	Fecha Extracción	[ADN] ng/µL, DO	[ADN] ng/µL, PG	DO/PG	260 nm / 280 nm	Detalle	Sexo	Volumen de ADN utilizando	Volumen de ADN disponible
BQUCH0047	Marquesas	23/07/2012	134,8	8,0	16,9	1,99	G	Femenino	23,6	76,4
BQUCH0048	Marquesas	24/07/2012	355,4	10,2	34,9	1,95	g	Femenino	13,6	86,4
BQUCH0049	Marquesas	23/07/2012	145,3	3,2	45,1	2,00	d	Femenino	28,1	71,9
BQUCH0050	Marquesas	24/07/2012	73,9	0,2	369,5	2,03	NSO	Femenino	182,1	-82,1
BQUCH0051	Marquesas	07/10/2011	190,5	21,5	8,8	1,93	G	Femenino	16,9	83,1
BQUCH0053	Marquesas	18/07/2012	82,8	9,8	8,5	1,89	d	No Amplifica	32,2	67,8
BQUCH0056	Tahiti	30/09/2011	277,3	2,0	136,5	1,91	NSO	Femenino	27,0	73,0
BQUCH0058	Tahiti	18/07/2012	552,1	65,1	8,5	2,05	GdR	Femenino	9,1	90,9
BQUCH0059	Hawái	27/09/2011	236,4	14,6	16,2	1,91	G	Femenino	15,5	84,5
BQUCH0060	Pitcairn	25/07/2012	205,7	12,4	16,6	1,96	D	Femenino	17,1	82,9
BQUCH0063	Raiatea	18/07/2012	109,7	4,3	25,5	1,98	g	Femenino	30,2	69,8
BQUCH0064	Hawái	06/12/2011	439,8	12,0	36,8	1,92	Gd	Masculino	12,1	87,9
BQUCH0065	Hawái	06/12/2011	451,8	12,7	35,7	1,94	G	Femenino	11,8	88,2
BQUCH0066	Hawái	23/07/2012	716,0	25,5	28,1	1,94	GR	Femenino	9,0	91,0
BQUCH0067	Samoa	25/11/2011	308,8	3,0	101,6	1,70	g	Femenino	21,3	78,7
BQUCH0068	Samoa	30/09/2011	85,2	5,2	16,4	1,70	g	Femenino	34,3	65,7
BQUCH0069	Samoa	26/07/2012	440,2	8,8	49,8	2,03	D	Femenino	12,9	87,1
BQUCH0074	Samoa	26/07/2012	393,3	9,9	39,6	1,96	Gr	Femenino	13,1	86,9
BQUCH0075	Samoa	26/07/2012	796,1	25,6	31,1	2,10	Gr	Femenino	8,7	91,3
BQUCH0077	Samoa	26/07/2012	533,7	20,3	26,3	2,04	Gr	Femenino	10,2	89,8
BQUCH0078	Samoa	26/07/2012	131,3	0,4	328,3	1,83	NSO	No Amplifica	95,2	4,8
BQUCH0082	Samoa	18/07/2012	296,8	17,7	16,8	2,06	G	Femenino	13,4	86,6
BQUCH0083	Samoa	18/07/2012	108,1	5,9	18,4	2,01	g	Femenino	28,6	71,4
BQUCH0084	Samoa	23/07/2012	258,2	9,9	26,1	1,98	G	Femenino	15,8	84,2
BQUCH0085	Samoa	20/07/2012	395,8	20,6	19,2	2,04	Gr	Femenino	11,5	88,5
BQUCH0086	Samoa	26/07/2012	457,8	21,8	21,0	2,00	Gr	Femenino	10,7	89,3
BQUCH0087	Samoa	20/07/2012	307,4	15,7	19,6	2,03	Gr	Femenino	13,4	86,6
BQUCH0088	Samoa	07/10/2011	192,8	16,1	12,0	1,95	G	Femenino	17,2	82,8
BQUCH0089	Samoa	20/07/2012	280,6	10,1	27,6	2,03	Gr	Femenino	15,1	84,9
BQUCH0090	Samoa	20/07/2012	217,8	22,3	9,7	1,99	Gr	Femenino	15,5	84,5
BQUCH0091	Samoa	23/07/2012	301,0	7,3	41,3	1,96	G	Femenino	15,8	84,2
BQUCH0092	Samoa	20/07/2012	69,4	3,8	18,4	2,00	g	Femenino	41,8	58,2
BQUCH0093	Samoa	26/07/2012	217,7	4,6	47,6	1,99	G	Femenino	20,8	79,2

### Continuación. Tabla I. Detalle del banco genómico.

**DO:** densidad óptica; **PG:** Picogreen; **Detalle:** G: presencia de banda genómica, g: leve presencia de banda genómica, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: gran presencia de RNA, r: leve presencia de RNA, NSO: no se observa. Todas las extracciones de ADN fueron resuspendidas en un volumen final de 100 µL.

Código	Localidad	Fecha Extracción	[ADN] ng/µL, DO	[ADN] ng/µL, PG	DO/PG	260 nm / 280 nm	Detalle	Sexo	Volumen de ADN utilizando	Volumen de ADN disponible
BQUCH0094	Samoa	30/07/2012	284,4	14,0	20,4	1,95	G	Femenino	14,2	85,8
BQUCH0095	Tonga	25/07/2012	654,6	18,2	36,0	1,97	GR	Femenino	9,7	90,3
BQUCH0096	Tonga	25/07/2012	247,3	6,3	39,4	2,01	G	Femenino	17,9	82,1
BQUCH0097	Tonga	25/07/2012	352,6	11,9	29,8	1,97	G	Femenino	13,2	86,8
BQUCH0098	Tonga	25/07/2012	479,3	31,4	15,3	1,92	GR	Femenino	10,1	89,9
BQUCH0099	Tonga	25/07/2012	451,0	9,7	46,3	1,94	GR	Femenino	12,5	87,5
BQUCH0100	Tonga	25/07/2012	584,3	32,4	18,0	2,01	GR	Femenino	9,3	90,7
BQUCH0101	Tonga	25/07/2012	388,8	17,8	21,8	2,01	GR	Femenino	11,8	88,2
BQUCH0102	Tonga	24/07/2012	257,4	12,6	20,4	1,99	Gd	Femenino	15,1	84,9
BQUCH0103	Tonga	25/07/2012	196,8	8,0	24,5	1,96	G	Femenino	18,9	81,1
BQUCH0104	Tonga	07/10/2011	120,2	7,0	17,1	1,94	g	Femenino	25,9	74,1
BQUCH0105	Tonga	24/07/2012	268,1	13,9	19,2	2,03	G	Femenino	14,6	85,4
BQUCH0106	Tonga	24/07/2012	475,1	33,0	14,4	1,97	GR	Femenino	10,1	89,9
BQUCH0107	Tonga	24/07/2012	318,0	14,1	22,5	2,01	G	Femenino	13,4	86,6
BQUCH0108	Tonga	24/07/2012	158,0	2,8	56,5	2,00	NSO	Femenino	28,4	71,6
BQUCH0109	Tonga	25/07/2012	310,0	17,3	17,9	1,98	Gdr	Femenino	13,2	86,8
BQUCH0110	Tonga	27/09/2011	514,3	33,2	15,5	1,82	G	Femenino	9,8	90,2
BQUCH0111	Tonga	24/07/2012	103,3	8,3	12,4	1,96	G	Femenino	28,0	72,0
BQUCH0112	Tonga	24/07/2012	362,5	13,6	26,7	1,99	G	Femenino	12,7	87,3
BQUCH0113	Tonga	24/07/2012	254,4	12,7	20,1	1,99	G	Femenino	15,2	84,8
BQUCH0114	Fiji	10/01/2011	740,5	25,1	29,6	1,93	SD	Femenino	8,9	91,1
BQUCH0115	Fiji	26/07/2012	640,5	24,6	26,0	2,08	Gr	Femenino	9,3	90,7
BQUCH0116	Fiji	26/07/2012	556,6	29,1	19,1	2,05	Gr	Femenino	9,6	90,4
BQUCH0117	Fiji	26/07/2012	715,4	23,5	30,5	2,07	Gr	Femenino	9,1	90,9
BQUCH0118	Taiwán	05/04/2012	157,0	1,8	85,5	2,07	gr	Femenino	34,1	65,9
BQUCH0119	Taiwán	30/03/2012	313,2	11,5	27,2	2,14	GdR	Masculino	14,0	86,0
BQUCH0120	Taiwán	30/03/2012	118,3	2,7	44,0	2,00	NSO	Masculino	33,1	66,9
BQUCH0121	Taiwán	30/03/2012	362,7	14,1	25,7	2,05	gdR	Femenino	12,6	87,4
BQUCH0122	Taiwán	05/04/2012	490,8	8,8	56,0	2,01	gd	Femenino	12,5	87,5
BQUCH0123	Taiwán	05/04/2012	394,4	5,8	67,7	2,00	gd	Masculino	15,2	84,8
BQUCH0124	Taiwán	05/04/2012	455,1	13,5	33,6	2,04	gdR	Femenino	11,6	88,4
BQUCH0125	Taiwán	05/04/2012	550,2	10,8	50,9	2,03	gDR	Masculino	11,4	88,6
BQUCH0126	Taiwán	30/03/2012	74,9	0,5	148,1	1,96	NSO	Masculino	91,0	9,0

### Continuación. Tabla I. Detalle del banco genómico.

**DO:** densidad óptica; **PG:** Picogreen; **Detalle:** G: presencia de banda genómica, g: leve presencia de banda genómica, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: gran presencia de RNA, r: leve presencia de RNA, NSO: no se observa. Todas las extracciones de ADN fueron resuspendidas en un volumen final de 100 µL.

Código	Localidad	Fecha Extracción	[ADN] ng/µL, DO	[ADN] ng/µL, PG	DO/PG	260 nm / 280 nm	Detalle	Sexo	Volumen de ADN utilizando	Volumen de ADN disponible
BQUCH0127	Taiwán	30/03/2012	114,3	4,1	27,6	2,01	D	Femenino	29,8	70,2
BQUCH0128	Taiwán	05/04/2012	197,4	5,7	34,4	2,02	gD	Masculino	20,4	79,6
BQUCH0129	Taiwán	30/03/2012	124,6	1,9	64,8	2,07	D	Masculino	36,6	63,4
BQUCH0130	Taiwán	10/01/2011	338,9	4,2	81,1	1,89	d	Masculino	18,1	81,9
BQUCH0131	Taiwán	10/01/2011	564,8	4,7	120,6	2,08	d	Masculino	14,9	85,1
BQUCH0132	Taiwán	10/01/2011	439,3	6,1	71,6	2,09	D	Femenino	14,4	85,6
BQUCH0133	Taiwán	10/01/2011	840,9	5,7	146,5	2,18	d	Masculino	12,6	87,4
BQUCH0134	Santiago	25/11/2011	400,4	5,7	69,8	1,94	G	Femenino	15,2	84,8
BQUCH0135	I. Pascua	07/10/2011	226,6	20,5	11,1	1,97	G	Femenino	15,3	84,7
BQUCH0136	Pitcairn	27/09/2011	409,1	3,0	136,7	1,93	NSO	Femenino	19,9	80,1
BQUCH0137	Taiwán	06/12/2011	1308,8	23,3	56,3	2,03	GR	Masculino	7,8	92,2
BQUCH0138	Taiwán	06/12/2011	1169,1	41,0	28,5	2,02	GR	Masculino	7,4	92,6
BQUCH0139	Taiwán	06/12/2011	1448,4	61,9	23,4	2,03	GR	Femenino	6,9	93,1
BQUCH0140	Taiwán	06/12/2011	981,9	59,8	16,4	2,04	GR	Femenino	7,5	92,5
BQUCH0141	Japón	02/08/2012	256,7	28,1	9,1	2,06	G	Masculino	13,9	86,1
BQUCH0142	Japón	02/08/2012	2538,0	301,0	8,4	2,22	GR	Femenino	5,9	94,1
BQUCH0143	Japón	02/08/2012	303,3	14,3	21,3	2,10	Gr	Masculino	13,7	86,3
BQUCH0144	Japón	02/08/2012	635,7	*	*	2,19	GR	Femenino	8,1	91,9
BQUCH0145	Japón	02/08/2012	120,4	12,3	9,8	2,00	g	Femenino	24,0	76,0
BQUCH0146	I. Pascua	21/06/2012	217,2	11,8	18,5	1,92	g	Femenino	16,8	83,2
BQUCH0147	I. Pascua	20/06/2012	307,7	26,1	11,8	1,96	G	Femenino	12,6	87,4
BQUCH0148	I. Pascua	20/06/2012	617,8	30,2	20,5	1,90	G	Femenino	9,2	90,8
BQUCH0149	I. Pascua	19/06/2012	355,3	8,9	39,8	1,61	g	Femenino	14,0	86,0
BQUCH0150	I. Pascua	19/06/2012	233,9	4,0	58,3	1,73	g	Femenino	21,0	79,0
BQUCH0151	I. Pascua	19/06/2012	156,5	9,5	16,6	1,99	GR	Femenino	21,0	79,0
BQUCH0152	I. Pascua	19/06/2012	687,6	29,0	23,7	1,61	Gr	Femenino	8,9	91,1
BQUCH0153	I. Pascua	19/06/2012	472,9	11,8	40,2	1,83	Gr	Femenino	11,8	88,2
BQUCH0154	I. Pascua	19/06/2012	479,2	5,4	88,2	1,88	Gr	Femenino	14,7	85,3
BQUCH0155	I. Pascua	20/06/2012	205,5	5,1	40,2	1,98	Gr	Femenino	20,6	79,4
BQUCH0156	I. Pascua	20/06/2012	195,8	37,4	5,2	1,97	G	Femenino	16,0	84,0
BQUCH0157	I. Pascua	21/06/2012	265,4	28,3	9,4	2,01	G	Femenino	13,6	86,4
BQUCH0158	I. Pascua	21/06/2012	169,4	18,1	9,4	2,01	G	Femenino	18,5	81,5
BQUCH0159	I. Pascua	21/06/2012	196,3	8,7	22,6	1,99	g	Femenino	18,6	81,4

### Continuación. Tabla I. Detalle del banco genómico.

**DO:** densidad óptica; **PG:** Picogreen; **Detalle:** G: presencia de banda genómica, g: leve presencia de banda genómica, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: gran presencia de RNA, r: leve presencia de RNA, NSO: no se observa. Todas las extracciones de ADN fueron resuspendidas en un volumen final de 100 µL.

Código	Localidad	Fecha Extracción	[ADN] ng/µL, DO	[ADN] ng/µL, PG	DO/PG	260 nm / 280 nm	Detalle	Sexo	Volumen de ADN utilizando	Volumen de ADN disponible
BQUCH0160	I. Pascua	21/06/2012	82,0	3,6	22,5	2,01	NSO	Femenino	37,6	62,4
BQUCH0161	Hawái	20/08/2012	469,0	50,2	9,3	2,15	GR	Femenino	9,9	90,1
BQUCH0162	Hawái	20/08/2012	181,8	4,4	41,6	2,03	g	Femenino	22,9	77,1
BQUCH0163	Hawái	20/08/2012	682,6	65,3	10,4	1,99	GR	Femenino	8,4	91,6
BQUCH0164	Hawái	20/08/2012	1502,5	113,8	13,2	2,12	GR	Femenino	6,6	93,4
BQUCH0165	Hawái	20/08/2012	924,6	132,6	7,0	1,83	GR	Masculino	7,4	92,6
BQUCH0166	Hawái	21/08/2012	1009,9	311,2	3,2	1,78	G	Masculino	7,1	92,9
BQUCH0167	Hawái	20/08/2012	67,7	3,7	18,5	2,11	g	Masculino	42,7	57,3
BQUCH0168	Hawái	20/08/2012	300,5	36,4	8,3	2,18	GR	Masculino	12,5	87,5
BQUCH0169	Hawái	21/08/2012	465,0	56,7	8,2	1,92	G	Masculino	9,8	90,2
BQUCH0170	Hawái	21/08/2012	179,4	7,4	24,1	1,81	G	Femenino	20,2	79,8
BQUCH0171	Hawái	20/08/2012	1234,7	182,5	6,8	2,11	GR	Masculino	6,8	93,2
BQUCH0172	Hawái	20/08/2012	670,5	97,0	6,9	1,88	Gr	Masculino	8,3	91,7
BQUCH0173	Hawái	20/08/2012	763,9	53,9	14,2	2,06	G	Masculino	8,2	91,8
BQUCH0174	Hawái	16/08/2012	613,5	44,5	13,8	1,95	SD	Femenino	8,9	91,1
BQUCH0176	Hawái	21/08/2012	871,6	80,9	10,8	1,99	G	Masculino	7,7	92,3
BQUCH0177	Hawái	16/08/2012	1942,0	246,8	7,9	2,03	GR	Masculino	6,2	93,8
BQUCH0178	Hawái	21/08/2012	454,3	2,2	204,4	1,94	NSO	Femenino	22,9	77,1
BQUCH0179	Hawái	27/08/2012	926,0	37,1	24,9	1,99	Gr	Femenino	8,0	92,0
BQUCH0180	Hawái	27/08/2012	278,3	7,9	35,4	2,07	Gr	Femenino	16,0	84,0
BQUCH0181	Hawái	16/08/2012	270,0	20,9	12,9	2,05	GR	Femenino	13,8	86,2
BQUCH0182	Hawái	27/08/2012	1162,6	28,7	40,5	2,05	GR	Femenino	7,8	92,2
BQUCH0183	Hawái	27/08/2012	243,8	5,2	47,2	1,97	NSO	Masculino	19,0	81,0
BQUCH0184	Hawái	16/08/2012	821,5	84,2	9,8	2,05	GR	Femenino	7,8	92,2
BQUCH0185	Hawái	27/08/2012	165,7	8,3	19,9	1,95	g	Masculino	20,7	79,3
BQUCH0186	Hawái	27/08/2012	202,4	79,7	2,5	1,97	G	Masculino	15,3	84,7
BQUCH0187	Hawái	21/08/2012	215,4	83,5	2,6	1,92	G	Femenino	14,6	85,4
BQUCH0188	Hawái	21/08/2012	116,2	12,9	9,0	1,80	G	Femenino	24,5	75,5
BQUCH0189	Hawái	27/08/2012	321,4	24,2	13,3	1,98	G	Masculino	12,5	87,5
BQUCH0190	Hawái	21/08/2012	278,9	38,7	7,2	1,94	Gr	Femenino	12,9	87,1
BQUCH0191	Hawái	21/08/2012	153,9	7,6	20,4	2,06	Gr	Masculino	22,0	78,0
BQUCH0192	Hawái	21/08/2012	805,2	3,1	257,4	2,12	GR	Masculino	17,1	82,9
BQUCH0193	Hawái	27/08/2012	638,4	34,8	18,4	2,07	GR	Femenino	9,0	91,0

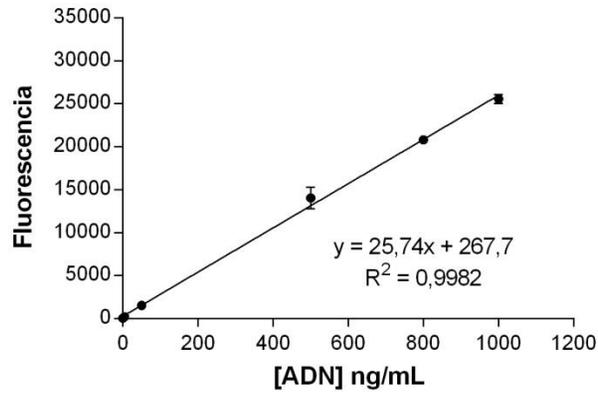
### Continuación. Tabla I. Detalle del banco genómico.

**DO:** densidad óptica; **PG:** Picogreen; **Detalle:** G: presencia de banda genómica, g: leve presencia de banda genómica, D: alto porcentaje de degradación, d: leve porcentaje de degradación, R: gran presencia de RNA, r: leve presencia de RNA, NSO: no se observa. Todas las extracciones de ADN fueron resuspendidas en un volumen final de 100 µL.

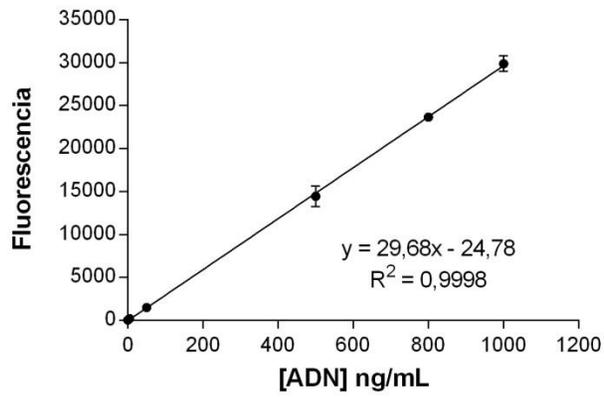
Código	Localidad	Fecha Extracción	[ADN] ng/µL, DO	[ADN] ng/µL, PG	DO/PG	260 nm / 280 nm	Detalle	Sexo	Volumen de ADN utilizando	Volumen de ADN disponible
BQUCH0194	Hawái	16/08/2012	282,0	14,3	19,8	1,77	GR	Masculino	14,2	85,8
BQUCH0195	Hawái	16/08/2012	472,0	24,5	19,3	1,72	Gr	Femenino	10,5	89,5
BQUCH0201	Vietnam	30/10/2012	453,0	7,4	61,1	1,94	Gr	Masculino	13,5	86,5
BQUCH0202	Vietnam	30/10/2012	1262,0	307,8	4,1	1,66	Gr	Femenino	6,7	93,3
BQUCH0203	Vietnam	30/10/2012	610,5	12,2	49,9	1,94	Gr	Masculino	10,7	89,3
BQUCH0204	Vietnam	30/10/2012	1361,0	167,1	8,1	1,95	Gr	Masculino	6,6	93,4
BQUCH0204d	Vietnam	31/10/2012	1222,0	140,7	8,7	1,97	GR	Masculino	6,8	93,2
BQUCH0205	Vietnam	30/10/2012	1290,0	123,9	10,4	1,89	Gr	Femenino	6,8	93,2
BQUCH0208	I. Pascua	03/01/2013	517,1	70,0	7,4	2,07	GR	Femenino	9,3	90,7
BQUCH0208d	I. Pascua	04/01/2013	518,1	81,4	6,4	2,14	GR	Femenino	9,2	90,8
BQUCH0209	I. Pascua	03/01/2013	363,5	36,8	9,9	2,07	GR	Femenino	11,3	88,7
BQUCH0210	I. Pascua	27/12/2012	91,4	3,7	24,6	1,52	g	Femenino	34,9	65,1
BQUCH0211	I. Pascua	27/12/2012	312,4	21,4	14,6	1,94	G	Femenino	12,8	87,2
BQUCH0212	I. Pascua	03/01/2013	88,6	5,2	16,9	2,00	GR	Femenino	33,3	66,7
BQUCH0213	I. Pascua	03/01/2013	164,7	10,6	15,6	2,05	GR	Femenino	20,0	80,0
BQUCH0214	I. Pascua	27/12/2012	139,9	1,2	121,0	1,89	NSO	Femenino	45,2	54,8
BQUCH0215	I. Pascua	27/12/2012	222,0	7,9	28,0	1,88	G	Femenino	17,8	82,2
BQUCH0216	I. Pascua	19/12/2012	182,9	8,2	22,2	1,98	GR	Femenino	19,6	80,4
BQUCH0217	I. Pascua	19/12/2012	154,5	7,4	20,8	2,03	GR	Femenino	22,0	78,0
BQUCH0218	I. Pascua	19/12/2012	396,4	61,5	6,4	2,06	Gr	Femenino	10,5	89,5
BQUCH0219	I. Pascua	19/12/2012	625,0	48,5	12,9	2,11	GR	Femenino	8,8	91,2
BQUCH0220	I. Pascua	19/12/2012	162,9	18,4	8,9	1,92	GR	Femenino	18,9	81,1
BQUCH0221	I. Pascua	19/12/2012	290,7	35,7	8,2	2,08	G	Femenino	12,7	87,3
BQUCH0222	I. Pascua	19/12/2012	278,6	24,1	11,6	2,12	G	Femenino	13,4	86,6
BQUCH0223	I. Pascua	19/12/2012	238,0	25,0	9,5	2,07	G	Femenino	14,6	85,4
BQUCH0224	I. Pascua	19/12/2012	100,5	10,3	9,7	2,13	GR	Femenino	27,8	72,2
BQUCH0225	I. Pascua	19/12/2012	228,2	16,6	13,7	2,12	G	Femenino	15,6	84,4
BQUCH0226	I. Pascua	03/01/2013	476,8	47,9	9,9	2,05	GR	Femenino	9,8	90,2
BQUCH0233	Marquesas	03/01/2013	196,9	24,4	8,1	2,03	Gr	Femenino	16,4	83,6
BQUCH0234	Marquesas	03/01/2013	841,4	103,1	8,2	2,11	GdR	Femenino	7,7	92,3

Anexo 3. Curvas de calibración utilizadas en la cuantificación con Picogreen.

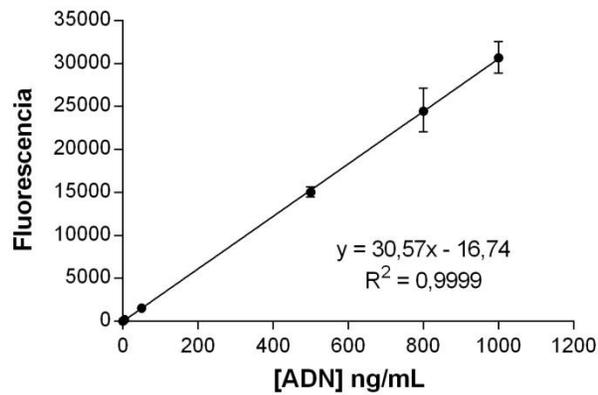
Curva de calibración 1



Curva de calibración 2

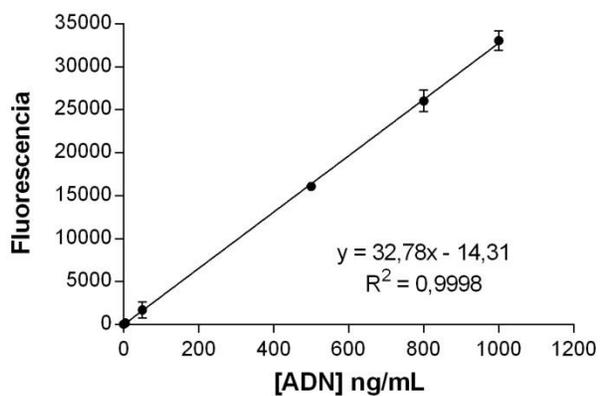


Curva de calibración 3

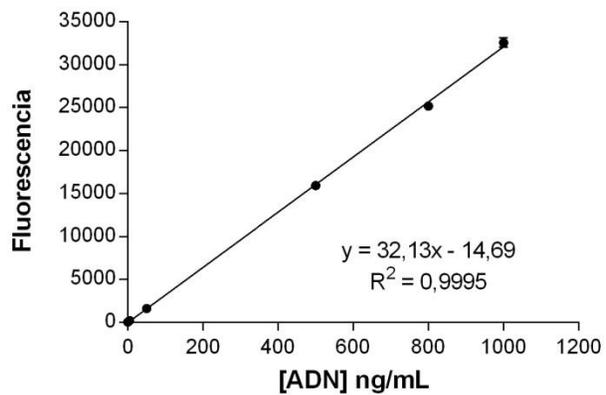


Continuación. Curvas de calibración utilizadas en la cuantificación con Picogreen.

**Curva de calibración 4**



**Curva de calibración 5**



**Anexo 4. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación.**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó, : dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0001	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0002	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0003	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0004	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0005	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0006	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	NA	NA	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0007	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0009	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0010	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0011	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0012	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0013	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0014	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0015	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0023	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0024	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	209	199	199	196	201	112	112
BQUCH0027	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0028	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0029	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0030	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0031	I. Pascua	248	248	221	229	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0032	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	209	199	199	196	201	112	112

**Continuación. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó,  : dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0033	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0035	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0036	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	209	199	199	196	201	112	112
BQUCH0037	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0038	I. Pascua	248	248	223	227	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0040	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	200	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0041	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0042	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	272	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0043	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0045	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0046	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0047	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0048	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	NA	NA	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0049	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0050	Marquesas	248	248	221	221	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	NA	NA	260	268	NA	NA	NA	NA	199	199	196	201	NA	NA
BQUCH0051	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0056	Tahití	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	272	NA	NA	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0058	Tahití	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0059	Hawái	248	250	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0060	Pitcairn	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	NA	NA	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0063	Raiatea	248	248	221	227	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112

**Continuación. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó, : dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0064	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	140	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	144
BQUCH0065	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0066	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0067	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	270	NA	NA	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0068	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	270	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0069	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	NA	NA	NA	NA	199	199	196	199	112	112
BQUCH0074	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	114	114
BQUCH0075	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0077	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0082	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	207	199	199	196	199	112	112
BQUCH0083	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	207	199	199	196	199	112	112
BQUCH0084	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	207	199	199	196	199	112	112
BQUCH0085	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	207	199	199	196	199	112	112
BQUCH0086	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	NA	NA	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0087	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0088	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0089	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0090	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0091	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0092	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0093	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112

**Continuación. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó,  : dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0094	Samoa	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0095	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0096	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0097	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0098	Tonga	248	248	223	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0099	Tonga	248	250	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0100	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	NA	NA	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	197	203	199	199	196	201	112	112
BQUCH0101	Tonga	248	250	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0102	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0103	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0104	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0105	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0106	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0107	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	201	196	201	112	112
BQUCH0108	Tonga	248	248	217	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	NA	NA	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0109	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0110	Tonga	248	248	221	229	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0111	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0112	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0113	Tonga	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0114	Fiji	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	NA	NA	NA	NA	199	199	196	201	112	112
BQUCH0115	Fiji	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112

**Continuación. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó,  : dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0116	Fiji	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0117	Fiji	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0118	Taiwán	248	252	211	239	207	211	242	243	233	233	168	168	99	105	151	151	240	240	262	264	223	223	192	192	205	215	201	201	110	110
BQUCH0119	Taiwán	248	248	207	231	211	211	245	245	229	229	168	168	105	105	151	151	236	236	260	266	220	223	194	194	199	199	196	209	126	126
BQUCH0120	Taiwán	248	267	211	211	207	211	242	242	229	233	178	187	97	101	151	155	236	236	248	260	NA	NA	211	230	199	211	196	203	108	108
BQUCH0121	Taiwán	248	248	213	221	207	211	245	245	229	229	168	168	97	105	151	165	240	240	248	248	223	223	216	222	199	211	201	201	112	112
BQUCH0122	Taiwán	248	257	219	237	207	212	242	245	221	229	168	178	87	101	151	151	236	240	248	270	220	220	222	224	199	205	196	196	108	112
BQUCH0123	Taiwán	248	248	219	227	207	211	242	245	233	233	168	168	97	101	151	161	236	240	246	260	220	223	192	194	199	199	196	209	112	112
BQUCH0124	Taiwán	248	251	219	225	211	211	242	245	229	229	168	187	105	105	149	151	240	240	248	256	223	226	192	217	201	213	199	201	114	114
BQUCH0125	Taiwán	248	248	219	221	207	211	242	245	233	233	168	168	103	107	151	151	240	240	264	266	220	223	192	192	199	201	201	203	125	128
BQUCH0126	Taiwán	248	250	219	243	211	211	243	243	229	229	168	168	97	105	151	151	236	236	246	254	NA	NA	NA	NA	201	215	196	209	NA	NA
BQUCH0127	Taiwán	248	248	219	219	207	207	245	245	233	233	168	178	105	105	151	151	236	240	258	262	220	223	194	211	199	199	201	201	116	116
BQUCH0128	Taiwán	248	248	207	211	207	207	245	245	233	233	168	168	97	99	161	171	236	240	262	262	220	220	192	192	201	205	196	209	110	110
BQUCH0129	Taiwán	248	265	211	225	211	211	242	245	229	229	168	168	97	97	151	151	240	240	252	260	NA	NA	192	192	199	201	201	209	110	110
BQUCH0130	Taiwán	250	267	221	235	207	207	243	245	221	229	168	189	103	105	151	151	236	240	258	266	NA	NA	192	192	215	215	196	203	110	110
BQUCH0131	Taiwán	248	248	225	225	207	211	242	245	229	233	178	189	89	103	151	161	236	240	268	268	220	223	176	196	201	215	196	209	110	110
BQUCH0132	Taiwán	248	269	221	229	208	211	242	245	229	229	176	178	93	105	151	151	236	236	247	247	223	223	192	205	203	203	196	196	102	102
BQUCH0133	Taiwán	248	279	207	215	207	211	245	245	229	233	178	189	97	97	151	151	236	240	246	268	223	223	192	226	203	203	196	203	102	110
BQUCH0134	Santiago	232	232	215	227	207	209	246	246	224	224	168	172	87	87	149	153	236	239	244	266	222	223	197	197	215	215	201	201	114	142
BQUCH0135	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0136	Pitcairn	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0137	Taiwán	248	248	219	231	211	211	242	243	229	229	168	178	101	101	151	151	236	236	260	264	220	226	192	194	199	201	196	209	114	116

**Continuación. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó,  : dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0138	Taiwán	248	248	219	231	211	211	242	243	229	229	168	178	101	101	151	151	236	236	260	264	220	226	192	194	199	201	196	209	114	116
BQUCH0139	Taiwán	248	248	227	233	211	211	245	245	229	233	168	189	62	97	151	151	237	240	260	268	220	226	192	192	199	213	196	201	112	114
BQUCH0140	Taiwán	248	249	211	233	211	211	243	243	221	233	168	170	97	99	151	151	240	240	260	264	220	220	192	192	215	215	201	201	110	112
BQUCH0141	Japón	283	283	227	227	207	207	241	241	229	229	168	168	105	105	161	161	236	236	246	250	223	223	201	201	197	199	196	203	131	167
BQUCH0142	Japón	283	283	221	227	207	207	241	241	229	229	168	168	97	97	161	161	236	236	246	252	223	223	201	201	197	197	196	196	131	131
BQUCH0143	Japón	283	283	227	227	207	207	241	241	229	229	168	168	97	105	161	161	236	239	250	274	223	223	201	203	197	199	196	203	119	133
BQUCH0144	Japón	283	283	227	227	207	207	241	241	229	229	168	168	97	105	161	165	236	236	246	250	223	223	201	201	199	199	196	196	119	119
BQUCH0145	Japón	200	287	221	227	207	207	241	241	229	229	168	168	97	105	161	161	236	236	250	250	220	223	203	203	197	199	196	203	131	131
BQUCH0146	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0147	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0148	I. Pascua	NA	NA	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0149	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0150	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0151	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0152	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0153	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0154	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0155	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0156	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0157	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	NA	NA	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0158	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0159	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112

**Continuación. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó,  : dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0160	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0161	Hawái	246	248	225	227	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0162	Hawái	246	248	225	227	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0163	Hawái	246	248	225	227	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0164	Hawái	246	248	225	227	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0165	Hawái	279	279	221	225	207	211	240	245	229	232	158	166	87	99	140	183	239	239	250	254	223	223	190	217	223	223	201	201	108	108
BQUCH0166	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	131
BQUCH0167	Hawái	279	279	221	225	207	211	240	245	229	232	158	166	87	99	140	183	239	239	250	254	223	223	190	217	223	223	201	201	108	108
BQUCH0168	Hawái	279	279	221	225	207	211	240	245	229	232	158	166	87	99	140	183	239	239	250	254	223	223	190	217	223	223	201	201	108	108
BQUCH0169	Hawái	279	279	221	225	207	211	240	245	229	232	158	166	87	99	140	183	239	239	250	254	223	223	190	217	223	223	201	201	108	108
BQUCH0170	Hawái	246	248	225	227	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	268	NA	NA	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0171	Hawái	279	279	221	225	207	211	240	245	229	232	158	166	87	99	140	183	239	239	250	254	223	223	190	217	223	223	201	201	108	108
BQUCH0172	Hawái	279	279	221	225	207	211	240	245	229	232	158	166	87	99	140	183	239	239	250	254	223	223	190	217	223	223	201	201	108	108
BQUCH0173	Hawái	279	279	221	225	207	211	240	245	229	232	158	166	87	99	140	183	239	239	250	254	223	223	203	205	223	223	201	201	108	108
BQUCH0174	Hawái	246	248	225	227	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	190	217	199	199	196	199	112	112
BQUCH0176	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	144
BQUCH0177	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	144
BQUCH0178	Hawái	NA	NA	221	225	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	270	NA	NA	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0179	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	270	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0180	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0181	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0182	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112

**Continuación. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó,  dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0183	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	131
BQUCH0184	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0185	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	144
BQUCH0186	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	203	205	223	225	201	201	108	131
BQUCH0187	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	190	217	199	199	196	201	112	112
BQUCH0188	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0189	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	144
BQUCH0190	Hawái	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0191	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	144
BQUCH0192	Hawái	279	279	221	225	207	211	239	245	232	232	158	166	87	101	140	183	239	239	250	256	223	223	190	217	223	225	201	201	108	144
BQUCH0193	Hawái	246	248	225	227	207	211	245	245	229	233	168	178	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	199	112	112
BQUCH0194	Hawái	279	279	221	225	207	211	240	245	229	232	158	166	87	99	140	183	239	239	250	254	223	223	190	217	223	223	201	201	108	108
BQUCH0195	Hawái	248	248	223	225	207	211	245	245	229	233	168	191	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0201	Vietnam	224	245	215	215	206	206	239	240	229	229	168	170	83	97	144	151	236	242	248	264	220	240	195	197	201	201	203	203	163	163
BQUCH0202	Vietnam	279	287	213	213	209	209	240	245	166	168	166	168	74	93	175	181	236	236	248	258	220	222	226	244	201	201	201	201	118	118
BQUCH0203	Vietnam	293	293	213	219	206	209	239	240	225	225	166	168	83	83	151	151	239	242	239	248	220	223	196	198	201	201	201	201	122	151
BQUCH0204	Vietnam	287	287	205	213	206	209	239	245	229	229	166	168	101	101	149	194	240	242	248	250	220	220	192	194	213	233	201	201	142	175
BQUCH0205	Vietnam	287	287	213	213	208	209	240	242	229	229	168	168	97	97	151	151	240	240	248	258	220	220	196	200	201	201	201	201	153	153
BQUCH0208	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0209	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0210	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	266	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0211	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112

**Continuación. Tabla II. Detalle de alelos encontrados en la genotipificación**

\*A1: alelo 1; A2: alelo 2, NA: no amplificó,  : dato eliminado del análisis estadístico.

Código de Muestra	Localidad	Bro07		Bro08		Bro10		Bro13		Bro15		Bropap_02801		Bropap_16591		Bropap_20939		Bropap_20558		Bropap_02214		Bropap_23758		Bropap_25444		Bropap_26773		Bropap_26985		Bropap_30248	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2								
BQUCH0212	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0213	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0214	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	NA	NA	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0215	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0216	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0217	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0218	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0219	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0220	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0221	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	266	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0222	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0223	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0224	I. Pascua	248	248	221	225	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	270	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0225	I. Pascua	248	248	223	227	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0226	I. Pascua	248	248	223	227	207	211	245	245	229	233	168	189	89	93	151	151	236	240	262	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0233	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112
BQUCH0234	Marquesas	248	248	221	225	207	211	245	245	229	240	168	189	89	93	151	151	236	240	260	268	223	223	203	205	199	199	196	201	112	112

### Anexo 5. Tabla III. Detalle del análisis de diversidad genética.

N: tamaño de muestra, Go: genotipos observados, PLP: porcentaje de loci polimórficos, Na: número de alelos, Ne: número de alelos efectivos, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, F, índice de fijación, p: valor de significancia (\* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001), MM: monomórfico.

Localidad	Locus	N	Go	Na	Ne	Ho	He	F	p
Taiwán	Bro07	19	10	10,000	1,814	0,474	0,449	-0,056	0,818
	Bro08	19	18	14,000	8,805	0,842	0,886	0,050	0,173
	Bro10	19	5	4,000	2,117	0,474	0,528	0,102	0,345
	Bro13	19	6	3,000	2,490	0,579	0,598	0,032	0,331
	Bro15	19	5	3,000	2,278	0,368	0,561	0,343	0,094
	Bropap_02801	19	8	6,000	2,533	0,632	0,605	-0,043	0,775
	Bropap_16591	19	13	10,000	5,309	0,632	0,812	0,222	0,042
	Bropap_20939	19	6	6,000	1,483	0,316	0,325	0,030	0,458
	Bropap_20558	19	4	3,000	2,093	0,421	0,522	0,194	0,219
	Bropap_02214	19	17	12,000	8,494	0,789	0,882	0,105	0,007
	Bropap_25444	19	11	12,000	3,195	0,579	0,687	0,157	0,096
	Bropap_26773	19	11	7,000	4,599	0,632	0,783	0,193	0,013
	Bropap_26985	19	8	5,000	3,557	0,684	0,719	0,048	0,402
	Bropap_30248	19	13	9,000	5,597	0,368	0,821	0,551	0,000
Japón	Bro07	5	2	3,000	1,515	0,200	0,340	0,412	0,111
	Bro08	5	2	2,000	1,471	0,400	0,320	-0,250	1,000
	Bro10	5	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro13	5	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro15	5	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_02801	5	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_16591	5	3	2,000	2,000	0,600	0,500	-0,200	0,873
	Bropap_20939	5	2	2,000	1,220	0,200	0,180	-0,111	0,804
	Bropap_20558	5	2	2,000	1,220	0,200	0,180	-0,111	0,804
	Bropap_02214	5	4	4,000	2,778	0,800	0,640	-0,250	0,873
	Bropap_25444	5	3	2,000	1,724	0,200	0,420	0,524	0,333
	Bropap_26773	5	3	2,000	2,000	0,600	0,500	-0,200	0,873
	Bropap_26985	5	2	2,000	1,724	0,600	0,420	-0,429	1,000
	Bropap_30248	5	4	4,000	2,778	0,400	0,640	0,375	0,143
Vietnam	Bro07	5	4	5,000	3,125	0,400	0,680	0,412	0,048
	Bro08	5	4	4,000	2,381	0,400	0,580	0,310	0,111
	Bro10	5	4	3,000	2,381	0,600	0,580	-0,034	0,619
	Bro13	5	4	4,000	3,333	1,000	0,700	-0,429	1,000
	Bro15	5	3	4,000	2,381	0,200	0,580	0,655	0,016
	Bropap_02801	5	3	3,000	2,174	0,800	0,540	-0,481	1,000
	Bropap_16591	5	5	5,000	4,167	0,400	0,760	0,474	0,024
	Bropap_20939	5	4	6,000	3,333	0,600	0,700	0,143	0,234
	Bropap_20558	5	5	4,000	3,571	0,600	0,720	0,167	0,257
	Bropap_02214	5	4	5,000	3,125	1,000	0,680	-0,471	1,000
	Bropap_25444	5	5	9,000	8,333	1,000	0,880	-0,136	1,000
	Bropap_26773	5	2	3,000	1,515	0,200	0,340	0,412	0,111
	Bropap_26985	5	2	2,000	1,471	0,000	0,320	1,000	0,111
	Bropap_30248	5	5	7,000	6,250	0,400	0,840	0,524	0,001

**Continuación. Tabla III. Detalle del análisis de diversidad genética.**

*N*: tamaño de muestra, *Go*: genotipos observados, *PLP*: porcentaje de loci polimórficos, *Na*: número de alelos, *Ne*: número de alelos efectivos, *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada, *F*, índice de fijación, *p*: valor de significancia (\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ), MM: monomórfico.

Localidad	Locus	<i>N</i>	<i>Go</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Isla de Pascua	Bro07	60	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro08	60	3	5,000	2,249	1,000	0,555	-0,801	0,000
	Bro10	60	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bro13	60	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro15	60	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_02801	60	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_16591	60	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_20939	60	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_20558	60	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_02214	60	3	4,000	2,769	1,000	0,639	-0,565	0,000
	Bropap_25444	60	2	3,000	2,100	1,000	0,524	-0,909	0,000
	Bropap_26773	60	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_26985	60	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
Bropap_30248	60	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM		
Marquesas	Bro07	12	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro08	12	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,001
	Bro10	12	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,001
	Bro13	12	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro15	12	2	3,000	2,462	1,000	0,594	-0,684	0,007
	Bropap_02801	12	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,001
	Bropap_16591	12	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,001
	Bropap_20939	12	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_20558	12	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,001
	Bropap_02214	12	3	4,000	2,717	1,000	0,632	-0,582	0,005
	Bropap_25444	12	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,001
	Bropap_26773	12	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_26985	12	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,001
Bropap_30248	12	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM		
Tahiti	Bro07	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro08	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bro10	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bro13	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro15	2	2	3,000	2,667	1,000	0,625	-0,600	0,572
	Bropap_02801	2	2	3,000	2,667	1,000	0,625	-0,600	0,572
	Bropap_16591	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_20939	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_20558	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_02214	2	2	4,000	4,000	1,000	0,750	-0,333	0,423
	Bropap_25444	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_26773	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_26985	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
Bropap_30248	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM		

**Continuación. Tabla III. Detalle del análisis de diversidad genética.**

*N*: tamaño de muestra, *Go*: genotipos observados, *PLP*: porcentaje de loci polimórficos, *Na*: número de alelos, *Ne*: número de alelos efectivos, *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada, *F*, índice de fijación, *p*: valor de significancia (\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ). MM: monomórfico.

Localidad	Locus	<i>N</i>	<i>Go</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Pitcairn	Bro07	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro08	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bro10	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bro13	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro15	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_02801	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_16591	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_20939	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_20558	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_02214	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_25444	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_26773	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_26985	2	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,157
	Bropap_30248	2	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
Hawái	Bro07	37	4	4,000	2,438	0,216	0,590	0,633	0,000
	Bro08	37	3	4,000	2,423	1,000	0,587	-0,703	0,000
	Bro10	37	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bro13	37	3	3,000	1,659	0,486	0,397	-0,224	0,281
	Bro15	37	4	4,000	3,233	0,730	0,691	-0,057	0,000
	Bropap_02801	37	4	6,000	4,729	1,000	0,789	-0,268	0,000
	Bropap_16591	37	3	5,000	4,526	1,000	0,779	-0,284	0,000
	Bropap_20939	37	3	3,000	2,615	0,459	0,618	0,256	0,000
	Bropap_20558	37	2	3,000	2,714	0,514	0,631	0,187	0,000
	Bropap_02214	37	5	7,000	4,812	1,000	0,792	-0,262	0,000
	Bropap_25444	37	2	4,000	3,997	1,000	0,750	-0,334	0,000
	Bropap_26773	37	3	3,000	2,467	0,270	0,595	0,545	0,000
	Bropap_26985	37	3	3,000	2,079	0,514	0,519	0,011	0,000
	Bropap_30248	37	4	4,000	2,514	0,270	0,602	0,551	0,000
Samoa	Bro07	17	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro08	17	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bro10	17	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bro13	17	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro15	17	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_02801	17	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_16591	17	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_20939	17	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_20558	17	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_02214	17	2	3,000	2,232	1,000	0,552	-0,812	0,001
	Bropap_25444	17	2	3,000	2,439	1,000	0,590	-0,695	0,001
	Bropap_26773	17	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_26985	17	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_30248	17	2	2,000	1,125	0,000	0,111	1,000	0,000

**Continuación. Tabla III. Detalle del análisis de diversidad genética.**

*N*: tamaño de muestra, *Go*: genotipos observados, *PLP*: porcentaje de loci polimórficos, *Na*: número de alelos, *Ne*: número de alelos efectivos, *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada, *F*, índice de fijación, *p*: valor de significancia (\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ). MM: monomórfico.

Localidad	Locus	<i>N</i>	<i>Go</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tonga	Bro07	18	2	2,000	1,117	0,111	0,105	-0,059	0,803
	Bro08	18	4	5,000	2,365	1,000	0,577	-0,733	0,051
	Bro10	18	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bro13	18	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro15	18	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_02801	18	2	3,000	2,111	1,000	0,526	-0,900	0,000
	Bropap_16591	18	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_20939	18	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_20558	18	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_02214	18	2	3,000	2,111	1,000	0,526	-0,900	0,000
	Bropap_25444	18	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_26773	18	2	2,000	1,057	0,056	0,054	-0,029	0,904
	Bropap_26985	18	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,000
	Bropap_30248	18	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
Fiji	Bro07	3	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro08	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bro10	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bro13	3	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bro15	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bropap_02801	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bropap_16591	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bropap_20939	3	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_20558	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bropap_02214	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bropap_25444	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bropap_26773	3	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	
	Bropap_26985	3	1	2,000	2,000	1,000	0,500	-1,000	0,083
	Bropap_30248	3	1	1,000	1,000	0,000	0,000	MM	

**Anexo 6. Tabla IV. Detalle análisis multilocus.**

Incremento en la combinación de los Loci	Muestras con coincidencia de genotipo	Muestras con genotipo único	Probabilidad de Identidad		
			Taiwán	Japón	Vietnam
Bro08	9	20	2,3E-02	5,1E-01	2,2E-01
+ Bropap_02214	6	23	5,7E-04	9,7E-02	3,1E-02
+ Bropap_30248	2	27	3,0E-05	1,8E-02	1,4E-03
+ Bropap_16591	2	27	1,8E-06	6,8E-03	1,4E-04
+ Bropap_25444	2	27	2,1E-07	2,9E-03	3,7E-06
+ Bropap_26773	2	27	1,6E-08	1,1E-03	1,7E-06
+ Bro07	2	27	4,9E-09	5,0E-04	2,4E-07
+ Bropap_26985	2	27	6,3E-10	2,1E-04	1,2E-07
+ Bropap_02801	2	27	1,2E-10	2,1E-04	3,5E-08
+ Bropap_20939	2	27	5,8E-11	1,5E-04	4,1E-09
+ Bro13	2	27	1,4E-11	1,5E-04	5,9E-10
+ Bro10	2	27	4,3E-12	1,5E-04	1,6E-10
+ Bropap_20558	2	27	1,5E-12	1,0E-04	2,1E-11
+ Bro15	2	27	4,2E-13	1,0E-04	4,6E-12