

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE TEXTILES ETNOGRÁFICOS (TAPA)
ANTIGUOS ELABORADOS A PARTIR DE FIBRA
VEGETAL USANDO DIFERENTES MARCADORES
MOLECULARES**

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:

BÁRBARA PEÑA AHUMADA

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

SANTIAGO – CHILE

Enero 2017

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 la candidata

BÁRBARA PEÑA AHUMADA

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización en 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:

Dra. Ximena Moncada Rodríguez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela

Dra. Carla Delporte Vergara

Dr. Patricio Hinrichsen Ramírez

LUGAR DE REALIZACIÓN

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

- Ancient DNA laboratory
Anatomy Department
University of Otago
Dunedin, Nueva Zelanda

FINANCIAMIENTO

- Proyecto FONDECYT 1120175.
- Ayuda de estancias cortas de investigación en el extranjero, año académico 2015.
Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Departamento de Postgrado y Postítulo,
Universidad de Chile.

A la fecha, esta tesis ha dado origen a las siguientes comunicaciones:

- **B. Peña, O. Kardailsky, C. Payacán, E. Matisoo-Smith, X. Moncada, D. Seelenfreund, A. Seelenfreund.**

Caracterización genética de textiles etnográficos antiguos provenientes de Oceanía elaborados a partir de fibra vegetal usando marcadores moleculares.

Panel presentado en el XVI Congreso Latinoamericano de Genética.

Montevideo, Uruguay. 9-12 Octubre 2016.

- **B. Peña.**

Identificación y caracterización genética de textiles etnográficos (*tapa*) antiguos elaborados a partir de fibra vegetal usando diferentes marcadores moleculares.

Comunicación oral en el XXXIII Congreso de la Asociación Nacional de Estudiantes de Bioquímica (ANEB).

Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 3 de Agosto, 2016

Esta tesis ha dado origen a la siguiente publicación:

Seelenfreund, A., Sepúlveda, M., Petchey, F., **Peña-Ahumada, B.**, Payacán, C., Gutiérrez, S., Cárcamo, J., Kardailsky, O., Moncada, X., Rojas, A.M., Moraga, M., Matisoo-Smith, E., Seelenfreund, A. (2016). **Characterization of an archaeological decorated bark cloth from Agakautai Island, Gambier archipelago, French Polynesia.** *Journal of Archaeological Science*, 76, 56-69.

“Con la investigación, el hombre disputa palmo a palmo el territorio de la naturaleza a lo ignoto, pero no conocemos el destino de esa lucha. (..) Pero hay una faceta extraordinaria de esta <lucha con lo ignoto> que ya podemos reconocer y afirmar: el hecho mismo que esta lucha es posible. Es de por sí sorprendente, de hecho, el fenómeno de esta capacidad que tenemos de comprender la realidad natural y desvelar al menos alguno de sus secretos”

M. Bersanelli & M. Gargantini.
Solo el asombro conoce (2003)

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a mi padre, su inteligencia y mirada sobre las cosas fueron lo que desde pequeña despertó mi pasión por entender el mundo y su funcionamiento, planteando en mí las primeras preguntas de mi vida. A mi madre, porque a un ejemplo de mujer más fuerte y certera no he conocido jamás. Estas cualidades por casi 25 años han forjado mi personalidad y carácter, pero por sobre todo, me hacen lo que hoy soy.

A las personas que me acompañaron en el inicio de este camino, cuando debía decidir que estudiar, en especial a Marco Aleo y Valeska Cabañas. El descubrimiento y la certeza de mi corazón se lo debo en gran parte a ustedes, y sin esto, quizás en donde estaría. A Daniel González, Byron Verdejo, Mariana Pasten, María José Sillano, Cristina Galeno, Lorenzo Locatelli y tantos más que durante estos años de universidad me acompañaron. Han sido el punto firme entre las olas del mar.

A los amigos de la universidad, con los cuales recorrí gran parte de estos siete años como estudiante. A Constanza Morgado, Sebastián Gutiérrez, Ariel Toledo, Paulina Villar, Daniela Herrera, Rodrigo Osorio, Lissette Colomer y Felipe González, por compartir esta pasión por lo que estudiamos y por todos los momentos juntos estudiando y también por todos los carreteados. Es un privilegio haber pasado estos años juntos y vernos crecer.

A mis directoras de tesis, la Dra. Daniela Seelenfreund y Dra. Ximena Moncada, y a la jefa del proyecto, la Dra. Andrea Seelenfreund. Estos dos años de tesis han sido los de mayor formación y maduración de la carrera, y les agradezco toda la dedicación, confianza y la apuesta que han hecho por mí. Agradezco esas largas conversaciones en las que discutíamos los resultados y el curso de ésta a veces incierta tesis, y también aquellas otras en las que hablábamos de lo que pasaba fuera de la tesis y del laboratorio. Le agradezco también al Dr. Sergio Lobos, por permitirme ser su ayudante, y por todo su apoyo en este proceso.

A la Dra. Elizabeth Matisoo-Smith, quien abrió las puertas de su laboratorio para que realizara uno de los objetivos fundamentales de esta tesis, y a Olga Kardailsky, que tuvo la paciencia de enseñarme a trabajar en un laboratorio de ADN antiguo cuando yo apenas comenzaba a balbucear el inglés.

A Claudia Payacán, Gabriela Olivares y Gerardo Silva por todos los momentos compartidos en el laboratorio, por los viajes, asados y cumpleaños celebrados. Me refiero en especial a Claudia Payacán, por compartir toda su experiencia en el trabajo de laboratorio con muestras antiguas y porque junto con Gabriela Olivares, contribuyó enormemente que finalmente realizara la tesis en el laboratorio. Y también a Mónica, Eliseo y Elías, por celebrar conmigo los resultados de los últimos experimentos y por la compañía de estos meses.

Por último, agradezco a todas las instituciones que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta tesis: a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, al Laboratorio de Microbiología de la facultad que me permitió trabajar en sus mesones durante mis primeros meses de tesis, a la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile por otorgarme la beca de estadía en el extranjero y darme la oportunidad de tener una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida y a la Universidad de Otago, por abrirme sus puertas.

Índice General

Índice General	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas.....	vi
Resumen.....	viii
Summary: Identification and genetic characterization of ancient ethnographic bark cloth textiles (<i>tapa</i>) made from plant fibers using different molecular markers.....	x
1 Introducción.....	1
1.1 El rescate de la historia a través del estudio de ADN antiguo.	2
1.2 Marcadores moleculares para la caracterización de ADN antiguo.....	3
1.3 Estudios genéticos involucrados en la reconstrucción del Poblamiento de Oceanía.	5
1.4 <i>Broussonetia papyrifera</i> como modelo comensal y su relevancia cultural en el Pacífico.....	7
1.5 Estudios genéticos realizados en <i>Broussonetia papyrifera</i>	10
1.6 Estudio de piezas de <i>tapa</i> antigua como fuente de ADN para el estudio de poblaciones antiguas de <i>B. papyrifera</i>	11
2 Hipótesis.....	14
3 Objetivos	14
3.1 Objetivo General.	14
3.2 Objetivos Específicos.	14
4 Materiales y Métodos.....	15
4.1 Materiales.....	15
4.1.1 Reactivos e insumos generales.	15
4.1.2 Soluciones y Amortiguadores.....	15
4.1.3 Equipos.	16
4.1.4 Material Biológico.....	16
4.1.4.1 Material de <i>tapa</i> de prueba.	16
4.1.4.2 Material de textiles etnográficos y arqueológicos.....	16
S.I.: sin información.....	18
4.1.4.3 Material de herbario antiguo.....	18
4.2 Metodología	19
4.2.1 Trabajo con muestras de ADN y toma de muestras de herbario.....	19
4.2.1.1 Cuidados para el trabajo con muestras de <i>tapa</i> etnográfica antigua y herbario antiguo.	19
4.2.1.2 Protocolo de toma de muestras de material de herbario.....	20
4.2.2 Determinación de las condiciones de extracción y análisis de ADN de muestras de prueba.	22
4.2.2.1 Optimización de la extracción de ADN a partir de muestras de prueba.....	22

4.2.2.2	Evaluación de la integridad del ADN extraído.	23
4.2.2.3	Análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido.	23
4.2.2.3.1	Medición de concentración de ADN mediante espectrofotometría.	23
4.2.2.3.2	Medición de concentración de ADN mediante fluorescencia.	23
4.2.2.4	Análisis del material genético obtenido a partir del material de <i>tapa</i> contemporánea.	23
4.2.2.4.1	Amplificación de la región ITS-1.	23
4.2.2.4.2	Amplificación del marcador de sexo (<i>Male Marker</i>).	24
4.2.2.4.3	Amplificación de Microsatélites (SSR).	24
4.2.2.5	Análisis de datos.	26
4.2.2.5.1	Análisis de las secuencias de ITS-1.	26
4.2.2.5.2	Análisis del marcador de sexo <i>Male Marker</i>	26
4.2.2.5.3	Análisis de microsatélites (SSR).	26
4.2.3	Extracción de ADN a partir de muestras etnográficas de <i>tapa</i> antigua y determinación de su amplificabilidad mediante ITS-1.	26
4.2.3.1	Extracción de ADN a partir de muestras de <i>tapa</i> etnográfica antigua.	26
4.2.3.2	Evaluación de la integridad del ADN extraído.	27
4.2.3.3	Análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido.	27
4.2.3.3.1	Medición de concentración de ADN mediante espectrofotometría.	27
4.2.3.3.2	Medición de concentración de ADN mediante fluorescencia.	27
4.2.3.4	Amplificación de la región ITS-1.	27
4.2.3.4.1	Amplificación de la región ITS-1 en la Universidad de Otago:	28
4.2.3.4.2	Amplificación de la región ITS-1 en la Universidad de Chile:	28
4.2.3.4.3	Análisis de las secuencias de ITS-1.	28
4.2.3.5	Purificación de los ADN obtenidos.	28
4.2.4	Determinación de la amplificabilidad del material genético obtenido a partir de <i>tapa</i> antigua y caracterización utilizando un marcador de sexo y 10 SSR.	29
4.2.4.1	Rediseño y amplificación de la región del Marcador de Sexo (<i>Male Marker</i>):	29
4.2.4.2	Amplificación de diez microsatélites (SSR).	30
4.2.4.3	Análisis de datos.	30
4.2.4.3.1	Análisis del marcador de sexo.	30
4.2.4.3.2	Análisis de microsatélites (SSR).	30
4.2.5	Extracción y caracterización de ADN de herbario de <i>B. papyrifera</i>	31
4.2.5.1	Extracción de ADN a partir de muestras de herbario antiguo.	31
4.2.5.2	Evaluación de la integridad del ADN extraído.	31
4.2.5.3	Análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido.	31
4.2.5.3.1	Medición de concentración de ADN mediante espectrofotometría.	31

4.2.5.3.2	Medición de concentración de ADN mediante fluorescencia.....	31
4.2.5.4	Análisis genético mediante marcadores moleculares del ADN obtenido a partir de herbario.	32
4.2.5.4.1	Amplificación de la región ITS-1:	32
4.2.5.4.2	Amplificación de la región del Marcador de Sexo (<i>Male Marker</i>):.....	32
4.2.5.4.3	Amplificación de Microsatélites (SSR):.....	32
4.2.5.5	Análisis de datos.	32
5	Resultados.	33
5.1	Determinación de las condiciones de extracción y análisis con distintos marcadores moleculares en <i>tapa</i> contemporánea.....	33
5.1.1	Extracción y cuantificación de ADN a partir de <i>tapa</i> contemporánea.....	33
5.1.2	Efecto de la temperatura y tiempo de incubación con el tampón de extracción en el rendimiento de extracción.	34
5.1.3	Análisis del material de <i>tapa</i> contemporánea con distintos marcadores moleculares.	36
5.1.3.1	Evaluación de la amplificabilidad de la región ITS-1.....	36
5.1.3.2	Evaluación de la amplificabilidad del marcador de sexo (<i>Male Marker</i>).....	38
5.1.3.3	Evaluación de la amplificabilidad de microsatélites	39
5.2	Extracción de ADN a partir de muestras etnográficas de <i>tapas</i> antiguas y evaluación de su amplificabilidad mediante el marcador ITS-1.....	42
5.2.1	Extracción y cuantificación de ADN a partir de <i>tapa</i> antigua.....	42
5.2.1.1	Evaluación de la amplificabilidad de la región ITS-1.....	43
5.2.1.1	Análisis de sitios polimórficos de las secuencias de ITS-1.	45
5.3	Caracterización genética de textiles elaborados a partir de <i>B. papyrifera</i> mediante un marcador de sexo y diez SSR	48
5.3.1	Optimización, evaluación y caracterización de la amplificabilidad de un marcador de sexo (<i>Male Marker</i>).	48
5.3.2	Evaluación de la amplificabilidad y caracterización de muestras de textiles etnográficos mediante diez microsatélites.....	50
5.4	Extracción y caracterización de ADN de herbario de <i>B. papyrifera</i>	53
5.4.1	Extracción de ADN a partir de muestras de herbario.	53
5.4.2	Análisis del material genético extraído a partir de muestras de herbario.....	54
5.4.2.1	Amplificación de la región ITS-1.	54
5.4.2.2	Amplificación del marcador de sexo <i>Male Marker</i>	56
5.4.2.3	Amplificación de 10 marcadores de SSR.	57
5.5	Integración de los resultados obtenidos del análisis de las muestras de <i>tapa</i> y material de herbario con la información disponible de material contemporáneo y de herbario de <i>B. papyrifera</i> disponible.....	59
6	Discusión.	75

6.1	Extracción y caracterización de ADN obtenido de muestras de herbario de <i>B. papyrifera</i>	75
6.2	Extracción de ADN a partir de piezas de textil etnográfico antiguo.	77
6.3	Caracterización genética de las muestras de ADN obtenidas a partir de <i>tapa</i> antigua etnográfica.	79
6.3.1	Evaluación de la amplificabilidad de la región ITS-1.....	80
6.3.2	Amplificabilidad del marcador de sexo <i>Male Marker</i>	83
6.3.3	Amplificabilidad de 10 marcadores de SSR.....	83
8	Referencias.	88
Anexos		96
Anexo I.....		96
Anexo II.		97
Anexo III.....		101
Anexo IV.....		102
Anexo V.....		103
Anexo VI.....		104
Anexo VII.....		105
Anexo VIII.		106
Anexo IX.....		107
Anexo X.....		114
Anexo XI.....		117

Índice de Figuras

Figura 1: Mapa del Pacífico.	6
Figura 2. Proceso de manufacturación de textiles de corteza o <i>tapa</i>	9
Figura 3. Fotografías de las 17 muestras de textiles etnográficos (<i>tapa</i>) utilizadas en esta tesis.	17
Figura 4. Protocolo de toma de muestras de herbarios facilitadas por el Bishop Museum y el Museo Nacional de Historia Natural.	21
Figura 5: Esquema de las seis combinaciones nuevas para la amplificación del marcador de sexo.	29
Figura 6: Análisis de integridad de ADN genómico de la tercera extracción de muestras contemporáneas de <i>tapa</i>	33
Figura 7. Comparación del análisis de ADN genómico de una muestra contemporánea de <i>tapa</i> obtenido a diferentes temperaturas de incubación.	34
Figura 8. Rendimiento de la extracción de ADN evaluada a diferentes tiempos y temperaturas de extracción.	35
Figura 9. Amplificación de la región ITS-1 a partir del ADN obtenido de muestras de <i>tapa</i> contemporánea. ..	37
Figura 10. Amplificación de la región ITS-1 de los CE realizados durante las cinéticas de extracción a 37°C y 60°C.	38
Figura 11. Amplificación de la región <i>Male Marker</i> a partir del ADN obtenido de muestra de <i>tapa</i> contemporánea.	39
Figura 12. Amplificación del marcador SSR Bro 15 utilizando ADN obtenido a partir de <i>tapa</i> moderna.	40
Figura 13. Electroferogramas del marcador Bro 08 en muestras de <i>tapa</i> contemporánea.	40
Figura 14. Análisis de los resultados de la primera extracción de ADN a partir de piezas etnográficas de <i>tapa</i>	42
Figura 15. Amplificación de la región ITS-1 mediante KAPA HiFi HotStart PCR Kit a partir del ADN obtenido de la segunda extracción de muestras de <i>tapa</i> antigua.	44
Figura 16. Alineamiento de las secuencias obtenidas de la región ITS-1 de ADN de <i>tapas</i> antiguas.	47
Figura 17. Ensayo de amplificación de las diferentes combinaciones para el rediseño del ensayo del marcador de sexo.	48
Figura 18. Ensayo de amplificación de las muestras de <i>tapa</i> contemporánea utilizando el ensayo del marcador de sexo rediseñado.	49
Figura 19. Amplificación de las muestras de <i>tapa</i> antigua utilizando el ensayo rediseñado del marcador de sexo.	50
Figura 20. Amplificación del marcador SSR Bro 08 utilizando ADN obtenido a partir de <i>tapa</i> antigua.	51
Figura 21. Análisis de los resultados de la extracción de ADN a partir de muestras de herbario.	53

Figura 22. Amplificación de la región ITS-1 a partir del ADN obtenido de muestras de herbarios.	55
Figura 23. Alineamiento de las secuencias obtenidas de la amplificación de la región ITS-1 de ADN de muestras de herbario	56
Figura 24. Amplificación de las muestras de herbario utilizando el ensayo del marcador de sexo rediseñado	56
Figura 25. Amplificación de ADN de muestras de herbario con el marcador de SSR Bropap 26985.....	57
Figura 26: Pieza BQUCHTE001	61
Figura 27: Pieza BQUCHTE002.....	61
Figura 28: Pieza BQUCHTE003.....	62
Figura 29: Pieza BQUCHTE004.	63
Figura 30: Pieza completa de <i>tapa</i> de la que proviene la muestra BQUCHTE005.....	64
Figura 31: Pieza BQUCHTE005.....	64
Figura 32: Pieza BQUCHTE006.	65
Figura 33: Pieza completa de <i>tapa</i> de la que proviene la muestra BQUCHTE006.	65
Figura 34: Pieza BQUCHTE007.....	65
Figura 35: Pieza BQUCHTE008.....	66
Figura 36: Pieza completa de <i>tapa</i> de la que proviene la muestra BQUCHTE008.	66
Figura 37: Pieza BQUCHTE009.	67
Figura 38: Pieza BQUCHTE010.	68
Figura 39: Pieza BQUCHTE011.	68
Figura 40: Pieza BQUCHTE012.....	69
Figura 41: <i>Tapa</i> funeraria encontrada en el año 2010 en una cueva de la isla Agakautai, archipiélago de Gambier.	70
Figura 42: Mapa integrativo de los alelos encontrados en la <i>tapa</i> funeraria.	71
Figura 43. Mapa integrativo de los alelos encontrados en dos muestras..... de <i>tapa</i> etnografica antigua.....	85
Figura A. Curvas de calibración utilizadas en la cuantificación con Picogreen®.....	101
Figura B. Alineamiento de las secuencias obtenidas de la amplificación de la región ITS-1 de ADN..... de <i>tapas</i> conntemporáneas.....	105

Índice de Tablas

Tabla 1. Muestras de textiles etnográficos (<i>tapa</i>) antiguos analizados en esta tesis. Código de la muestra, isla de procedencia, año de manufacturación y etiqueta de la muestra.....	18
Tabla 2. Resumen de las características de los SSR disponibles para la realización de esta tesis.....	25
Tabla 3. Razón de absorbancia 260nm/ a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.....	36
Tabla 4. Resumen de los alelos encontrados en las seis <i>tapas</i> contemporáneas analizadas con los siete SSR ...	41
Tabla 5. Variante encontrada en la posición relativa 203 de las secuencias identificadas como <i>B. papyrifera</i> en la región ITS-1.....	46
Tabla 6. Secuencia de los partidores utilizados en el ensayo del marcador de sexo <i>Male Marker</i> rediseñado ...	49
Tabla 7. Resumen de los alelos encontrados en las muestras de <i>tapa</i> etnográfica analizadas con 10 marcadores SSR.....	52
Tabla 8. Muestras de herbario seleccionadas para análisis con 12 marcadores moleculares.....	54
Tabla 9: Alelos y genotipos no detectados anteriormente en muestras de herbario ni en material contemporáneo.....	58
Tabla 10. Resumen de los resultados del análisis genético realizado en las 17 piezas de <i>tapa</i> antigua.....	60
Tabla I. Muestras de <i>tapa</i> contemporánea de prueba: Código de la muestra, isla de procedencia, año de manufacturación y etiqueta de la muestra.....	96
Tabla II: Muestras de herbario disponibles para la realización de esta tesis. Código de la muestra, localidad e isla de procedencia, recolector y año de recolección.....	97
Tabla III. Secuencia de los seis nuevos partidores diseñados para el ensayo de <i>Male Marker</i> corto.....	102
Tabla IV. Concentración, razón de absorbancia 260nm/280nm y rendimiento de las tres extracciones de las muestras de <i>tapa</i> moderna.....	103
Tabla V. Concentración, razón de absorbancia 260nm/280nm y rendimiento de las extracciones de <i>tapa</i> moderna de BQUCHTE019 a diferentes temperaturas y tiempos de incubación....	104
Tabla VI. Concentración, razón 260nm/280nm y rendimiento de las extracciones de <i>tapa</i> antigua.....	106
Tabla VII. Especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1.....	107
Tabla VIII. Concentración, razón 260nm/280nm y rendimiento de las extracciones de muestras herbario.....	114
Tabla IX. Resumen de los alelos encontrados en muestras de herbarios analizadas con 10 SSR.....	117

ABREVIATURAS

° C:	Grados Celsius
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr:	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
AFLP:	<i><u>A</u>mplified <u>F</u>ragment <u>L</u>ength <u>P</u>olymorphism</i>
AP:	<u>A</u> ntes del <u>P</u> resente
BLAST:	<i><u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool.</i>
BSA:	<i><u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumin</i> (Albúmina de suero bovino)
CTAB:	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTP:	Desoxirribonucleótidos
EDTA:	Ácido etildiaminotetraacético
h:	horas
ISSR:	<i><u>I</u>nter-<u>S</u>imple <u>S</u>equence <u>R</u>epeat</i>
ITS:	<i><u>I</u>nternal <u>T</u>ranscribed <u>S</u>pacer</i>
MgCl ₂ :	Cloruro de magnesio
min:	Minutos
NaCl:	Cloruro de sodio
NCBI:	<i><u>N</u>ational <u>C</u>enter for <u>B</u>iotecnology <u>I</u>nformation</i>
pb:	Pares de bases
s:	segundos
SCAR:	<i><u>S</u>equence <u>C</u>haracterized <u>A</u>mplified <u>R</u>egion</i>
SNP:	<i><u>S</u>ingle <u>N</u>ucleotide <u>P</u>olymorphism.</i>
SSR:	<i><u>S</u>imple <u>S</u>equence <u>R</u>epeat</i> , microsatélites
TBE:	Tris/Borato/EDTA

Resumen

Las colecciones de museos son una fuente preciada de información acerca del pasado. En particular las colecciones de plantas y animales, como también los objetos etnográficos de origen biológico se han sometidos recientemente a análisis genéticos, permitiendo la reconstrucción directa de ciertos aspectos del pasado. A diferencia del análisis genético de muestras contemporáneas que sólo permiten proponer una hipótesis acerca del pasado, los análisis de muestras antiguas permiten acceder a información sin el sesgo o alteraciones provocados por eventos históricos posteriores.

Los estudios de ADN antiguo (ADNa) han permitido reconstruir las rutas de migración de los primeros grupos humanos que salieron de África. El último gran movimiento migratorio humano hacia zonas inhabitadas del planeta, que culminó con el poblamiento de las islas de Oceanía Remota, finalizó hace tan solo alrededor de mil años, cuando el hombre colonizó las islas de Hawái, Rapa Nui y Nueva Zelanda. Este proceso fue complejo, y no hay consenso de las rutas seguidas por los navegantes prepolinésicos.

La reconstrucción de las rutas de los humanos para llegar a las remotas islas del Océano Pacífico, se ha abordado mediante diversas estrategias. Una de ellas es el “enfoque comensal”, que consiste en el estudio genético de especies animales y vegetales estrechamente asociadas al hombre y que fueron transportadas intencionalmente hasta las islas de Oceanía Remota. El estudio de estas especies permite dilucidar posibles rutas migratorias, complementando información arqueológica y lingüística existente.

Entre las especies vegetales transportadas hacia el Pacífico se encuentra la morera de papel (*Broussonetia papyrifera*), especie dioica proveniente de Taiwan y el sur y este de Asia continental. Esta especie fue introducida al Pacífico por su gran valor cultural como fuente de fibra para la elaboración de textiles, conocidos como tela de corteza (“*bark-cloth*”) o “*tapa*”. Los textiles de corteza, al ser un símbolo de riqueza y poder, se conservaban en las familias por mucho tiempo, por lo que podrían entregar información genética de individuos de *B. papyrifera* presentes en Oceanía de tiempos incluso anteriores a los primeros contactos con los europeos, y anteriores a la toma de las primeras muestras para herbarios. Además, fueron materiales etnográficos de interés para los europeos que los colectaron o recibieron como regalos, por lo que actualmente se encuentran en diversas colecciones del mundo.

La pregunta fundamental de investigación que guió este trabajo fue la siguiente: ¿Es posible obtener ADN a partir de *tapa* antigua y caracterizarlo mediante marcadores moleculares?

Las hipótesis de esta tesis son: 1.- **Es posible extraer y caracterizar ADN de textiles etnográficos (*tapa*) antiguos mediante la región ITS-1 para identificar la especie vegetal utilizada como fuente de fibra y 2.- Es posible caracterizar ADN de *B. papyrifera* aislado a partir de textiles etnográficos antiguos (*tapa*) mediante un marcador de sexo y marcadores de microsatélites, para aportar a la comprensión general de la dispersión antrópica de esta especie en Oceanía Remota.**

El objetivo general de este trabajo **fue aislar y caracterizar ADN de muestras de textiles etnográficos (*tapa*) antiguos mediante marcadores moleculares y comparar las características genéticas de los textiles elaborados a partir de *B. papyrifera* con los datos de muestras contemporáneas y de herbario con el fin de aportar a la comprensión general de la dispersión antrópica de esta especie en Oceanía Remota.**

A partir de 17 muestras de textiles antiguos provenientes de distintas islas de Oceanía, se extrajo exitosamente ADN antiguo de todas las muestras, no observándose una correlación entre la antigüedad de la pieza de *tapa* y la cantidad de ADN obtenido. Mediante el estudio del marcador molecular ITS-1 se determinó la especie vegetal de origen de cada pieza textil, identificándose 13 de las 17 piezas como elaboradas a partir de *B. papyrifera*. Además, se detectaron sitios polimórficos en la región ITS-1.

Para caracterizar las piezas elaboradas a partir de *B. papyrifera*, se utilizó un marcador de sexo, que permitió tipificar una pieza textil como proveniente de una planta femenina. Además, el análisis mediante 10 marcadores de SSR indicó la presencia de 41 alelos detectados anteriormente en muestras contemporáneas y de herbario de *B. papyrifera*. Interesantemente, se encontraron 74 nuevos alelos no observados anteriormente en material de herbario, ni contemporáneo de *B. papyrifera*, sugiriendo que en el pasado existió una mayor diversidad genética en individuos de *B. papyrifera* en Oceanía Remota.

El estudio de 51 muestras de herbario provenientes de las mismas islas o de islas cercanas de las cuales provenían las muestras de *tapa* antigua analizadas en esta tesis, contribuyó a la comparación de resultados. Se registraron además 9 alelos y 10 genotipos nuevos en muestras de herbario, no observados anteriormente en material contemporáneo ni en otras muestras de herbario de *B. papyrifera*.

Los resultados de esta tesis confirman que es posible extraer y caracterizar ADN proveniente de piezas textiles antiguas, siendo éste el primer reporte hasta la fecha, de la extracción y análisis de ADN a partir de muestras etnográficas y arqueológicas de textiles de origen vegetal.

Summary:

Identification and genetic characterization of ancient ethnographic bark cloth textiles (*tapa*) made from plant fibers using different molecular markers

Museum collections are a prized source of information about the past. In particular, collections of plants and animals, as well as ethnographic objects of biological origin have recently undergone genetic analysis, allowing the direct reconstruction of certain aspects of the past. Unlike the genetic analysis of contemporary samples that only allow to propose a hypothesis about the past, the analyses of old samples allow access to information without the bias or alterations provoked by later historical events.

Ancient DNA studies have allowed reconstructing the migration routes of the first human groups that left Africa. The last great human migratory movement to uninhabited areas of the planet, culminating in the settlement of the islands of Remote Oceania, ended only about a thousand years ago, when humans colonized the islands of Hawaii, Rapa Nui and New Zealand. This process was complex, and there is no consensus on the routes followed by pre-polynesian navigators.

The reconstruction of human routes to reach the remote islands of the Pacific Ocean has been approached through various strategies. One of these is the "commensal approach," which consists of the genetic study of animal and plant species closely associated with humans and that were intentionally transported to the islands of Remote Oceania. The study of these species allows to suggest migratory routes taken by these species and the people that transported them, complementing existing archaeological and linguistic information.

Among the plant species transported into the Pacific is paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*), a species native to South and continental Asia, as well as Taiwan. This multifunctional dioecious tree species was introduced to the Pacific because of its great cultural value as a source of fiber for the production of textiles, known as bark-cloth or *tapa*. Bark cloth textiles, being a symbol of wealth and power, were kept in families for a long time, and therefore can provide genetic information on the genetic diversity of the *B. papyrifera* population used to manufacture these textiles. These samples may even provide information on paper mulberry in Oceania that precedes even the first contacts with Europeans. Barkcloth may also provide a window to the past on times prior to the taking of the first herbarium samples by European explorers. Bark cloth was of interest to Europeans who collected or received them as gifts, and later these became part of various museum collections around the world.

The fundamental research question that guided this work was the following: Is it possible to obtain DNA from samples taken from ethnographic *tapa* (bark cloth textiles) and characterize these using molecular markers?

The hypotheses of this thesis are: 1.- **It is possible to extract and characterize DNA from ancient ethnographic textiles (*tapa*) using the ITS-1 region to identify the plant species used as a source of fiber** and 2.- **It is possible to characterize DNA from *B. papyrifera* isolated from ancient ethnographic textiles (*tapa*) using a sex marker and microsatellite markers, to increase our understanding of the human mediated dispersal of this species in Remote Oceania.**

The main aim of this work was **to isolate and characterize DNA from ancient ethnographic (*tapa*) textile samples using molecular markers and to compare the genetic characteristics of textiles made from *B. papyrifera* with data from contemporary and herbarium samples for the purpose of contributing to the understanding of the human mediated dispersal of this species in Remote Oceania.**

Ancient DNA was successfully extracted from all 17 textile samples from different islands in Oceania. No correlation between the age of the *tapa* piece and the amount of DNA obtained was found. The species used in the manufacture of the textiles was assessed analyzing the ITS-1 region. Thirteen of the 17 samples were made from *B. papyrifera*. In addition, polymorphisms within the ITS-1 region were detected.

A sex marker was used to determine the sex of the plants used in the making of the textiles. In addition, analysis with 10 SSR markers indicated the presence of 41 previously detected alleles in contemporary and *B. papyrifera* herbarium samples. Interestingly, we also found 74 new alleles, not previously found either in herbarium material or contemporary *B. papyrifera* leaf samples, suggesting that in the past there was greater genetic diversity in *B. papyrifera* in Remote Oceania.

The study of 51 herbarium specimens coming from the same island region of the bark cloth samples analyzed in this thesis, allowed comparing these two sources. Nine new alleles and 10 new genotypes were found in these herbarium samples. None of these had been previously recorded either in contemporary leaf material or other herbarium samples of *B. papyrifera*.

The results of this thesis confirm that it is possible to extract and characterize DNAa from old bark cloth textiles. This is the first report to date of the extraction and analysis of DNA from old ethnographic and archaeological samples of ethnographic textiles of plant origin.

1 Introducción

La última etapa de poblamiento humano a zonas deshabitadas del planeta finalizó hace tan sólo 1000 años atrás, con la ocupación de las islas más lejanas de Oceanía Remota: Hawái, Nueva Zelanda y Rapa Nui (Wilmshurst *et al.*, 2011). La historia de cómo el hombre pobló las islas del Pacífico, una de las áreas más vastas de la Tierra, ha fascinado a historiadores, arqueólogos, antropólogos y genetistas. Últimamente, se ha comparado este proceso con la exploración espacial, ya que involucró la colonización a larga distancia de las pequeñas y distantes islas que están en medio del Pacífico. Dicha colonización involucró el movimiento de cientos, incluso miles de personas luego de que pequeños grupos humanos realizaran viajes exploratorios a estas porciones de tierra, gracias a los avances tecnológicos de estos grupos en navegación y transporte, y a la optimización de los recursos naturales encontrados en dichas islas (Sheerin y Cunio, 2016). Está documentado que los viajes a través del Pacífico fueron realizados por expertos navegantes que contaban con tecnología suficiente para recorrer distancias de más de 2.000 km entre islas (Kirch, 2010), llegando incluso a las costas de América (Storey y Matisoo-Smith, 2014).

La comprensión del proceso de poblamiento del Pacífico se ha estudiado mediante un enfoque holístico que integra tres disciplinas: arqueología, lingüística y genética. Las herramientas arqueológicas han permitido determinar la temporalidad de las principales olas migratorias (Wilmshurst *et al.*, 2011), mientras que los estudios lingüísticos han sugerido el origen de las lenguas polinésicas (Gray *et al.*, 2009). Por otra parte, los estudios genéticos de ADN antiguo, tanto humano como de diferentes especies animales y vegetales asociadas al hombre, han develado que existió un complejo proceso de colonización y movimiento humano en esta zona del planeta, ya que algunas especies vegetales se transportaron a Oceanía Remota desde Asia, otras desde Nueva Guinea (Matisoo-Smith y Robins, 2004; Storey *et al.*, 2007; Larson *et al.*, 2007), e incluso algunas desde América (Clarke *et al.*, 2006; Roullier *et al.*, 2012).

Las fuentes de ADN antiguo pueden ser variadas. Las más estudiadas son restos arqueológicos humanos, animales y vegetales. Se ha demostrado que es posible extraer ADN a partir de diferentes materiales de valor cultural tales como pergaminos (Poulakakis *et al.*, 2007), plumas (Hartnup *et al.*, 2011) y papiros (Marota *et al.*, 2002), entre otros. En esta tesis se propone la caracterización por primera vez de una colección de material etnográfico elaborado a partir de fibras vegetales, de gran importancia en las culturas del Pacífico, con herramientas de genética molecular. Se espera que este estudio contribuya a la comprensión del proceso de migración y el poblamiento del Pacífico.

1.1 El rescate de la historia a través del estudio de ADN antiguo.

El estudio de ADN antiguo (ADNa) nos permite reconstruir el pasado ‘en tiempo real’. El análisis genético de muestras contemporáneas nos permite tan sólo hacer una inferencia, es decir, proponer una hipótesis acerca del pasado, mientras que los análisis realizados a partir de muestras antiguas (de más de 50 años) nos permiten obtener la información en forma directa y verificar la hipótesis propuesta (Willerslev y Cooper, 2005).

El primer análisis de ADNa se reportó a mediados de los años 80’, cuando se secuenció el mtDNA de una especie de cebra extinta (*Equus quagga quagga*) a partir de una muestra de museo (Higuchi *et al.*, 1984). Las colecciones de museos, desde este punto de vista, juegan un rol fundamental como fuente de ADNa. No sólo las colecciones de plantas y animales, sino también de objetos y productos etnográficos de origen biológico son una fuente preciada de información acerca del pasado. Ejemplo de esto son los estudios realizados en pergaminos griegos de los siglos XIII a XVI (Poulakakis *et al.*, 2007). En ese trabajo se extrajo ADN de dichos pergaminos y mediante el análisis del gen de *citocromo b* se encontró que las secuencias analizadas provenían de cuero de cabra (*Capra hircus*) y no de origen ovino o bovino. El análisis realizado por Harnup *et al.* (2011) a partir de una capa de plumas antigua maorí, permitió determinar el origen del plumaje a partir del análisis de secuencias de ADN mitocondrial, determinando que las plumas provenían principalmente del kiwi marrón (*Apteryx mantelli*) de la isla del norte de Nueva Zelanda y, en menor grado, del kiwi moteado (*Apteryx owenii*) (Harnup *et al.*, 2011). Otro ejemplo es el análisis realizado en ADN extraído a partir de madera de un barco que estuvo en el lecho marino por más de cuatro siglos (Speirs *et al.*, 2009). Utilizando partidores de cloroplasto específicos para una especie de roble (*Quercus ssp.*) se logró obtener una secuencia de 74 pb, lo que permitió identificar la especie y el origen de la madera utilizada para construir esa embarcación.

La inestabilidad *post mortem* de los ácidos nucleicos es el problema metodológico central de todos los estudios de ADNa. En tejidos metabólicamente activos, el ADN es reparado rápida y eficientemente. En cambio, en células muertas o dormantes, el ADN sufre hidrólisis u oxidaciones espontáneas debido a la acción de endonucleasas y de las condiciones ambientales. Esto dificulta la obtención de ADN íntegro, recuperándose generalmente fragmentos de entre 100 y 500 pb. Las muestras de ADN *post mortem* se caracterizan por tener hebras dañadas, sufrir modificaciones y pérdida de bases, lo que puede causar la amplificación y secuenciación preferente de ADN contaminante (por no encontrarse dañado) (Willerslev y Cooper, 2005; Rizzi *et al.*, 2012).

Dado que el trabajo con ADN involucra todas estas dificultades, algunos autores han cuestionado la veracidad de ciertos resultados de secuenciación de fragmentos de ADN (Abbot, 2003; Barbujani y Bertorelle, 2003). Como respuesta a estos cuestionamientos y a modo de normalizar el trabajo con ADN, diferentes autores han planteado ciertos ‘criterios de autenticidad y trabajo’ para evaluar la legitimidad y reproducibilidad de las secuencias de ADN, entre los que destacan el procesamiento de las muestras antiguas y la extracción de material genético en áreas dedicadas exclusivamente al trabajo con ADN para evitar la contaminación con ADN contemporáneo. Además se recomienda una separación física entre las áreas de extracción y amplificación de ADN; se exige también el uso de controles negativos de extracción y su amplificación para evaluar la presencia de contaminantes, la realización de replicados de extracción y amplificación de ADN, la evaluación de la recuperación de ADN en la muestra de acuerdo a la edad e historia de conservación de la muestra, así como la posible contaminación de la misma al momento de la toma de muestras (Cooper y Poinar, 2000; Gilbert *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, en los estudios de ADN se obtienen secuencias pequeñas de no más de 500 pb. Sin embargo, este tamaño es adecuado para el estudio de marcadores moleculares de pequeña longitud que permitan identificar el organismo fuente de la secuencia y evaluar diversidad genética entre individuos de una misma especie.

1.2 Marcadores moleculares para la caracterización de ADN antiguo

Un marcador molecular se define como una pequeña región de ADN que presenta polimorfismos entre sujetos de la misma especie (Andersen y Lübberstedt, 2003). Entre las propiedades que debe poseer un buen marcador molecular, destacan el tener una naturaleza polimórfica, una ocurrencia frecuente en el genoma, permitir un ensayo rápido y simple para su determinación, una alta reproducibilidad y además de presentar datos de fácil intercambio entre distintos laboratorios (Joshi *et al.*, 1999).

Entre los marcadores moleculares que se han utilizado para la caracterización de ADN encontramos secuencias cortas (<100 pb) de genoma de cloroplasto, como el gen *rbcL* (Marota *et al.*, 2002) o el fragmento *tf42* (Speirs *et al.*, 2009); secuencias de <350 pb de genoma mitocondrial (Higuchi *et al.*, 1984; Matisoo-Smith y Robins, 2004; Gyulai *et al.*, 2006; Hartnup *et al.*, 2011); y secuencias nucleares como el *Internal Transcribed Spacer* (ITS-1) (Szabó *et al.*, 2005), el gen *adh* (Huanca-Mamani *et al.*, 2015) y secuencias repetidas como los microsatélites o SSR (100-350 pb) (Manen *et al.*, 2003; Szabó *et al.*, 2005).

Los marcadores moleculares se pueden utilizar tanto como secuencias *barcoding*, es decir, para identificar la especie a la cual pertenece la secuencia obtenida, como para evaluar diversidad genética en una población a través del estudio de polimorfismos. Existen dos tipos de polimorfismos: los de secuencia, en el que se observa un cambio puntual en la secuencia nucleotídica, también llamados SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*); y los polimorfismos de longitud, en los que se observa un cambio en el número de repeticiones de una secuencia (como es el caso de los microsatélites) (Butler, 2009).

La elección del tipo de marcador para identificar, caracterizar y/o evaluar la diversidad genética de una especie o población, depende principalmente de la fuente de obtención del ADN y de la calidad del mismo. En circunstancias en las que la fuente de material genético permite obtener ADN en abundancia y de buena calidad, como es el uso de hojas frescas o tejido vivo, es posible utilizar marcadores genéticos que involucren el estudio de fragmentos de gran tamaño (>500 pb). En un escenario en el que la fuente para la obtención de material genético no permite obtener ADN de buena calidad, como los casos en las que las fuentes de ADN han estado expuestas al paso del tiempo, a ambientes adversos, o se encuentran procesadas (cuero, pergaminos, textiles antiguos) en general se utilizan marcadores de tamaño pequeño (<350 pb) como los microsatélites y secuencias de ITS (Poulakakis *et al.*, 2007; Marota *et al.*, 2002; Matisoo-Smith *et al.*, 2004).

Los ITS o "*Internal Transcribed Sequences*" son secuencias que se encuentran entre los genes ribosomales 18S, 5.8S y 26S, las cuales forman unidades repetidas en tándem (Alvárez & Wendel, 2003), en la que se distinguen dos regiones denominadas ITS-1 e ITS-2. Estas secuencias permiten análisis taxonómicos y filogenéticos, pues presentan variabilidad intra-familia, intra-género e incluso intra-especie (Powers *et al.*, 1997; Besse, 2014).

Los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeats*) corresponden a motivos de 1-6 pb que se repiten en tándem, encontrándose tanto en las regiones codificantes como no codificantes del genoma nuclear, mitocondrial y de cloroplasto (Kalia *et al.*, 2010). Son altamente polimórficos y el número de repeticiones es variable entre individuos, características que permiten una discriminación a nivel de variedades, subespecies, poblaciones, ecotipos e individuos (Weising *et al.*, 2005). Los SSR son de naturaleza multialélica, presentan una herencia co-dominante y una localización específica (Kalia *et al.*, 2010), propiedades que permiten utilizarlos en procesos forenses y de criminalística cuando es necesario confirmar relaciones de filiación entre dos personas y/o para la identificación de osamentas (Gill, 2002). En plantas se utilizan para evaluar diversidad genética (Liu *et al.*, 2011) y para el análisis de procesos de domesticación y dispersión de especies vegetales (Lia *et al.*, 2007).

1.3 Estudios genéticos involucrados en la reconstrucción del Poblamiento de Oceanía.

El estudio de ADN humano a través de marcadores moleculares altamente polimórficos como los SSR, la zona hipervariable del ADN mitocondrial (ADNmt), y la zona no recombinante del cromosoma Y (NRY), han permitido reconstruir las rutas de migración de los primeros grupos humanos que salieron desde África para poblar el resto del planeta (Underhill *et al.*, 2007). La reconstrucción de las rutas utilizadas por los humanos para llegar a la última zona del planeta en poblarse (las remotas islas del Océano Pacífico), ha sido abordada mediante la integración de tres disciplinas: la arqueología, la lingüística y la genética.

Esta vasta región del planeta se conoce también como Oceanía Remota y comprende todas las islas ubicadas al este de las Islas Salomón, entre las que se encuentra Fiji, Samoa, Tonga, Rapa Nui, Hawái y Nueva Zelanda, mientras que todas las islas ubicada al oeste de las Islas Salomón (incluyéndolas) se le conoce como Oceanía Cercana, respecto del continente asiático (Matisoo-Smith, 2014).

La evidencia arqueológica ha permitido trazar la temporalidad de los diferentes movimientos humanos a través de análisis de C^{14} (Wilmhurst *et al.*, 2011). El poblamiento del Pacífico comenzó con la migración de humanos modernos hace aproximadamente 60-40.000 años antes del presente (AP), período en el que grupos humanos provenientes del Sudeste asiático gradualmente alcanzaron lo que hoy corresponde a las islas de Indonesia, Nueva Guinea y el norte de Australia. La ocupación de las Islas Salomón representa la ocupación más oriental de la primera ola migratoria (Matisoo-Smith, 2014).

La última fase del asentamiento humano en el Pacífico está marcada por la llegada de humanos a los extremos de Oceanía Remota, el triángulo Polinésico (formado por Rapa Nui, Nueva Zelanda y Hawái), ocupando Hawái hace 1000-1200 años AP, Rapa Nui hace 800-1200 años AP y Nueva Zelanda hace alrededor de 700 años AP (Matisoo-Smith, 2014). Si bien se ha sugerido que se pobló primero el centro del triángulo polinésico y luego sus vértices, aún quedan preguntas abiertas, como por ejemplo ¿Cómo fue poblado el triángulo polinésico? ¿Cuál es el origen de la población que llegó a Rapa Nui y a Nueva Zelanda? (Matisoo-Smith, 2014). En la **Figura 1** se resume la temporalidad de la ocupación de las diferentes zonas de Pacífico.

Los viajes de exploración y asentamiento que realizaron los primeros humanos a Oceanía Remota, se realizaron en embarcaciones en las cuales transportaban especies vegetales para cultivo y animales domésticos hacia nuevas islas inhabitadas, lo que atestigua su experticia en la construcción de canoas y

en tecnología de navegación (Kirch, 2010), sugiriendo que los viajes hacia Oceanía Remota fueron eventos planificados y no al azar (Kayser *et al.*, 2006).

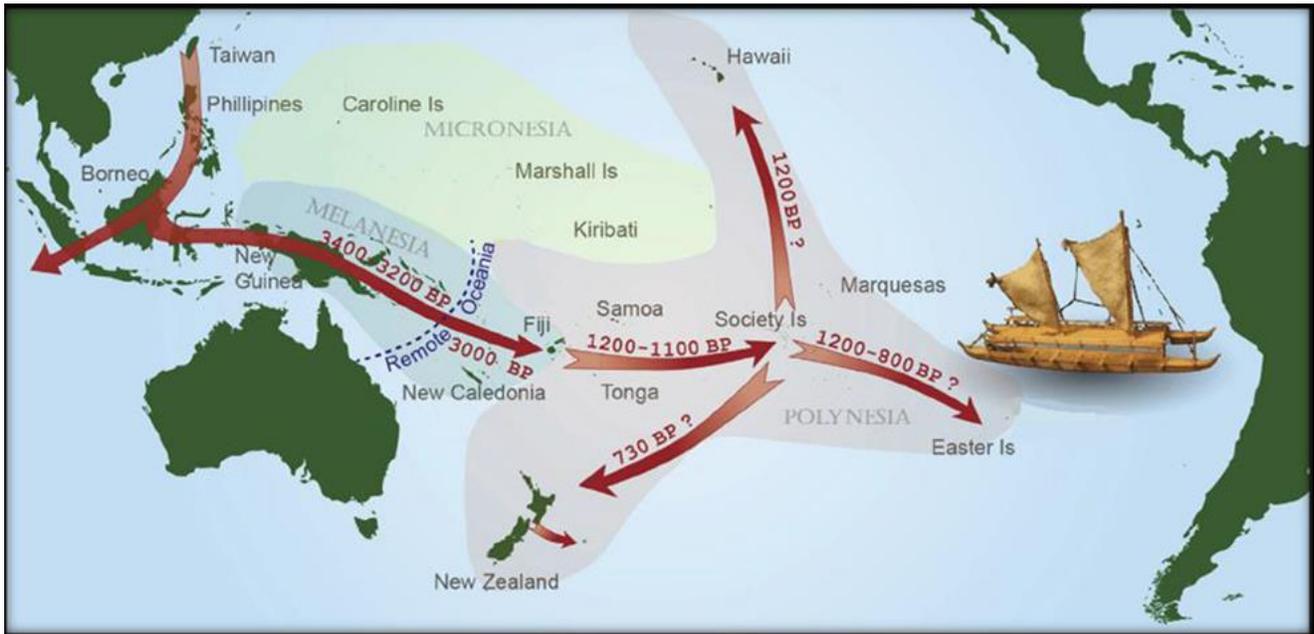


Figura 1: Mapa del Océano Pacífico. La línea punteada azul delimita Oceanía Cercana de Oceanía Remota (Adaptada de Matisoo-Smith, 2014).

La evidencia lingüística ha demostrado que Taiwán es el lugar de origen de las lenguas que actualmente se hablan en las diferentes islas del Pacífico, sugiriendo que el asentamiento en Oceanía Remota tuvo su origen en una segunda oleada migratoria, más reciente (hace 4.000 AP) que la que llevó a los primeros viajeros a asentarse en Nueva Guinea y las Islas Salomón, y proveniente directamente desde Taiwán (Gray *et al.*, 2009).

La evidencia genética en humanos indica un decrecimiento de oeste a este en la diversidad genética total de los haplogrupos de NRY y ADNmt, lo que proporciona evidencia del asentamiento en el Pacífico en esa direccionalidad y sugiriendo que los viajes hacia el Pacífico fueron eventos planificados (Kayser *et al.*, 2006). Sin embargo, los estudios genéticos en humanos para estudiar el asentamiento en el Pacífico presentan algunos problemas, ya que la mayor parte de la población que habita esta zona desde el siglo XVIII es el resultado del mestizaje entre polinésicos, europeos y asiáticos, quienes llegaron a esa región durante los siglos XVIII y XIX (Matisoo-Smith *et al.*, 1994). Además existen diversos problemas éticos y culturales asociados a la obtención de ADN humano.

A partir de estas dificultades, se ha utilizado la estrategia o enfoque comensal para el estudio del asentamiento humano del Pacífico. Este enfoque consiste en el estudio genético de especies que fueron

introducidas antrópicamente a Oceanía Remota, entre las que se encuentran especies animales y vegetales fundamentales para la sobrevivencia humana y la reproducción de su cultura (Matisoo-Smith, 1994; Kirch, 2000). El estudio genético de especies animales y vegetales estrechamente asociadas al hombre durante el poblamiento de Oceanía Remota puede revelar patrones complementarios, relacionados con actividades humanas como el comercio y la agricultura (Seelenfreund *et al.*, 2010). En este contexto, el estudio de materiales fuente de ADN_a ha jugado un rol fundamental.

Estudios realizados a partir de restos arqueológicos de perro en el Pacífico, han indicado mediante el estudio de ADN_{mt} que poseen un mismo linaje proveniente de Vietnam, y que fueron introducidos al Pacífico como una población pequeña que permaneció aislada de otras poblaciones de la misma especie (Savolainen *et al.*, 2004). Un estudio en ADN_{mt} de muestras arqueológicas de cerdo también indica que el linaje introducido a Oceanía Remota proviene de Vietnam (Larson *et al.*, 2007), en contraste a lo indicado por la evidencia lingüística (Gray *et al.*, 2009). Sin embargo, el mismo estudio en cerdo, indica además la introducción de un segundo linaje de cerdos, provenientes de China, vía Taiwán, que se asentó en las islas que se encuentran al norte de Nueva Guinea y que conforman la zona de Micronesia. El trabajo realizado en ADN_{mt}, extraído de restos arqueológicos de la rata polinésica apoya este movimiento (Matisoo-Smith *et al.*, 2004). Por otra parte, los estudios realizados en restos arqueológicos de huesos de pollo encontrados en las costas chilenas, apoya la hipótesis de un contacto entre los habitantes del Pacífico y América del Sur (Storey *et al.*, 2012).

Otra especie que ha aportado al entendimiento del proceso de colonización del Pacífico es la morera de papel o *Broussonetia papyrifera*, especie no comestible que fue introducida en Oceanía Remota debido a su gran valor cultural para los pueblos del Pacífico (Seelenfreund *et al.*, 2010). Es una especie proveniente del Sudeste asiático y su utilización como fuente de fibra para la elaboración de textiles ha entregado información diferente a la aportada por las especies anteriormente mencionadas.

1.4 *Broussonetia papyrifera* como modelo comensal y su relevancia cultural en el Pacífico

La morera de papel o *Broussonetia papyrifera* es una especie ampliamente distribuida en la Oceanía, siendo unas de las 20 especies que se introdujeron a Rapa Nui (Métraux 1971; Orliac y Orliac 1998) y una de las seis que se introdujeron a Nueva Zelanda (Sykes 1969; Matthews 1996). *B. papyrifera*, perteneciente a la familia de las Moraceae, es una planta dioica y perenne en su hábitat nativo, que corresponde a Sudeste asiático (Matthews 1996). Esta especie es usada en el este de Asia para la elaboración de papel (“washi” en Japón) y textiles, como forraje y planta medicinal. En la medicina

china tradicional su uso es diverso (Wang *et al.*, 2012). Su propagación en el Pacífico es de tipo vegetativa, tal como muchas otras especies cultivadas por los polinésicos (Barker, 2002; Elevitch, 2006).

Los textiles manufacturados a partir de esta especie, se conocen como tela de corteza (“*bark-cloth*”) o “*tapa*”. El nombre para estos textiles en Samoa es *siapo*, en Tonga es *ngatu*, mientras que en Fiji se conoce como *masi* (Ewin, 2009). En Hawái la *tapa* que no está pintada se conoce como *kapa*, y en Niue como *hiapo*. La riqueza de términos para este textil refleja la importancia cultural y económica de este material para los pueblos de Oceanía. El término *tapa* se utilizaba originalmente solo en Tahití y se expandió su uso por los europeos que viajaron por Oceanía en el siglo XVIII, usándola como término genérico para las telas de corteza. La palabra *tapa* significa ‘borde’ en tahitiano (Mesenhöller y Lueb, 2013).

Para la elaboración de *tapa* a partir de *B. papyrifera*, se requiere que los tallos de esta especie alcancen una altura de aproximadamente 3 metros. Es necesario además que genere tallos largos, delgados y sin ramificaciones. Una vez alcanzada la altura deseada, el tallo de la planta se corta, se retira la corteza, y luego se humedece, remoja, raspa y golpea en una superficie plana (Barker, 2002). En algunos casos (en especial en las *tapas* tardías de Hawái, correspondientes al período post-contacto occidental), se incluía un proceso temprano de fermentación, que deja el material más pegajoso y cohesivo. En el proceso de golpeado, se obtienen trozos que alcanzan el doble del ancho original de la tira de corteza utilizada. A partir de tiras de corteza de 8 cm de largo, se puede obtener *tapa* de hasta 50 cm de largo, y dependiendo de la intensidad del golpeado, se obtienen telas de diferentes texturas y grosores (ver **Figura 2**). La *tapa* antigua también puede ser reparada de esta manera, aunque no es un proceso común. En algunas islas, la tela incluso es barnizada con goma vegetal para hacerla resistente a la lluvia (Mesenhöller y Lueb, 2013). La *tapa* obtenida en muchas islas es decorada, utilizando técnicas de estampado, impresión y dibujos a pulso (Barker, 2002).

En *tapas* del siglo XIX, post contacto europeo, analizadas mediante espectroscopía de fluorescencia con rayos X y HPLC, se determinó el uso de pigmentos y colorantes tradicionales e introducidos en la decoración de las telas. Entre las especies que proveen pigmentos destaca el noni (*Morinda citrifolia*), planta introducida a Hawái por los polinésicos hace aproximadamente 1000 años, y que produce un colorante amarillo-anaranjado, generado principalmente por un compuesto antraquinónico. Con el fin de producir pigmentación roja, los hawaianos agregaban coral quemado (Ca(OH)_2), ya que la solución alcalina favorece el cambio de color de este compuesto. También se utilizaban algunos materiales inorgánicos, como el óxido de hierro como pigmento rojo (Bisulca *et al.*, 2015).



Figura 2. Proceso de manufacturación de textiles de corteza o *tapa*. **A.** *Broussonetia papyrifera*. **B y C.** Separación de la corteza del tallo de *B. papyrifera*. **D.** Proceso de humedecimiento y golpeado de la corteza. **E.** *Tapa* terminada sin decoración. **F.** Textil o *tapa* terminada con decoración final. (Fotografías A. Seelenfreund).

El uso de estas telas es muy variado en las diferentes islas del Pacífico. Este textil fue utilizado como ofrendas en contextos ceremoniales, donde la exposición de la *tapa* tiene una connotación que revela el prestigio y la fuerza de los grupos que la produjeron. Los diseños exponen vigor y poder, destacando en sus motivos lo cotidiano y social de su cultura (Mesenhöller y Lueb, 2013). La *tapa* se utilizaba como vestimenta en rituales religiosos más que como prenda de uso cotidiano. Era producida en gran escala y se utilizaban piezas de gran tamaño como tela decorativa en fiestas importantes, como matrimonios o eventos privados de los jefes de la isla, así como también en sus funerales, dado que este textil es un símbolo de riqueza (Barker, 2002; Seelenfreund *et al.*, 2010, Mesenhöller y Lueb, 2013).

Esta tela también fue usada para envolver a los recién nacidos, ya que al provenir del otro mundo, se considera que contienen en su cuerpo parte de la energía sagrada que mueve el mundo. La piel es parte del límite del cuerpo, y la *tapa* cumplía el rol de ser una piel adicional, a modo de envoltorio o corteza, que refuerza y limita el flujo de esta energía sagrada. El tatuado también cumplía este rol, a modo de blindaje de la piel. Los patrones geométricos encontrados en *tapas* y tatuajes en las armas que llevaban los guerreros tonganos y fijianos, se relacionan con el empoderamiento y la fortaleza (Mesenhöller y Lueb, 2013).

Dada la importancia de la *tapa* en el ámbito social y religioso, y a su amplia producción y utilización en el Pacífico, el estudio genético de la especie fuente de fibra para la elaboración de este textil (*B. papyrifera*), representa una aproximación novedosa y culturalmente diferente para comprender el proceso del poblamiento del Pacífico.

1.5 Estudios genéticos realizados en *Broussonetia papyrifera*

Con el fin de evaluar la diversidad genética de la población *B. papyrifera* presente en Oceanía Remota, nuestro grupo de investigación ha utilizado en forma exitosa diversos marcadores moleculares para el estudio de muestras contemporáneas de esta especie.

El marcador ITS-1 (no así la región ITS-2) exhibió diversidad, pues se determinó la presencia de un polimorfismo en el sitio relativo 203 que logra distinguir a los individuos provenientes de Asia (variante G) de los que provienen de Oceanía Remota (variante T) (Seelenfreund *et al.*, 2011). El marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) también permitió diferenciar muestras asiáticas de muestras de Oceanía Remota, observándose además dos poblaciones en Hawái, lo que sugiere al menos dos eventos de introducción de esta especie (González-Lorca *et al.*, 2015). Estudios realizados con un marcador de sexo para esta especie (*Male Marker*), indican además que en las islas del Pacífico sólo se encuentran individuos femeninos, a excepción del archipiélago de Hawái, donde se encontraron ambos sexos (Peñailillo *et al.*, 2016).

Por otra parte, los análisis de muestras contemporáneas de *B. papyrifera* con SSRs, han encontrado diversidad genética en las muestras provenientes de Oceanía, sugiriendo diferencias entre poblaciones de Polinesia Oriental y Polinesia Occidental (Olivares, 2016). Además, con estos marcadores se confirmó la presencia de más de una población de esta especie en Hawái, reafirmando los resultados obtenidos con ISSR y *Male Marker* (Peñailillo *et al.*, 2016).

Es preciso señalar que la evaluación de la diversidad genética de *B. papyrifera* en Oceanía Remota a partir de material contemporáneo provee información sobre la diversidad genética actual de las poblaciones en estudio, lo cual no necesariamente refleja su diversidad genética en el pasado. El uso de material antiguo, ya sea proveniente de herbarios o de objetos que actualmente se encuentran en colecciones en museos, puede entregar información sobre las poblaciones pasadas. Dado que la morera de papel ha desaparecido localmente en algunas islas, mientras que otras son de muy difícil acceso, es de gran interés realizar estudios material antiguo de *B. papyrifera*.

El trabajo realizado por Payacán (2015) presenta la diversidad genética de *B. papyrifera* en las islas del Pacífico a partir de muestras de herbarios, utilizando los marcadores moleculares ITS-1, la región *Male Marker*, y siete marcadores de SSR (Payacán, 2015). Conjuntamente, tanto los SSR como el marcador de sexo demostraron que algunas muestras de herbario antiguas poseen características genéticas distintas a las que se habían descrito hasta la fecha en muestras contemporáneas, lo cual fue un hallazgo de gran interés. Ejemplo de esto es el hallazgo de cuatro individuos masculinos en Polinesia, provenientes de las Islas Marquesas y de las Islas Australes.

El estudio genético de herbarios complementa el estudio realizado en hojas contemporáneas de *B. papyrifera*, sin embargo, permite acceder hacia el pasado solamente hasta el momento de la toma misma de la muestra. Es decir, las muestras más antiguas posibles de obtener corresponden al período cuando se produjo el contacto europeo (siglo XVII), cuando se crearon las primeras colecciones de herbarios con especies vegetales del Pacífico. Por otra parte, no existen muestras de herbarios de todas las islas de la Polinesia, lo que impide hacer un estudio genético exhaustivo de las poblaciones de *B. papyrifera* en el Pacífico.

Dada su importancia en el ámbito social y religioso, y a su amplia producción y utilización en el Pacífico, el estudio genético de muestras de *tapa* de los siglos XVIII, XIX y principios del siglo XX, es un novedoso modelo de estudio para inferir movimientos migratorios humanos, comportamientos agrícolas y sociales de las poblaciones polinésicas.

1.6 Estudio de piezas de *tapa* antigua como fuente de ADN para el estudio de poblaciones antiguas de *B. papyrifera*.

Los textiles de corteza, eran heredados de generación en generación, y al ser un símbolo de riqueza y poder, se conservaban en las familias por mucho tiempo. Además, fueron materiales etnográficos de interés para los europeos que los colectaron o recibieron como regalos en sus viajes por Oceanía en el siglo XVIII, y por lo que actualmente se encuentran en diversas colecciones del mundo. Por estos motivos, los textiles de *tapa* antigua pueden entregar información genética de las poblaciones de *B. papyrifera* presentes en Oceanía de tiempos incluso anteriores a los primeros contactos con los europeos, y anteriores a la toma de las primeras muestras para herbarios. El estudio de las piezas de *tapa* antigua exhibidas en diferentes museos en el mundo prometen ser una fuente de ADN para estudios moleculares y caracterización genética de *B. papyrifera* especialmente interesante. El aspecto cultural de estos textiles, (que no poseen los herbarios) hace que la caracterización genética de muestras de *tapa* contribuya una arista histórico-genética nueva no explorada hasta la fecha en estos textiles. Además,

contribuirá a poner en valor a cada ejemplar de estas mismas colecciones. Sin embargo, la pregunta que cabe hacerse entonces es ¿Es posible obtener ADN a partir de *tapa* antigua y caracterizarlo mediante marcadores moleculares?

Las referencias más cercanas que tenemos respecto a la extracción de ADN a partir de matrices tan complejas, es el citado ejemplo de extracción de ADN a partir de los maderos de un barco que estuvo sumergido durante casi cuatro siglos, del cual se logró obtener una secuencia de 74 pb de ADN de cloroplasto (Speirs *et al.*, 2009); y el trabajo de Poulakakis *et al.*, 2007 en el que se reportó la extracción de ADN a partir de pergaminos griegos de los siglos XIII-XVI y se amplificó una pequeña secuencia del gen de la citocromo b, que permitió identificar la especie animal a partir del cual fue elaborado cada pergamino (Poulakakis *et al.*, 2007).

Sin embargo, la obtención de ADN de textiles elaborados a partir de las fibras de *B. papyifera*, sólo se ha reportado por nuestro grupo (Moncada *et al.*, 2013). En este trabajo se utilizaron muestras de *tapa* contemporáneas de diferentes islas del Pacífico, y se informó la extracción de ADN de un tamaño suficiente para la amplificación de secuencias de aproximadamente 300 pb de la región ITS-1 y de fragmentos de aproximadamente 400 pb correspondientes a SSRs nucleares. Este es el único antecedente de extracción de ADN a partir de este tipo de matriz. No deja de ser sorprendente que sea posible obtener ADN de este material, pues como se mencionó anteriormente, el proceso de elaboración de estas piezas textiles incluye un proceso mecánico de golpes y un proceso químico en algunas islas del Pacífico que corresponde a la fermentación de las cortezas en agua de mar durante unos días.

En resumen, se poseen los siguientes antecedentes:

- ✓ Es posible obtener ADN a partir de matrices complejas, como por ejemplo, maderos de barcos hundidos (Speirs *et al.*, 2009) y pergaminos del siglo XIII (Poulakakis *et al.*, 2007).
- ✓ Es aconsejable utilizar marcadores moleculares de secuencia corta (<500 pb) para caracterizar genéticamente ADN antiguo.
- ✓ Se ha reportado la caracterización exitosa de ADN a partir de muestras de herbario de *B. papyrifera* utilizando marcadores moleculares de secuencias cortas, como la región ITS-1, el marcador de sexo *Male Marker*, y siete microsatélites.
- ✓ Se ha reportado la extracción de ADN a partir de *tapa* contemporánea, obteniéndose secuencias (<400 pb) identificadas como provenientes de *B. papyrifera*.

Dado que es posible obtener fragmentos de aproximadamente 400 pb a partir de *tapa* contemporánea, los marcadores más adecuados para la caracterización genética de material de *tapa* etnográfica antigua son el marcador ITS, el marcador de sexo *Male Marker* y marcadores de microsatélites. Dado que se ha informado que el marcador ITS-1 se puede utilizar como *DNA barcoding*, es decir, que permite identificar la especie vegetal de la cual se origina el material genético analizado, se puede utilizar este marcador para verificar que las fibras utilizadas para la elaboración de estas piezas textiles provienen de *B. papyrifera* (Wang *et al.*, 2015). Por otra parte, estos marcadores fueron utilizados anteriormente por nuestro grupo para caracterizar muestras contemporáneas y de herbario de *B. papyrifera*, lo que permitirá integrar estos resultados con los datos obtenidos de material de *tapa* etnográfica antigua.

En base a estos antecedentes, se proponen las siguientes hipótesis:

2 Hipótesis

- 1.- Es posible extraer y caracterizar ADN de textiles etnográficos (*tapa*) antiguos mediante la región ITS-1 para identificar la especie vegetal utilizada como fuente de fibra.
- 2.- Es posible caracterizar ADN de *B. papyifera* aislado a partir de textiles etnográficos antiguos (*tapa*) mediante un marcador de sexo y marcadores de microsátélites, para aportar a la comprensión general de la dispersión antrópica de esta especie en Oceanía Remota.

3 Objetivos

3.1 Objetivo General.

Aislar y caracterizar ADN de muestras de textiles etnográficos (*tapa*) antiguos mediante marcadores moleculares y comparar las características genéticas de los textiles elaborados a partir de *B. papyrifera* con los datos de muestras contemporáneas y de herbario, con el fin de aportar a la comprensión general de la dispersión antrópica de esta especie en Oceanía Remota.

3.2 Objetivos Específicos.

1. Determinar las condiciones de extracción y análisis de muestras de prueba de *tapa* contemporánea.
2. Extraer y evaluar la obtención de material genético a partir de muestras etnográficas de *tapa* antigua, determinar su amplificabilidad e identificar la especie de origen de la fibra mediante el análisis de la región ITS-1.
3. Caracterizar material genético obtenido de textiles elaborados a partir de *B. papyrifera* mediante un marcador de sexo y 10 SSR.
4. Extraer y caracterizar ADN de muestras de herbario de *B. papyrifera* provenientes de las mismas islas o islas cercanas de las *tapas* de la colección.
5. Integrar los resultados obtenidos del análisis de las muestras de *tapa* con los de muestras de herbario y la información disponible de muestras contemporáneas analizadas con los mismos marcadores, para aportar a la comprensión de la dispersión antrópica de esta especie en el Pacífico.

4 Materiales y Métodos.

4.1 Materiales.

4.1.1 Reactivos e insumos generales.

Bioline (Singapore): EasyLadder I (Cat. #BIO-33045).

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

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

Kapa Biosystems (Boston, Massachusetts, EEUU): KAPA HiFi HotStart PCR Kit (Cat. #07958897001).

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

Merck (Darmstadt, Alemania): Cloroformo p.a., etanol p.a., alcohol isoamílico p.a., Extran® MA 01 alcalino.

Promega® (Madison, Wisconsin, E.E.U.U.): DNA polimerasa GoTaq® Flexi (Cat. #M8295), dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Cat. #U1330), estándar de peso molecular de ADN λ /Hind III (Cat. #G171A).

Quiagen (Hilden, Alemania): MinElute PCR Purification Kit (Cat. #28004)

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

USBiological (Swampscott, Massachusetts, E.E.U.U.): Tris-base (Grado USP), EDTA (Grado Biología Molecular), ácido bórico (Grado Biología Molecular).

Thermo Scientific (Pittsburgh, Pensilvania, E.E.U.U.): Tampón de carga 6X (Cat. #R0611, estándar de peso molecular de ADN 1 kb plus (Cat. #SM1331). Placas negras de poliestireno Nunc™ F96 MicroWell™ (Cat. #237108).

Vetec Analytical Reagents (Toluca, México): Cloruro de sodio p.a.

4.1.2 Soluciones y Amortiguadores.

Cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1 v/v.

Cloruro de sodio (NaCl) 5 M.

Etanol 70% y 76%.

Tampón de extracción método modificado de Lodhi (CTAB 2%, Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8 y β -mercaptoetanol 1%).

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

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

4.1.3 Equipos.

Baño termostático Haake® modelo K15 DC1.

Baño seco VWR® analog heat block.

Espectrofotómetro UV-Visible NanoDrop™ 2000.

Termociclador Techne® TC-512.

Termociclador GeneAmp® PCR System 2700.

Termociclador Thermo® Hybaid Px2.

Transiluminador Ultra Lum® UVB-20.

Lector Multi-Modal Sinergy MX, BioTek.

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

4.1.4 Material Biológico

4.1.4.1 Material de tapa de prueba.

Se utilizaron seis muestras contemporáneas provenientes de las islas de Tonga, Samoa, Marquesas, Isla de Pascua y Hawái. En el **Anexo I** se indica el código de la muestra y la información disponible relativa a la isla de origen y el año de manufacturación.

4.1.4.2 Material de textiles etnográficos y arqueológicos.

Para la realización de esta tesis se dispuso de 17 muestras de *tapa* etnográfica antigua, provenientes de piezas de tapa de colecciones de museo y colecciones personales. Las dimensiones de las muestras varían

desde 5 cm x 5 cm a pequeñas tiras de fibra de menos de 1 cm por lado, como se aprecia en la **Figura 3**.

Las muestras BQUCHTE001 y BQUCHTE003-BQUCHTE010 proceden de colecciones de museo (B.P. Bishop Museum y Honolulu Museum of Arts, Hawái, EE.UU.), y las muestras BQUCHTE002 y BQUCHTE011 proceden de la colección privada de T. Allen.

Las muestras BQUCHTE013-BQUCHTE017 provienen de un contexto arqueológico y fueron encontradas en el año 2007 en la isla de Agakauitai, cercana a Mangareva, la isla principal del archipiélago de las islas Gambier y actualmente se encuentran en el Musée de Tahiti et des Îles, en Papeete, Tahiti, Polinesia Francesa. Según el análisis de datación, su fecha de elaboración es aproximadamente entre los años 1760-1810, lo cual corresponde a un periodo de pre-contacto europeo para esa isla (Seelenfreund *et al.*, 2016).

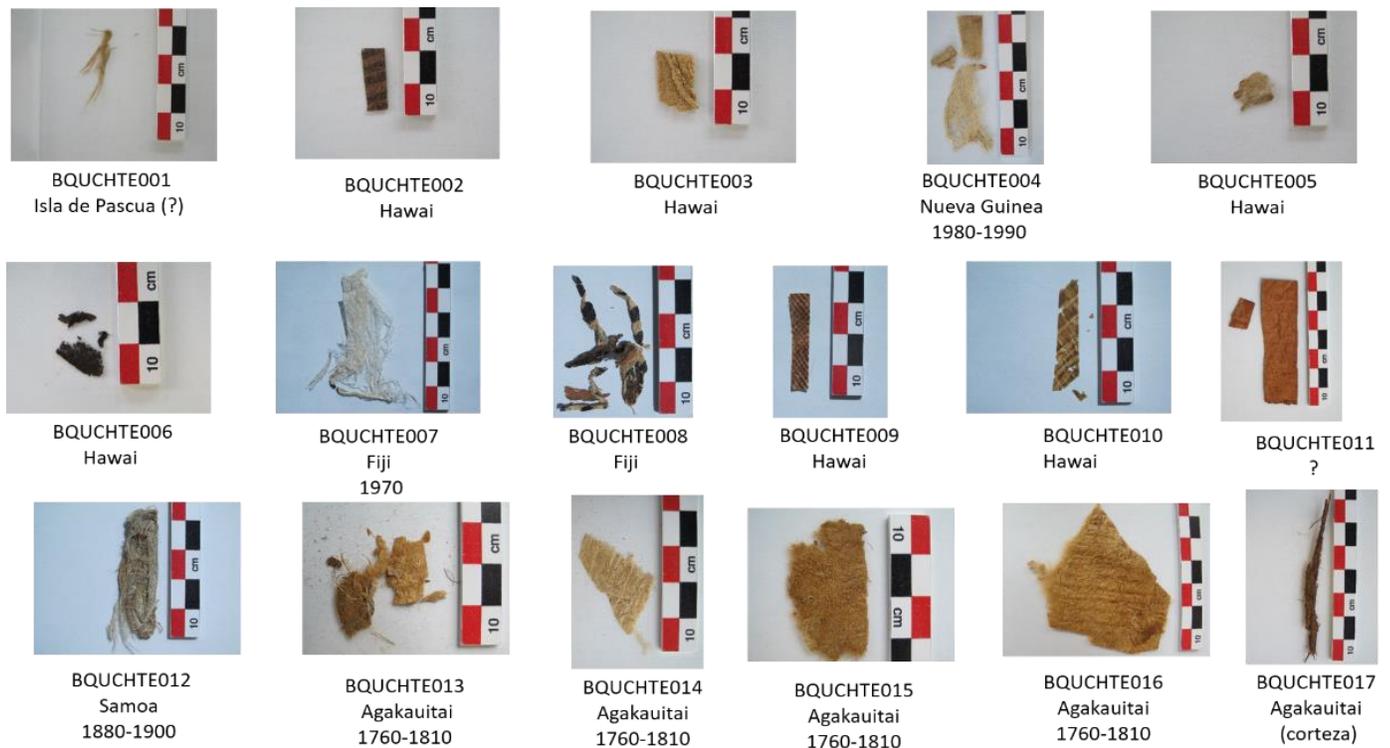


Figura 3. Fotografías de las 17 muestras de textiles etnográficos (*tapa*) utilizadas en esta tesis. En la figura se indica el código, la isla de procedencia, y en algunos casos el año aproximado de manufacturación.

En la **Tabla 1** se indica el código de las muestras analizadas en esta tesis, y la información disponible en la etiqueta de cada una de ellas, como la isla de procedencia, el año aproximado de manufacturación.

Tabla 1. Muestras de textiles etnográficos (*tapa*) antiguos analizados en esta tesis. Código de la muestra, isla de procedencia, año de manufacturación y etiqueta de la muestra.

Código	Isla	Año de elaboración	Etiqueta
BQUCHTE001	Isla de Pascua (?)	S.I.	Bishop Museum D. 2228 Cordage from Easter Island? Tapa Cloth
BQUCHTE002	Hawai	S.I.	Bishop Museum cat #2494 Hawaiian
BQUCHTE003	Hawai (?)	S.I.	Bishop Museum "No water mark" on envelop-no number, probably Hawai
BQUCHTE004	New Guinea	1980-1990	New Guinea 1980-1990 Coll. Tricia Allen
BQUCHTE005	Hawai	S.I.	Honolulu Museum of Art, Hawai 622.1
BQUCHTE006	Hawai	S.I.	Honolulu Museum of Art, Hawai #4121
BQUCHTE007	Fiji	1970	Fiji 1970 T3
BQUCHTE008	Fiji	S.I.	Honolulu Museum of Art, Fiji 2506
BQUCHTE009	Hawai (?)	S.I.	Bishop Museum cat #2492
BQUCHTE010	Hawai (?)	S.I.	Hawai? Sin dato
BQUCHTE011	SI	S.I.	Bishop Museum? Emory collection? T8
BQUCHTE012	Samoa	1880-1900	Tapa 1880-1990 American Samoa Coll. Tricia Allen
BQUCHTE013	Agakautai, Archipiélago Gambier	1760-1810	Tapa Mangareva Bolsa A (5)
BQUCHTE014	Agakautai, Archipiélago Gambier	1760-1810	Mangareva-Tapa Bolsa A Museo Tahiti y las Islas 23/7/14 (3)
BQUCHTE015	Agakautai, Archipiélago Gambier	1760-1810	Mangareva Tapa Bolsa B 23/7/14 (4)
BQUCHTE016	Agakautai, Archipiélago Gambier	1760-1810	Mangareva Tapa Bolsa B 23/7/14 (7)
BQUCHTE017	Agakautai, Archipiélago Gambier (corteza)	S.I.	Corteza o Astilla de trozo de madera cubierta por 'la tapa' funeraria (de bolsa A) (6)

S.I.: Sin Información

4.1.4.3 Material de herbario antiguo.

Para la realización de esta tesis se dispuso de una colección de 51 muestras de hoja de 49 herbarios de *B. papyrifera*, provenientes de localidades de las cuales anteriormente no se poseía material de herbario

caracterizado. Estas muestras fueron recolectadas entre los años 1903 y 1985 y fueron facilitados en préstamo por el Museo Bishop de Hawái. En el **Anexo II** se resume la información de las muestras de herbario analizadas en esta tesis.

4.2 Metodología

4.2.1 Trabajo con muestras de ADN y toma de muestras de herbario.

4.2.1.1 Cuidados para el trabajo con muestras de *tapa* etnográfica antigua y herbario antiguo.

El trabajo con materiales que son fuente de ADN, como las muestras de *tapa* etnográfica antigua y las muestras de herbarios utilizadas en esta tesis, requiere de ciertas atenciones y cuidados para evitar la contaminación con ADN contemporáneo. La extracción de ADN se realizó en el laboratorio de ADN de la Dra. Elizabeth Matisoo-Smith (Universidad de Otago, Nueva Zelanda), siguiendo los criterios de trabajo con ADN publicados por diversos autores (Cooper y Poinar, 2000; Gilbert *et al.*, 2005) en tres aspectos diferentes: diseño experimental, características del laboratorio de ADN y manipulación y trabajo con muestras antiguas.

- a) En el aspecto experimental es crucial la utilización de controles de extracción para verificar que los reactivos utilizados durante la extracción no se encuentran contaminados. Deben ser incluidos también en las reacciones de amplificación a modo de control, junto con controles negativos de amplificación (que consisten en muestras sin templado) con el fin de pesquisar cualquier tipo de contaminación en cada uno de los pasos del diseño experimental. Además, es importante tener en cuenta que generalmente la cantidad de muestra disponible para realizar extracción de ADN y posteriores análisis genéticos es limitada, por lo que el diseño experimental debe prever la realización de múltiples extracciones (en triplicado si es posible) y la optimización del uso del material genético durante el análisis del mismo.
- b) Un laboratorio de ADN debe encontrarse en un edificio diferente con respecto al lugar donde se trabaja con ADN contemporáneo y se realizan las reacciones de amplificación; debe tener un sistema de presión positiva; un sistema de iluminación UV y reactivos y equipos dedicados exclusivamente al trabajo con ADN (por tanto, no deben haber estado antes en un laboratorio de ADN contemporáneo).
- c) Entre los cuidados que se debe tener durante el trabajo con muestras de ADN se destacan: la necesidad de un cambio de ropa y de zapatos antes de ingresar a laboratorio de ADN, utilización de un overol de trabajo, de mascarilla, red para el cabello y una máscara que cubra todo el rostro;

trabajo en todo momento con doble guante; y la prohibición del ingreso de objetos que hayan estado en contacto con ADN contemporáneo (celular, joyas, reloj, cuaderno de protocolo, etc.). También es necesario limpiar el área de trabajo entre la extracción de una muestra y otra con una solución de cloro y etanol al 76%. Todas estas precauciones son necesarias para evitar la contaminación con ADN contemporáneo humano.

Con el fin de obtener ADN de las muestras en estudio que cumpliera con las características señaladas, la extracción de la totalidad de las muestras etnográficas antiguas de *tapa* y de las muestras de herbario se realizó en el Laboratorio de ADN antiguo de la Universidad de Otago, Dunedin, Nueva Zelanda bajo la dirección de la Dra. Elizabeth Matisoo-Smith.

La preparación de las reacciones de amplificación por PCR también se realizó en el laboratorio de ADN antiguo en la Universidad de Otago, agregando los controles positivos contemporáneos de ADN en el laboratorio de ADN moderno justo antes de iniciar la reacción de amplificación de los extractos de ADN de *tapa* etnográfica. Dichos laboratorios se encontraban en edificios físicamente separados.

Parte de las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en la Universidad de Chile (Santiago, Chile), las cuales se prepararon en una sala físicamente separada del laboratorio de Biología Molecular (en el cual se trabaja con ADN moderno). Dicha sala (en adelante sala de trabajo de ADN) está equipada con una estación de trabajo de acrílico con luz UV (prendida previamente durante 20 min antes de su utilización) y un refrigerador para guardar a 4°C las extracciones de ADN realizadas en la Universidad de Otago. Los reactivos y materiales de laboratorio utilizados para preparar la reacción de PCR se dedicaron exclusivamente al trabajo con ADN. Los controles positivos de ADN moderno se agregaron en el laboratorio de Biología Molecular, donde se encuentran los termocicladores para iniciar la amplificación. La totalidad de las muestras de herbario se amplificaron en la Universidad de Chile.

4.2.1.2 Protocolo de toma de muestras de material de herbario.

Las 49 muestras de herbario provenientes del Bishop Museum fueron solicitadas formalmente en préstamo por la investigadora responsable del proyecto FONDECYT en el que se enmarca esta tesis, siguiendo el protocolo establecido. Estos préstamos se realizaron por medio del Museo Nacional de Historia Natural (MNHN). Una vez aceptada la solicitud, los ejemplares de herbario del Bishop Museum fueron enviados al MNHN por un período de un año, a contar de Agosto del 2015. Los ejemplares en préstamo del Bishop Museum fueron devueltos en la fecha acordada y recibidos en conformidad.

La toma de muestras se realizó en la sección de botánica del MNHN. En la **Figura 4** se muestran las etapas de este procedimiento, descrito por Payacán (2015):

1. Cada ejemplar fue fotografiado antes de la intervención (**Figura 4.A**). Se observó la disposición estética de las hojas del herbario, con el fin de seleccionar la zona desde la cual se tomaría la muestra. Cada herbario presenta en la esquina superior derecha el código del museo; en la esquina inferior derecha se informa el año, lugar y recolector de la muestra; en la esquina inferior izquierda se informa el nombre del taxónomo que identificó el ejemplar de estudio y la fecha de dicha identificación.
2. Para la toma de muestra se seleccionaron zonas del herbario donde las hojas no fueran visibles, tomando trozos de una superficie no mayor a 1 cm² y que no presentan evidencia de infección por patógenos. Se tomó muestra en triplicado en todos los casos, excepto en las muestras BISH58346, BISH58360, BISH58363, BISH8382, BISH58347, de las que se tomó muestra en duplicado; y en la muestra BISH32928 que se tomó sólo una replicado. Los herbarios BISH58357 y BISH58358 tenían dos especímenes en la misma hoja de cartulina, indicando nombres diferentes para cada uno. De estos herbarios se muestrearon ambos especímenes, aumentando así el número de muestras de herbarios recogidas de 49 a 51. Para las extracciones de ADN se utilizó un replicado y se guardaron el segundo y tercer replicado a modo de contra-muestras.
3. La zona intervenida fue indicada y fotografiada (**Figura 4.B**). En todos los herbarios intervenidos se pegaron etiquetas indicando el uso dado a las muestras recolectadas (análisis de ADN), la fecha de toma de muestra, el nombre de la investigadora responsable del proyecto, las instituciones involucradas, el número de proyecto y el número de catálogo interno del proyecto.
4. Se fotografió el ejemplar de herbario luego de la intervención (**Figura 4.C**). Las muestras tomadas se introdujeron en tubos de 1,5 ml estériles y se guardaron en una habitación separada de donde se almacenan las muestras contemporáneas.

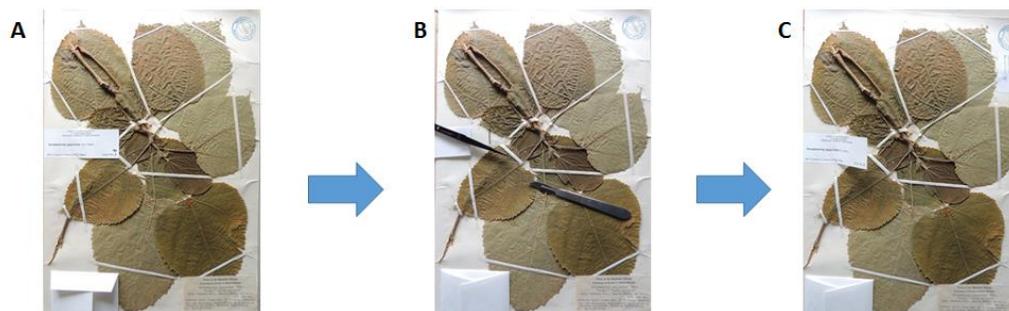


Figura 4. Protocolo de toma de muestras de herbarios facilitadas por el Bishop Museum y el Museo Nacional de Historia Natural. El ejemplo presentado corresponde a la muestra BISH58350, proveniente de Hawái y recolectada por Hatheway, W.H. en el año 1950. **A:** Fotografía del herbario antes de la toma de muestra; **B:** Fotografía en la cual se indica la zona intervenida del herbario. **C:** Fotografía del herbario luego de la intervención.

4.2.2 Determinación de las condiciones de extracción y análisis de ADN de muestras de prueba.

4.2.2.1 Optimización de la extracción de ADN a partir de muestras de prueba.

La extracción de ADN a partir de muestras contemporáneas de *tapa* se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (que se encuentra físicamente separado del Laboratorio de Biología Molecular), con el fin de evitar contaminación con ADN contemporáneo de *B. papyrifera*. Durante todo el proceso de extracción de ADN se utilizó un overol de trabajo y se tomaron las precauciones anteriormente mencionadas para el trabajo con ADN antiguo (utilización de doble guante, limpieza de las zonas de trabajo con una solución cloro y luego etanol al 76%, y la utilización de reactivos especialmente dedicados para el trabajo con *tapa* contemporánea). En cada extracción se incluyó un control de extracción, que consiste en un tubo que fue procesado siguiendo el mismo protocolo de extracción de ADN, pero sin agregar muestra de *tapa* en el paso inicial.

El protocolo utilizado para la extracción en muestras de *tapa* se basa en el método de Lodhi *et al.* (1994) modificado según lo publicado por Moncada *et al.* (2013). Las modificaciones que se realizaron al protocolo original correspondieron al aumento de la concentración de β -mercaptoetanol de 0,1%, a 1% y la eliminación del uso de PVP en el tampón de extracción. El procedimiento consistió en la separación de las fibras del textil mediante la utilización de pinzas sobre un mortero autoclavado y lavado con una solución de cloro y posteriormente con una solución de etanol al 76%. Posteriormente se procedió a empapar las fibras con 800 μ L de tampón de extracción que contiene CTAB al 2% y β -mercaptoetanol al 1%, presionando suavemente las fibras sobre el mortero. Las fibras se incubaron durante 20 min, 1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 24 h y 48 h tanto a 37°C como a 60°C, con el fin de evaluar la temperatura y tiempo óptimo de incubación para aumentar el rendimiento de la extracción. Se procedió a extraer proteínas e impurezas con 600 μ L de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se recuperaron 450 μ L de fase acuosa y se añadieron 225 μ L de NaCl 5M. Se precipitaron los ácidos nucleicos utilizando 900 μ L de etanol absoluto frío y se dejó a 4°C durante toda la noche. El ADN precipitado se separó mediante dos centrifugaciones consecutivas de 3 min cada una, a 3.000 rpm y 6.000 rpm. El precipitado se lavó con 500 μ L de etanol 76% mantenido a 4°C, y se centrifugó finalmente a 6.000 rpm durante 5 min. El etanol residual se evaporó a 50-55°C en baño seco. El ADN obtenido se suspendió en 100 μ L de agua MilliQ autoclavada y se almacenó a -20°C. En cada extracción se incluyó un control de extracción.

4.2.2.2 Evaluación de la integridad del ADN extraído.

La integridad del ADN genómico obtenido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X. Las muestras se cargaron utilizando 5 µL de ADN genómico, 1 µL de GelRed™ 1:100 y 1 µL de tampón de carga 6x. Se incluyó 1,5 µL del estándar de peso molecular GeneRuler™ 1kb plus con 1 µL de GelRed™ 1:100. Los geles se visualizaron en un transiluminador UV.

4.2.2.3 Análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido.

4.2.2.3.1 Medición de concentración de ADN mediante espectrofotometría.

Se evaluó la concentración y pureza del ADN obtenido mediante absorbancia a 260 nm y la razón A260/A280, respectivamente. Las mediciones se realizaron en un equipo Nanodrop™ 2000 utilizando 1 µL de ADN genómico.

4.2.2.3.2 Medición de concentración de ADN mediante fluorescencia.

También se utilizó el reactivo Picogreen®, el componente crítico del sistema comercial Picogreen®dsDNA Assay Kit, agente intercalante de ADN que emite fluorescencia en forma específica al unirse al ADN de doble hebra, para determinar la concentración de ADN. Las mediciones mediante este sistema se realizaron en el equipo Synergy Mx a una longitud de excitación de 485 nm y una longitud de emisión de 538 nm, en placas Nunc negras de 96 pocillos con fondo plano. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se preparó una solución de trabajo 1:200 diluyendo 1 µL de Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent en 199 µL de amortiguador TE 1X provisto por el fabricante. A cada pocillo se agregaron 100 µL de solución de trabajo, 199 µL de amortiguador TE 1X y 1 µL de ADN genómico. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y se midió la concentración de ADN. Para obtener el valor de concentración de ADN en ng/µL se restó el valor del blanco a cada valor de fluorescencia de las muestras, el cual se interpoló en la curva de calibración obtenida para cada conjunto de lecturas. Finalmente, el valor de concentración obtenido se multiplicó por el factor de dilución empleado (200x). La curva de calibración se obtuvo con 6 puntos diluyendo el estándar de genoma de fago λ, provisto por el fabricante. (Ver **Anexo III**).

4.2.2.4 Análisis del material genético obtenido a partir del material de *tapa* contemporánea.

4.2.2.4.1 Amplificación de la región ITS-1.

Se utilizaron los siguientes partidores: sentido ITS-A (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') y antisentido ITS-C (5'-GCA ATT CAC ACC AAG TAT CGC-3'). El medio de reacción consistió

en 2 µL de ADN genómico sin diluir, 1X de amortiguador Green GoTaq G2® Flexi Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,625 mM de dNTPs, 0,25 µM de cada partidor, 1 mg/mL de BSA y 0,2 U/mL de enzima GoTaq G2® Flexi DNA Polymerase (Promega). Como control negativo de amplificación se usó agua miliQ estéril. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C durante 7 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en un transiluminador UV (Moncada *et al.*, 2013).

4.2.2.4.2 Amplificación del marcador de sexo (*Male Marker*).

Se utilizó los partidores y el protocolo diseñado por Peñailillo *et al.* (2016) para la PCR dúplex en la cual se obtienen dos amplicones de 420 pb y 273 pb utilizando el partidor sentido MMF (5'- AGC CCT TTG GAT CGC GAC TTA GAA-3') y los partidores antisentido MMRS18 (5'- TGT CAA CGT CAT CAT CGT CGT CGT-3') y MMRL (5'- CTG GAC AAG ACC AAC TTT GAA TCC G-3'). El amplicón de 420 pb se obtiene utilizando los partidores MMF – MMRL, fragmento común tanto para especímenes femeninos y masculinos. El amplicón de 273 pb se obtiene utilizando los partidores MMF-MMRS18, fragmento que se obtiene exclusivamente en individuos masculinos. (Peñailillo *et al.*, 2016). El medio de reacción consistió en 3 µL de ADN genómico sin diluir, el amortiguador Green GoTaq G2® Flexi Buffer 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,625 mM de dNTPs, 0,5 µM de partidor sentido, 0,25 µM de partidor antisentido MMRS18, 0,25 µM de partidor antisentido MMRL, BSA 1mg/mL y 0,125 U/mL de ADN polimerasa GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase en un volumen final de 20 µL. Como control negativo de amplificación se usó agua miliQ estéril. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, seguido por una extensión final 72°C durante 7 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en un transiluminador UV (Payacán, 2015).

4.2.2.4.3 Amplificación de Microsatélites (SSR)

Se utilizaron siete marcadores de SSR de los diez disponibles para la realización de esta tesis, que se detallan en el **Tabla 2**. Los marcadores escogidos para esta primera aproximación fueron: Bro 08, Bro 15, Bropap 02214, Bropap 2801, Bropap 20558, Bropap 26985 y Bropap 30248. Las reacciones de PCR se realizaron usando un partidor sentido, en cuyo extremo 5' se incorporó una región conservada de 18 pb del fago M13 (denominada cola M13), a la que se unió un partidor universal de M13 marcado con un fluoróforo (6-FAM-5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') de acuerdo a Schuelke (2000),

permitiendo visualizar el producto de PCR generado mediante electroforesis capilar. El medio de reacción consistió en 2 µL de ADN genómico sin diluir, 1X de amortiguador Green GoTaq G2® Flexi Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,125 µM de partidor sentido, 0,5 µM de partidor sentido M13, 0,5 µM de partidor antisentido, BSA 1 mg/mL y 0,125 U/µL de enzima GoTaq G2® Flexi DNA Polymerase en un volumen final de 20 µL. Como control negativo de amplificación se utilizó agua milliQ estéril. El programa de PCR consistió de dos etapas: (i) desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C (o 56°C, dependiendo del microsatélite) durante 45 s y 72°C durante 45 s, (ii) 8 ciclos de 95°C durante 30 s, 53°C durante 45 s, 72°C durante 45 s y una extensión final de 72°C durante 30 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X y visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Payacán, 2015).

Tabla 2. Resumen de las características de los SSR disponibles para la realización de esta tesis.

<i>Marcador</i>	Motivo repetido	Temperatura de apareamiento	Rango de tamaño (pb)	Secuencia de partidores
Bro 08	(TC) ₁₇	55 °C	205-243	PS: 5' - TAG ACC CAC CTC CCA AAC AG-3'
				PA:5' - ATT CGG AGG CAT CTG AGA GA-3'
Bro 15	(CAAA) ₁₀	56°C	166-240	PS: 5' - CCG TAG CGA TCT TCC AGA AA-3'
				PA:5' - AAA GAA ATG GCG GAA ATG TG-3'
Bropap 02801	(AC) ₁₁	56°C	137-199	PS: 5' - GAC ATC TCA TAA AAT GTT TAA ATC CAG-3'
				PA:5' - AAT TGC CCT GTA GCA TTC CG-3'
Bropap 02214	(GA) ₁₉	55°C	230-274	PS: 5' - CGG AAG AGA GAG ATT ACA AAC TAG C-3'
				PA:5' - ACT TGA CCA TTC TAA GCA AGA CC-3'
Bropap 20558	(TAT) ₇	55°C	218 – 243	PS: 5' - TCC ACC ATC CAA CGA TGA AG-3'
				PA: 5' - GGG CTA AAC TAC CTT GTC CG-3'
Bropap 26985	(TG) ₁₂	56°C	176 – 244	PS: 5' - AGA ATC ACC ACT CTC CCT TGG-3'
				PA: 5' -TGG TTT GCT TCA TTC AAA AAG TG-3'
Bropap 30248	(GA) ₁₄	56°C	95 – 175	PS: 5' - AGA GCA GGG CAA GCA ATA TC-3'
				PA: 5' - GGT CAT CCA TTT GTC TGA ACC TC-3'
Bro 07	(TC) ₂	55 °C	200-295	PS: 5' - GCT TTC TGT ACC CCC AA ATG - 3'
				PA: 5' - TTC TTT AGC TCG AGG GCG TA - 3'
Bro 13	(GA) ₉	55°C	239-250	PS: 5' - AGA GAG GGA CAA CAT CAA CGA - 3'
				PA: 5' - TGG TCT GTG ACC CAT TTC TTC - 3'
Bropap 25444	(GA) ₁₄	55°C	176-274	PS: 5' - TCA CAC TTA CAC ACG GAG GG - 3'
				PA: 5' - GGT ACG TAA TTC CCA CCA CC - 3'

PS: Partidor sentido

PA: Partidor antisentido

4.2.2.5 Análisis de datos.

4.2.2.5.1 Análisis de las secuencias de ITS-1.

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se analizaron y editaron con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v7.2.3 (Hall, 1999). Posteriormente, se alinearon utilizando el método Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el software CLC Sequence Viewer.

4.2.2.5.2 Análisis del marcador de sexo *Male Marker*.

La tipificación de sexo se realizó mediante una inspección visual de los amplicones. Las bandas que se separaron por medio de electroforesis de geles de agarosa al 1,5% se fotografiaron bajo luz UV.

Se tipificó como individuo femenino al observar una única banda a 420 pb, mientras que se tipificó como individuo masculino cuando se observaron dos bandas de 420 pb y 273 pb.

4.2.2.5.3 Análisis de microsatélites (SSR).

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

4.2.3 Extracción de ADN a partir de muestras etnográficas de *tapa* antigua y determinación de su amplificabilidad mediante ITS-1.

4.2.3.1 Extracción de ADN a partir de muestras de *tapa* etnográfica antigua.

La extracción de ADN a partir de las muestras de *tapa* etnográfica antigua se realizó en el Laboratorio de ADN antiguo de la Universidad de Otago según el protocolo anteriormente descrito en el punto 4.2.2.1, incluyendo algunas modificaciones: las fibras se incubaron con 1000 µL tampón de extracción durante toda la noche a 60°C en agitación. En cada extracción se incluyó un control de extracción.

Se realizaron tres extracciones de ADN de las muestras de aquellas en que fue posible hacer triplicados (algunas muestras eran tan pequeñas que sólo fue posible realizar una única extracción). Se trabajó tomando en cuenta todas las exigencias mencionadas anteriormente en el punto 4.2.1.1 para el trabajo con materiales fuente de ADN.

El procedimiento consistió en la separación de las fibras del textil mediante la utilización de pinzas sobre un mortero autoclavado y lavado con una solución de cloro y posteriormente con una solución de etanol

al 76%. Posteriormente se procedió a empapar las fibras con 1000 μL de tampón de extracción, presionando suavemente las fibras sobre el mortero. Las fibras se incubaron durante toda la noche a 60°C. Se procedió a extraer proteínas e impurezas con 800 μL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se recuperaron 500 μL de fase acuosa y se añadieron 250 μL de NaCl 5M. Se precipitaron los ácidos nucleicos utilizando 900 μL de etanol absoluto frío y se dejó a 4°C durante toda la noche. El ADN precipitado se separó mediante dos centrifugaciones consecutivas de 3 min cada una, a 3.000 rpm y 6.000 rpm en microcentrífuga. El precipitado se lavó con 500 μL de etanol 76% mantenido a 4°C, y se centrifugó finalmente a 6.000 rpm durante 5 min. El etanol residual se evaporó a 50-55°C en baño seco. El ADN obtenido se suspendió en 100 μL de agua MilliQ autoclavada y se almacenó a -20°C.

4.2.3.2 Evaluación de la integridad del ADN extraído.

La integridad del ADN genómico obtenido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X, según lo descrito en el punto 4.2.2.2.

4.2.3.3 Análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido.

4.2.3.3.1 Medición de concentración de ADN mediante espectrofotometría.

Se evaluó la concentración y pureza del ADN obtenido mediante absorbancia a 260 nm y la razón A260/A280, respectivamente. Las mediciones se realizaron en un equipo Nanodrop™ 2000 utilizando 1 μL de ADN genómico.

4.2.3.3.2 Medición de concentración de ADN mediante fluorescencia.

Se utilizó el sistema comercial Picogreen® dsDNA Assay Kit, según el protocolo descrito anteriormente en el punto 4.2.2.3.2. Para obtener el valor de concentración de ADN en ng/ μL se restó el valor del blanco a cada valor de fluorescencia de las muestras, el cual se interpoló en la curva de calibración obtenida para cada conjunto de lecturas. Finalmente, el valor de concentración obtenido se multiplicó por el factor de dilución empleado (200x).

4.2.3.4 Amplificación de la región ITS-1

La amplificación de este marcador en extractos de ADN de muestras de *tapa* etnográfica antigua se realizó tanto en la Universidad de Otago como en la Universidad de Chile, utilizando diferentes polimerasas y programas para la reacción de PCR. Los partidores utilizados fueron los mismos en ambos casos: sentido ITS-A (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') y antisentido ITS-C (5'-GCA ATT CAC ACC AAG TAT CGC-3').

4.2.3.4.1 Amplificación de la región ITS-1 en la Universidad de Otago:

La mezcla de PCR consistió en 2 µL de ADN genómico sin diluir, 4 µL de 5X KAPA HiFi Buffer, 0,5 mM de MgCl₂, 0,625 mM de dNTPs, 0,25 µM de partidor sentido, 0,25 µM de partidor antisentido, 1U/rx de KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase y agua grado Biología Molecular para completar un volumen final de 20 µL. El programa de PCR utilizado fue el recomendado por el fabricante, que consistió en una desnaturación inicial a 95°C de 3 min, 40 ciclos de 98°C durante 20 s, 60°C durante 15 s y 72°C durante 20 s, seguido de un paso de extensión final a 72°C durante 1 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE al 1% y se tiñeron utilizando el colorante para ácidos nucleicos Gel Red.

4.2.3.4.2 Amplificación de la región ITS-1 en la Universidad de Chile:

El medio de reacción consistió en 2 µL de ADN genómico sin diluir, 1X de amortiguador Green GoTaq G2® Flexi Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,625 mM de dNTPs, 0,25 µM de cada partidor, 1 mg/mL de BSA y 0,2 U/mL de enzima GoTaq G2® Flexi DNA Polymerase. Como control negativo de amplificación se usó agua miliQ estéril. El programa de PCR consistió en una desnaturación inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C durante 7 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5% y se visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en un transiluminador UV (Moncada *et al.*, 2013).

4.2.3.4.3 Análisis de las secuencias de ITS-1.

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se analizaron y editaron con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v7.2.3 (Hall, 1999). Posteriormente, se alinearon utilizando el método Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el software CLC Sequence Viewer.

4.2.3.5 Purificación de los ADN obtenidos.

Se purificaron los extractos de ADN obtenidos de *tapa* antigua que no se lograron amplificar mediante ITS-1 utilizando el sistema comercial MiniElute PCR Purification Kit de Quiagen. Para esto se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. La purificación se realizó en la Sala de Trabajo de ADN, utilizando reactivos destinados exclusivamente para el trabajo con ADN. Los extractos de ADN de *tapa* antigua que fueron identificados mediante la región ITS-1 como secuencias de *B. papyrifera* se analizaron con el marcador de sexo *Male Marker* y con diez marcadores de microsatélites SSR.

4.2.4 Determinación de la amplificabilidad del material genético obtenido a partir de *tapa* antigua y caracterización utilizando un marcador de sexo y 10 SSR.

4.2.4.1 Rediseño y amplificación de la región del Marcador de Sexo (*Male Marker*):

El marcador de sexo diseñado en nuestro laboratorio (Peñailillo *et al.*, 2016) consiste en la amplificación de dos fragmentos de 420 pb y 273 pb en una PCR dúplex. El amplicón de 420 pb es común tanto para especímenes femeninos y masculinos, mientras que el amplicón de 273 pb se obtiene exclusivamente en especímenes masculinos.

Debido a la alta degradación del ADN obtenido a partir de muestras de *tapa* contemporánea y a las dificultades para amplificar esta región, se rediseñó este marcador de manera de obtener amplicones más pequeños. Para esto se tomaron en cuenta los partidores diseñados por Peñailillo *et al.* (2016) y el análisis bioinformático realizado por Fuentes (2015) del marcador de sexo. El rediseño consistió principalmente en el reposicionamiento de los partidores MMF y MMRL, sin modificar la secuencia del partidor MMRS18, diseñado para la amplificación diferencial del fragmento pequeño exclusivo para especímenes masculinos. La estrategia consistió en ubicar zonas de la secuencia del marcador de sexo que son altamente conservadas entre individuos femeninos y masculinos, provenientes tanto de la zona nativa como de la zona introducida. Como resultado de este análisis, se escogieron tres zonas para el diseño de 6 partidores: 3 de ellos para la hebra sentido y 3 para la hebra antisentido, con lo que se obtuvieron 6 nuevas combinaciones de partidores (**Figura 5**). La secuencia de los partidores rediseñados se encuentran en el **Anexo IV**.

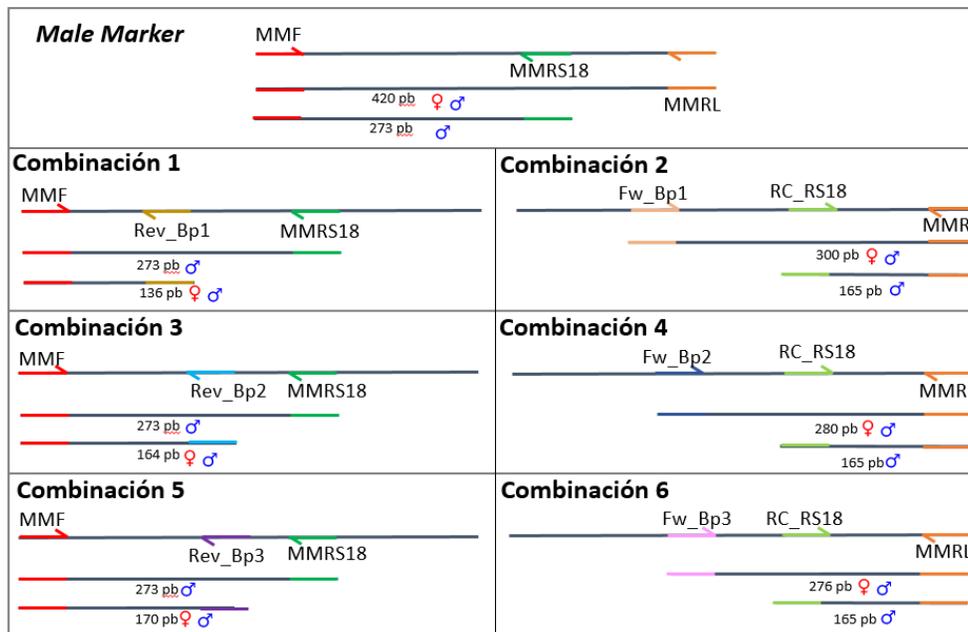


Figura 5: Esquema de las seis combinaciones nuevas para la amplificación del marcador de sexo.

El medio de reacción para la combinación escogida (combinación 2) para amplificar muestras de *tapa* antigua consistió en 3 µL de ADN genómico sin diluir, el amortiguador Green GoTaq G2® Flexi Buffer 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,625 mM de dNTPs, 0,5 µM de partidor sentido BP2_FW, 0,25 µM de partidor antisentido MMS18_RC, 0,25 µM de partidor antisentido MMRL, BSA 1 mg/mL y 0,125 U/mL de ADN polimerasa GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase en un volumen final de 20 µL. Como control negativo de amplificación se usó agua miliQ estéril. El programa de PCR consistió en una desnaturación inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, seguido por una extensión final 72°C durante 7 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en un transiluminador UV (Payacán, 2015).

4.2.4.2 Amplificación de diez microsatélites (SSR)

Con el fin de integrar los datos obtenidos de *tapa* mediante SSR con los datos disponibles en el laboratorio de muestras contemporáneas, se analizaron un total de diez marcadores de SSR para el análisis de *tapa* antigua, correspondientes a los diez marcadores indicados en la **Tabla 2**

El medio de reacción y el protocolo de amplificación se realizaron según lo indicado en el punto 4.2.2.4.3 para la amplificación de SSR en muestras de prueba.

4.2.4.3 Análisis de datos.

4.2.4.3.1 Análisis del marcador de sexo.

La tipificación de sexo se realizó mediante una inspección visual de los amplicones. Las bandas que se separaron por medio de electroforesis de geles de agarosa al 1,5% se fotografiaron bajo luz UV.

Se tipificó como individuo femenino al observar una única banda a 300 pb, mientras que se tipificó como individuo masculino cuando se observaron dos bandas de 300 pb y 165 pb.

4.2.4.3.2 Análisis de microsatélites (SSR).

Los amplicones obtenidos se enviaron a análisis de electroforesis capilar (Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile).

Los electroferogramas se visualizaron con el programa Peak Scanner™ v1.0 (Applied Biosystems) y el tamaño de los alelos se registró en tablas Excel.

4.2.5 Extracción y caracterización de ADN de herbario de *B. papyrifera*.

4.2.5.1 Extracción de ADN a partir de muestras de herbario antiguo.

La extracción de ADN a partir de las muestras de herbario antiguo se realizó en el Laboratorio de ADN antiguo de la Universidad de Otago según el protocolo de Payacán (2015), aumentando el volumen de tampón de extracción utilizado (de 800 μ L a 1000 μ L) y aumentando el tiempo de incubación con el tampón de extracción de 20 min a una incubación durante toda la noche a 60°C con agitación.

El procedimiento consistió en la disgregación y molienda de las muestras de herbario en el tampón de extracción en un mortero autoclavado y lavado con una solución de cloro y posteriormente con una solución de etanol al 76%. Se agregaron 1000 μ L de tampón de extracción y luego de traspasar el contenido a un tubo de microfuga de 2 mL, se incubó el extracto durante toda la noche a 60°C. Se procedió a extraer proteínas e impurezas con 800 μ L de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se recuperaron 500 μ L de fase acuosa y se añadieron 250 μ L de NaCl 5M. Se precipitaron los ácidos nucleicos utilizando 900 μ L de etanol absoluto frío y se dejó a 4°C durante toda la noche. El ADN precipitado se separó mediante dos centrifugaciones consecutivas de 3 min cada una, a 3.000 rpm y 6.000 rpm. El precipitado se lavó con 500 μ L de etanol 76% mantenido a 4°C, y se centrifugó finalmente a 6.000 rpm durante 5 min. El etanol residual se evaporó a 50-55°C en baño seco. El ADN obtenido se suspendió en 100 μ L de agua MilliQ autoclavada y se almacenó a -20°C.

4.2.5.2 Evaluación de la integridad del ADN extraído.

La integridad del ADN genómico obtenido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X, como se menciona en el punto 4.2.2.2.

4.2.5.3 Análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido.

4.2.5.3.1 Medición de concentración de ADN mediante espectrofotometría.

Se evaluó la concentración y pureza del ADN obtenido mediante absorbancia a 260 nm y la razón A260/A280, respectivamente. Las mediciones se realizaron en un equipo Nanodrop™ 2000 utilizando 1 μ L de ADN genómico.

4.2.5.3.2 Medición de concentración de ADN mediante fluorescencia.

Se utilizó el sistema comercial Picogreen® dsDNA Assay Kit, según el protocolo descrito anteriormente en el punto 4.2.2.3.2. Para obtener el valor de concentración de ADN en ng/ μ L se restó el valor del blanco a cada valor de fluorescencia de las muestras, el cual se interpoló en la curva de calibración

obtenida para cada conjunto de lecturas. Finalmente, el valor de concentración obtenido se multiplicó por el factor de dilución empleado (200x).

4.2.5.4 Análisis genético mediante marcadores moleculares del ADN obtenido a partir de herbario.

4.2.5.4.1 Amplificación de la región ITS-1:

Los amplicones utilizados fueron sentido ITS-A (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') y antisentido ITS-C (5'-GCA ATT CAC ACC AAG TAT CGC-3'). El medio de reacción y el programa de PCR fue el mismo que se utilizó para el análisis de *tapa* etnográfica antigua mediante el kit GoTaq G2® Flexi (punto 4.2.4.1.2).

4.2.5.4.2 Amplificación de la región del Marcador de Sexo (*Male Marker*):

Para la tipificación de las muestras de herbario, se utilizó el protocolo descrito por Peñailillo *et al.* (2016) (ver sección 4.2.2.4.2). Las muestras que no lograron ser tipificadas con este ensayo, fueron tipificadas con el ensayo rediseñado de *Male Marker* (ver sección 4.2.4.3). Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y visualizaron por tinción con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en un transiluminador UV (Payacán, 2015).

4.2.5.4.3 Amplificación de Microsatélites (SSR):

Se utilizaron los diez marcadores de microsatélites SRR utilizados para el análisis de *tapa* antigua para el estudio de muestras de herbario (Bro 07, Bro 08, Bro 13, Bro 15, Bropap 02214, Bropap 02801, Bropap 20558, Bropap 25444, Bropap 26985 y Bropap 30248), según el protocolo indicado en el punto 4.2.4.4. La secuencia de los partidores utilizados, incluyendo su temperatura de apareamiento se detalla en la **Tabla 2**.

4.2.5.5 Análisis de datos.

El análisis de las secuencias obtenidas mediante la amplificación de la región ITS-1 se realizó según lo indicado en el punto 4.2.2.5.1. El análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante el ensayo del marcador de sexo se realizó según lo descrito en el punto 4.2.2.5.2, mientras que el análisis de los amplicones obtenidos mediante el análisis de 10 SSR se realizó según lo detallado en el punto 4.2.2.5.3.

5 Resultados.

5.1 Determinación de las condiciones de extracción y análisis con distintos marcadores moleculares en *tapa* contemporánea.

Como una primera aproximación experimental para el trabajo con muestras de *tapa* etnográfica antigua, se ensayó y optimizó el protocolo de extracción de ADN y de análisis con marcadores moleculares usando seis muestras de *tapa* contemporánea.

5.1.1 Extracción y cuantificación de ADN a partir de *tapa* contemporánea.

Se realizaron tres extracciones exitosas de cada una de las muestras de prueba (BQUCHTE018, BQUCHTE019, BQUCHTE020, BQUCHTE021, BQUCHTE022, BQUCHTE023) utilizando el método modificado de Lodhi *et al.* (1994) publicado por Moncada *et al.* (2013), incubando las muestras con el tampón de extracción durante 20 min a 60°C. En la **Figura 6** se presenta un gel de agarosa al 0,8% que en que se observa un bandeo difuso de ADN que está altamente degradado para todas las muestras. Los carriles de los controles de extracción no presentan este bandeo.

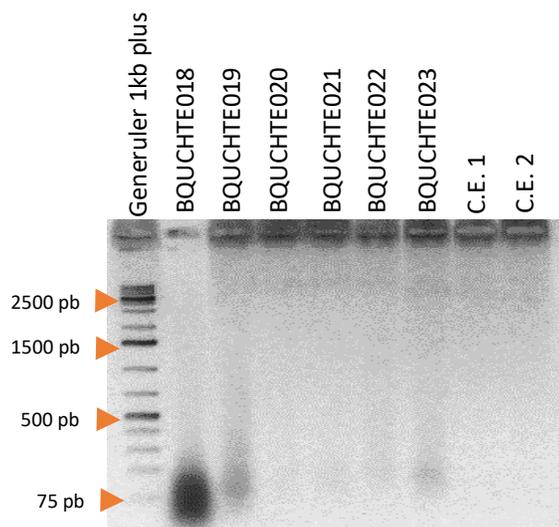


Figura 6: Análisis de integridad de ADN genómico de la tercera extracción de muestras contemporáneas de *tapa*. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con GelRed. C.E: controles de extracción.

Los resultados de la determinación de la concentración y pureza de ADN de las muestras mediante absorbancia a 260 nm y la razón 260/280, indicaron que la concentración de ADN varió en un rango entre 2,2 y 292,4 ng/μL, mientras que las razones de pureza variaron entre 1,02 y 6,43. La determinación de la concentración de ADN mediante el agente intercalante PicoGreen indicó que concentraciones de ADN que fluctuaron entre 0 ng/μL y 21,1 ng/μL (ver **Anexo V**).

Las primeras dos extracciones se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular, tomando las precauciones necesarias para evitar contaminación cruzada con ADN contemporáneo y entre las muestras (cambio de guantes luego de la manipulación de cada muestra, limpieza con cloro, etc.). Aún así, los controles de extracción de las dos primeras extracciones resultaron contaminados, determinado mediante la cuantificación de los controles de extracción por espectrofotometría y fluorimetría (**Anexo V**).

La tercera extracción se realizó utilizando un overol de laboratorio en el Laboratorio de Microbiología, maximizando además las medidas precautorias para evitar contaminación con ADN moderno. La cuantificación de ADN mediante espectrofotometría y fluorimetría indicaron valores negativos para los controles de extracción de la tercera extracción (**Anexo V**). Estos resultados indican que es posible extraer ADN a partir de muestras de *tapa* contemporánea, obteniéndose ADN de bajo peso molecular debido al alto nivel de degradación del mismo, confirmando así lo publicado anteriormente por Moncada *et al.* (2013).

5.1.2 Efecto de la temperatura y tiempo de incubación con el tampón de extracción en el rendimiento de extracción.

Con el fin de determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación de la muestra con el tampón de extracción en el rendimiento de la extracción, se realizaron dos cinéticas en que las muestras se incubaron con el tampón de extracción durante 20 min, 1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 24 h y 48 h tanto a 37°C como a 60°C (**Figura 7**). Se incluyó un control de extracción en cada tiempo de incubación.

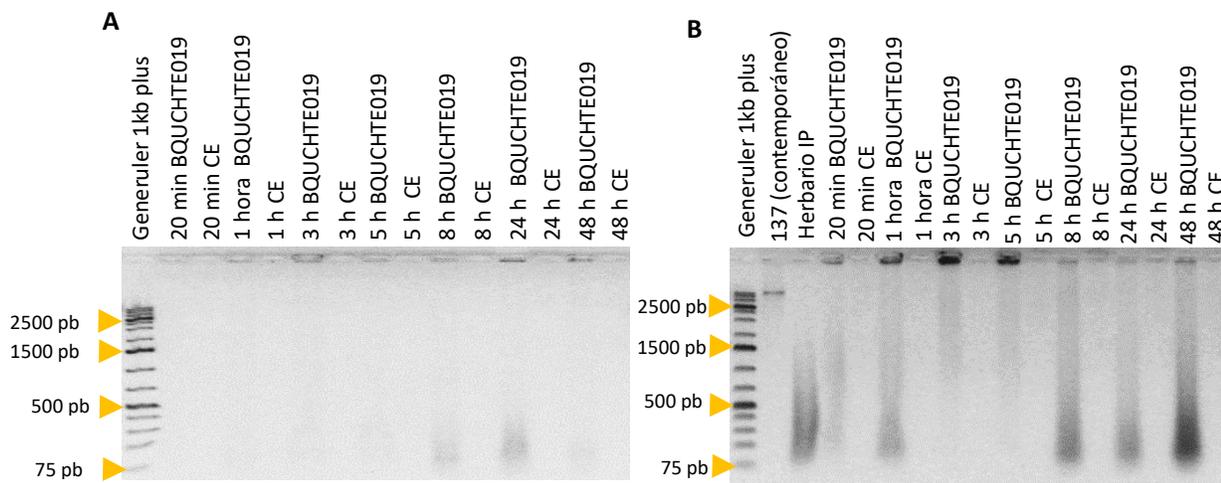


Figura 7. Comparación del análisis de ADN genómico de una muestra contemporánea de *tapa* obtenido a diferentes temperaturas de incubación. A. Curva obtenida a 37°C B. Curva obtenida a 60°C. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

Ambas curvas se obtuvieron de muestras extraídas en el Laboratorio de Microbiología utilizando sólo la muestra BQUCHTE019. Con fines comparativos, en estos experimentos se procuró pesar la misma cantidad de *tapa* para cada muestra (10 mg). La cuantificación de los extractos de ADN de *tapa* mediante absorbancia y fluorimetría se resume en el Anexo VI. En la **Figura 8** se presentan estos datos como gráfico de barras.

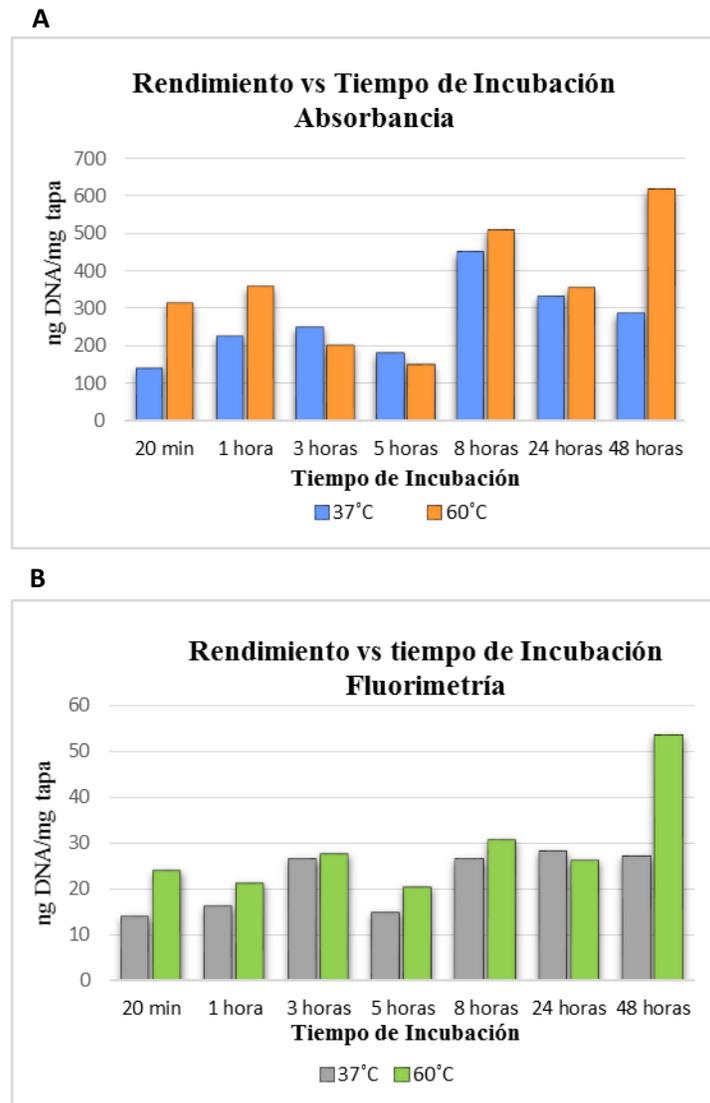


Figura 8. Rendimiento de la extracción de ADN evaluada a diferentes tiempos y temperaturas de extracción.

A. Rendimiento de extracción de ADN según cuantificación a 260 nm mediante absorbancia. **B.** Rendimiento de extracción de ADN según cuantificación mediante reactivo Picogreen.

Como se observa en la **Figura 8**, la incubación por un periodo de ocho o más h permite obtener una mayor cantidad de ADN con respecto a la incubación de 20 min, tiempo que hasta este punto se utilizaba en el protocolo original de Moncada *et al.* (2013). En la **Tabla 3** se observa que a mayores tiempos de incubación con el tampón de extracción, la razón 260/280 mejora con respecto a la incubación con 20

min. Por otra parte, la incubación a 60°C permite la extracción de mayor cantidad de ADN que una incubación a 37°C a tiempos mayores de 8 h de incubación con el tampón de extracción, como se observa en la **Figura 8**. Cabe destacar que el estudio del efecto tanto del tiempo de incubación con el tampón de extracción como el estudio del efecto de la temperatura en la incubación con el tampón de extracción se realizó sólo una vez, por lo que no fue posible realizar un estudio estadístico sobre los datos obtenidos.

Tabla 3. Razón de absorbancia 260 nm/ 280 nm a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.

Tiempo incubación	Temperatura (°C)	Pureza (260nm/280nm)
20 min	37	1,68
	60	1,7
1 h	37	1,65
	60	1,8
3 h	37	1,71
	60	1,52
5 h	37	1,73
	60	1,55
8 h	37	1,87
	60	1,98
24 h	37	1,91
	60	1,88
48 h	37	1,8
	60	1,95

Estos datos permitieron optimizar el protocolo de extracción de ADN a partir de *tapa*. En adelante, las extracciones de ADN a partir de muestras etnográficas de *tapa* se realizaron a 60°C incubando con el tampón de extracción durante toda la noche (más de 8 h).

5.1.3 Análisis del material de *tapa* contemporánea con distintos marcadores moleculares.

Para evaluar la amplificabilidad del ADN extraído desde el material de prueba se usaron nueve marcadores moleculares. Estos corresponden a la región nuclear ITS-1 de ADNr, el marcador de sexo para *B. papyrifera* denominado “región *Male Marker*” y siete marcadores de microsatélites.

5.1.3.1 Evaluación de la amplificabilidad de la región ITS-1.

La amplificación del ADN obtenido durante las primeras dos extracciones (incubación a 60°C durante 20 min) fue exitosa para las seis muestras de *tapa* contemporánea. Sin embargo, la presencia de bandas

en los controles de extracción confirmó la presencia de ADN contaminante detectado anteriormente mediante absorbancia y fluorimetría. La cuantificación de los controles de la tercera extracción, realizada en el Laboratorio de Microbiología, no indicó la presencia de ADN en los controles de extracción. Sin embargo, la presencia de bandas en estos controles luego de la amplificación de la región ITS-1, también indica la presencia de ADN contaminante (**Figura 9**).

Los amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar a Macrogen, obteniéndose secuencias legibles para todos ellos. El análisis y visualización de los electroferogramas se realizó en el software BioEdit 7.1.3.0 y se analizaron mediante la herramienta BLAST para corroborar si la zona de ITS-1 amplificada corresponde a la de *B. papyrifera*. Las secuencias obtenidas a partir de la amplificación de la región ITS-1 corresponden a *B. papyrifera*, sugiriendo que el ADN contaminante proviene de *B. papyrifera* o que realmente las piezas se manufacturaron a partir de fibras de esta especie (**Ver anexo VII**).

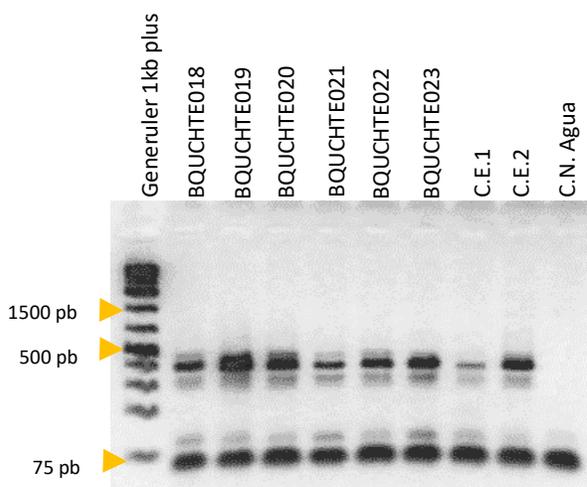


Figura 9. Amplificación de la región ITS-1 a partir del ADN obtenido de muestras de *tapa* contemporánea. Las muestras CE1 y CE2 corresponden a los controles de extracción 1 y 2, respectivamente. La muestra C.N. Agua corresponde al control negativo de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

El trabajo de Seelenfreund *et al.* (2011) reportó que todas las muestras provenientes de las islas de Oceania Remota comparten un polimorfismo que consiste en una transversión de G a T en la posición relativa 203 de la región ITS-1, distinguiéndolas de las muestras asiáticas. El alineamiento de las secuencias obtenidas mostró que las secuencias analizadas presentan la transversión de G a T (variante polinésica), lo que coincide con la procedencia informada de estas piezas. El CE2 presentó también el polimorfismo polinésico, en cambio el CE1 presentó una doble señal en la posición polimórfica (resultados no mostrados).

Se analizó también otro sitio polimórfico (Olivares, 2016), que indica en la posición relativa 99 una transversión de C a T en muestras masculinas de Hawai y una muestra de China. Este polimorfismo no se detectó en la muestra de *tapa* contemporánea proveniente de Hawai analizada en esta tesis, ni en las demás muestras de *tapa* contemporánea.

Con el fin de verificar que los controles de extracción de las muestras extraídas para la realización de las curvas a 37°C y 60°C se encontraban libres de contaminación, se amplificaron los controles de extracción junto con la muestra BQUCHTE019, utilizada a modo de control positivo. Cabe destacar que al analizar los controles de extracción en geles de agarosa al 0,8% no se observa ADN (**Figura 6**). Sin embargo, como se aprecia en la **Figura 10**, la mayor parte de los controles de extracción presenta contaminación, aún después de cambiar el lugar de realización de las extracciones (Laboratorio de Biología Molecular al de Microbiología), de cambiar los reactivos utilizados y tratar de extremar las medidas para evitar contaminación.

Estos resultados confirman la necesidad de realizar las extracciones de ADN de las muestras antiguas de *tapa* en un laboratorio de ADN antiguo, para evitar la contaminación con ADN moderno.

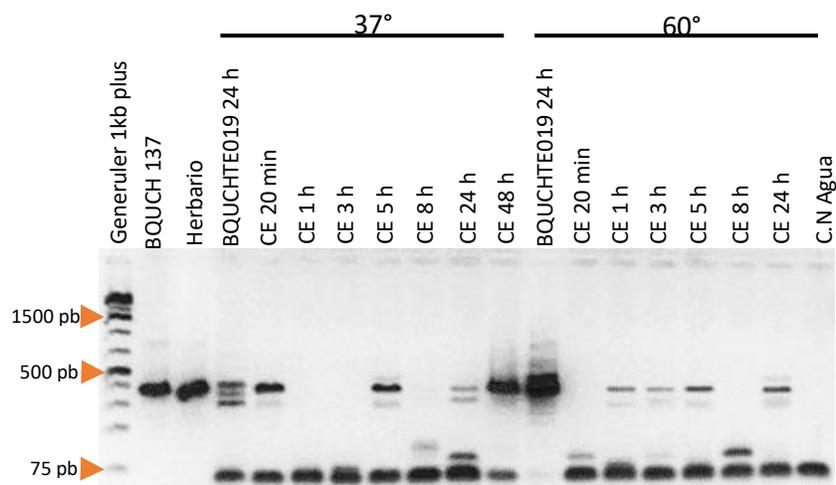


Figura 10. Amplificación de la región ITS-1 de los CE realizados durante las cinéticas de extracción a 37°C y 60°C. C.E: Control de Extracción, C.N. Agua: Control negativo de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

5.1.3.2 Evaluación de la amplificabilidad del marcador de sexo (*Male Marker*).

En esta PCR dúplex se obtienen dos amplicones, uno de 420 pb que se obtiene utilizando los partidores MMF - MMRL, fragmento común para individuos femeninos y masculinos; y otro amplicón de 273 pb obtenido con los partidores MMF – MMRS18 que amplifica exclusivamente en individuos masculinos (Peñailillo *et al.*, 2016).

Las amplificaciones con este marcador del producto de las primeras tres extracciones presentaron amplicones para las seis muestras de *tapa* contemporánea, pero al igual que con el marcador ITS-1, las amplificaciones indican presencia de contaminación en los controles de extracción, incluyendo además los controles de extracción de las dos cinéticas realizadas en el Laboratorio de Microbiología (**Figura 11**). El tamaño de las bandas amplificadas no corresponde a lo esperado respecto de los controles del mismo ensayo. Por estas razones no fue posible tipificar las muestras analizadas con este marcador como femeninas o masculinas. Dado que el objetivo fundamental de la tesis no está centrado en el análisis de muestras de *tapa* contemporánea, no se insistió en este análisis.

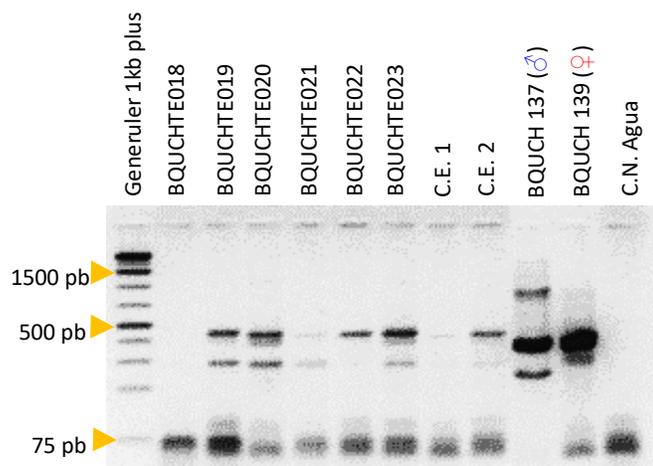


Figura 11. Amplificación de la región Male Marker a partir del ADN obtenido de muestra de *tapa* contemporánea. La muestra BQUCH137 corresponde a un control positivo masculino que presenta una doble banda (de 420 pb y de 273 pb). La muestra BQUCH139 corresponde a un control positivo femenino que debe presentar una banda a 421 pb. C.E: Control de Extracción. H₂O: Control negativo de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

En la **Figura 11** se observa que la muestra BQUCHTE018 no presenta amplificación de ninguna de las dos bandas predichas. Esto lleva a suponer que el ADN presente en esta muestra se encuentra con tal grado de degradación que imposibilita la amplificación de fragmentos superiores a 300 pb. Se plantea el re-diseño de este ensayo para la amplificación de fragmentos más pequeños, permitiendo así la amplificación y la tipificación de muestras con ADN altamente degradado.

5.1.3.3 Evaluación de la amplificabilidad de microsatélites

Se amplificaron las seis muestras de *tapa* contemporánea con siete marcadores de SSR. La presencia de bandas en los controles de extracción en algunos casos nuevamente indica la presencia de ADN contaminante. A modo de ejemplo, en la **Figura 12** se presenta la electroforesis de un gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del marcador Bro15, que no presentó amplificación en los controles de extracción.

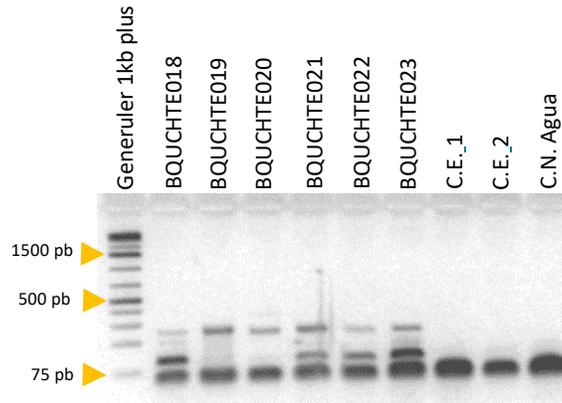


Figura 12. Amplificación del marcador SSR Bro 15 utilizando ADN obtenido a partir de *tapa* moderna. C.E: Control de Extracción. H₂O: Control Negativo de la reacción de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

A modo de ejemplo, en la **Figura 13** se presenta el análisis y asignación de los alelos:

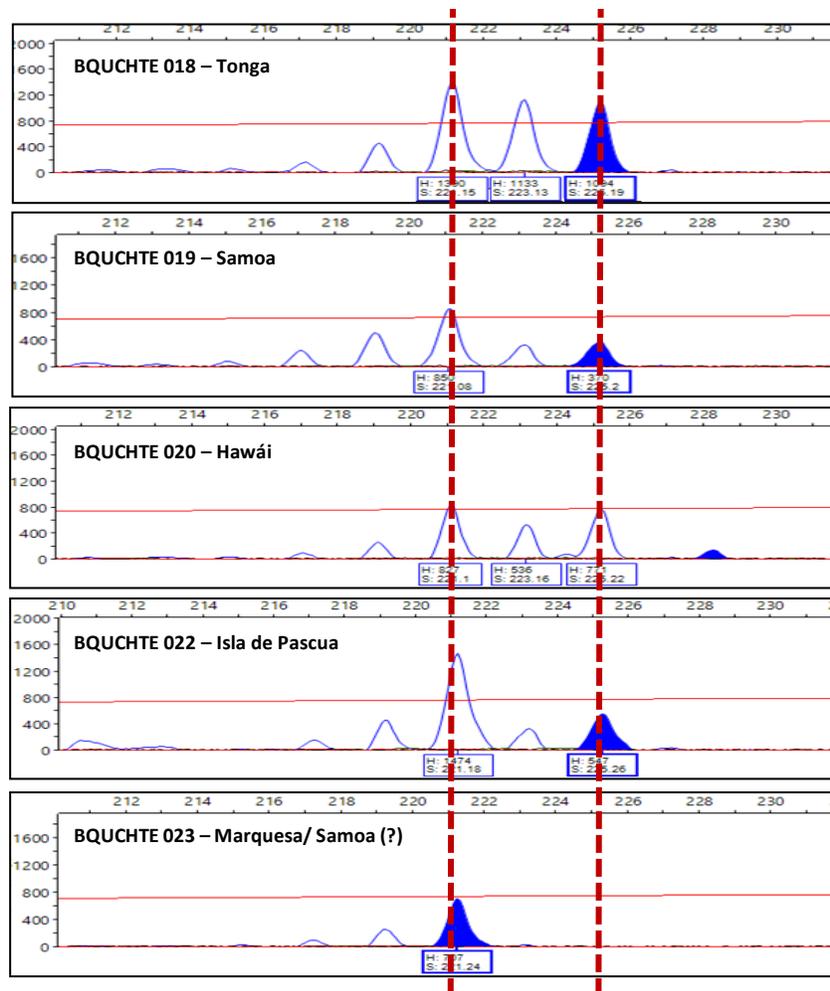


Figura 13. Electroferogramas del marcador Bro 08 en muestras de *tapa* contemporánea. Imágenes adaptadas de electroferogramas mostrados por el programa Peak Scanner v1.0. Se señala el código identificador, localidad de origen y genotipo identificado de cada muestra en el electroferograma correspondiente. Las señales identificadas como alelos poseen un recuadro que señala sus tamaños. La línea punteada en rojo indica el genotipo común encontrado en muestras polinésicas con este marcador. Este marcador presentó tres alelos para las muestras BQUCHTE 018 y BQUCHTE 020.

En la **Tabla 4** se encuentra un resumen de los alelos encontrados en las seis muestras de *tapa* contemporánea analizadas con siete marcadores SSR. En general, las muestras presentan alelos y genotipos detectados anteriormente tanto en muestras contemporáneas, como de herbario de *B. papyrifera*. Se utilizó un código de colores para el análisis de los alelos encontrados. Las muestras BQUCHTE018, BQUCHTE020, BQUCHTE021 presentaron más de 2 alelos en los marcadores Bro 08, Bro 15 y Bropap 2801 (celdas de color crema), lo que sugiere la presencia de más de un individuo de *B. papyrifera* en dichas muestras. No se logró amplificación en todos los casos.

Se identificaron siete alelos (alelos indicados en color rojo) y cuatro genotipos (celdas en color celeste) que no se habían detectado anteriormente en muestras contemporáneas ni de herbario de *B. papyrifera*. Por ejemplo, la muestra BQUCHTE019 presenta genotipos esperados para seis de los marcadores de SSR utilizados para el análisis, sin embargo, en el marcador Bropap 30248 exhibe un genotipo que no se había detectado anteriormente. Por otra parte, la muestra BQUCHTE023 presenta alelos y genotipos no esperados para individuos de *B. papyrifera* provenientes de las Islas Marquesas. Los marcadores Bro 08, Bro 15 y Bropap 30248 presentan alelos detectados anteriormente, pero no los genotipos esperados (celdas de color celeste). Por otra parte, los marcadores Bropap 02214 y Bropap 02801 indican alelos no observados anteriormente en muestras contemporáneas, ni de herbario. Además, en cuatro muestras se encontraron alelos observados anteriormente en muestras de *B. papyrifera*, pero no en las localidades de las cuales provienen las muestras (alelos indicados en color verde en la **Tabla 5**).

Tabla 4. Resumen de los alelos encontrados en las seis tapas contemporáneas analizadas con los siete SSR

Muestra	Localidad	Bro 08	Bro 15	Bropap 02214	Bropap 02801	Bropap 20558	Bropap 26985	Bropap 30248
BQUCHTE 018	Tonga	221/223/225	229/233	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
BQUCHTE 019	Samoa	221/225	229/233	260/268	168/191	236/240	196/199	108/112
BQUCHTE 020	Hawái	221/223/225	229/233	N.A.	168/188/197	236/240	193/199	108/108
BQUCHTE 021	Isla de Pascua	N.A.	229/233/240	N.A.	162/162	N.A.	N.A.	108/108
BQUCHTE 022	Isla de Pascua	221/225	229/233	N.A.	166/166	N.A.	N.A.	108/108
BQUCHTE 023	Marquesas/Samoa (?)	221/221	229/229	238/238	180/180	N.A.	225/225	108/110

Aa: Alelos no observados anteriormente en muestras contemporáneas ni herbario de *B. papyrifera*.

Aa: Alelos detectados anteriormente en muestras contemporáneas y de herbario de *B. papyrifera*, pero no en las localidades de las cuales proviene la muestra de *tapa* analizada.

N.A.: No amplificó.

: Marcadores que sugieren que la muestra fue elaborada con individuos genéticamente diferentes.

: Genotipos no observados anteriormente en muestras contemporáneas, ni de herbario de *B. papyrifera*.

En resumen, los resultados obtenidos indican que es posible extraer y amplificar ADN proveniente de muestras de *tapa* contemporánea con los marcadores moleculares ITS y SSR. El análisis mediante SSR además indica la presencia en muestras de *tapa* contemporánea de alelos no detectados anteriormente en material contemporáneo ni de herbario de *B. papyrifera*. Los resultados también indican que es necesario rediseñar los partidores del marcador de sexo *Male Marker* para amplificar fragmentos más pequeños.

5.2 Extracción de ADN a partir de muestras etnográficas de *tapas* antiguas y evaluación de su amplificabilidad mediante el marcador ITS-1.

5.2.1 Extracción y cuantificación de ADN a partir de *tapa* antigua.

La extracción de ADN a partir de las piezas de *tapa* antigua se realizó según el protocolo de Moncada *et al.* (2013) en el Laboratorio de ADN antiguo de la Universidad de Otago, Dunedin, Nueva Zelanda con modificaciones para mejorar el rendimiento de la misma (optimización realizada en material de *tapa* contemporánea). En la **Figura 14** se presenta un gel de agarosa al 0,8% en el que se cargó ADN obtenido de las 17 piezas de *tapa* antigua, observándose para todas las muestras un alto nivel de degradación. No se observa ADN en los controles de extracción (C.E.).

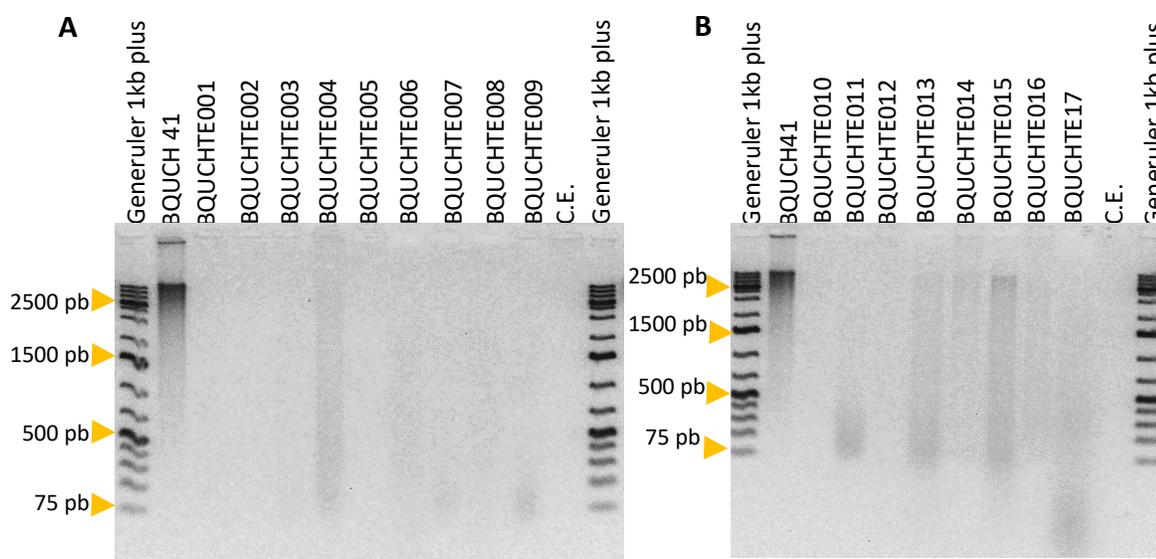


Figura 14. Análisis de los resultados de la primera extracción de ADN a partir de piezas etnográficas de *tapa*. La muestra BQUCH41 corresponde a ADN moderno extraído a partir de hojas contemporáneas de *B. papyrifera*. C.E.= Control de Extracción. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

La mayoría de las piezas se extrajeron en triplicado (BQUCHTE004, BQUCHTE007, BQUCHTE008, BQUCHTE011, BQUCHTE012, BQUCHTE013, BQUCHTE014, BQUCHTE015, BQUCHTE016 y BQUCHTE017), cinco piezas se extrajeron en duplicado (BQUCHTE002, BQUCHTE003, BQUCHTE006, BQUCHTE009 y BQUCHTE010) y dos piezas se extrajeron solo una vez, debido a que se contaba con poco material de partida (BQUCHTE001 y BQUCHTE005).

Las extracciones a partir de piezas de *tapa* etnográfica antigua presentaron concentraciones de ADN en un rango entre 4,2 y 94,8 ng/μL de ADN (**Anexo VIII**). En la mayoría de los casos, los rendimientos de extracción indican que fue posible obtener más de 100 ng de ADN/mg de *tapa*, según la lectura por absorbancia a 260 nm. La cuantificación mediante el reactivo Picogreen indica concentraciones de ADN negativas para la mayoría de las muestras, lo que refleja la dificultad de obtener ADN a partir de este tipo de matriz (resultados no mostrados). La razón 260 nm/280 nm de estas extracciones en general se encuentra fuera del rango óptimo (1,7-2,0).

5.2.2 Evaluación de la amplificabilidad de la región ITS-1.

Las diferentes extracciones de una misma pieza de *tapa* se indican en adelante mediante un sufijo correspondiente al número de extracción. A modo de ejemplo, BQUCHTE004_E1, BQUCHTE004_E2 y BQUCHTE004_E3 indican las muestras de las extracciones uno, dos y tres, respectivamente de la pieza BQUCHTE004.

Utilizando el sistema comercial KAPA HiFi HotStart PCR Kit se evaluó la amplificabilidad de la región ITS-1 de las extracciones 1 y 2 de ADN de muestras de *tapa* etnográfica antigua. Se logró amplificar la región ITS-1 en 14 de las 17 muestras. Las extracciones de la pieza BQUCHTE004 amplificaron exitosamente en cada ensayo realizado. Por otra parte, no fue posible detectar amplificación de las extracciones de las piezas BQUCHTE006, BQUCHTE008 y BQUCHTE017 en ningún ensayo. A modo de ejemplo, en la Figura 15 se muestra la amplificación de la segunda extracción de *tapas* antiguas.

Los 16 amplicones obtenidos se secuenciaron consiguiéndose secuencias legibles para todas las muestras, excepto para las muestras BQUCHTE001_E1, BQUCHTE002_E1 y BQUCHTE013_E1. Mediante la herramienta BLAST se identificaron 10 amplicones como secuencias de *B. papyrifera*, provenientes de 9 piezas diferentes de *tapa* etnográfica. El amplicón obtenido de la muestra BQUCHTE011_E1 se identificó como *Impatiens sp* con un 98% de identidad, mientras que el amplicón de la muestra BQUCHTE015_E se identificó como *Solanum lycopersicum* (tomate) con un 99% de identidad (**Ver Anexo IX**). En este anexo se presenta el detalle de las especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1 amplificada de todos los amplicones obtenidos en esta tesis.

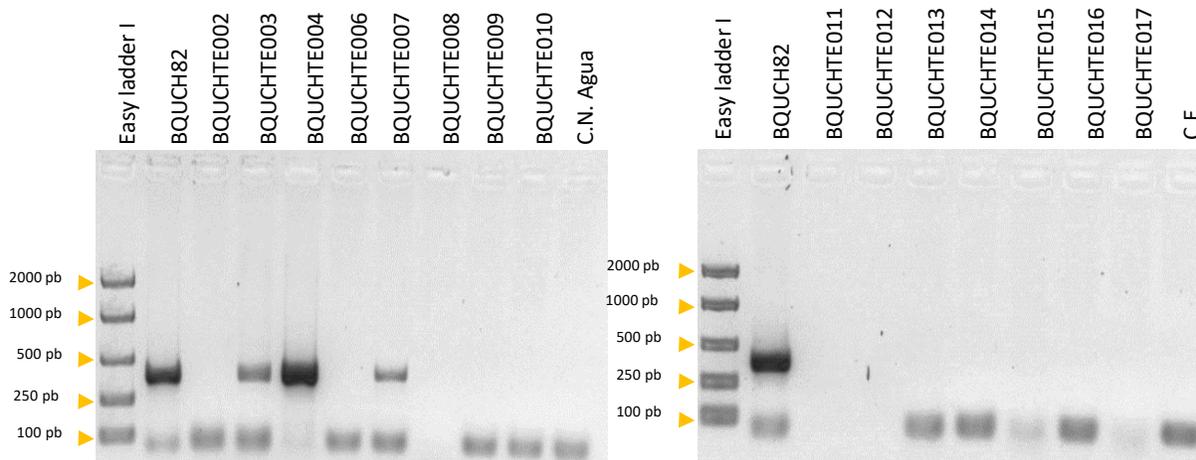


Figura 15. Amplificación de la región ITS-1 mediante KAPA HiFi HotStart PCR Kit a partir del ADN obtenido de la segunda extracción de muestras de *tapa* antigua. La muestra 82 corresponde a ADN de hoja contemporánea de *B. papyrifera* cargado como control positivo C.E: Control de Extracción. H₂O: Control Negativo de la reacción de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Se evaluó también la amplificabilidad de la región ITS-1 de las extracciones 1, 2 y 3 de ADN de muestras de *tapa* etnográfica antigua utilizando el sistema comercial enzima GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase. Se obtuvo amplificación de la región ITS-1 en 14 de las 17 muestras con este sistema comercial. Al igual que con el primer protocolo, sólo las extracciones de la pieza BQUCHTE004 amplificaron en cada ensayo realizado y las extracciones de las piezas BQUCHTE006, BQUCHTE008 y BQUCHTE017 no pudieron ser amplificadas en ningún ensayo.

De los 20 amplicones obtenidos se consiguieron secuencias legibles para todas las muestras, excepto para las muestras BQUCHTE010_E2 y BQUCHTE014_E3. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante BLAST identificándose seis amplicones como secuencias de *B. papyrifera*. Se encontraron secuencias de especies no identificadas anteriormente, entre las que se encuentran *Triticum sp.*, *Aspergillus sp.*, *Lagenaria sicararia sp.*, *Leontodon sp.*, entre otras (**Anexo IX**).

Con el fin de aumentar el número de muestras amplificadas y analizadas mediante ITS-1, se purificaron los extractos de ADN obtenidos de *tapa* antigua que no se lograron amplificar mediante este marcador o que presentaban coloración. Se purificaron 29 muestras, de las cuales 20 lograron ser amplificadas. De las 19 secuencias legibles obtenidas, seis fueron identificadas como secuencias de *B. papyrifera*. El resto de las secuencias se identificaron como *Sporobolus sp.*, *Helianthus sp.*, *Citrus maxima*, *Cipressus sp.*, entre otras especies (**Anexo IX**).

5.2.2.1 Análisis de sitios polimórficos de las secuencias de ITS-1.

En la **Tabla 5**, se resumen los polimorfismos encontrados en la posición relativa 203 de las 22 secuencias identificadas como *B. papyrifera*, tanto en su secuencia sentido como antisentido. Las dos últimas letras en el nombre de la muestra indican el lugar de la amplificación de la muestra: OA = amplificación realizada en la Universidad de Otago; BM = amplificación realizada en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Chile; P= amplificación realizada en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Chile luego de purificar la muestra.

El análisis del sitio polimórfico relativo 203 se realizó con éxito en gran parte de las secuencias, sin embargo, las secuencias BQUCHTE012_E1_OA y BQUCHTE013_E1_OA no se tipificaron debido al alto ruido de fondo de los electroferogramas. Por otra parte, las muestras BQUCHTE005_E1_OA, BQUCHTE009_E1_OA, BQUCHTE014_E1_OA y BQUCHTE016_E2_BM sólo lograron ser tipificadas mediante el análisis de la secuencia ITS-C (antisentido). El resto de las muestras se tipificaron exitosamente, presentando la gran mayoría de las muestras una doble señal en el sitio relativo 203, siendo predominante la señal de la variante polinésica por sobre la asiática. Las muestras BQUCHTE005_E1_OA (Hawái) y BQUCHTE007_E3_P (Fiji) presentaron una doble señal de igual intensidad en este sitio polimórfico. Es importante tener en cuenta que es probable que cada pieza de textil fue elaborada a partir de corteza de más de un individuo de *B. papyrifera*, lo que podría explicar la doble señal en este sitio polimórfico.

Las muestras BQUCHTE005_E1_BM, BQUCHTE007_E3_BM, BQUCHTE010_E1_OA, BQUCHTE012_E3_P y BQUCHTE016_E2_BM presentaron claramente la variante polinésica en sus secuencias, resultado esperado considerando las localidades de las cuales provienen estas piezas (Hawái, Fiji, Hawái, Samoa y Agakautai, respectivamente). Cabe destacar que sólo en dos casos se detectaron diferencias en el análisis realizado en la Universidad de Otago y el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Chile. Esto ocurrió en las muestras BQUCHTE005 y BQUCHTE007, puesto que en el análisis de la muestra BQUCHTE005 (Hawái) se obtuvo una doble señal en este sitio polimórfico en un laboratorio, mientras que en el otro laboratorio se identificó claramente la variante polinésica. En la muestra BQUCHTE007 (Fiji) se observó una doble señal en la muestra analizada en la Universidad de Otago (con predominancia de la variante polinésica); en la muestra analizada en la Universidad de Chile se observó claramente la variante polinésica; por otro lado se observó una doble señal de igual intensidad cuando se purificó esta muestra.

Tabla 5. Variante encontrada en la posición relativa 203 de las secuencias identificadas como *B. papyrifera* en la región ITS-1.

Muestra	Procedencia	Sentido	Polimorfismo
BQUCHTE003_E2_OA	Hawái	ITS-A	T > G
		ITS-C	A > C
BQUCHTE004_E1_OA	Nueva Guinea	ITS-A	T > G
		ITS-C	A > C
BQUCHTE004_E2_OA	Nueva Guinea	ITS-A	T > G
		ITS-C	A > C
BQUCHTE004_E1_BM	Nueva Guinea	ITS-A	T > A
		ITS-C	A
BQUCHTE004_E2_BM	Nueva Guinea	ITS-A	T = A
		ITS-C	A > C
BQUCHTE004_E3_BM	Nueva Guinea	ITS-A	T = A
		ITS-C	A > C
BQUCHTE005_E1_OA	Hawái	ITS-A	-
		ITS-C	C = A
BQUCHTE005_E1_BM	Hawái	ITS-A	T
		ITS-C	A
BQUCHTE007_E2_OA	Fiji	ITS-A	T
		ITS-C	A > C
BQUCHTE007_E3_BM	Fiji	ITS-A	T
		ITS-C	A
BQUCHTE007_E3_P	Fiji	ITS-A	T = G
		ITS-C	A = C
BQUCHTE008_E1_P	Fiji	ITS-A	G
		ITS-C	C
BQUCHTE009_E1_OA	Hawái (?)	ITS-A	-
		ITS-C	C > A
BQUCHTE010_E1_OA	Hawái (?)	ITS-A	T
		ITS-C	A
BQUCHTE010_E2_P	Hawái	ITS-A	G
		ITS-C	A > G
BQUCHTE012_E1_OA	Samoa	ITS-A	-
		ITS-C	-
BQUCHTE012_E2_P	Samoa	ITS-A	G
		ITS-C	C
BQUCHTE012_E3_P	Samoa	ITS-A	T
		ITS-C	A
BQUCHTE013_E1_OA	Agakautai	ITS-A	-
		ITS-C	-
BQUCHTE014_E1_OA	Agakautai	ITS-A	-
		ITS-C	A > C
BQUCHTE015_E2_P	Agakautai	ITS-A	G
		ITS-C	C
BQUCHTE016_E2_BM	Agakautai	ITS-A	-
		ITS-C	A

Por otra parte, las muestras BQUCHTE008_E1_P, BQUCHTE012_E2_P, BQUCHTE015_P presentaron la variante asiática en sus secuencias. Cabe mencionar que la pieza BQUCHTE012 fue tipificada como polinésica mediante el análisis de la muestra BQUCHTE012_E3_P. La pieza BQUCHTE008 proviene de la Isla de Fiji, la pieza BQUCHTE012 de Samoa y la pieza BQUCHTE015 del sitio arqueológico en el archipiélago de Mangareva (Agakautai). Según lo informado por

Seelenfreund *et al.* (2011) era de esperar encontrar la variante polinésica y no la variante asiática en estas piezas.

Se analizó también el polimorfismo detectado en la posición relativa 99 (Olivares, 2016) en todas las secuencias en las que fue posible hacerlo, no detectándose la transición de C a T en las secuencias de ITS-1 obtenidas.

Posteriormente al análisis de los electroferogramas, las secuencias identificadas como secuencias de *B. papyrifera*, se alinearon utilizando el algoritmo Clustal W presente en el programa CLC sequence viewer 7. En la **Figura 16**, se presenta el alineamiento de algunas de estas secuencias. Cabe destacar que en las secuencias que presentaron doble señal en la posición relativa 203, sólo se indica una de las señales detectadas, correspondiente a la señal predominante o mayoritaria.

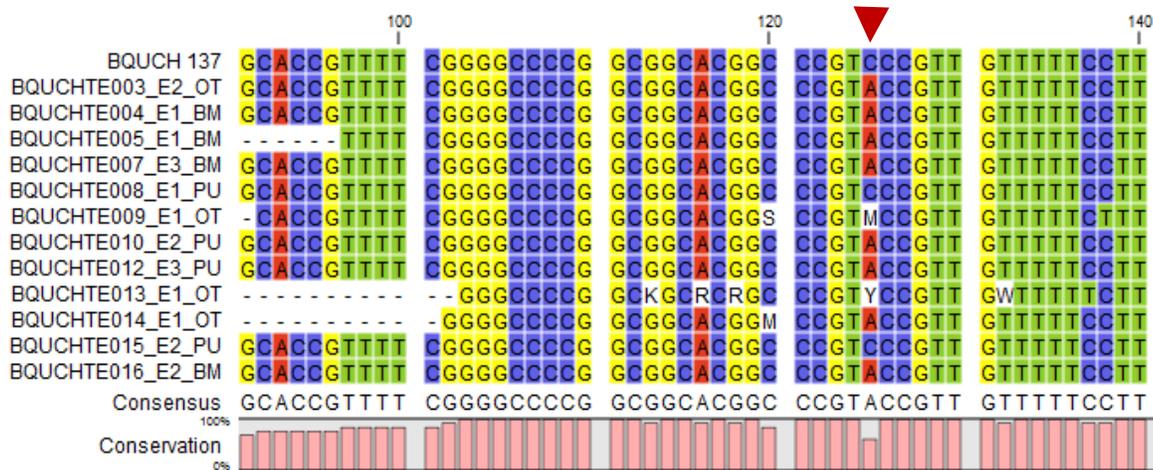


Figura 16. Alineamiento de las secuencias obtenidas de la región ITS-1 de ADN de *tapas* antiguas. La punta de flecha indica el polimorfismo en la posición relativa 203.

En resumen, los resultados obtenidos en la Universidad de Otago revelan que es posible extraer ADN proveniente de muestras de *tapa* etnográficas antiguas. También quedó en evidencia que es indispensable trabajar en un laboratorio especializado de ADN antiguo para obtener material genético libre de contaminación de ADN contemporáneo.

Además, demuestran que es posible determinar la especie de la cual proviene la fibra para la elaboración de piezas de *tapa* antigua. El estudio de la región ITS-1 indica además que mediante el análisis del polimorfismo en la posición relativa 203 es posible determinar si las fibras de *B. papyrifera* utilizadas para la elaboración de *tapa* presentan la variante asiática o polinésica.

5.3 Caracterización genética de textiles elaborados a partir de *B. papyrifera* mediante un marcador de sexo y diez SSR

Para caracterizar los textiles que se identificaron como elaborados a partir de *B. papyrifera* se usaron 11 marcadores moleculares. Estos corresponden a un marcador de sexo para *B. papyrifera* denominado “región *Male Marker*” y diez marcadores de microsatélites.

5.3.1 Optimización, evaluación y caracterización de la amplificabilidad de un marcador de sexo (*Male Marker*).

Como se planteó en la sección 5.1.3.2., dado la alta degradación del ADN obtenido a partir de muestras de *tapa*, se rediseñó el ensayo del marcador de sexo *Male Marker* que se utiliza en el laboratorio de manera de obtener amplicones más pequeños como productos de la PCR. El rediseño del ensayo consistió principalmente en el diseño de seis nuevos partidores, de modo que fue posible obtener seis nuevos productos de amplificación, como se observa en la **Figura 5** de Materiales y Métodos. En la **Figura 17** se presenta un gel de agarosa al 1,5%, en que se muestra la amplificación de prueba de las 6 nuevas combinaciones de partidores producto del rediseño de este ensayo.

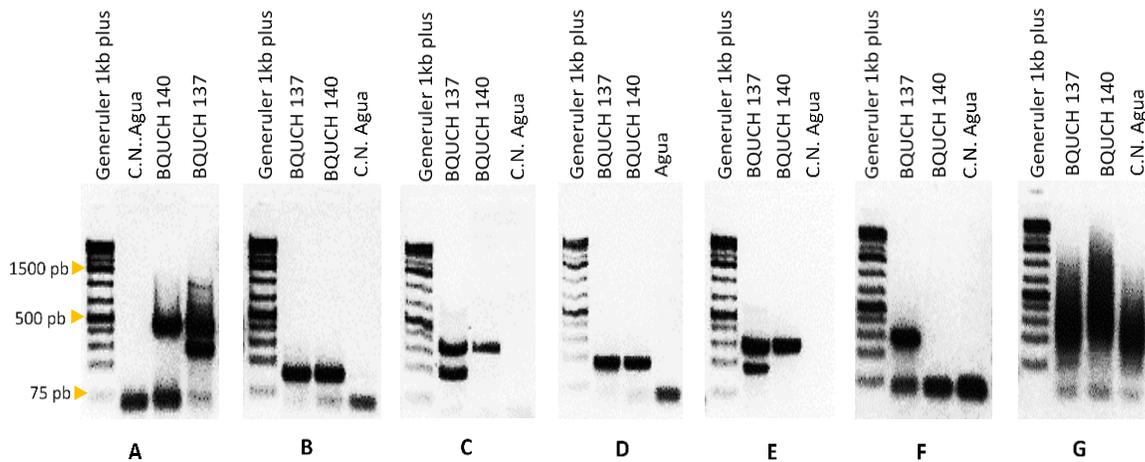


Figura 17. Ensayo de amplificación de las diferentes combinaciones para el rediseño del ensayo del marcador de sexo. Las muestras BQUCH137 y BQUCH140 corresponden a ADN de plantas controles, contemporáneas de *B. papyrifera* tipificadas visualmente como masculina y femenina, respectivamente; C.N. Agua: Control negativo de amplificación. **A:** Ensayo de *Male Marker* optimizado por Peñailillo *et al.* (2016). **B:** Ensayo de *Male Marker* utilizando combinación 1. **C:** Ensayo de *Male Marker* utilizando combinación 2. **D:** Ensayo de *Male Marker* utilizando combinación 3. **E:** Ensayo de *Male Marker* utilizando combinación 4. **F:** Ensayo de *Male Marker* utilizando combinación 5. **G:** Ensayo de *Male Marker* utilizando combinación 6.

Las combinaciones 2 y 4 presentan el patrón de bandeo y los tamaños de banda esperado para la muestra femenina y masculina. Las combinaciones 1, 3 y 5 presentaron amplificación sólo de una banda, mientras que la combinación 6 presentó amplificaciones inespecíficas. En una repetición de este

experimento, pero agregando muestras de ADN *tapa* contemporánea, se seleccionó como ensayo del marcador de sexo *Male Marker* rediseñado la combinación 2. La secuencia de los partidores de esta combinación se presenta en la **Tabla 6**. En la **Figura 18**, se presenta la amplificación de muestras de *tapa* contemporánea con la combinación seleccionada.

Tabla 6. Secuencia de los partidores utilizados en el ensayo del marcador de sexo *Male Marker* rediseñado

Partidor	Secuencia	pb
Fw_BP_2	5'- CCC GTA ACC GTG GAT CTA AAA AGC-3' (hebra sentido)	24
RC RS18	5'- TGA TGA CGT TGA CAT GGC-3' (hebra sentido)	18
RL (J)	5'- CTG GAC AAG ACC AAC TTT GAA TCC G-3' (hebra antisentido)	25

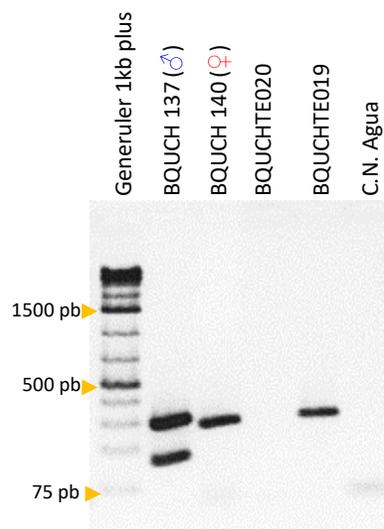


Figura 18. Ensayo de amplificación de las muestras de *tapa* contemporánea utilizando el ensayo del marcador de sexo rediseñado. Las muestras BQUCH137 y BQUCH140 corresponden a extractos de hoja contemporánea de *B. papyrifera* tipificadas visualmente como masculina y femenina, respectivamente; C.N. Agua: Control negativo de amplificación.

Una vez optimizado este ensayo, se amplificaron los extractos identificados como ADN proveniente de *B. papyrifera*. En todas las reacciones de PCR se incluyeron dos muestras de ADN contemporáneo a modo de control positivo de amplificación, correspondientes a una muestra tipificada visualmente como femenina y masculina; además se incluyeron los controles de extracción de las muestras y un control negativo de amplificación (mezcla de reacción de la PCR sin templado). En la **Figura 19** se presenta los resultados del análisis de algunas de las muestras ensayadas con este marcador. En la única muestra que se logró tipificar con este ensayo, se aprecia la amplificación de la banda de 300 pb de la muestra BQUCHTE004, perfil de amplificación que la tipifica como muestra femenina.

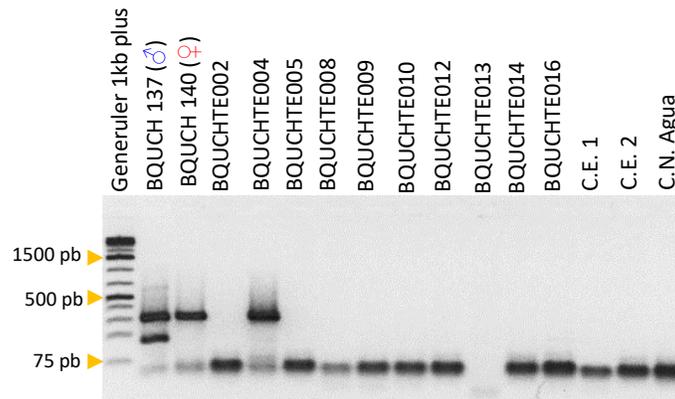


Figura 19. Amplificación de las muestras de *tapa* antigua utilizando el ensayo rediseñado del marcador de sexo. Las muestras BQUCH137 y BQUCH140 corresponden a extractos de hoja contemporánea de *B. papyrifera* tipificadas visualmente como masculina y femenina, respectivamente; C.E: Control de Extracción. C.N. Agua: Control negativo de amplificación.

Los extractos purificados que fueron identificados como ADN provenientes de *B. papyrifera* también se analizaron con este ensayo, no siendo posible tipificar ninguna de las muestras ensayadas. Estos resultados indican que no fue posible tipificar la gran mayoría de las muestras de *tapas* etnográficas mediante un análisis genético de ADN con el marcador de sexo.

5.3.2 Evaluación de la amplificabilidad y caracterización de muestras de textiles etnográficos mediante diez microsatélites

Se analizaron las 22 muestras de *tapa* antigua identificadas como manufacturadas a partir de *B. papyrifera* mediante la amplificación de 10 marcadores de microsatélites. Los microsatélites escogidos fueron Bro 07, Bro 08, Bro 13, Bro 15, Bropap 02214, Bropap 02801, Bropap 20558, Bropap 25444, Bropap 26985 y Bropap 30248, debido a que se encuentran estandarizados, amplifican fácilmente, y resultados previos de nuestro grupo han reportado que son los más informativos en análisis previos de esta especie (Peñailillo, 2014; Payacán, 2015).

En todas las reacciones de PCR se incluyó una muestra de ADN contemporáneo a modo de control positivo de amplificación, además de los controles de extracción de las muestras y un control negativo de amplificación (mezcla de reacción de la PCR sin templado). A modo de ejemplo, en la **Figura 20** se presenta uno de los marcadores ensayados (Bro 08) con las muestras de *tapa* antigua.

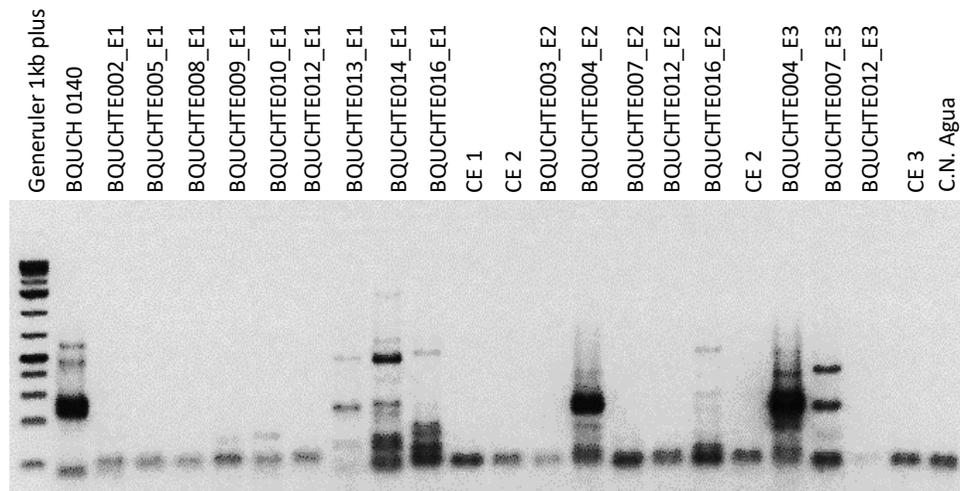


Figura 20. Amplificación del marcador SSR Bro 08 utilizando ADN obtenido a partir de *tapa* antigua. BQUCH140 corresponde al control positivo, ADN proveniente de hoja contemporánea de *B. papyrifera* C.E: Control de Extracción. C.N.: Control Negativo de la reacción de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

La amplificación de las muestras BQUCHTE013, BQUCHTE014, BQUCHTE015 y BQUCHTE016 (provenientes de un contexto arqueológico), en la mayor parte de los marcadores ensayados mostró bandas inespecíficas de mayor tamaño al esperado, lo que indica la presencia de contaminantes en estos extractos.

En la **Tabla 7** se resume los alelos encontrados en las muestras de *tapa* antigua analizadas con 10 marcadores SSR. La muestra BQUCHTE004 se tipificó exitosamente con los 10 marcadores SSR. El marcador Bro 08 presentó la mayor tasa de éxito, mientras que el marcador Bro 07 presentó mayores complicaciones durante la amplificación y asignación de alelos. En general, un 40% de los alelos observados en las piezas de *tapa* etnográfica antigua corresponden a alelos observados anteriormente en material contemporáneo y material de herbario. La mayor parte de estos alelos se observaron en la pieza BQUCHTE004, que corresponde a la pieza más contemporánea de la colección. En la **Tabla 7** se destaca con color rojo los alelos no observados anteriormente en material contemporáneo ni de herbario de *B. papyrifera*. En la última fila de la **Tabla 7**, se presenta el genotipo mayoritario encontrado en polinesia en cada marcador de SSR (tanto en material de contemporáneo como de herbario de *B. papyrifera*).

Los resultados del análisis de los marcadores Bro 13, Bro 15, Bropap 2214, Bropap 2081, Bropap 20558 y Bropap 25444 sugieren la presencia de más de un individuo en algunas de las muestra de ADN obtenido de las *tapas* etnográficas, pues se observaron más de dos alelos. Las celdas en color verde indican los alelos que se obtuvieron en al menos dos ensayos de amplificación diferentes.

Tabla 7. Resumen de los alelos encontrados en las muestras de tapa etnográfica analizadas con 10 marcadores SSR.

Muestras	Bro 07	Bro 08	Bro 13	Bro 15	Bropap 2214	Bropap 2801	Bropap 20558	Bropap 25444	Bropap 26985	Bropap 30248
BQUCHTE002					212					
BQUCHTE004	248/250	221/227	245/ 249/239	223/229/ 233/240/ 260	260/264/ 266/268	168/174/ 187/191	230/236/ 240	203/205/ 207	196/201	112/112
BQUCHTE007		221/221	206/ 224/261	217/223/ 250	207/211/ 220/225/ 239/254/ 285	168/191/ 181	164/187/ 237/240		192/192	
BQUCHTE008		213/213	241/241		258	165/168				
BQUCHTE010		221/227/ 235	239/240							
BQUCHTE012			239/245/ 249	163/241		124/124			276/276	
BQUCHTE013		201/201	159/206/ 223/234/ 253	240	247	176/222	225/230/ 252/257	154/167/ 203/207/ 251		
BQUCHTE014		227/227	206/226/ 234/252	240/251	211/220/ 164/214	176/222/ 259/267	171/176/ 211/260	167/198/ 203/207/ 227		
BQUCHTE015		213/213	241	151/170/ 201/208/ 214/240/ 241/261	250/258 / 216/239/ 245	159/176/ 206/222/ 254	173/199/ 204/210/ 218/229 /243	198/199/ 230/253	201/201	118/188
BQUCHTE016		213/227	206/226/ 258/261	230/232/ 240/251/ 256	199/206	176/222/ 283	206/216/ 240/251			
Genotipo Mayoritario en Polinesia	248/248	221/225	245/245	229/233	260/268	168/189	236/240	203/205	196/201	112/112

A/A: Alelos no detectados anteriormente en muestras contemporáneas ni herbario de *B. papyrifera*.

■: Alelos obtenidos en al menos en dos ensayos de amplificación diferentes.

De un total de 17 piezas de *tapa* antigua, fue posible caracterizar 10 piezas con al menos un marcador de SSR. De estas 10 piezas, seis se caracterizaron con seis o más marcadores de SSR. El 21% de los alelos obtenidos (indicados con celdas color verde en la **Tabla 7**) fueron confirmados en al menos dos ensayos de amplificación diferentes. El 79% restante se obtuvo del análisis de amplicones obtenidos en ensayos de amplificación diferentes o de un solo amplicón.

Como se ha mencionado anteriormente, las muestras BQUCHTE013, BQUCHTE014, BQUCHTE015 y BQUCHTE016, provienen de una manta funeraria encontrada un sitio arqueológico y son las piezas más antiguas de la colección (1760-1810). La mayor parte de los alelos encontrados en estas piezas son alelos no observados anteriormente en material contemporáneo y/o de herbario de *B. papyrifera*, lo que fue un hallazgo interesante y además confirma que no existió contaminación con ADN contemporáneo de *B. papyrifera*. Se caracterizaron exitosamente tres de estas cuatro muestras con al menos siete SSR.

Por otra parte, se logró caracterizar la pieza BQUCHTE012, la segunda más antigua (1880-1900), con cuatro SSR. Estos datos indican que la fecha de elaboración de la pieza no es determinante para caracterizar genéticamente *tapa* antigua. El análisis de los alelos encontrados y la comparación con la información disponible de muestras de material contemporáneo y de herbario se realizará en la sección 5.5.

En resumen, los resultados obtenidos en este objetivo indican que es posible amplificar ADN proveniente de muestras de *tapa* etnográfica antigua con SSR, indicando la presencia de alelos no detectados anteriormente en material contemporáneo ni de herbario de *B. papyrifera*. Una de las muestras de la colección se tipificó como femenina mediante el marcador de sexo rediseñado.

5.4 Extracción y caracterización de ADN de herbario de *B. papyrifera*.

5.4.1 Extracción de ADN a partir de muestras de herbario.

La extracción de ADN de las 51 muestras de hojas herbario disponibles para la realización de esta tesis, se realizó siguiendo el protocolo de Payacán (2015) con modificaciones para mejorar el rendimiento (optimización del protocolo realizado en muestras contemporáneas, véase sección 5.1). La extracción se realizó en el Laboratorio de ADN antiguo del Departamento de Anatomía de la Universidad de Otago, Dunedin, Nueva Zelanda. Se incluyeron dos controles de extracción. A modo de ejemplo, en la **Figura 21**, se presenta un gel de agarosa al 0,8% en el que se cargó 5 μ L de ADN obtenido de algunas muestras de herbario, observándose para todas las muestras un alto nivel de degradación. No se observa ADN en los controles de extracción (C.E.).

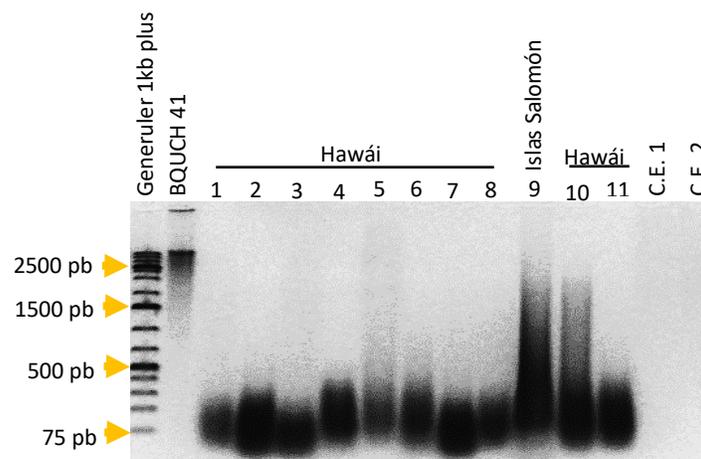


Figura 21. Análisis de los resultados de la extracción de ADN a partir de muestras de herbario. La muestra BQUCH41 corresponde a ADN moderno extraído a partir de hojas de *B. papyrifera*. C.E.= Control de Extracción. Orden de carga: carril 1: BISH444278; carril 2: BISH451765; carril 3: BISH58380; carril 4: BISH451764; carril

5: BISH58357; carril 6: BISH58346; carril 7: BISH58360; carril 8: BISH413708; carril 9: BISH505999; carril 10: BISH99313; carril 11: BISH58355. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

La concentración de ADN, medida mediante absorbancia a 260 nm de los extractos de muestras de herbario, varía en un rango entre 54 – 931 ng/μL. La razón 260 nm/ 280 nm de estas extracciones indican en general que se encuentran dentro del rango 1,69-2,05. Se determinó también la concentración de ADN de las muestras usando el agente intercalante fluorescente específico para ADN de doble hebra provisto en el sistema comercial Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit. La concentración de ADN varió en un rango entre 2,2 ng/μL y 220 ng/μL, como se aprecia en el **Anexo X**.

5.4.2 Análisis del material genético extraído a partir de muestras de herbario

Para evaluar la amplificabilidad del ADN extraído desde el material de herbario se utilizaron los mismos 12 marcadores moleculares usados para analizar muestras de *tapa* antigua. Se seleccionaron un total de 23 muestras de herbario para realizar los análisis genéticos con el marcador ITS-1 y los 10 marcadores de SSR. Las 51 muestras de herbarios se analizaron mediante marcador de sexo y 23 muestras se analizaron mediante los 10 marcadores de SSR. El criterio de selección fue priorizar el análisis aquellas muestras que provenían de localidades de las cuales no se poseían muestras contemporáneas ni de herbarios, como lo es el caso de las Islas Sólomon, Nueva Guinea, Fiji y algunas localidades de Hawái como Molokai, Lanai, Maui y Niihau. En la **Tabla 8** se presentan las 23 muestras seleccionadas.

Tabla 8. Muestras de herbario seleccionadas para análisis con 12 marcadores moleculares.

	CÓDIGO	LOCALIDAD	Año				
1	BISH32928	Fiji	1968	12	BISH58380	Maui (Hawái)	1927
2	BISH57308	Niihau (Hawái)	1912	13	BISH58386	Molokai (Hawái)	1928
3	BISH58345	Lanai (Hawái)	1914	14	BISH161323	Nueva Guinea	1937
4	BISH58352	Molokai (Hawái)	1928	15	BISH161324	Fiji	1924
5	BISH58385	Molokai (Hawái)	1909	16	BISH161326	Fiji	1934
6	BISH58360	Kauai (Hawái)	1928	17	BISH415045	Niihau (Hawái)	1947
7	BISH58362	Kauai (Hawái)	1909	18	BISH451077	Niihau (Hawái)	1949
8	BISH58363	Kauai (Hawái)	1909	19	BISH416666	Salomón	1977
9	BISH58364	Lanai (Hawái)	1914	20	BISH451764	Kauai (Hawái)	1909
10	BISH58370	Lanai (Hawái)	1927	21	BISH451766	Kauai (Hawái)	1909
11	BISH58375	Niihau (Hawái)	1912	22	BISH505999	Salomón	1985
				23	BISH757984	Fiji	1968

5.4.2.1 Amplificación de la región ITS-1.

Utilizando el sistema comercial GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase se evaluó la amplificabilidad de la región ITS-1 de los extractos de ADN de muestras de herbario. A modo de ejemplo, en la **Figura 22** se

presenta un gel de agarosa al 1,5% de algunas de las muestras de herbario analizadas con este marcador. Los 19 amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar, obteniéndose secuencias legibles para todas ellas.

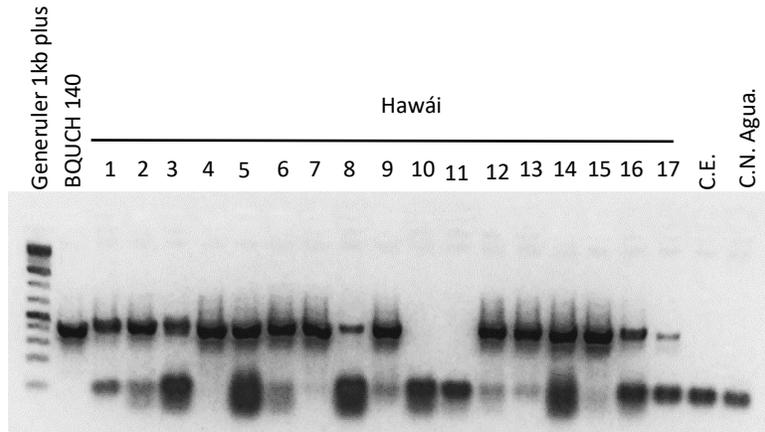


Figura 22. Amplificación de la región ITS-1 a partir del ADN obtenido de muestras de herbarios. C.E: Control de Extracción, H₂O: control negativo de PCR. Orden de carga: carril 1: BISH57308; carril 2: BISH58345; carril 3: BISH58352; carril 4: BISH58385; carril 5: BISH58360; carril 6: BISH58362; carril 7: BISH58363; carril 8: BISH58364; carril 9: BISH58370; carril 10: BISH58375; carril 11: BISH58380; carril 12: BISH58386; carril 13: BISH415045; carril 14: BISH451077; carril 15: BISH451764; carril 16: BISH451766; carril 17: BISH451766. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Las secuencias analizadas se analizaron mediante la herramienta BLAST identificándose los 19 amplicones como secuencias de *B. papyrifera* con altos valores de probabilidad (*e-value*) y porcentajes de identidad.

El análisis del sitio polimórfico relativo 203 indicó que todas las muestras provenientes de Hawái presentan una doble señal en este sitio, con una señal predominantemente polinésica por sobre la asiática, a excepción de la muestra BISH58362, proveniente de la localidad de Kauai, que presenta una doble señal de igual intensidad, tanto para la variante asiática como polinésica. Dado que en el análisis de muestras de herbario se tiene la seguridad de que se está analizando sólo un individuo, este resultado indica la presencia de una heterocigosis para esta posición en los individuos de Hawái. Por otra parte, las cuatro muestras de Fiji analizadas presentan la variante polinésica, con excepción de la muestra BISH161324 que presenta una doble señal, con una señal polinésica predominante, indicando una heterocigosis en esta posición. La única muestra de Nueva Guinea analizada también presenta una doble señal, predominando la variante polinésica. Las dos muestras analizadas provenientes de las islas Salomón presentan claramente la variante asiática (G) en sus secuencias.

Finalmente, los 19 amplicones obtenidos se alinearon utilizando el algoritmo Clustal W presente en el programa CLC sequence viewer 7. En la **Figura 23**, se presenta el alineamiento de estas secuencias.

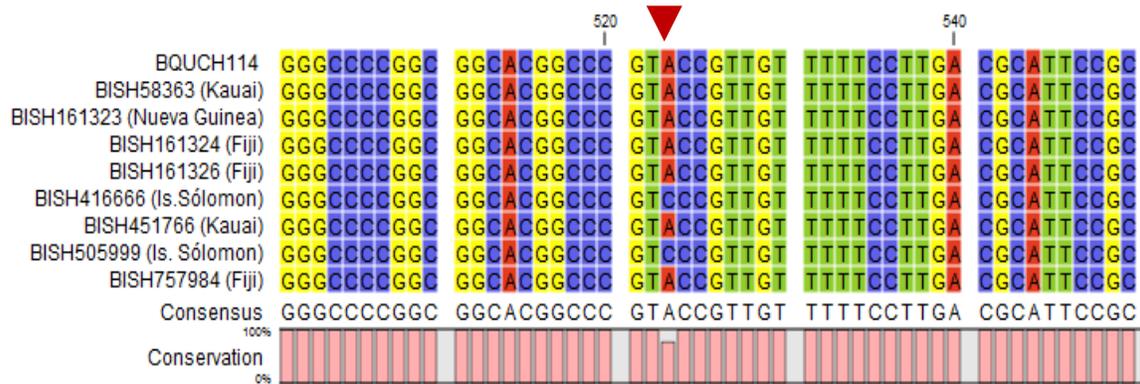


Figura 23. Alineamiento de las secuencias obtenidas de la amplificación de la región ITS-1 de ADN de muestras de herbario. La punta de flecha de color rojo indica el sitio polimórfico en la posición relativa 203.

5.4.2.2 Amplificación del marcador de sexo *Male Marker*.

La totalidad de las muestras de herbario disponibles para la realización de esta tesis se analizaron con el marcador de sexo. Este marcador es de gran interés pues un gran porcentaje de las muestras provienen de Hawái, y este archipiélago es la única localidad de toda Polinesia en la que se han identificado individuos masculinos de *B. papyrifera*. La tipificación de las muestras se realizó mediante el ensayo optimizado por Peñailillo *et al.* (2014). Las muestras que no se tipificaron con este protocolo se amplificaron con el protocolo rediseñado del marcador de sexo utilizado para tipificar las muestras de *tapa* antigua. En la **Figura 24** se presenta un gel de agarosa al 1,5% con la amplificación de algunas de las muestras de herbario utilizando el protocolo del marcador de sexo rediseñado.

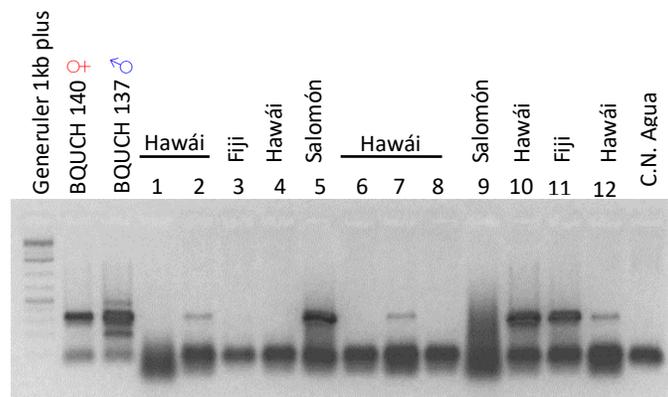


Figura 24. Amplificación de las muestras de herbario utilizando el ensayo del marcador de sexo rediseñado. BQUCH140: Control positivo femenino; BUQUCH137: Control positivo masculino; H₂O: control negativo de PCR. Orden de carga: carril 1: BISH58358; carril 2: BISH161323; carril 3: BISH161324; carril 4: BISH413708; carril 5: BISH416666; carril 6: BISH451763; carril 7: BISH451764; carril 8: BISH451767; carril 9: 505999; carril 10: BISH66829; carril 11: BISH757984; carril 12: BISH763194. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Se tipificaron positivamente 42 de las 51 muestras de herbarios disponibles para esta tesis, mientras que no se logró tipificar las nueve restantes, ni mediante el ensayo del marcador de sexo estandarizado por Peñailillo *et al.* (2016), ni mediante el ensayo rediseñado en esta tesis. Todas las muestras tipificadas son femeninas: 27 de ellas fueron tipificadas mediante el ensayo de Peñailillo *et al.*, 2016 mientras que 15 fueron tipificadas con el ensayo rediseñado del macador de sexo.

5.4.2.3 Amplificación de 10 marcadores de SSR.

Se analizaron las 23 muestras de herbario seleccionadas con 10 marcadores de microsatélites: Bro 07, Bro 08, Bro 13, Bro 15, Bropap 02214, Bropap 02801, Bropap 20558, Bropap 25444, Bropap 26985 y Bropap 30248. En todas las reacciones de PCR se incluyó una muestra de ADN contemporáneo a modo de control positivo de amplificación, además de los controles de extracción de las muestras y un control negativo de amplificación (mezcla de la PCR sin templado). Como ejemplo, en la **Figura 25** se presenta uno de los marcadores de SSR ensayados con las muestras de herbario.

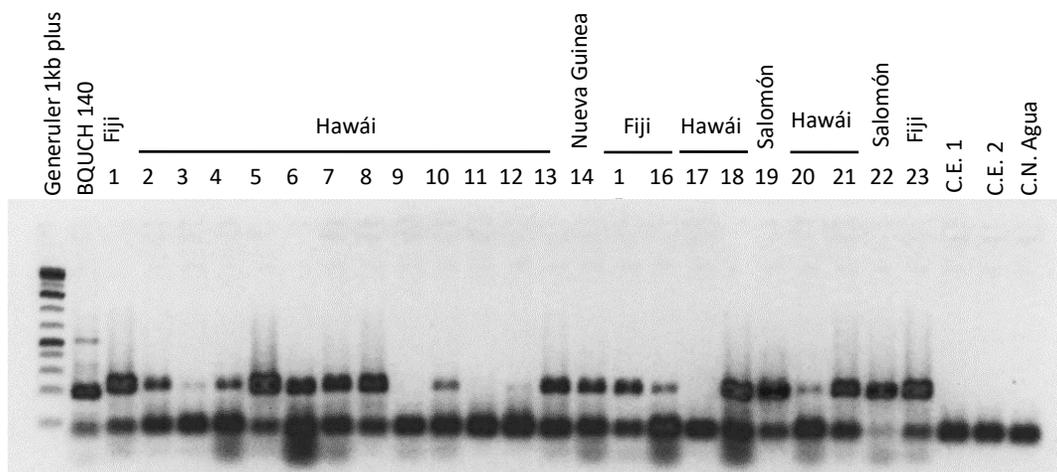


Figura 25. Amplificación de ADN de muestras de herbario con el marcador de SSR Bropap 26985.

C.E: Control de Extracción, H₂O: control negativo de PCR. BQUCH140: ADN de muestra contemporánea de *B. papyrifera*. Orden de carga: carril 1: BISH32928; carril 2: BISH57308; carril 3: BISH58345; carril 4: BISH58352; carril 5: BISH58385; carril 6: BISH58360; carril 7: BISH58362; carril 8: BISH58363; carril 9: BISH58364; carril 10: BISH58370; carril 11: BISH58375; carril 12: BISH58380; carril 13: BISH58386; carril 14: BISH161323; carril 15: BISH161324; carril 16: BISH161326; carril 17: BISH415045; carril 18: BISH451077; carril 19: BISH416666; carril 20: BISH451764; carril 21: BISH451766; carril 22: BISH505999; carril 23: BISH757984. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

En el **Anexo XI** se resume los alelos encontrados en las muestras de herbario analizadas con 10 marcadores SSR. En general, la mayor parte de las muestras analizadas se caracterizó con al menos nueve marcadores de SSR. La muestra BISH415045 fue la única muestra que se caracterizó con un solo marcador de SSR (Bro 08).

El marcador Bro 07 presentó mayor dificultad, tanto en la etapa de amplificación como en la asignación de alelos, mientras que los marcadores Bro 08, Bropap 26985 y Bropap 30248 presentaron el mayor porcentaje de éxito, tanto de amplificación como en la asignación de alelos.

En general se encontraron alelos ya detectados anteriormente en muestras contemporáneas y de herbario de *B. papyrifera*. Sin embargo, se observaron alelos nuevos para los marcadores Bro 07, Bro 08, Bropap 2081, Bropap 20558, Bropap 26985 y Bropap 30248 (**Anexo XI**, alelos en rojo) en las dos muestras de las Islas Salomón analizadas (BISH41666 y BISH505999). Algunos de estos nuevos alelos también se encontraron por primera vez en *tapa* antigua. Por ejemplo, con el marcador Bro 08 se detectó el alelo 201 también en la pieza BQCHTE013 (Agakautai, 1760-1810), mientras que con el marcador Bropap 20558 se identificó el alelo 230 en la pieza BQUCHTE004 (Nueva Guinea, 1980) y BQUCHTE013. El alelo 192 del marcador Bropap 26985 fue descubierto también en la pieza BQUCHTE007 (Fiji, 1970). Algunas muestras además presentaron genotipos no detectados anteriormente (éstos se muestran en forma resumida en la **Tabla 9** y se indican con negrita en el **Anexo XI**). Las otras muestras presentan genotipos esperados propios de Polinesia, con excepción de las muestras de las Islas Salomón ya mencionadas.

Tabla 9: Alelos y genotipos no detectados anteriormente en muestras de herbario ni en material contemporáneo.

Marcador	Genotipo	Localidad
Bro 07	259/261	Is. Salomón
Bro 08	201/213	Is. Salomón
Bro 13	240/241	Is. Salomón
Bropap 2801	159/168	Is. Salomón
Bropap 20558	223/236	Is. Salomón
	230/242	Is. Salomón
Bropap 26985	192/201	Is. Salomón
Bropap 30248	106/112	Fiji, Hawái
	135/142	Is. Salomón
	142/155	Is. Salomón

A/A: Alelos no observados anteriormente en muestras contemporáneas, ni herbario de *B. papyrifera*.

En resumen, en este objetivo se determinó el sexo de 41 de las 52 muestras de la colección de herbarios, resultando todas ellas femeninas. Además se analizó la región ITS-1 de 23 muestras de herbario seleccionadas, las cuales se caracterizaron exitosamente mediante 10 marcadores de SSR.

5.5 Integración de los resultados obtenidos del análisis de las muestras de *tapa* y material de herbario con la información disponible de material contemporáneo y de herbario de *B. papyrifera* disponible.

Los datos obtenidos de la caracterización genética de las 17 muestras de la colección de *tapa* etnográfica antigua, mediante el análisis de la región ITS-1, del marcador de sexo *Male Maker* y de 10 marcadores de microsatélites permiten en parte reconstruir la historia de cada pieza de la colección. Estos tres tipos de marcadores nos permiten obtener información de distinto tipo y significado.

Por una parte, el marcador ITS-1 cumple una doble función: en primer lugar como DNA *barcoding* para identificar la especie de la cual provienen las fibras de las cuales se elaboró el textil y en segundo lugar, indicar si las secuencias identificadas como *B. papyrifera* provienen de Asia o de la zona Polinésica analizando el polimorfismo en la posición relativa 203.

El marcador de sexo *Male Marker* permite tipificar sexualmente al individuo identificado como *B. papyrifera*, dato que es interesante porque hasta el momento se ha reportado la presencia de sólo individuos femeninos en Polinesia (tanto en material contemporáneo como de herbario), a excepción del archipiélago de Hawái en los que se han encontrado individuos femeninos y masculinos en material contemporáneo (Peñailillo *et al.*, 2016). En material de herbario existen hasta el momento 4 excepciones, identificándose 4 individuos masculinos, uno proveniente de las Islas Marquesas (recolectado el año 1921), otro proveniente de las Islas Australes (Rapa, recolectado el año 1921), y dos provenientes de Nueva Zelanda (recolectados el año 2006) (Payacán, 2015).

Por último, los 10 marcadores de SSR son los más informativos, pues dada su naturaleza alélica, detectan diversidad intra-especie, permitiendo así encontrar diferencias entre individuos y hacer estudios genéticos poblacionales. Además, el estudio de muestras de *tapa* con microsatélites permite determinar si la pieza textil fue confeccionada con uno o más individuos de *B. papyrifera* genotípicamente diferentes. Esta especie es diploide, por lo que se espera observar como máximo dos señales en un electroferograma al analizar a un solo individuo. Dado al trabajo previo realizado tanto en material contemporáneo como de herbario con estos marcadores (Peñailillo, 2014; Payacán, 2015; Olivares, 2016), el análisis de muestras de *tapa* con estos 10 marcadores también permite relacionar los genotipos encontrados en estas piezas con los genotipos encontrados tanto en la zona endémica como en Polinesia, abriendo las puertas además a una posible correlación geográfica de genotipos.

En la **Tabla 10** se presenta un resumen de los resultados positivos con los diferentes marcadores analizados en cada una de las muestras.

Tabla 10. Resumen de los resultados del análisis genético realizado en las 17 piezas de *tapa* antigua.

Pieza	Isla / Localidad	ITS-1		Marcador de sexo	SSR analizados
		Especie identificada	Polimorfismo		
BQUCHTE001	Isla de Pascua (?)	<i>Triticum aestivum</i>	-	-	-
BQUCHTE002	Hawái	<i>B. papyrifera</i> , <i>Sporobolus fertilis</i>	G	-	1
BQUCHTE003	Hawái (?)	<i>B. papyrifera</i> , <i>T. aestivum</i>	T > G	-	-
BQUCHTE004	New Guinea (1980-1990)	<i>B. papyrifera</i> (5n)	T > G	Femenina	10
BQUCHTE005	Hawái	<i>B. papyrifera</i> (2n)	T = G	-	-
BQUCHTE006	Hawái	-	-	-	-
BQUCHTE007	Fiji (1970)	<i>B. papyrifera</i> (3n), <i>Morus yunnanesis</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Helianthus annuus</i>	T > G	-	7
BQUCHTE008	Fiji	<i>B. papyrifera</i>	G	-	4
BQUCHTE009	Hawái (?)	<i>B. papyrifera</i> , <i>Fagus sylvatica</i>	G > T	-	-
BQUCHTE010	Hawái (?)	<i>B. papyrifera</i> , <i>F. sylvatica</i>	T	-	2
BQUCHTE011		<i>Impatiens sp</i> (2n), <i>Lolium perenne</i> , <i>Lolium multiflorum</i>	-	-	-
BQUCHTE012	Samoa (1880 1900)	<i>B. papyrifera</i> (2n), <i>Populus caspica</i> , <i>Populus alba</i>	T / G	-	4
BQUCHTE013	Agakautai (1760-1810)	<i>B. papyrifera</i> , <i>Lagenaria sicararia</i> , <i>Leontodon tingitanus</i> , <i>A. fumigatus</i>	-	-	7
BQUCHTE014	Agakautai (1760-1810)	<i>B. papyrifera</i> / <i>Citrus máxima</i>	T > G	-	7
BQUCHTE015	Agakautai (1760-1810)	<i>B. papyrifera</i> , <i>S. lycopersicum</i> , <i>C. sempervirens</i> , <i>F. sylvatica</i>	G	-	9
BQUCHTE016	Agakautai (1760-1810)	<i>B. papyrifera</i> (2n), <i>S. lycopersicum</i> , <i>Triticum sp.</i> , <i>A. fumigatus</i>	T	-	6
BQUCHTE017	Agakautai (corteza)	<i>A. fumigatus</i>	-	-	-

El marcador ITS-1 resultó útil para la identificación del ADN extraído a partir de las piezas de la colección. De las 17 piezas, 13 piezas fueron identificadas como *B. papyrifera* mediante al menos un ensayo de amplificación y posterior secuenciación de la región ITS-1. Las muestras BQUCHTE001, BQUCHTE011 y BQUCHTE017 fueron las únicas no identificadas como *B. papyrifera*, identificándose como *Triticum aestivum*, *Impatiens sp.*, y *Aspergillus fumigatus*, respectivamente. La pieza BQUCHTE006 fue la única que no se logró identificar mediante ITS-1.

El marcador de sexo *Male Marker* rediseñado permitió tipificar sólo una pieza, identificándose la pieza BQUCHTE004 como un textil elaborado a partir de individuos femeninos de *B. papyrifera*.

El análisis mediante 10 marcadores de SSR logró realizarse en 10 muestras, siendo las muestras BQUCHTE004, BQUCHTE007, BQUCHTE013, BQUCHTE014, BQUCHTE015 y BQUCHTE016 las que fueron analizadas con un mayor número de SSR (**Tabla 10**).

Cada pieza de tapa etnográfica cuenta una historia diferente, la cual puede ser develada en parte con el análisis de estos 12 marcadores. A continuación, se resume la información obtenida en esta tesis de cada una de las piezas textiles.



Figura 26: Pieza BQUCHTE001. La etiqueta de esta muestra indica: ‘Bishop Museum D. 2228 Cordage from Easter Island? Tapa Cloth’.

La pieza BQUCHTE001 (**Figura 26**) es un pequeño trozo de fibra obtenido a partir del borde de una pieza de *tapa* del Bishop Museum. Como indica su etiqueta, no se tiene certeza de que isla proviene, aunque se plantea a Rapa Nui como posible isla de origen. Dado al tamaño de la muestra, sólo se realizó un replicado de extracción. La amplificación de la región ITS-1 de esta pieza mediante KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase y GoTaq G2® Flexi DNA Polymerase fue exitosa en ambos casos, pero sólo se obtuvo una secuencia legible utilizando GoTaq. La secuencia obtenida se identificó como *Triticum aestivum* (trigo harinero) al compararla con la base de datos disponible en NCBI. No se ensayó la muestra de ADN obtenido de esta pieza con el resto de

los marcadores. Dado el poco material de partida (4,5 mg), es muy probable que la secuencia obtenida sea ADN contaminante proveniente del sitio en el que estaba la pieza antes de su ingreso a la colección en el Bishop Museum, pues no se ha reportado que esta especie sea usada como fuente de fibra y no crece en condiciones normales en ambientes tropicales o subtropicales.

La pieza BQUCHTE002 es un pequeño fragmento de *tapa* de aproximadamente 2 cm x 1 cm, proveniente de Hawái (**Figura 27**). Es un trozo que se encuentra decorado, con pigmentos negros posiblemente de origen orgánico (proveniente de *Aleurites moluccana*) o carbón vegetal (Bisulca *et al.*, 2014). De esta pieza se extrajo ADN en duplicado. La amplificación de la región ITS-1 fue exitosa mediante KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase y se obtuvo una secuencia legible que fue identificada como *B. papyrifera*. El análisis del polimorfismo en la posición relativa 203 de la región ITS-1 indicó la presencia de la variante asiática en esta muestra. El trabajo publicado por Seelenfreund *et al.* (2011)



Figura 27: Pieza BQUCHTE002. La etiqueta de esta muestra indica ‘Bishop Museum cat #2494 Hawaiian’

reportó el hallazgo de variantes asiáticas y polinésicas sólo en el archipiélago de Hawái, por lo que el resultado en esta pieza no es del todo sorprendente. El reporte de Peñailillo *et al.* (2016) indica que los individuos contemporáneos identificados con la variante asiática mediante ITS-1 además son masculinos, por lo que era esperable que el análisis del marcador de sexo en esta pieza tipificara al individuo de *B. papyrifera* como masculino. Lamentablemente, no se logró analizar esta muestra con dicho marcador. Es probable que la calidad del ADN extraído, además de la presencia de inhibidores de la PCR haya interferido en la amplificación, ya que esta pieza se caracterizó con sólo uno de los 10 marcadores de SSR. El alelo obtenido mediante el ensayo del marcador Bropap 2214 (212/212), y por tanto también el genotipo, no se había detectado anteriormente en material contemporáneo ni de herbario, y el alelo es de mucho menor tamaño que los detectados anteriormente en dicho marcador (239).



Figura 28: Pieza BQUCHTE003. La etiqueta de esta muestra indica: 'Bishop Museum "No water mark" on envelop-no number probable Hawaii'

La pieza BQUCHTE003 (**Figura 28**) de aproximadamente 1,5 cm x 1,0 cm proviene del Bishop Museum y no se tiene certeza si proviene o no de Hawái. Esta pieza era bastante gruesa, por lo que permitió realizar dos extracciones. Mediante la enzima KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase se obtuvo una secuencia legible que fue identificada como *B. papyrifera*. El análisis del sitio

polimórfico relativo 203 indicó la presencia de ambas variantes en esta secuencia, dado que se observó en el electroferograma una doble señal sólo en este sitio, con la prevalencia de la variante polinésica por sobre la asiática. Este resultado indicaría una heterocigosis en este sitio, o la presencia de más de un individuo de *B. papyrifera* en el extracto. En muestras de herbario provenientes de Hawái, analizadas en esta tesis, se encontró una heterocigosis en este sitio

polimórfico. Como se mencionó anteriormente, en Hawái se ha reportado la presencia de la variante asiática y polinésica, por lo que es posible que la pieza haya sido elaborada con plantas de variantes diferentes. Para esta pieza no fue posible amplificar el marcador de sexo ni los 10 microsatélites, sin embargo, la información obtenida a partir del análisis de ITS-1 indica que probablemente la elaboración de esta pieza se realizó a partir de corteza proveniente de individuos genéticamente diferentes de *B. papyrifera*.

La pieza BQUCHTE004 proviene de una colección privada (**Figura 29**). Es la pieza más moderna de la colección (1980-1990) y proviene de Nueva Guinea, isla de la cual no se poseían muestras contemporáneas ni de herbarios hasta antes de esta tesis. Es pieza se caracterizó con todos los marcadores. Dado el tamaño de esta pieza (5 cm x 2 cm), la extracción se realizó en triplicado. La región

ITS-1 de los extractos de ADN de esta pieza se amplificaron mediante ambas polimerasas, identificándose los amplicones como secuencias de *B. papyrifera*. El análisis del sitio polimórfico indica la presencia de ambas variantes en la secuencia, dado que se observa puntualmente una doble señal en el sitio, con una prevalencia de la variante polinésica por sobre la asiática. Esto podría indicar una heterocigosis en esta posición o la presencia de dos o más individuos genéticamente diferentes en la pieza de *tapa*. La muestra de herbario proveniente de Nueva Guinea analizada en esta tesis también indicó una heterocigosis en esta posición. El análisis mediante el marcador de sexo tipificó como femenino el o los individuos de *B. papyrifera* utilizados para elaborar esta pieza.



El análisis de los extractos con 10 marcadores de microsatélites confirma la presencia de al menos dos individuos genéticamente diferentes, pues en seis de los 10 marcadores se observaron más de dos alelos por muestra. En general, los alelos y genotipos encontrados en esta pieza han sido observados anteriormente en material contemporáneo y de herbario. El genotipo encontrado en el marcador Bro 07 se había detectado anteriormente en material contemporáneo de Tonga, Fiji y en individuos femeninos de Hawái, mientras que con el marcador Bro 08 se detectó un genotipo encontrado en material de herbario de Tubuai y en material contemporáneo de Raiatea y Japón. Los genotipos observados con los marcadores Bropap 30248 y Bropap 26985 son los comunes para todas las muestras de Polinesia. Los tres alelos encontrados con el marcador Bropap 25444 se habían encontrado anteriormente, y dos de ellos conforman el genotipo característico de Polinesia. El tercer alelo, en cambio, se encuentra en material contemporáneo de Nueva Caledonia, China y Samoa y en material de herbario de Isla de Pascua. El análisis con el marcador Bro 13 indica la presencia de tres alelos en la muestra, de los cuales uno es un alelo no observado anteriormente. Uno de los alelos corresponde al alelo común en toda Polinesia, mientras que el otro se ha observado en material contemporáneo de individuos masculinos de Hawái. Mediante el marcador Bro 15 se encontraron cinco alelos, dos de los cuales no se habían detectado anteriormente. Los otros tres alelos se han descrito en toda Polinesia. El análisis con el marcador Bropap 02214 indica la presencia de cuatro alelos detectados anteriormente, de los cuales tres son comunes en muestras provenientes de Polinesia, y uno ha sido observado en Taiwán. En el marcador Bropap 2801 se observaron cuatro alelos, uno no detectado anteriormente, dos comunes en Polinesia, y el último sólo en muestras proveniente de Taiwán. Por último, el marcador Bropap 20558 indicó la presencia de tres alelos, uno no detectado anteriormente y los otros dos conforman el genotipo común en muestras polinésicas y de Taiwán.

Figura 29: Pieza BQUCHTE004. La etiqueta de esta muestra indica: 'New Guinea 1980-1990 coll. Tricia Allen'

En resumen, el análisis de la pieza BQUCHTE004 con 12 marcadores moleculares indica que esta pieza fue elaborada con al menos dos individuos genéticamente diferentes de *B. papyrifera*, ambos femeninos y que además existe un componente asiático en su genoma, evidente en algunos microsatélites que indican la presencia de alelos observados anteriormente en Taiwán.



Figura 31: Pieza BQUCHTE005. La etiqueta de esta muestra indica: 'Honolulu Museum of AA Hawaii 662.1

proviene de Hawái y es un pequeño fragmento de una pieza completa propiedad del Honolulu Museum of Art (Figura 31). Dado al tamaño pequeño de esta pieza, sólo se realizó una extracción. Se obtuvieron secuencias legibles mediante ambas polimerasas, que fueron identificadas como de *B. papyrifera*. El análisis del sitio polimórfico relativo 203 indicó la presencia de ambas variantes en la secuencia obtenida mediante KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase, dado que en el electroferograma se observó una doble señal, sin una prevalencia de una variante por sobre la otra, indicando una heterocigosis para este sitio o la presencia de más de un individuo de *B. papyrifera* en el extracto. Por otro lado, el análisis de la secuencia obtenida mediante GoTaq G2® Flexi DNA Polymerase, presentó sólo la variante polinésica. Cabe recordar que en los herbarios provenientes de Hawái analizados en esta tesis se encontró una heterocigosis para este sitio. En esta pieza no se pudo amplificar el marcador de sexo y ni los microsatélites, sin embargo, la información obtenida a partir del análisis de ITS-1 indica que probablemente la elaboración de esta pieza se realizó a partir de cortezas provenientes de individuos genéticamente diferentes de *B. papyrifera*, consistente con la presencia de individuos con las variantes asiática y polinésica reportadas en Hawái.

La pieza BQUCHTE005 (Figura 30) de aproximadamente 1,0 cm x 1,0 cm proviene de Hawái y es un pequeño fragmento de una pieza completa propiedad del Honolulu Museum of Art (Figura 31). Dado al tamaño pequeño de esta pieza, sólo se realizó una extracción. Se obtuvieron secuencias legibles mediante ambas polimerasas, que fueron identificadas como de *B. papyrifera*. El análisis del sitio polimórfico relativo 203 indicó la presencia de ambas variantes en la secuencia obtenida mediante KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase, dado que en el electroferograma se observó una doble señal, sin una prevalencia de una variante por sobre la otra, indicando una heterocigosis para este sitio o la presencia de más de un individuo de *B.*



Figura 30: Pieza completa de tapa de la que proviene la muestra BQUCHTE005. La etiqueta de esta pieza indica que fue elaborada a partir de *B. papyrifera*. Conjunto de 5 tapas utilizada como ropa de cama (*kapa moe*).



Figura 32: Pieza BQUCHTE006. La etiqueta de esta muestra indica: 'Honolulu Museum of AA Hawai 662.1

La pieza BQUCTE006 (**Figura 32**) corresponde a pequeños fragmentos de color negro, provenientes de una pieza de *tapa* utilizada como cobertor de cama, adquirida en 1935 por el Honolulu Museum of Art (**Figuras 33**). La etiqueta de la foto de la pieza completa de la cual fueron extraídos estos fragmentos, indica que fue elaborada a partir de *B. papyrifera*. Se realizó un duplicado de extracción a partir de estos fragmentos. Aún después de purificar los extractos obtenidos, no sé logró amplificar la región ITS-1 de esta muestra con ninguno de los sistemas de amplificación

disponibles. Tampoco se logró caracterizar los extractos mediante el marcador de sexo o los 10 marcadores de SSR, siendo esta la única muestra de la cual no se obtuvo ninguna información adicional.



Figura 33: Pieza completa de tapa de la que proviene la muestra BQUCHTE006. La etiqueta de esta pieza indica que fue elaborada a partir de *B. papyrifera*.



Figura 34: Pieza BQUCHTE007. La etiqueta de esta muestra indica: 'Fiji 1970'.

La pieza BQUCTE007 de aproximadamente 10 cm x 3 cm es una *tapa* blanca, de la cual sólo se tiene la información que proviene de Fiji (**Figura 34**). Se realizó una extracción en triplicado y mediante ambas polimerasas se obtuvieron amplicones de la región ITS-1, que luego de secuenciar se identificaron como *B. papyrifera*. El análisis del sitio polimórfico relativo 203 indica la presencia de ambas variantes en la secuencia, pues se observa puntualmente una doble señal

en el sitio polimórfico, con prevalencia de la variante polinésica por sobre la asiática. En una de las cuatro muestras de herbario provenientes de Fiji analizadas en esta tesis se observó una heterocigosis en este sitio. El análisis de los varios amplicones obtenidos también llevó a identificar otras especies con este marcador, de las cuales ninguna se ha reportado como fuente de fibra. No se logró tipificar los extractos obtenidos mediante el marcador de sexo.

Esta pieza se caracterizó con siete de los 10 marcadores de SSR. Con el marcador Bro 08 se observó un alelo antes detectado, común en toda Polinesia, pero que no se había observado antes en forma homocigota. En los marcadores Bro 13, Bro 15 y Bro pap 26985 se detectaron alelos no observados anteriormente. El marcador Bro pap 02214 indicó la presencia de ocho alelos, de los cuales seis no se habían detectado anteriormente. Los alelos observados previamente, se habían detectado en material contemporáneo de Vietnam, y en material contemporáneo de China e individuos masculinos de Hawái, respectivamente.

En resumen, los datos moleculares obtenidos luego de la caracterización de esta pieza, indican que se trata de una pieza textil elaborada a partir de fibras de *B. papyrifera* de al menos dos individuos genéticamente diferentes, y sugieren un cierto componente asiático en su genoma (determinado por la presencia de alelos asiáticos en dos marcadores de SSR).



Figura 35: Pieza BQUCHTE008.

La etiqueta de esta muestra indica: 'Honolulu Museum of Art, Fiji 2506'.

La pieza BQUCHTE008 (**Figura 35**) son pequeños trozos que provienen de una pieza de *tapa* elaborada en Fiji, actualmente propiedad del Honolulu Museum of Art (**Figura 36**). Estos fragmentos de aproximadamente 4 cm x 0,5 cm son fragmentos de una pieza de gran tamaño decorada con dibujos geométricos realizados con pinturas a partir de la savia de árboles y hollín, característica de las *tapas* elaboradas en dicho archipiélago. Se realizó una extracción en triplicado y mediante GoTaq G2® Flexi DNA Polymerase se obtuvieron amplicones de la región ITS-1, luego de purificar los extractos obtenidos. La secuencia se identificó como *B. papyrifera*. El análisis del sitio polimórfico relativo 203 indicó claramente la presencia de la variante asiática en la

secuencia. Anteriormente no se había reportado la presencia de la variante asiática en Fiji, por lo que este resultado indica tres posibles escenarios diferentes: 1) que los individuos utilizados para elaborar esta pieza provengan de Hawái o de zonas cercanas a Asia; o 2) que en el tiempo en el que se elaboró esta pieza existían en Fiji individuos de *B. papyrifera* con la variante que hasta este trabajo habíamos considerado como "asiática". No se registra el dato del año de recolección o manufacturación de la muestra, por lo cual no es posible determinar la antigüedad de esta pieza. No es posible descartar que se trate de una pieza antigua elaborada en un periodo de tiempo en el cual se encontrarían individuos de *B. papyrifera* con la variante G en Fiji.

No se logró tipificar los extractos obtenidos mediante el marcador de sexo. Esta pieza se caracterizó con cuatro de los 10 marcadores de SSR, observándose alelos anteriormente detectados en material contemporáneo y de herbario, a excepción de un alelo encontrado con el marcador Bropap 2801 (alelo 165) que no se había observado anteriormente. Los genotipos encontrados en los marcadores Bro 08 (213/213) y Bro 13 (241/241) han sido detectados anteriormente en muestras contemporáneas de Vietnam y muestras de herbario de las islas Salomón, respectivamente, mientras que el genotipo encontrado con el marcador Bropap 2214 (258/258) no se había



Figura 36: Pieza completa de tapa de la que proviene la muestra BQUCHTE008. La etiqueta de la pieza indica que fue donada en 1928 al museo.

observado anteriormente, aunque este alelo se encuentra en muestras contemporáneas de China, Japón y Vietnam y en muestras de herbario de las islas Salomón y Nueva Zelanda. Dado que en estos tres marcadores se observó sólo un alelo, es posible que el segundo alelo no amplificó exitosamente debido a la presencia de inhibidores de la PCR y que los genotipos informados en este trabajo sean parciales y no sean homocigotos reales. El cuarto marcador analizado, Bropap 2801 fue genotipificado como 165/168, siendo el alelo 168 un alelo común tanto en muestras contemporáneas y de herbario provenientes de Asia y de Polinesia.

Estos resultados sugieren características similares a plantas de origen asiático de los individuos utilizados para elaborar esta pieza, o también que en el pasado existía una mayor diversidad genética en Fiji de la que se observa actualmente.



Figura 37: Pieza BQUCHTE009.

La etiqueta de esta pieza indica: 'Bishop Museum cat #2492'.

La pieza BQUCHTE009 es un fragmento de 3 cm x 1 cm proveniente de la colección del Bishop Museum (**Figura 37**) y no se tiene la certeza de su procedencia, aunque se plantea que proviene del archipiélago de Hawái. Es un fragmento de 16,5 mg, a partir del cual se realizó una extracción en duplicado. Se amplificó la región ITS-1 mediante ambas polimerasas, identificándose el amplicón obtenido con KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase como secuencia proveniente de *B. papyrifera*, mientras que el amplicón obtenido mediante GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase como *Fagus sylvatica* (haya europea), especie de la cual no se ha reportado que se utilice como fuente de fibra. El análisis del sitio polimórfico relativo 203 indicó una doble señal puntual en dicha posición, con una prevalencia de la variante asiática por sobre la polinésica, indicando una

heterocigosis en esta posición o que esta pieza fue elaborada con al menos dos individuos genéticamente diferentes. Como se mencionó anteriormente, en muestras de herbario provenientes de Hawái se observó una heterocigosis en esta posición, es posible que esta pieza provenga de Hawái. Aún después de purificar los extractos obtenidos, no sé logró caracterizar los extractos mediante el marcador de sexo ni los marcadores de SSR.



Figura 38: Pieza BQUCHTE010.

La etiqueta de esta pieza indica: 'Hawái (¿?), sin dato'.

La pieza BQUCTE010 es un fragmento de 3 cm x 1 cm de *tapa* muy delgada, proveniente supuestamente de Hawái (**Figura 38**). A partir de este fragmento se realizaron dos extracciones. Se amplificó la región ITS-1 mediante ambas enzimas, identificándose el amplicón obtenido con KAPA HiFi polymerase como secuencia proveniente de *B. papyrifera*, mientras que el amplicón obtenido mediante GoTaq polymerase se identificó como *Fagus sylvatica* (haya), especie de origen europeo la cual no se ha reportado como fuente de fibra o pigmento. El análisis del sitio polimórfico relativo 203 indicó claramente de la variante polinésica. Aún después de purificar los extractos obtenidos, no se logró caracterizar los extractos mediante el marcador de sexo, aunque sí se tipificó con

dos marcadores de microsatélites. El marcador Bro 08 indicó la presencia de tres alelos en el extracto (221/227/235), lo cual lleva a suponer que esta muestra fue elaborada con al menos dos individuos genéticamente diferentes. Los tres alelos se han detectado anteriormente en material contemporáneo y de herbario. El genotipo 221/227 ha sido observado en material contemporáneo proveniente de Raiatea y en material de herbario de Tubuai, mientras que el alelo 235 se encuentra en plantas contemporáneas de Taiwán y China y en material de herbario de Santiago. Por otra parte, el marcador Bro 13 indicó la presencia de los alelos 239/240, observados como genotipo en muestras contemporáneas provenientes de Vietnam. El componente asiático encontrado con estos dos microsatélites sugiere que posiblemente esta pieza fue manufacturada con individuos de *B. papyrifera* que reintroducidos desde Asia a Hawái en tiempos históricos (Gonzalez-Lorca *et al.*, 2016; Peñailillo *et al.*, 2016).

La pieza BQUCTE011 (**Figura 39**) es un fragmento principal de *tapa* de aproximadamente 3 cm x 7 cm que no presente decoración. A partir de esta pieza se realizaron 3 extracciones de ADN. Se amplificó exitosamente la región ITS-1 mediante ambas polimerasas, obteniendo en ambos casos amplicones que fueron identificados como secuencias provenientes de *Impatiens amphta*, especie nativa de los Himalaya. Esta especie no ha sido reportada como fuente de fibra ni de pigmentos colorantes, por lo que es muy probable que corresponda a una contaminación proveniente del lugar en el cual se mantuvo guardada antes de ser sometida al análisis genético. No se logró caracterizar los extractos obtenidos con el marcador de sexo ni con los marcadores de SSR, aún luego de purificar dichos extractos. El resultado obtenido a partir del análisis de esta pieza subraya la importancia de tomar precauciones para evitar la contaminación de estas piezas con ADN vegetal moderno.



Figura 39: Pieza BQUCHTE011.

La etiqueta de esta pieza indica: 'Bishop Museum? Emory collection?'



Figura 40: Pieza BQUCHTE012. La etiqueta de esta pieza indica: ‘Tapa 1880-1900 American Samoa Coll. Tricia Allen’

Esta pieza es la segunda más antigua de la colección disponible en esta tesis (**Figura 40**). La pieza BQUCHTE012 es un fragmento de *tapa* proveniente de una colección privada de la isla de Samoa, a partir de la cual se realizó una extracción en triplicado. El análisis de la región ITS-1 identificó un amplicón obtenido mediante KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase como una secuencia de *B. papyrifera*, que presentó una doble señal en el sitio polimórfico relativo 203, prevaleciendo la variante polinésica por sobre la variante asiática. Este resultado sugiere la presencia de al menos dos individuos genéticamente diferentes en la elaboración de esta pieza o de una heterocigosis para este sitio.

No se logró caracterizar los extractos obtenidos mediante el marcador de sexo, incluso luego de su purificación. Sin embargo, esta pieza se caracterizó con cuatro de los 10 marcadores de SRR. El marcador Bro 13 indicó la presencia de tres alelos, de los cuales dos se detectaron anteriormente en material contemporáneo y de herbarios de *B. papyrifera*, lo que además apoya la hipótesis de la presencia de dos individuos genéticamente diferentes en la elaboración esta *tapa*. Los alelos 239 y 245 encontrados se han observado anteriormente en muestras contemporáneas masculinas de Hawái y Vietnam, mientras que el alelo 249 también detectó en la pieza BQUCHTE004 analizada en esta tesis. El marcador Bro 15 indicó la presencia de los alelos 163 (no detectado anteriormente) y 241 (detectado en muestras modernas de Tonga, Rapa, Tahíti y Marquesas, y en muestras de herbario de Niue, Rapa y Marquesas). Los alelos observados en el marcador Bropap 2801 (124) y Bropap 26985 (276) no se habían detectado anteriormente, y se encuentran fuera del rango de alelos observados de estos marcadores. El análisis de estos cuatro SSR en conjunto con el análisis de ITS-1 indica la presencia de un componente asiático y polinésico en los extractos de ADN de esta pieza, pero no fue posible realizar un análisis más acabado con esta información.

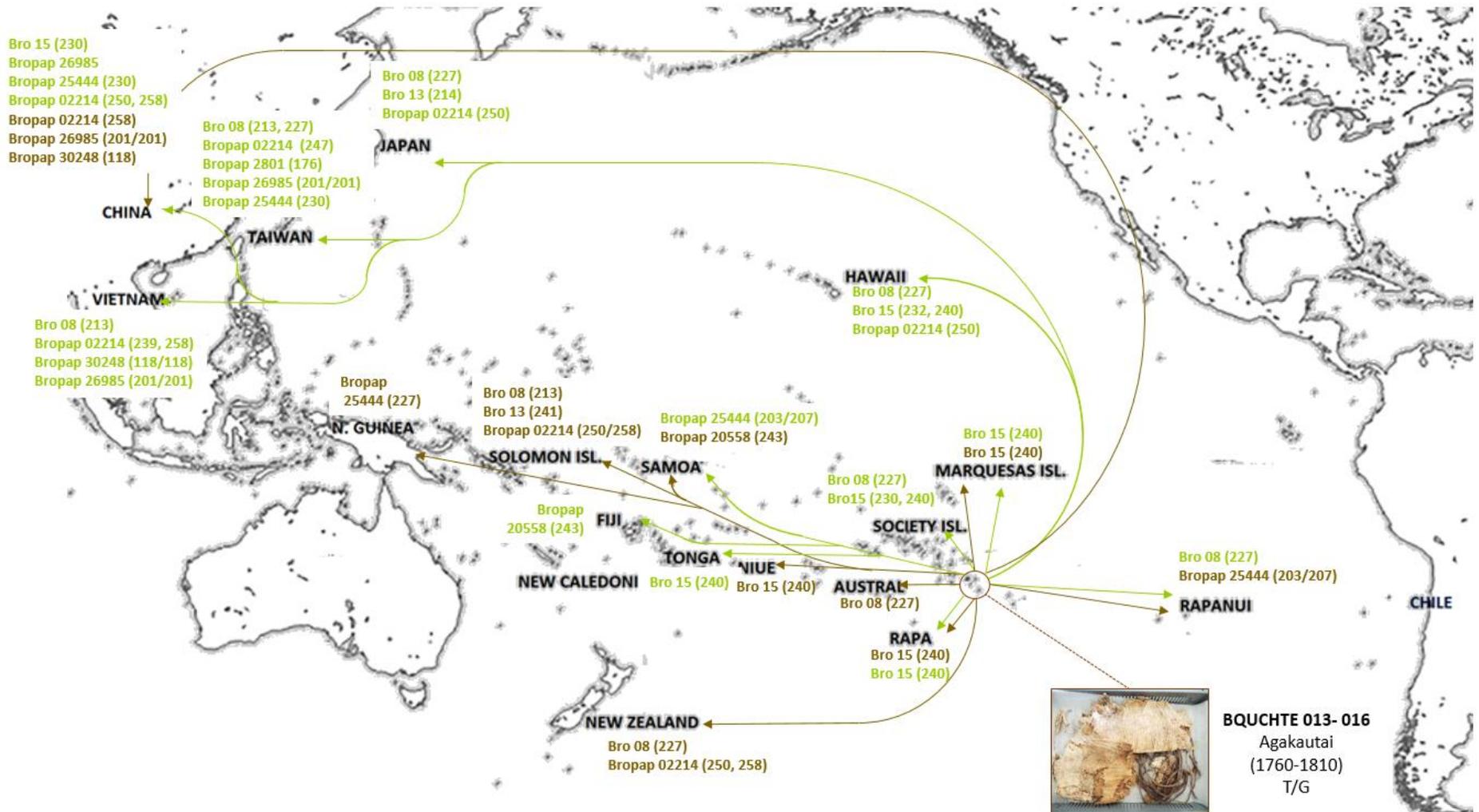
Las piezas BQUCHTE013, BQUCHTE014, BQUCHTE015, BQUCHTE016 y BQUCHTE017 son parte de diferentes zonas de una gran pieza de *tapa* (**Figura 41**) encontrada en un contexto arqueológico en una caverna de la isla rocosa Agakaitai, perteneciente al Archipiélago Gambier, Polinesia Francesa. Esta pieza fue datada mediante rC^{14} , indicando que fue elaborada entre 1760 y 1810, es decir, en un periodo anterior al contacto europeo con el Pacífico (Seelenfreund *et al.*, 2016) La pieza BQUCHTE 017 corresponde a una muestra de la corteza que envolvía esta gran *tapa*.



Figura 41: Tapa funeraria encontrada en el año 2010 en una cueva de la isla Agakauitai, archipiélago de Gambier.

Parte de los análisis realizados en esta tesis de estas piezas se encuentran publicados (Seelenfreund *et al.*, 2016). En rigor, las muestras BQUCHTE013, BQUCHTE014, BQUCHTE015 y BQUCHTE016 corresponden a replicados de la misma pieza, pero durante los análisis realizados se trataron como piezas totalmente independientes. A continuación, se presentarán los resultados encontrados por marcador encontrados en estas cuatro piezas. A modo de resumen, en la **Figura 42** se muestra un mapa integrativo donde se muestra la relación de los alelos encontrados en esta pieza con los alelos encontrados en muestras contemporáneas y de herbario de *B. papyrifera*.

La pieza BQUCHTE013 se extrajo en triplicado y se amplificó exitosamente la región ITS-1 mediante ambas polimerasas. Uno de los amplicones obtenidos utilizando el sistema KAPA, fue identificado como secuencia proveniente de *B. papyrifera*, mientras que los demás amplicones se identificaron como secuencias provenientes de *Lagenaria siceraria* (zapallo), *Leontodon tingitanus* y *Aspergillus fumigatus* (hongo), especies que en ningún caso son fuente de fibra. No fue posible tipificar el sitio polimórfico relativo 203. El marcador de sexo no amplificó, aún luego de purificar los extractos, mientras que se caracterizaron siete de los 10 marcadores de SSR. El marcador Bro 08 indicó la presencia de un alelo no detectado anteriormente en muestras contemporáneas ni de herbario (alelo 201), pero que sin embargo encontró en muestras de herbario provenientes de las islas Salomón analizadas en esta tesis. El marcador Bro 13 indicó la presencia de cinco alelos diferentes (sugiriendo la presencia de al menos tres individuos genéticamente diferentes durante la elaboración de esta pieza), los cuales no se han observado anteriormente en material contemporáneo, ni de herbario. El marcador Bro 15 indicó la presencia del alelo 240, detectado anteriormente en muestras contemporáneas de Tonga, Rapa, Tahití, Marquesas e individuos femeninos de Hawái, y en material de herbario proveniente de Niue, Rapa y



— Alelos encontrados en material contemporáneo de *B. papyrifera* y en las muestras BQUCHTE 013-016.

— Alelos encontrados en material de herbario de *B. papyrifera* y en las muestras BQUCHTE 013-016.

Figura 42: Mapa integrativo de los alelos encontrados en la *tapa* arqueológica. Las fechas indican las localidades en las que anteriormente se encontraron los alelos detectados en la *tapa* arqueológica, tanto con material contemporáneo como de herbario de *B. papyrifera*.

Marquesas. El marcador Bropap 2214 indicó la presencia del alelo 247, detectado anteriormente como homocigoto en muestras contemporáneas de Taiwán. El marcador Bropap 2801 indicó la presencia del alelo 176, presente también en material moderno de Taiwán, y el alelo 222 no observado anteriormente. Con el marcador Bropap 20558 se observaron cuatro alelos no encontrados anteriormente, de los cuales uno, el alelo 230, se detectó en la pieza BQUCHTE004 y en una muestra de herbario analizada en esta tesis proveniente de las islas Salomón. Con el marcador Bropap 25444 se observó el genotipo 203/207 encontrado en herbarios provenientes de Rapa Nui y en muestras modernas de Samoa. Además, se observaron tres alelos adicionales, no detectados anteriormente.

La pieza BQUCHTE014 se extrajo en triplicado y se amplificó exitosamente la región ITS-1 mediante ambas enzimas. Uno de los amplicones obtenidos utilizando la polimerasa KAPA HiFI Hotstart, fue identificado como secuencia proveniente de *B. papyrifera*, observándose ambas variantes debido a una doble señal en la secuencia (y predominando la variante polinesica por sobre la asiática). El otro amplicón obtenido se identificó como secuencia proveniente de *Citrus maxima*. El marcador de sexo no amplificó aún luego de purificar los extractos, mientras que al igual que la pieza anterior, se caracterizaron siete de los 10 marcadores de SSR. El marcador Bro 08 indicó la presencia de alelo 227, detectado anteriormente como genotipo de plantas contemporáneas de Japón y muestras de herbario de Nueva Zelanda y Santiago, además de muestras contemporáneas provenientes de Raiatea, Rapa Nui, individuos femeninos de Hawái. El marcador Bro13 detectó la presencia de cuatro alelos, de los cuales tres son iguales a alelos detectados únicamente en la pieza BQUCHTE013. El marcador Bro15 presentó los alelos 240 (detectado en la pieza BQUCHTE013) y 251 (no detectado anteriormente). Los marcadores Bropap 2214, Bropap 2801 y Bropap 20558 presentaron de cuatro alelos no observados anteriormente en cada marcador (dos de los cuatro alelos en Bropap 2801 se detectaron en BQUCHTE013). Con el marcador Bropap 25444 se observaron los alelos 167/198/203/207/227, de los cuales tres también se detectaron en la muestra BQUCHTE013.

La pieza BQUCHTE015 se extrajo en triplicado y también se amplificó exitosamente la región ITS-1 mediante ambas enzimas. Uno de los amplicones obtenidos utilizando la polimerasa GoTaq G2, se identificó como secuencia proveniente de *B. papyrifera*, observándose claramente la variante asiática. Las otras secuencias analizadas indicaron la presencia de ADN de *Solanum lycopersicum* (tomate), *C. sempervirens* (Ciprés) y *F. sylvatica*. El marcador de sexo no amplificó, aún luego de purificar los extractos. Sin embargo, se analizaron exitosamente nueve de los 10 marcadores de SSR.

Los genotipos encontrados con los marcadores Bro 08 (213/213) y Bro 13 (241/241) se habían observado anteriormente en plantas contemporáneas de Vietnam y muestras de herbario de las islas

Salomón, mientras que con el marcador Bro 15 se encontraron siete alelos putativos no observados anteriormente en muestras contemporáneas ni de herbario; sin embargo, se detectó también el alelo 240 encontrado en las muestras BQUCHTE013 y BQUCHTE014 y en plantas contemporáneas de Tonga, Rapa, Tahití, Marquesas e individuos femeninos de Hawái, y en material de herbario proveniente de Niue, Rapa y Marquesas. El marcador Bropap 2214 indicó la presencia de cinco alelos diferentes, de los cuales tres se habían observado anteriormente en muestras contemporáneas y de herbario (alelo 250 visto en muestras contemporáneas masculinas de Hawái, Japón y China, alelo 258 detectados en muestras contemporáneas de China, Taiwán y Vietnam, y alelo 239 en Vietnam). Con el marcador Bropap 2801 se observaron cinco alelos no detectados anteriormente, de los cuales dos (176 y 222) se observaron también en BQUCHTE013 y BQUCHTE014. En el marcador Bropap 20558 se observaron siete alelos diferentes, de los cuales sólo uno se había detectado en material contemporáneo de Fiji y en material de herbario de Samoa. El marcador Bropap 25444 presentó cuatro alelos diferentes, de los cuales sólo se había detectado uno en plantas contemporáneas de China y Taiwán. Bropap 26985 indicó la presencia del alelo 201, detectado anteriormente como genotipo contemporáneo de China, Taiwán y Vietnam. Finalmente, se observó el alelo 118 con el marcador Bropap 30248, encontrado como homocigoto en muestras contemporáneas de Vietnam.

La pieza BQUCHTE016 también se extrajo en triplicado y se amplificó exitosamente la región ITS-1 mediante ambas polimerasas. Uno de los amplicones obtenidos con la enzima GoTaq G2, fue identificado como secuencia proveniente de *B. papyrifera*, observándose claramente la variante polinésica. Por otra parte, otro amplicón obtenido utilizando la polimerasas KAPA también se identificó como secuencia de *B. papyrifera*, pero presentó una doble señal en el sitio polimórfico relativo 203, con una prevalencia de la variante polinésica. Las otras secuencias analizadas indicaron la presencia de ADN de *S. lycopersicum* (tomate), *Triticum sp* y *A. fumigatus*. El marcador de sexo no amplificó, aún luego de purificar los extractos, pero se analizaron seis SSR exitosamente.

El marcador Bro 08 indicó la presencia de los alelos 213 y 227 observados anteriormente en las muestras BQUCHTE015 y BQUCHTE014, respectivamente. El marcador BR013 indicó la presencia de seis alelos no detectados anteriormente, de los cuales sólo dos también se observaron en la muestra BQUCHTE014. Bro 15 indicó la presencia de cinco alelos, de los cuales tres ya se habían detectado anteriormente; uno de ellos es 240, encontrado también en las muestras BQUCHTE013 y BQUCHTE014, mientras que el alelo 230 se ha observado en plantas contemporáneas de China y Japón, y el alelo 232 en individuos contemporáneos masculinos de Hawái. Con el marcador Bropap 2214 se observaron dos alelos no detectados anteriormente, mientras que con Bropap 2801 se observaron tres

alelos nos detectados anteriormente, de los cuales dos (176 y 222) se observaron también en las muestras BQUCHTE013, BQUCHTE014 y BQUCHTE015. Finalmente, en el marcador Bropap 20558, se observaron cuatro alelos, de los cuales sólo el alelo 240 ha sido detectado en la mayor parte de las muestras asiáticas y polinésicas analizadas anteriormente con este marcador.

En resumen, el análisis de estas cuatro piezas antiguas permite afirmar que existe un alto componente asiático en la *tapa* funeraria, confirmado tanto mediante el análisis de la región ITS-1 como de 10 SSR, lo que además sugiere que en pasado existió una mayor diversidad genética en esta zona del Pacífico. Las otras especies identificadas mediante el marcador ITS-1, no se han reportado como fuente de fibra ni colorante y seguramente es ADN contaminante que estaba presente en las piezas antes de la extracción y análisis genético.

La pieza BQUCHTE017, correspondiente a la corteza encontrada junto a la *tapa* funeraria, sólo se caracterizó mediante ITS-1, identificándose la secuencia como *A. fumigatus*, especie de hongo presente comúnmente en el ambiente.

6 Discusión.

En esta tesis se planteó el objetivo de extraer ADN a partir de textiles etnográficos antiguos provenientes de las islas del Pacífico, elaborados a partir de corteza vegetal, para posteriormente realizar una caracterización genética que involucró dos etapas: en primer lugar, la amplificación de la región ITS-1 (utilizado como marcador *DNA barcoding*) para identificar la especie fuente de las fibras con las cuales se elaboraron estas piezas textiles y en segundo lugar, la caracterización genética de las fibras identificadas como *B. papyrifera* mediante la amplificación de un marcador de sexo y 10 marcadores SSR.

Para la realización de esta tesis, se contó con 17 muestras de textiles etnográficos antiguos de diferentes islas del Pacífico. Dado que estas piezas son únicas, para la estandarización del método de extracción de ADN y de caracterización genética se utilizaron como muestras de prueba seis muestras del mismo tipo de textil etnográfico contemporáneo elaboradas a partir de fibras de *B. papyrifera*. Además, se agregaron 51 muestras de 49 herbarios de *B. papyrifera* con el fin de aumentar la información de material de herbario con el cual contrastar los datos obtenidos.

De manera general, se extrajo exitosamente ADN a partir de casi todas las muestras antiguas utilizando un método manual modificado de Lodhi *et al.* 1994. El análisis genético de las piezas se realizó utilizando los marcadores ITS-1, 10 SSR y un marcador de sexo, lo cual hasta donde sabemos, representa el primer trabajo realizado con muestras de esta naturaleza.

Se comenzará esta discusión comentando los resultados obtenidos en material de herbario, debido a que es un material de trabajo del cual ya se tenía experiencia en el laboratorio. Por otra parte, la adición de herbarios en esta tesis se realizó sólo con el fin de tener más información con la que comparar los resultados de *tapa* etnográfica antigua.

6.1 Extracción y caracterización de ADN obtenido de muestras de herbario de *B. papyrifera*.

Los extractos de ADN obtenidos a partir de material de herbario mediante el protocolo de extracción estandarizado en material de prueba de *tapa*, en general presentaron una mayor concentración de ADN que la informada por Payacán (2015), lo que confirma que un mayor tiempo de incubación de las muestras con el tampón de extracción aumenta el rendimiento de extracción. Esto se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% utilizados para analizar la integridad del ADN obtenido.

La caracterización mediante los marcadores moleculares ITS-1, sexo y 10 microsatélites fue exitosa para la mayoría de las muestras ensayadas. La región ITS-1 se ensayó en 23 muestras de herbarios seleccionadas, siendo exitosa la amplificación de este marcador en 21 muestras. Por otra parte, la tipificación del sitio polimórfico relativo 203 fue exitosa en 19 de las 21 muestras amplificadas. Las muestras provenientes de Hawái presentaron una heterocigosis en este sitio, al igual que la única muestra de Nueva Guinea analizada en esta tesis. Anteriormente no se habían caracterizado muestras de herbario provenientes de Hawái, sin embargo, se informó el hallazgo de la variante G en la única muestra de Nueva Guinea analizada (Payacán, 2015). Su ubicación geográfica (en Oceanía Cercana) puede explicar la presencia de ambas variantes en dicha muestra.

Se ha informado la reintroducción reciente de *B. papyrifera* desde Asia a Hawái (Gonzalez-Lorca *et al.*, 2015; Peñailillo *et al.*, 2016), lo que en parte puede explicar la presencia de ambas variantes en estas muestras. Sin embargo, Olivares (2016) ha informado que las poblaciones de plantas de *B. papyrifera* femeninas (primera introducción desde Polinesia) y las poblaciones masculinas (re-introducciones recientes desde Asia), son poblaciones que se diferencian completamente mediante SSR, según el análisis bayesiano de estructuras de poblaciones. En este trabajo, se observó que la población masculina de Hawái comparte en un 100% los genotipos asiáticos, mientras que la población femenina comparte en un 100% los genotipos polinésicos.

El análisis con el marcador de sexo *Male Marker* tipificó a las muestras de Hawái seleccionadas como femeninas. La selección de las muestras de herbario de Hawái se realizó dando prioridad a las muestras provenientes de localidades de las cuales no se poseen muestras contemporáneas hawaianas, es decir, de las islas más alejadas de la isla principal del archipiélago de Hawái. El hallazgo de individuos femeninos en estas localidades sugiere que en estas islas las poblaciones de *B. papyrifera* corresponden a poblaciones antiguas introducidas en tiempos remotos. Con fines comparativos, es necesario estudiar muestras de herbario provenientes de las islas principales de Hawái para evaluar la presencia de individuos masculinos que introducidos desde Asia.

Las muestras de Fiji, Nueva Guinea y una de las muestras de las Islas Salomón se tipificaron como femeninas. Una de las muestras de las Islas Salomón no se logró tipificar, incluso al ensayar el protocolo rediseñado del marcador de sexo que permite la obtención de fragmentos más cortos. Estos resultados apoyan lo sugerido por Peñailillo *et al.* (2016), acerca de una selección de plantas femeninas de *B. papyrifera* introducidas en Oceania Remota.

El análisis de SSR en las 23 muestras seleccionadas de herbario en general indicó la presencia de alelos observados con anterioridad, tanto en muestras de herbario como material contemporáneo. Por otra

parte, la muestra de Nueva Guinea analizada indicó la presencia de los genotipos comunes para Polinesia en la mayor parte de marcadores SSR estudiados. Esta es información de interés, pues corresponde a Oceanía Cercana. En la **Tabla 9** se resumen los alelos nuevos encontrados, principalmente en las Islas Salomón. Estos alelos probablemente reflejan una diversidad genética proveniente de Asia, pues las muestras de herbario de estas islas corresponden a introducciones relativamente recientes (Chang *et al.*, 2015).

6.2 Extracción de ADN a partir de piezas de textil etnográfico antiguo.

La extracción se realizó en el laboratorio de ADN de la Dra. Elizabeth Matisoo-Smith, siguiendo los criterios de trabajo con ADN publicados por diversos autores (Cooper y Poinar, 2005; Gilbert *et al.*, 2000) entre los que se destacan la inclusión de controles de extracción y controles negativos de amplificación y la utilización de reactivos dedicados exclusivamente al trabajo con ADN.

La extracción de ADN del material antiguo de *tapa* etnográfica y de herbario se realizó en base a la estandarización del protocolo de extracción de ADN de muestras de prueba de *tapa* contemporánea. Esta optimización (respecto al protocolo publicado por Moncada *et al.*, 2013) involucró un aumento del tiempo de incubación con el tampón de extracción, un aumento del volumen del tampón utilizado para la extracción, incorporación de agitación durante la incubación con el tampón de extracción y una estandarización respecto a la cantidad de *tapa* utilizada para realizar la extracción.

Cabe destacar que en todo este proceso de optimización del protocolo de extracción y amplificación de ADN a partir de muestras contemporáneas de *tapa*, hubo problemas importantes de contaminación en los controles de extracción y amplificación. Aunque esta estandarización se realizó incluyendo algunas de las medidas de prevención de contaminación de los protocolos de trabajo con ADN (como la utilización de overol de trabajo, la limpieza de utensilios y superficies con cloro, extracción de ADN en un lugar diferente del cual se realizan reacciones de amplificación y la utilización de reactivos dedicados a estas muestras para la reacción de PCR) no fue posible evitar dicha contaminación, probablemente debido a que se utilizaron los mismos reactivos que para la extracción de ADN contemporáneo. Estos problemas desaparecieron al realizar la extracción de ADN en el laboratorio de ADN de la Dra. Matisoo-Smith, lo cual confirma y enfatiza la importancia de trabajar siguiendo los protocolos de trabajo con ADN.

Para evaluar la calidad del ADN obtenido, se utilizaron tres criterios:

- La cantidad de ADN extraído, cuantificando el material genético obtenido mediante un método espectrofotométrico (absorbancia a 260 nm) y un método fluorimétrico (agente intercalante PicoGreen)
- La pureza del ADN obtenido, mediante la razón 260 nm/280 nm
- La integridad del ADN extraído, mediante el análisis electroforético en geles de agarosa al 0,8%.

La cuantificación del ADN obtenido de las piezas de textiles antiguos mediante el sistema comercial Quanti-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit dio como resultado concentraciones negativas de ADN. Este método de cuantificación se basa en la intercalación de los anillos aromáticos principales del reactivo PicoGreen entre las bases nitrogenadas de las hebras de ADN (Dragan *et al.*, 2010). Esta interacción incrementa la fluorescencia del reactivo PicoGreen más de 1000 veces (Singer *et al.*, 1997). Por tanto, este método permite la cuantificación del material genético de doble hebra presente en el extracto, con un límite de detección inferior de 0,05 ng/uL (Dragan *et al.*, 2010). Es probable que la cantidad de ADN de doble hebra presente en los extractos de ADN de las piezas de *tapa* etnográfica antigua se encontraba bajo el nivel de detección del método.

La cuantificación mediante espectrofotometría se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm dio resultados positivos de concentración de ADN para estas muestras, con concentraciones entre 4,5 ng/uL – 1167 ng/μL. Esta metodología se basa en la absorbancia que presentan las bases nitrogenadas del ADN a 260 nm. El problema que presenta esta técnica es que mide la absorbancia de toda molécula presente en el extracto que absorba a 260 nm, entre las que se pueden encontrar nucleótidos y bases nitrogenadas libres, metabolitos secundarios vegetales, aminoácidos, pigmentos que contengan anillos aromáticos, etc. Por este motivo las concentraciones obtenidas mediante este método pueden estar sobreestimadas hasta en tres órdenes de magnitud, debido a la presencia de interferentes coloreados extraídos junto con el material genético (Payacán, 2015). Esto se comprueba al observar que los extractos coloreados obtenidos de las muestras de *tapa* etnográfica antigua cuantificados por absorbancia presentan una mayor concentración aparente de ADN.

La pureza del ADN obtenido se evaluó mediante la razón 260nm/280nm. Las razones entre 1,8-2,0 se consideran óptimas, mientras que aquellas que están bajo 1,8 indican la co-extracción de proteínas metabolitos secundarios y pigmentos. Una razón de absorbancia mayor a 2,0 generalmente se atribuye a preparaciones con presencia de ARN. De los 42 extractos evaluados, sólo el 19% de los extractos presentó una razón 260 nm/280 nm dentro de los parámetros esperados; el 10% presentó una razón sobre 2,0, mientras que el 71% restante de los extractos presentó una razón bajo 1,8. La baja exactitud de la técnica, como se indicó anteriormente, puede explicar los resultados obtenidos. Dada la antigüedad de

estos textiles, la probabilidad de co-extracción de ARN es casi nula, lo que invalida los resultados de los extractos que presentaron una razón sobre 2,0. Dado que estos textiles son elaborados a partir de corteza, es probable que durante la extracción de ADN se haya co-extraído azúcares y proteínas, lo que explica el gran porcentaje de muestras con una razón bajo 1,8. La evaluación de la pureza mediante la razón 260 nm/280 nm se sugiere sólo como herramienta complementaria al estudio de la calidad de los extractos de material genético obtenido. Por otra parte, estos resultados no son sorprendentes, considerando el origen y el procesamiento al cual se sometieron estas piezas durante su elaboración.

La integridad del ADN obtenido se evaluó mediante electroforesis en geles de 0,8% de agarosa. Mediante esta técnica, es posible evaluar el grado de degradación de material genético extraído. El ADN genómico obtenido a partir de fuentes que permiten la extracción de ADN íntegro y de buena calidad, presenta perfiles electroforéticos que indican la obtención de ADN de alto peso molecular. Los perfiles electroforéticos obtenidos de los extractos de *tapa* antigua indicaron la presencia ADN altamente fragmentado y degradado, en concordancia con lo esperado, dado la fuente de obtención del mismo. Esta evaluación es importante, porque además indica la presencia de ADN en el extracto y que éste corresponde a ADN_a.

Para el trabajo con ADN_a, el criterio de calidad más importante corresponde a la prueba de funcionalidad del mismo, la cual consiste en corroborar la amplificabilidad de la muestra con los diferentes marcadores moleculares utilizados para su caracterización genética. La concentración de ADN, la pureza, y la integridad del ADN de los extractos no son factores determinantes, pues es crucial la elección de los marcadores moleculares, que generen amplicones de tamaños menores a 370 pb. Sin embargo, las mediciones habituales de concentración y pureza son importantes para guiar las pruebas de amplificabilidad, ya que permiten prever los problemas que pueden ocurrir en la amplificación mediante PCR.

6.3 Caracterización genética de las muestras de ADN obtenidas a partir de *tapa* antigua etnográfica.

Las herramientas utilizadas para caracterizar el ADN obtenido a partir de muestras antiguas deben tener en cuenta que el ADN_a generalmente presenta una alta degradación y daño en sus secuencias, por lo que no es adecuado para la caracterización mediante técnicas que utilicen enzimas de restricción como el AFLP o regiones del genoma de más de 400 pb. Los marcadores moleculares de menos de 400 pb han sido ampliamente utilizados para caracterizar ADN_a, entre los que destacan SSR, secuencias cortas de ADN_r como la región ITS-1 (Szabó *et al.*, 2005) y zonas polimórficas de ADN_{mt} y ADN_{cp} de fuentes animales y vegetales, respectivamente (Marota *et al.*, 2002; Matisoo-Smith y Robins, 2004).

En esta tesis se utilizaron tres tipos de marcadores moleculares que nos permitieron obtener información a tres niveles diferentes. En primer lugar, se utilizó el marcador ITS-1 como marcador tipo *DNA barcoding*, es decir como una secuencia de ADN que permite identificar la especie fuente del ADN extraído a partir de *tapa* etnográfica antigua. Luego se utilizó un marcador de sexo para determinar si los ADN identificados como *B. papyrifera* provenían de individuos femeninos o masculinos. Finalmente, se utilizaron 10 marcadores de SSR para evaluar la diversidad de los ADN identificados como *B. papyrifera*. Los SSR, al evaluar la presencia de diferentes alelos en especies diploides, permiten determinar la presencia de más de un individuo en la contribución de material genético. Todos estos marcadores son secuencias cortas de entre 100 pb- 370 pb, por lo que son apropiados para caracterizar ADN.

No se observó una correlación entre concentración de ADN (medida por absorbancia), pureza y perfil electroforético con la amplificabilidad de las muestras. Tampoco se observó una relación directa entre la antigüedad de la muestra y su amplificabilidad. Por ejemplo, las muestras BQUCHTE013, BQUCHTE014, BQUCHTE015 y BQUCHTE016, provenientes de un contexto arqueológico datadas mediante rC^{14} en 250 años de antigüedad (Seelenfreund *et al.*, 2016) tuvieron un mejor índice de amplificación que muestras de menor antigüedad presente en la colección. Tomando en cuenta el proceso de elaboración de *tapa* y que en cada isla éste presenta ciertas particularidades, es muy probable que la amplificabilidad de los marcadores utilizados para caracterizar genéticamente *tapa* etnográfica antigua dependa del tipo de proceso utilizado para su manufacturación y de la conservación de la pieza en el tiempo.

Para las reacciones de amplificación de estos marcadores se incluyó la utilización de BSA, ampliamente utilizado en reacciones de PCR para mejorar el rendimiento de la reacción. Se ha postulado que esta proteína capturaría interferentes de la ADN Polimerasa Taq.

6.3.1 Evaluación de la amplificabilidad de la región ITS-1.

Se estudió esta región utilizando dos sistemas comerciales para su amplificación: KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase y GoTaq G2® Flexi DNA Polymerase. La primera polimerasa se utilizó en el laboratorio de ADN de la Universidad de Otago, mientras que la segunda se utilizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Chile. Ambos sistemas permitieron la amplificación de una gran parte de las muestras, mostrando diferencias principalmente en la calidad de los electroferogramas obtenidos. De manera general, la enzima GoTaq permitió la amplificación de un mayor número de muestras (71% de las muestras) que la enzima KAPA. Se amplificó exitosamente la región ITS-1 en el 70% de los casos. Solo la muestra BQUCHTE006 no se pudo amplificar (en ninguno de sus replicados).

Para la amplificación de algunas muestras fue necesario purificar el extracto de material genético obtenido mediante el sistema comercial MiniElute PCR Purification Kit, lo que permitió aumentar a un 35% el número de muestras amplificadas.

Se compararon las secuencias obtenidas mediante la amplificación de la región ITS-1 con cuatro secuencias de la región ITS-1 de *B. papyrifera* depositadas en la base de datos del NCBI GenBank (números de acceso: HM623778.1, KT207496.1, AB604292.1, AY345156.1). Este ensayo fue muy importante, dado que permitió a pesquisar contaminantes y descartar las muestras que no fueron identificadas como ADN de *B. papyrifera* de los ensayos siguientes. De los 57 amplicones obtenidos con este ensayo, el 40,3% fue identificado como ADN de *B. papyrifera*. El resto de las muestras se identificaron como ADN de diversas especies, como *Solanum lycopersicum*, *Morus yunnanensis*, *Impatiens amphtha*, *Aspergillus fumigatus* y *Glycine max*, entre otras. En la literatura se tiene registro del uso primordial de *B. papyrifera* como fuente de fibra para la elaboración de *tapa* (Daniels, 2005), u otras especies pertenecientes a la familia de las Moraceas como *Artocarpus altilis* y *Ficus sp.* (Daniels, 2005). Algunas de las especies identificadas mediante este ensayo no son especies vegetales utilizadas como fuente de fibra ni de colorantes usados en la decoración de las mismas (como el tomate, el cacao, o el girasol). Es muy probable que las piezas de *tapa* hayan estado en contacto con esas especies antes de su caracterización genética, ya que son piezas que eran utilizadas en las islas del Pacífico en ceremonias religiosas, como nacimientos o funerales, adornando paredes e incluso usadas para tapizar el camino por donde se trasladan los reyes durante un matrimonio (Berker, 2002; Mesenhöller y Lueb, 2013), por lo que nunca fueron intencionadas para un uso aséptico o de laboratorio. Por otro lado, después de haber sido adquiridas en sus lugares de origen, y antes de ingresar a las respectivas colecciones de museos, pueden haber servido de alfombras, cobertores de camas o de manteles. Aunque la contaminación puede haber ocurrido luego de la toma de muestra y durante su almacenamiento anterior a la extracción de ADN, Seelenfreund *et al.*, (2016), indican por ejemplo que la *tapa* arqueológica encontrada en el archipiélago de las islas Gambier fue extendida sobre un mesón de cocina cuando fue encontrada. Uno de los extractos de ADN de las piezas de *tapa* perteneciente a esta *tapa* arqueológica fue identificado como ADN de tomate mediante ITS-1. ¡Quién sabe si aquel día los dueños de casa tuvieron ensalada de tomate en la cena! Estas observaciones deben tomarse en cuenta al tomar una muestra que potencialmente puede ser fuente de ADN para una posterior caracterización genética.

El marcador ITS-1 se ha utilizado para caracterizar genéticamente muestras contemporáneas de *B. papyrifera* (Seelenfreund *et al.*, 2011). El trabajo reportó la presencia de un sitio polimórfico en la posición relativa 203 que separaba muestras provenientes de Taiwán y Santiago (variante G) de las

muestras de Oceanía Remota (variante T). Este marcador también se utilizó para analizar muestras de herbario de *B. papyrifera* de aproximadamente 100 años de antigüedad, que le permitió observar ambas variantes sin detectar diversidad genética intra-Polinesia (Payacán, 2014). Por otra parte, Olivares (2016) reportó la presencia de otro sitio polimórfico en la posición relativa 99 que separaba muestras contemporáneas de China y Hawai (variante T) del resto de las muestras (variante C).

Las secuencias identificadas como ADN de *B. papyrifera* se analizaron para identificar la presencia de estos polimorfismos. No se detectó el polimorfismo en la posición relativa 99 informado por Olivares, (2016) en ninguna de las secuencias analizadas. Por otra parte, el análisis del sitio polimórfico de la posición relativa 203 se realizó exitosamente en el 91% de las secuencias identificadas como *B. papyrifera*. Sólo dos muestras no se lograron tipificar debido al alto ruido de fondo de los electroferogramas. Cabe mencionar que estas dos secuencias se obtuvieron utilizando la enzima KAPA HiFi Polymerase. El 18% de las secuencias fueron tipificadas sólo mediante el análisis de la secuencia ITS-C (antisentido).

Un 40% de las secuencias presentaron una doble señal en este sitio polimórfico, en general presentando señales de intensidades diferenciales, con predominio de una variante por sobre la otra (en general, la señal de la variante T predominaba por sobre la señal de la variante G). Salvo excepciones, los replicados de las muestras eran consistentes entre sí. Como se ha mencionado anteriormente, estos resultados indican presencia de heterocigosis o que la pieza de *tapa* fue elaborada a partir de más de un individuo de *B. papyrifera*. Para responder esta pregunta, es crucial el análisis mediante marcadores SSR. La variante asiática encontrada en estas piezas podría indicar que en el pasado llegaron a estas islas individuos de *B. papyrifera* con genotipos que actualmente sólo encontramos en la zona nativa de esta especie (Seelenfreund *et al.*, 2011).

El análisis visual de los electroferogramas obtenidos sugiere la presencia de varias secuencias en el amplicón. La utilización de secuenciación masiva, particularmente de la tecnología Illumina, podría ayudar a identificar todas las secuencias ITS-1 presente en los extractos. Esta metodología se basa en el uso de pequeñas secuencias templado (100-150 pb) que son secuenciadas mediante la utilización de dNTP fluorescentes, a las cuales se les añade una secuencia corta para identificarlas (Rizzi *et al*, 2012). La ventaja de esta metodología, es que evitaría obtener secuencias con una doble señal en el sitio polimórfico relativo 203 y además permitiría cuantificar el número de secuencias que presenta la variante polinésica o asiática, logrando estimar el ‘porcentaje’ de componente asiático o polinésico en cada muestra.

6.3.2 Amplificabilidad del marcador de sexo *Male Marker*.

Durante el desarrollo de esta tesis se rediseñó el ensayo del marcador de sexo estandarizado por Peñailillo *et al.* (2016). Este ensayo contempla la amplificación de un fragmento de 420 pb presente tanto en individuos femeninos y masculinos y otro fragmento de 273 pb presente sólo en individuos masculinos. Debido a la naturaleza de los extractos de ADN obtenidos en esta tesis a partir de *tapa* etnográfica antigua y a la baja probabilidad de amplificar un fragmento de 420 pb a partir de ADN_a, se rediseñaron los partidores de este ensayo de manera de distinguir entre muestras femeninas y masculinas amplificando fragmentos más pequeños, de 300 pb y 165 pb, respectivamente.

Se estudiaron los 22 extractos identificados como ADN de *B. papyrifera* con este ensayo rediseñado del marcador de sexo, siendo posible amplificar sólo 3 extractos, que corresponden al triplicado de la muestra BQUCHTE004. Esta muestra fue tipificada como femenina.

Este marcador de sexo fue obtenido mediante AFLP por Wang *et al.* (2011), y hasta la fecha no se dispone de información acerca de su ubicación en el genoma de *B. papyrifera*. Debido a que no hay mayor información acerca de este marcador, no es posible justificar explicar el bajo porcentaje de amplificación de este marcador a la secuencia o posición de este marcador en el genoma.

6.3.3 Amplificabilidad de 10 marcadores de SSR.

Mediante el análisis de 10 marcadores de SSR en muestras de *tapa* antigua se identificaron 74 alelos no observados anteriormente en material contemporáneo ni de herbario. Estos nuevos alelos se encontraron con los marcadores Bro 08, Bro 13, Bro15, Broapa 2214, Bropap 2801, Broapa 20558, Bropap 25444 y Bropap 26985.

Los marcadores Bro 07, Bropap 26985 y Broap 30248 fueron los más difíciles de ensayar y analizar, ya que se obtuvo un número reducido de amplicones con estos marcadores y además muchos de ellos no presentaron información legible luego del análisis mediante electroforesis capilar. Para todos los ensayos de SSR de esta tesis se utilizó la enzima GoTaq G2® Flexi DNA Polymerase. En un trabajo previo realizado con muestras de herbario en nuestro laboratorio, se indica que para el ensayo de muestras difíciles de amplificar se utilizó la polimerasa GoTaq® G2 Hot Start (Payacán, 2015). Sería interesante volver a ensayar las muestras difíciles utilizando esta polimerasa.

El estudio de los alelos observados en las piezas de *tapa* antigua, permitió identificar alelos detectados anteriormente en material contemporáneo y de herbario provenientes de Asia en la pieza encontrada en

la isla de Agakauai (archipiélago de Gambier), y en las piezas elaboradas en las islas de Fiji, Samoa, Hawái y Nueva Guinea. En los trabajos realizados anteriormente por nuestro grupo en muestras contemporáneas (Peñailillo, 2014 y Olivares, 2016), y en material de herbario (Payacán, 2015) se ha observado una diversidad genética relativamente restringida, en comparación a los alelos y genotipos encontrados en la zona asiática y en los individuos masculinos de Hawái (Payacán, 2015; Olivares, 2016). Los nuevos alelos encontrados, en conjunto con el fuerte componente asiático encontrado en algunas piezas de *tapa* antigua, sugieren que en pasado hubo una mayor diversidad alélica en el Pacífico de la que se observa actualmente.

Nuestro grupo ha evaluado también la transferibilidad de los marcadores de SSR utilizados en esta tesis a otras especies de la familia de *Moraceas* (manuscrito en preparación). Los resultados de este trabajo indican que no se encontró transferibilidad de estos marcadores en muestras de *Broussonetia kazinoki*, *Artocarpus altilis* (árbol del pan) y especies de *Morus*, a excepción del marcador Bropap 02214 que presentó una baja transferibilidad con *B. kazinoki*. Además, el hallazgo de alelos que están dentro del rango de tamaño esperado, que sugiere que los fragmentos obtenidos a partir de los extractos de *tapa* antigua provienen de ADN de *B. papyrifera*.

Como se observa en la **Figura 43**, que presenta un resumen integrativo de los alelos encontrados en 2 piezas de *tapa* etnográfica antigua, no es posible asignar en forma inequívoca la región de origen de cada pieza en base a la integración de la información genética de poblaciones actuales y de muestras de herbario de *B. papyrifera*. La detección de alelos nuevos conjuntamente con alelos ya observados anteriormente abre un paisaje genético mucho más complejo de lo que esperábamos.

Como se ha mencionado anteriormente, es probable que la elaboración de *tapa* involucre la utilización de más de un individuo genéticamente diferente de *B. papyrifera*. Esto se confirmó mediante la detección de más de dos alelos con gran parte de los marcadores analizados. La detección de más de dos alelos por marcador impide asignar genotipos y por lo tanto analizar los resultados obtenidos mediante el análisis de coordenadas principales y el análisis bayesiano de estructura de poblaciones (Payacán, 2015; Peñailillo, 2014) o mediante la contrucciones de redes de genotipos (Olivares, 2016). Esto dificulta el análisis de resultados, siendo complejo realizar una correlación geográfica entre los alelos encontrados en las piezas de *tapa* antigua y los observados en material de herbario y contemporáneo. Sin embargo, fue posible determinar la presencia de componentes asiáticos y polinésicos en las muestras estudiadas.

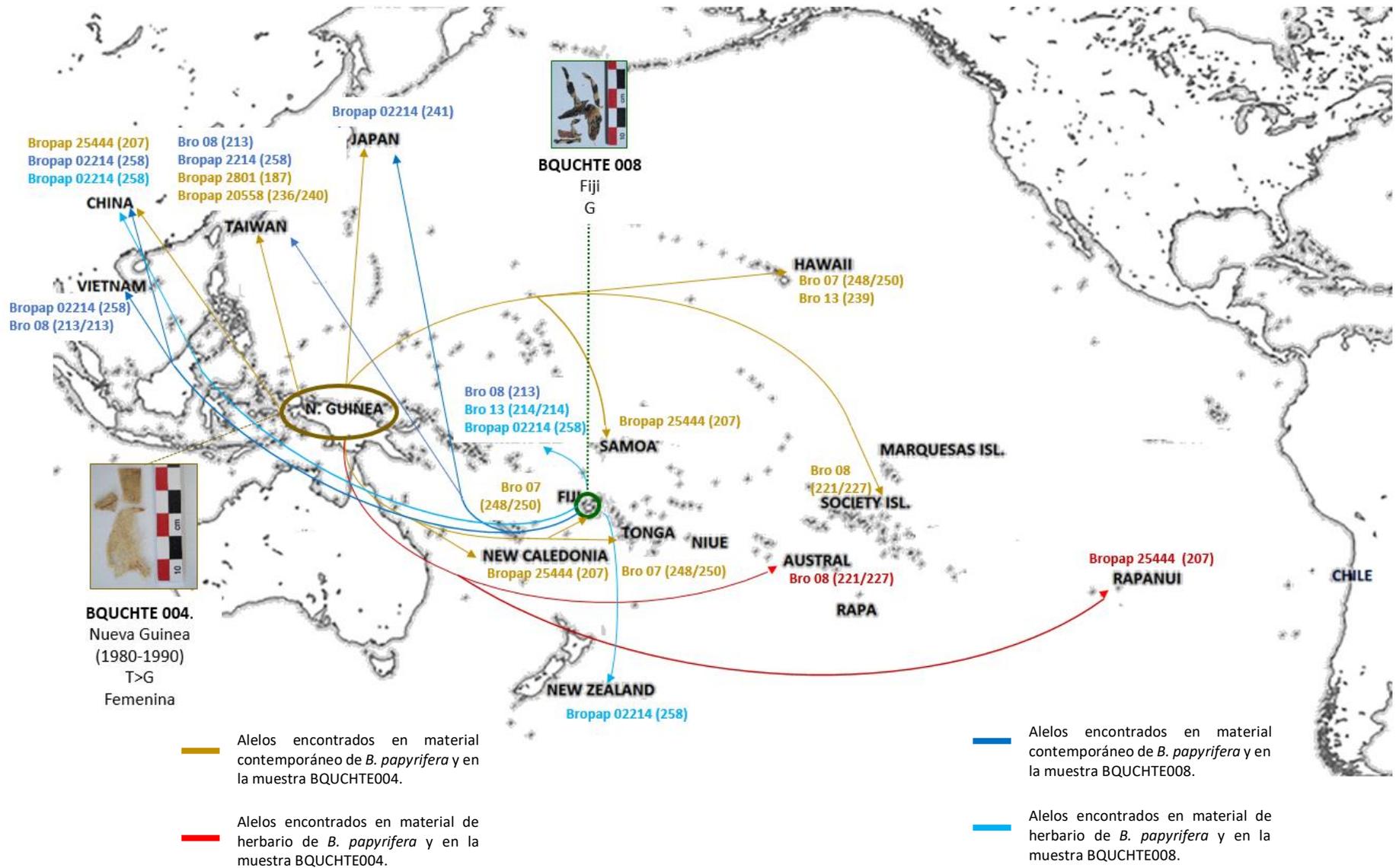


Figura 43: Mapa integrativo de los alelos encontrados en dos piezas de tapa etnográfica antigua. Las fechas indican las localidades en las que anteriormente se encontraron los alelos detectados en la tapa arqueológica, tanto con material contemporáneo como de herbario de *B. papyrifera*.

El número de muestras contemporáneas y de herbarios provenientes de Oceanía Remota, analizadas con la región ITS-1, el marcador de sexo *Male Marker* y los 10 SSR utilizados en esta tesis, es considerablemente mayor al número de muestras provenientes de la zona endémica (Asia) y Oceanía Cercana. Es necesario ampliar el número de muestras contemporáneas y de herbario de estas dos últimas zonas analizadas con estos marcadores para evaluar la presencia de los alelos que se observaron en esta tesis y que no se habían detectado anteriormente.

El análisis de *tapa* etnográfica antigua mediante este conjunto de marcadores ha permitido reconstruir el pasado genético de *B. papyrifera* en Oceanía, apreciándose una diversidad genética no reportada anteriormente en material de herbario, ni contemporáneo. Esto reafirma la importancia del cuidado y estudios de estas y cualquier tipo de pieza etnográfica que pueda ser fuente de ADN, pues son fuente de información genética que nos abre caminos hacia el pasado.

7. Conclusiones.

- ✓ La extracción de ADN a partir de *tapas* contemporáneas (muestras de prueba), permitió establecer y optimizar las condiciones de extracción de ADN a partir de esta matriz.
- ✓ La extracción de ADN de *tapa* etnográfica antigua fue exitosa para el 100% de las muestras (17 piezas de entre 250 y 30 años de antigüedad). No se observó una correlación entre la antigüedad de la pieza de *tapa* y la cantidad de ADN obtenido.
- ✓ El análisis genético del material obtenido mediante el marcador ITS-1 permitió determinar la especie vegetal fuente de fibra a partir de la cual se elaboró la pieza textil en estudio, identificándose 13 de las 17 piezas como elaboradas a partir de *B. papyrifera*.
- ✓ El análisis de la secuencia del marcador ITS-1 en la posición relativa polimórfica 203 permitió distinguir entre fibras provenientes de plantas con la variante “asiática” o “polinésica”. En la mayor parte de las muestras se determinó la presencia de ambas variantes, a excepción de una pieza proveniente de Fiji, en la que se encontró solamente la variante asiática.
- ✓ El marcador de sexo *Male Marker* rediseñado no fue útil paratipificar el ADN de las fibras de piezas de textiles antiguos. Se tipificó un textil como proveniente de una planta femenina.
- ✓ Es posible analizar genéticamente el material obtenido mediante marcadores SSR. El análisis con 10 marcadores de SSR indicó la presencia de alelos detectados anteriormente en muestras contemporáneas y de herbario de *B. papyrifera*. Sin embargo, además se encontraron 74 nuevos alelos no observados anteriormente en material de herbario ni contemporáneo de *B. papyrifera*.
- ✓ El hallazgo de alelos nuevos, sugiere que en el pasado existió una mayor diversidad genética en individuos de *B. papyrifera* en Oceanía Remota de la observada en material de herbario y contemporáneo.
- ✓ En el estudio de muestras de herbario provenientes de las mismas islas o islas cercanas de las cuales provenían las muestras de *tapa* antigua analizadas en esta tesis, se registraron mediante SSR 9 alelos y 10 genotipos nuevos, no observado anteriormente en material contemporáneo ni de herbario de *B. papyrifera*.
- ✓ Los resultados de esta tesis confirman que es posible extraer y caracterizar ADN proveniente de piezas textiles antiguas, siendo éste el primer reporte hasta la fecha, de la extracción y análisis de ADN a partir de muestras antiguas de *tapas* etnográficas.

8 Referencias.

- Abbott, A. (2003). **Anthropologists cast doubt on human DNA evidence.** *Nature*, 423 (6939), 468-468.
- Álvarez, I., & Wendel, J.F. (2003). **Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference.** *Molecular phylogenetics and evolution*, 29 (3), 417-434.
- Andersen, J.R., & Lübberstedt, T. (2003) **Functional markers in plants.** *Plant Science*, 8, 554-560.
- Barbujani, G., & Bertorelle, G. (2003). **Were Cro-Magnons too like us for DNA to tell?** *Nature*, 424 (6945), 127-127.
- Barker C. (2002) **Plate 432 *Broussonetia papyrifera*.** *Curtis's Botanical Magazine*, 19, 8-18.
- Besse, P. (2014). **Nuclear Ribosomal RNA Genes: ITS Region.** *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, 141-149.
- Bisulca, C., Schattenburg-Raymond, L., du Preez, K. (2015) **Hawaiian Barkcloth form the Bishop Museum Collections: A Characterization of Materials and Techniques in Collaboration with Modern Practitioners to Effect Preservation of a Traditional Cultural Practise.** *Materials Research Society* 1656, mrsf13-1656.
- Buter, J.M. (2009) **Fundamentals of forensic DNA typing.** Academic Press.
- Chang, C. S., Liu, H. L., Moncada, X., Seelenfreund, A., Seelenfreund, D., & Chung, K. F. (2015). **A holistic picture of Austronesian migrations revealed by phylogeography of Pacific paper mulberry.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (44), 13537-13542.
- Clarke, A.C., Burtenshaw, M.K., McLenachan, P.A., Erickson, D.L., Penny, D. (2006). **Reconstructing the origins and dispersal of the Polynesian bottle gourd (*Lagenaria siceraria*).** *Molecular Biology and Evolution*, 23 (5), 893-900.
- Cooper A., Poinar H.N. (2000). **Ancient DNA: do it right or not at all.** *Science*, 289 (5482): 1139-1139.

- Daniels, V. (2005). **The characteristics of modern and old barkcloth (*tapa*)**, *The Conservator*, 29:1, 95-104.
- Dragan, A.I., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R. J., Schenerman, M.A., Geddes, C.D. (2010). **Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding**. *Biophysical journal*, 99 (9), 3010-3019.
- Elevitch C.R. (2006). **Traditional Trees of Pacific Islands: Their Culture, Environment, and Use. Holualoa, Hawaii: Permanent Agriculture Resources**
- Ewin, R. (2009) **Staying Fijian: Vatulele island barkcloth and social identity**. *Honolulu, HI, University of Hawaii Press*
- Forster, P., Harding, R., Torroni, A., Bandelt, H.J. (1996). **Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal**. *American Journal of Human Genetics*, 59 (4), 935.
- Fuentes, A. (2015). **Análisis molecular y bioinformático de un marcador de sexo de *Broussonetia papyrifera* (L.) HERIT. EX VENT.** Memoria para optar al Título profesional de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Gilbert, M.T.P., Bandelt, H.J., Hofreire, M., Barnes, I. (2005). **Assessing ancient DNA studies**. *Ecology and Evolution*, 30, 541-544.
- Gill, P. (2002). **Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK-past, present, and future perspectives**. *Biotechniques*, 32 (2), 366-385.
- González-Lorca, J., Rivera-Hutinel, A., Moncada, X., Lobos, S., Seelenfreund, D., Seelenfreund, A. (2015). **Ancient and modern introduction of *Broussonetia papyrifera* ([L.] Vent.; Moraceae) into the Pacific: Genetic, geographical and historical evidence**. *New Zealand Journal of Botany*, 53 (2), 75-89
- Gray, R.D., Drummond, A.J., Greenhill, S.J. (2009). **Language phylogenies reveal expansion pulses and pauses in Pacific settlement**. *Science*, 323 (5913), 479-483.

- Gyulai, G., Humphreys, M., Lagler, R., Szabo, Z., Toth, Z., Bittsánszky, A., Gyulao, F., Heszky, L. (2006). **Seed remains of common millet from the 4th (Mongolia) and 15th (Hungary) centuries: AFLP, SSR and mtDNA sequence recoveries.** *Seed Science Research*, 16 (03), 179-191.
- Hall, T.A. (1999). **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Series*, 4, 95–98.
- Hartnup, K., Huynen, L., Te Kanawa, R., Shepherd, L.D., Millar, C. D., Lambert, D.M. (2011). **Ancient DNA recovers the origins of Māori feather cloaks.** *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10), 2741-2750.
- Higuci, R., Bowman, B., Freiburger, M., Rydert, O.A., Wilson A.C. (1984) **DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family.** *Science*, 312, 282-284.
- Huanca-Mamani, W., Muñoz, I., Laime D., Bastias, E. (2015). **Genetic analysis of archeological maize from the site of San Lorenzo (Azapa, Chile): A contribution to the prehispanic maize problem.** *Chungara, Revista de Antropología Chilena*, 47 (4), 565-573.
- Joshi, S.P., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S. (1999) **Molecular markers in plant genome analysis.** *Current Science*, 77, 230-240.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K. (2011). **Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants.** *Euphytica*, 177 (3), 309-334.
- Kayser M., Brauer S., Cordaux R., Casto A., Lao O., Zhivotovsky L.A., Moise-Faurie C., Rutledge R.B., Schiefenhoewel W., Gil D., Lin A.A., Underhill P.A., Oefner P.J., Trent R.J., Stoneking M. (2006). **Melanesian and Asian origins of Polynesians: mtDNA and Y chromosome gradients across the Pacific.** *Molecular Biology and Evolution*, 23 (11): 2234-2244
- Kirch, P.V., (2010). **Peopling of the Pacific: A holistic anthropological perspective.** *Annual Review 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., Dieu Thuy, N. T., Randi, E., Doherty, M., Due, R.A., Bolt, R., Djubiantono, T., Griffin, B., Intho, M., Keane, E., Kirch, P., Li, K-T., Morwood, M., Pedriña, L.M., Piper, P.J., Rabett, J. R., Shooter, P., Van den Bergh, G., West, E., Wickler, S., Yuan J., Cooper, A., (2007). **Phylogeny and ancient DNA of Sus provides insights into neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (12), 4834-4839.
- Lia, V.V., Confalonieri, V.A., Ratto, N., Hernández, J.A.C., Alzogaray, A.M.M., Poggio, L., Brown, T. A. (2007). **Microsatellite typing of ancient maize: insights into the history of agriculture in southern South America.** *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274 (1609), 545-554.
- Liu, X., Tang, H., Li, D., Hou, L. (2011). **Genetic diversity of coconut cultivars in China by microsatellite (SSR) markers.** *Molecular Plant Breeding*, 2, 83-91
- Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Reisch B.I. (1994). **A simple and efficient method for DNA extraction from grapevines cultivars and Vitis species.** *Plant Molecular Biology Reporter*, 12 (1) 6.13.
- Manen, J.F., Bouby, L., Dalnoki, O., Marinval, P., Turgay, M., Schlumbaum, A. (2003). **Microsatellites from archaeological Vitis vinifera seeds allow a tentative assignment of the geographical origin of ancient cultivars.** *Journal of Archaeological Science*, 30 (6), 721-729.
- Marota, I., Basile, C., Ubaldi, M., Rollo, F. (2002). **DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites.** *American Journal of Physical Anthropology*, 117 (4), 310-318.
- Matisoo-Smith, E. (1994). The human colonisation of Polynesia. **A novel approach: genetic analyses of the Polynesian rat (Rattus exulans).** *The Journal of the Polynesian Society*, 103 (1), 75-87.
- Matisoo-Smith, E. (2015). **Ancient DNA and the human settlement of the Pacific: A review.** *Journal of human evolution*, 79, 93-104.

- Matisoo-Smith, E.A., Robins, J.H. (2004). **Origins and dispersals of Pacific peoples: evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 9167-9172.
- Matthews, P.J. 1996. **Plant dispersal and human movement: evidence for a complex history in Polynesia.** *Minpaku Tsushi* 73, 80-85.
- Mesenhöller, P., Lueb, O. (2013) **Made in Oceania.** *Rautenstrauch-Joest-Museum*. Kulturen der Welt, Köln.
- Métraux, A. 1971. **Ethnology of Easter Island.** *Bernice P. Bishop Museum Bulletin* 60. Honolulu, HI, Bishop Museum Press. (first printed 1940).
- Moncada, X., Payacán, X., Arriaza, F., Lobos, S., Seelenfreund, D., Seelenfreund, A. (2013) **DNA extration and amplification from comtemporary Polynesian Bark-Cloth.** *PLoS One* 8 (2), e56549.
- Olivares, G., 2016. **Estudio de la diversidad genética de la morera de papel (*Broussonetia papyrifera*) en Oceanía Remota para inferir posibles rutas de poblamiento de esta región.** (Tesis de Magíster en Bioquímica). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Orliac C., Orliac M. (1998) **Evolution du couvert végétal à l’Ile de Pâques du 15è au 19è siècle.** *Vargas-Casanova P ed. Easter Island and East Polynesian Prehistory*. Santiago, Chile, Instituto de Estudios Isla de Pascua, Universidad de Chile, Pp.195-200
- Payacán, C. 2015, **Caracterización genética a partir de ADN antiguo de muestras de herbarios de *Broussonetia papyrifera* (L.) L’Herit. Ex Vent. del Pacífico mediante marcadores moleculares,** (Tesis de Magíster en Bioquímica). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Peñailillo J. (2014). **Estudio de la diversidad genética de la Morera de papel (*Broussonetia papyrifera* (L.) L’Herit. ex Vent.) en el Pacífico mediante un marcador molecular de sexo microsátélites.** (Tesis de Magíster en Bioquímica). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

- Peñailillo, J., Olivares, G., Moncada, X., Payacán, C., Chang, C. S., Chung, K. F., Matthews, P.J., Seelenfreund, A., Seelenfreund, D. (2016). **Sex Distribution of Paper Mulberry (*Broussonetia papyrifera*) in the Pacific.** *PLoS One*, 11(8), e0161148.
- Poulakakis, N., Tselikas, A., Bitsakis, I., Mylonas, M., Lymberakis, P. (2007). **Ancient DNA and the genetic signature of ancient Greek manuscripts.** *Journal of Archaeological Science*, 34(5), 675-680.
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A., Murray, P.C.B., Fleming, C. C., Szalanski, A.L., Adams, B.A., Harris, T.S. (1997). **The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes.** *Journal of Nematology*, 29(4), 441.
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., Caramelli, D. (2012). **Ancient DNA studies: new perspectives on old samples.** *Genetics Selection Evolution*, 44(1), 1.
- Roullier, C., Benoit, L., McKey, D.B., Lebot, V. (2013). **Historical collections reveal patterns of diffusion of sweet potato in Oceania obscured by modern plant movements and recombination.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 2205-2210.
- Savolainen P., Leitner T., Wilton A.N., Matisoo-Smith E., Lundeberg J. (2004). **A detailed picture of the origin of the Australian dingo, obtained from the study of mitochondrial DNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), 12387-12390.
- Schuelke M. (2000). **An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.** *Nature Biotechnology*, 18(2): 233-234.
- Seelenfreund, D., Clarke, A. C., Oyanedel, N., Piña, R., Lobos, S., Matisoo-Smith, E. A., & Seelenfreund, A. (2010). **Paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) as a commensal model for human mobility in Oceania: anthropological, botanical and genetic considerations.** *New Zealand Journal of Botany*, 48 (3-4), 231-247.
- Seelenfreund, D., Piña, R., Ho, K.Y., Lobos, S., Moncada, X., Seelenfreund, A. (2011). **Molecular analysis of *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. (Magnoliophyta: Urticales) from the Pacific, based on ribosomal sequences of nuclear DNA.** *New Zealand Journal of Botany*, 49(3), 413-420.

- Seelenfreund, A., Sepúlveda, M., Petchey, F., Peña-Ahumada, B., Payacán, C., Gutiérrez, S., Cárcamo, J., Kardailsky, O., Moncada, X., Rojas, A.M., Moraga, M., Matisoo-Smith, E., Seelenfreund, A. (2016). **Characterization of an archaeological decorated bark cloth from Agakauitai Island, Gambier archipelago, French Polynesia.** *Journal of Archaeological Science*, 76, 56-69.
- Sheerin, T.F. & Cunio, P.M., (2016) **Polynesian Colonization as a model for human expansion into the Solar System.** In, *AIAA SPACE*, 2016 (p. 5400, 1-10)
- Singer, V.L., Jones, L.J., Yue, S.T., Haugland, R.P. (1997). **Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation.** *Analytical Biochemistry*, 249(2), 228-238.
- Speirs, A.K., McConnachie, G., Lowe, A. (2009). **Chloroplast DNA from 16th century waterlogged oak in a marine environment: initial steps in sourcing the Mary Rose timbers.** *Archaeological Science under a microscope: Studies in residue and ancient DNA analysis in honour of Thomas H. Loy. Terra Australis*, 30, 175-189.
- 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 Sciences*, 104(25), 10335-10339.
- Storey, A.A., & Matisoo-Smith, E.A. (2014). **No evidence against Polynesian dispersal of chickens to pre-Columbian South America.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, E3583.
- Szabó, Z., Gyulai, G., Humphreys, M., Horváth, L., Bittsánszky, A., Lágler, R., Heszky, L. (2005). **Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars.** *Euphytica*, 146(1-2), 87-94.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J. (1994). **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix.** *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Underhill, P.A., & Kivisild, T. (2007). **Use of Y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations.** *Annual Review of Genetics*, 41, 539-564.

- Wang, D. W., Li, Y., & Li, Z. Q. (2011). **Identification of a Male-Specific Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and a Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) Marker in *Eucommia ulmoides* Oliv.** *International journal of molecular sciences*, 12 (1), 857-864.
- Wang, X. C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J. H., Li, J. Q. (2015). **ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?** *Molecular ecology resources*, 15 (3), 573-586.
- Wang G.W., Huang B.K., Qin L.P. (2012). **The genus *Broussonetia*: a review of its phytochemistry and pharmacology.** *Phytotherapy Research*, 26 (1), 1-10.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., Kahl, G. (2005). **DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications.** *CRC Press*, Segunda edicion.
- Willerslev, E., Cooper, A. (2005). **Review paper. Ancient DNA.** *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272 (1558), 3-16.
- Wilmshurst, J.M., Hunt, T.L., Lipo, C.P., Anderson, A.J. (2011). **High-precision radiocarbon dating shows recent and rapid initial human colonization of East Polynesia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 1815-1820.

Anexos

Anexo I.

Tabla I. Muestras de *tapa* contemporánea de prueba: Código de la muestra, isla de procedencia, año de manufacturación y etiqueta de la muestra.

Código	Isla	Año	Etiqueta
BQUCHTE018	Tonga	SI	<i>Tapa</i> Tonga
BQUCHTE019	Samoa	SI	<i>Tapa</i> Samoa
BQUCHTE020	Hawái	2012	Hawaii Modern Roen Hufford 2012
BQUCHTE021	Isla de Pascua	SI	--
BQUCHTE022	Isla de Pascua	SI	--
BQUCHTE023	Marquesas o Samoa	SI	--

SI: sin información

Anexo II.

Tabla II: Muestras de herbario disponibles para la realización de esta tesis. Código de la muestra, localidad e isla de procedencia, recolector y año de recolección.

	CÓDIGO	LOCALIDAD	RECOLECTOR	AÑO
1	BISH57308	Main Hawaiian Islands Niihau USA Foot of Mt on W side	Stokes, J.F.G.	01-01-1912
2	BISH58345	Main Hawaiian Islands Lanai USA Aukuu Hill, bench at foot	Munro, G.C. 299	03-04-1914
3	BISH58346	Main Hawaiian Islands Hawaii USA N.Kona, Puuanahulu	Rock, J.F.C. 3663	06-17-1909
4	BISH58347	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Kilauea, Apua	Fagerlund, G.O. 1214	11-01-1945
5	BISH58350	Main Hawaiian Islands Oahu USA Kealia trail	Hatheway, W.H. 276	06-25-1950
6	BISH58351	Main Hawaiian Islands Oahu USA Honolulu, Kamehameha Girls' School	Rankin, P.	07-03-1936
7	BISH58352	Main Hawaiian Islands Molokai USA Wawaia Valley, 2nd E gulch	Degener, O. 8688	06-27-1928
8	BISH58355	Main Hawaiian Islands Oahu USA central Lualualei, below Kanehoa Valley 10	Christophersen, E. 3719	06-29-1932
9	BISH58357(m)	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Hookena	Emory, K.P. 1272	04-14-1924
10	BISH58357(f)	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Hookena	Emory, K.P. 1272	04-14-1924
11	BISH58358 (p) (1)	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Hawaii (Wauke)	Emory, K.P. 1	03-01-1924
12	BISH58358 (w) (2)	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Hawaii (Puaaha)	Emory, K.P. 1	03-01-1924
13	BISH58360	Main Hawaiian Islands Kauai USA Halemanu	Rock, J.F.C. 2380	02-14-1909
14	BISH58361	Main Hawaiian Islands Oahu USA Punaluu Mt	Rock, J.F.C. 1343	02-02-1909

Anexo II (continuación)

Tabla II: Muestras de herbario disponibles para la realización de esta tesis. Código de la muestra, localidad e isla de procedencia, recolector y año de recolección.

	CÓDIGO	LOCALIDAD	RECOLECTOR	AÑO
15	BISH58362	Main Hawaiian Islands Kauai USA Halemanu	Rock, J.F.C. 2373	02-14-1909
16	BISH58363	Main Hawaiian Islands Kauai USA Kauai	Rock, J.F.C. 2548	1909
17	BISH58364	Main Hawaiian Islands Lanai USA Aukuu	Munro, G.C. 046	03-04-1914
18	BISH58368	Main Hawaiian Islands Oahu USA Waianae Mts	Rock, J.F.C. 17052	04-01-1918
19	BISH58370	Main Hawaiian Islands Lanai USA Waiakeakua	Munro, G.C. 136	07-16-1927
20	BISH58371	Main Hawaiian Islands Oahu USA Vineyard St. Nursery	Caum, E.L.	01-04-1937
21	BISH58375	Main Hawaiian Islands Niihau USA Foot of Mt on W side	Stokes, J.F.G.	01-01-1912
22	BISH58376	Main Hawaiian Islands Oahu USA Honolulu	Bryan, W.A.	12-02-1903
23	BISH58377	Main Hawaiian Islands Molokai USA Kaluaaha Valley	Forbes, C.N. 360.Mo	08-01-1912
24	BISH58378	Main Hawaiian Islands Lanai USA Kaiholena Valley	Forbes, C.N. 92	06-01-1913
25	BISH58380	Main Hawaiian Islands Maui USA East Maui, Makawao District, Ulupalakua, near	Degener, O. 8694	08-07-1927
26	BISH58381	Main Hawaiian Islands Oahu USA Hills east of Kawaihapai	Degener, O. 8686	01-27-1929
27	BISH58382	Main Hawaiian Islands Oahu USA Lualualei Valley	Degener, O. 8685	05-01-1932

Anexo II (continuación)

Tabla II: Muestras de herbario disponibles para la realización de esta tesis. Código de la muestra, localidad e isla de procedencia, recolector y año de recolección.

	CÓDIGO	LOCALIDAD	RECOLECTOR	AÑO
28	BISH58384	Main Hawaiian Islands Oahu USA Hills E of Kawaihapai	Degener, O. 8683	04-12-1931
29	BISH58385	Main Hawaiian Islands Molokai USA Wawaia Valley, 2nd E gulch	Degener, O. 8688	06-27-1928
30	BISH58386	Main Hawaiian Islands Molokai USA W of Nalapue	Degener, O. 8637	06-30-1928
31	BISH58387	Main Hawaiian Islands Oahu USA Kamanele Park, Honolulu	Degener, O. 8682	09-30-1930
32	BISH99313	Main Hawaiian Islands Oahu USA Honolulu, Kamehameha Girls' School	Grant, M.L. 7129	07-31-1934
33	BISH161323	New Guinea Papua New Guinea Near Ekua	Blackwood, B. 260	03-27-1937
34	BISH161324	Viti Levu Group Ovalau Fiji Namuka-i-Lau, lowlands, even cultivated about village	Bryan Jr., E.H. 474	08-13-1924
35	BISH161326	Fiji East coast	Smith, A.C. 1097	02-01/08- 1934
36	BISH32928	Cakaudrove Fiji Yacata Island, Yacata Village	Koroiveibau, D. 15559	02-04-1968
37	BISH413708	Main Hawaiian Islands Oahu USA Kealia,	St.John, H. 17646	11-08-1936
38	BISH415045	Main Hawaiian Islands Niihau USA Halulu Lake, N side, thicket in gulch	St.John, H. 22739	08-12-1947
39	BISH415077	Main Hawaiian Islands Niihau USA Haa Valley, on basalt cliff of small gorge	St.John, H. 23638	04-01-1949
40	BISH416666	Guadalcanal Solomon Islands Guadalcanal, Horiara	Krauss, N.L.H. 1445	01-16-1977

Anexo II (continuación)

Tabla II: Muestras de herbario disponibles para la realización de esta tesis. Código de la muestra, localidad e isla de procedencia, recolector y año de recolección.

	CÓDIGO	LOCALIDAD	RECOLECTOR	AÑO
41	BISH444278	Main Hawaiian Islands Oahu USA Waianae Mts	Bryan, L.W. s.n.	02-12-1941
42	BISH445703	Main Hawaiian Islands Oahu USA Hahaione Valley	Christophersen, E. 1628	02-25-1931
43	BISH451763	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Punaluu	Rock, J.F.C. 1304	02-05-1909
44	BISH451764	Main Hawaiian Islands Kauai USA At the foot of Hanapepe Valley	Rock, J.F.C. 5848	09-28-1909
45	BISH451765	Main Hawaiian Islands Kauai USA Halemanu	Rock, J.F.C. 1585	02-14-1909
46	BISH451766	Main Hawaiian Islands Kauai USA Kaholuamanu	Rock, J.F.C. 1756	03-03-1909
47	BISH451767	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Punaluu	Rock, J.F.C. 1312	02-09-1909
48	BISH505999	Guadalcanal Solomon Islands Honiara	Krauss, N.L.H. 1801	Mar-1985
49	BISH668629	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Napoopoo	Neal, M.C. 1274	04-07-1924
50	BISH757984	Cakaudrove Fiji Yacata Island; Yacata Village	Koroiveibau, D. 15560	03-01-1968
51	BISH763194	Main Hawaiian Islands Hawaii USA Napoopoo	Neal, M.C. 1273	04-07-1924

Anexo III

Figura A. Curvas de calibración utilizadas en la cuantificación con Picogreen®.

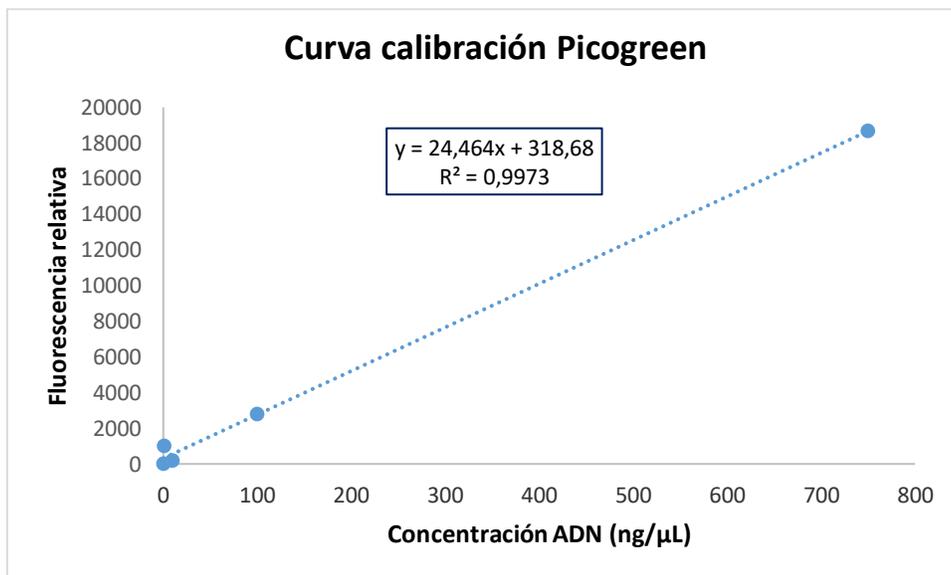


Figura A.1. Curva de Calibración utilizada en la cuantificación de ADN mediante Picogreen para muestras de prueba de *tapa*.

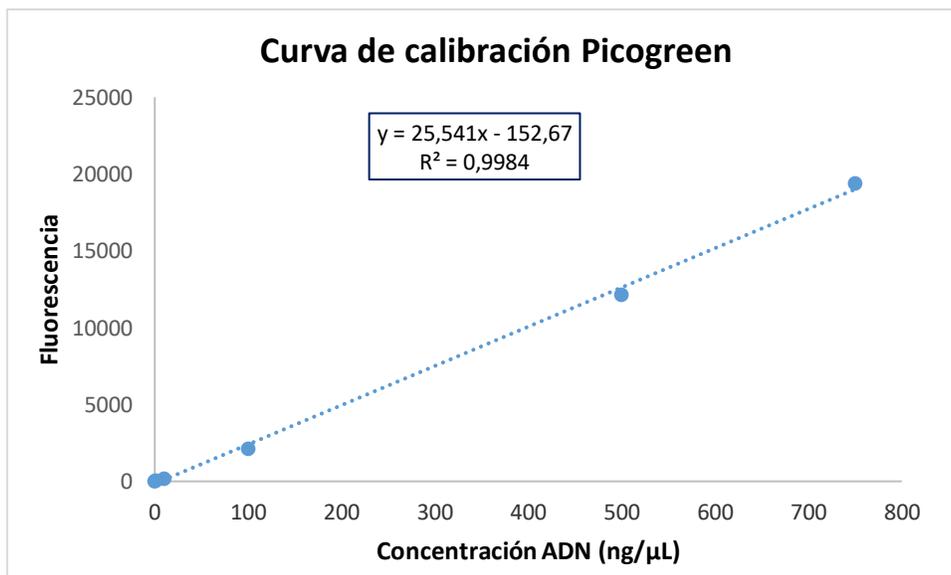


Figura A.2. Curva de Calibración utilizada en la cuantificación de ADN mediante Picogreen para muestras de *tapa* antigua.

Anexo IV.

Tabla III Secuencia de los seis nuevos partidores diseñados para el ensayo del marcador de sexo corto.

Partidor	Secuencia	Pb
Fw_BP_1	5'- CGGGA ACTCCGTCATC-3'	16
Fw_BP_2	5'- CCCGTAACCGTGGATCTAAAAAGC-3'	24
Fw_BP_3	5'- TGGATCTAAAAAGCCGTTCA-3'	20
RC_BP_1	5'- GATGACGGAGTTCCCG-3'	16
RC_BP_2	5'- GCTTTTTAGATCCACGGTTACGGG-3'	24
RC_BP_3	5'- TGAACGGCTTTTTAGATCCA-3'	20
RC RS18	5'- TGATGACGTTGACATGGC-3'	18

Anexo V

Tabla IV. Concentración, razón de absorbanza 260nm/280nm y rendimiento de las tres extracciones de las muestras de tapa moderna.

Código	Número de Extracción	[DNA] PG* (ng/μL)	Rendimiento PG* (ng DNA/mg tejido)	[DNA] Abs** (ng/μL)	Rendimiento Abs** (ng DNA/mg tejido)	Pureza (260nm/280nm)
BQUCHTE018	1	-	-	90,1	536	1,67
	2	5	21	57,3	249	1,68
	3	21,1	93	292,4	1283	1,95
BQUCHTE019	1	-	-	86,4	386	1,92
	2	0	0	52,4	223	1,92
	3	3,6	25	158	1097	2,67
BQUCHTE020	1	-	-	5,6	42	1,47
	2	0,7	4	4,3	26	1,78
	3	0	0	2,2	15	1,02
BQUCHTE021	1	-	-	11,3	70	1,68
	2	1,4	3	10,2	23	1,8
	3	0,2	1	260,3	656	6,43
BQUCHTE022	1	-	-	30,7	146	1,80
	2	1	3	39	98	2,49
	3	1	3	102,1	267	1,78
BQUCHTE023	1	-	-	21,9	104	1,74
	2	0,8	3	20,6	63	1,89
	3	1,1	5	11,5	54	2,01
CE1	1	-	-	3,4	-	-
	2	-0,8	-	3	-	-
	3	-0,5	-	-7,7	-	-
CE2	1	-	-	1,7	-	-
	2	-0,7	-	3,1	-	-
	3	-0,5	-	-7,3	-	-

*PG: Agente intercalante Picogreen®, ** Abs 260: Absorbanza a 260 nm, coloreada

Anexo VI

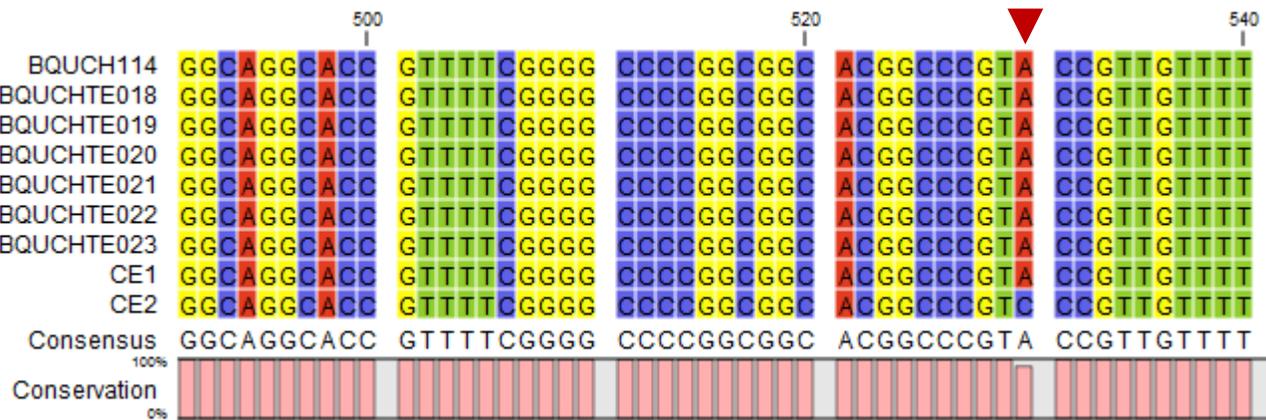
Tabla V. Concentración, razón de absorbancia 260nm/280nm y rendimiento de las extracciones de *tapa* moderna de BQUCHTE019 a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.

Tiempo incubación	Temperatura (°C)	[DNA] PG* (ng/μL)	Rendimiento PG* (ng DNA/mg tejido)	[DNA] Abs** (ng/μL)	Rendimiento Abs** (ng DNA/mg <i>tapa</i>)	Pureza (260nm/280nm)
20 min	37	2,37	33	23,2	318	1,68
	60	1,92	17	24,8	216	1,70
1 h	37	2,46	14	33,5	195	1,65
	60	1,87	18	31,2	306	1,80
3 h	37	2,21	24	20,6	226	1,71
	60	2,2	21	15,9	149	1,52
5 h	37	2,57	15	30,4	176	1,73
	60	1,86	20	13,6	148	1,55
8 h	37	2,41	29	40,5	482	1,87
	60	3,29	41	54	675	1,98
24 h	37	4,86	32	56	371	1,91
	60	2,67	30	35,9	408	1,88
48 h	37	1,98	12	20,6	121	1,80
	60	6,15	77	70,5	881	1,95

*PG: Agente intercalante Picogreen®, ** Abs 260: Absorbancia a 260 nm

Anexo VII

Figura B. Alineamiento de las secuencias obtenidas de la amplificación de la región ITS-1 de ADN de tapas contemporáneas. La punta de flecha roja indica el sitio polimorfo.



Anexo VIII.

Tabla VI. Concentración, razón 260nm/280nm y rendimiento de las extracciones de *tapa* antigua.

Muestra	Extracción 1			Extracción 2			Extracción 3		
	[DNA] ng/ μ L	Abs 260nm/ 280 nm	Rendimiento (ng DNA/ mg muestra)	[DNA] ng/ μ L	Abs 260nm/ 280 nm	Rendimiento (ng DNA/ mg muestra)	[DNA] ng/ μ L	Abs 260nm/ 280 nm	Rendimiento (ng DNA/ mg muestra)
BQUCHTE001	14,1	1,44	313	-	-	-	-	-	-
BQUCHTE002	11,6	1,56	155	11,7	1,6	195	-	-	-
BQUCHTE003	55,2	1,55	657	104	1,56	615	-	-	-
BQUCHTE004	28,2	1,97	313	94,8	2,09	810	10,8	1,9	135
BQUCHTE005	8,4	1,56	195	-	-	-	-	-	-
BQUCHTE006	259	1,33	4544	4,2	1,79	114	-	-	-
BQUCHTE007	29,5	1,97	321	29,1	1,88	331	26,3	1,9	231
BQUCHTE008	192	1,36	1979	144	1,34	1619	180	1,34	1230
BQUCHTE009	71,1	1,57	948	6,6	2,37	92	-	-	-
BQUCHTE010	12,4	1,38	210	4,5	2,66	92	-	-	-
BQUCHTE011	25	1,84	291	56	2,02	311	23,6	2,09	197
BQUCHTE012	28,5	1,44	236	36,2	1,64	318	62,5	1,51	446
BQUCHTE013	226,9	1,17	1445	114	1,38	1216	204	1,35	1076
BQUCHTE014	8,4	1,38	95	19,8	1,52	228	16,4	1,49	180
BQUCHTE015	193,6	1,37	1713	225	1,36	1974	259	1,49	1715
BQUCHTE016	15,3	1,35	128	32,5	1,34	325	27,7	1,29	170
BQUCHTE017	1167	1,36	4541	198	1,34	1771	53,2	1,32	512
CE	-2.8	-	-	-0.7	-	-	-1.7		

 : Muestra coloreada

Abs=Absorbancia

Anexo IX

Tabla VII. Especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1.

Muestra	Sentido	Especie	E value	% identidad
BQUCHTE001_E1_OA	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	Ilegible	-	-
BQUCHTE001_E1_BM	ITS-A	<i>Triticum petropavlovskiyi</i>	1,00E-141	99
	ITS-C	<i>Triticum aestivum</i> (3)	9,00E-144	100
BQUCHTE002_E1_OA	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	Ilegible	-	-
BQUCHTE002_E02_P	ITS-A	<i>Sporobolus fertilis</i>	1,00E-127	99
	ITS-C	<i>Sorobulus indicus</i>	3,00E-138	99
BQUCHTE003_E2_OA	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	5,00E-17	100
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	9,00E-66	100
BQUCHTE003_E2_BM	ITS-A	<i>Triticum aestivum</i> / <i>Triticum turgidum</i>	e2e-139	99
	ITS-C	<i>Triticum aestivum</i> 3°	1,00E-141	99
BQUCHTE003_E02_P	ITS-A	<i>Triticum sp.</i>	2,00E-135	100
	ITS-C	<i>Triticum sp.</i>	3,00E-133	99
BQUCHTE004_E1_OA	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	3,00E-23	75
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	1,00E-80	99
BQUCHTE004_E2_OA	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	1,00E-16	87
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	4,00E-75	99

*Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'Discontiguous megablast' que permite algunos 'desajustes' en la comparación con la base de datos. **Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'BlastN' que funciona de mejor manera para comparar con la base de datos e identificar secuencias cortas.

Anexo IX (continuación)

Tabla VII. Especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1.

Muestra	Sentido	Especie	E value	% identidad
BQUCHTE004_E1_BM	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	2,00E-115	95
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	3,00E-81	100
BQUCHTE004_E2_BM	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	1,00E-45	86
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	7,00E-78	98
BQUCHTE004_E3_BM	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	6,00E-39	84
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	3,00E-81	100
BQUCHTE005_E1_OA	ITS-A	<i>B. papyrifera</i> **	1,00E-16	71
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	9,00E-75	96
BQUCHTE005_E1_BM	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	1,00E-80	100
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	4,00E-112	99
BQUCHTE007_E1_OA	ITS-A	<i>Morus sp.</i>	5,00E-105	98
	ITS-C	Ilegible	-	-
BQUCHTE007_E2_OA	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	7,00E-15	100
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	3,00E-71	100
BQUCHTE007_E1_BM	ITS-A	<i>Aspergillus sp.</i>	6,00E-94	99
	ITS-C	<i>Uncultured fungus clone</i>	2,00E-110	98

*Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo ‘Discontiguous megablast’ que permite algunos ‘desajustes’ en la comparación con la base de datos. **Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo ‘BlastN’ que funciona de mejor manera para comparar con la base de datos e identificar secuencias cortas.

Anexo IX (continuación)

Tabla VII. Especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1.

Muestra	Sentido	Especie	E value	% identidad
BQUCHTE007_E2_BM	ITS-A	<i>Trichopues sempervirens/ Glycine max</i>	2,00E-129	99
	ITS-C	<i>Glycine max</i>	8,00E-124	99
BQUCHTE007_E3_BM	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	8,00E-134	99
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	2,00E-120	99
BQUCHTE007_E01_P	ITS-A	<i>Helianthus annus</i>	1,00E-147	99
	ITS-C	<i>Helianthus annus</i>	5,00E-162	99
BQUCHTE07_E02_P	ITS-A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,00E-116	100
	ITS-C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	8,00E-119	100
BQUCHTE007_E03_P	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	3,00E-149	100
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	1,00E-111	100
BQUCHTE008_E01_P	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	9,00E-144	100
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	7,00E-140	99
BQUCHTE009_E1_OA	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	4,00E-33	92
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	5,00E-74	96
BQUCHTE009_E1_BM	ITS-A	Uncultured <i>Leotiomycetes / Fagus crenata</i>	6,00E-156	99
	ITS-C	<i>Fagus sylvatica</i>	6,00E-161	99

*Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo ‘Discontiguous megablast’ que permite algunos ‘desajustes’ en la comparación con la base de datos. **Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo ‘BlastN’ que funciona de mejor manera para comparar con la base de datos e identificar secuencias cortas.

Anexo IX (continuación)

Tabla VII. Especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1.

Muestra	Sentido	Especie	E value	% identidad
BQUCHTE009_E02_P	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	Ilegible	-	-
BQUCHTE010_E1_OA	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	3,00E-138	100
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	9,00E-144	99
BQUCHTE010_E1_BM	ITS-A	Uncultured <i>Leotiomyces</i> / <i>Fagus sylvatica</i>	2,00E-155	99
	ITS-C	<i>Fagus sylvatica</i>	9,00E-144	99
BQUCHTE010_E2_BM	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	Ilegible	-	-
BQUCHTE010_E02_P	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	5,00E-121	97
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	7,00E-83	100
BQUCHTE011_E1_OA	ITS-A	<i>Impatiens sp</i>	2,00E-140	98
	ITS-C	<i>Impatiens sp</i>	6,00E-111	96
BQUCHTE011_E1_BM	ITS-A	<i>Impatiens amphta</i>	4,00E-142	97
	ITS-C	<i>Impatiens amphta</i>	9,00E-114	96
BQUCHTE011_E2_BM	ITS-A	<i>Lolium perenne</i> / <i>Lolium multiflorum</i>	9,00E-108	99
	ITS-C	<i>L. multiflorum</i>	2,00E-119	100

*Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'Discontiguous megablast' que permite algunos 'desajustes' en la comparación con la base de datos. **Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'BlastN' que funciona de mejor manera para comparar con la base de datos e identificar secuencias cortas.

Anexo IX (continuación)

Tabla VII. Especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1.

Muestra	Sentido	Especie	E value	% identidad
BQUCHTE012_E1_OA	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i> *	4,00E-31	92
BQUCHTE012_E2_BM	ITS-A	<i>Populus caspica</i> / <i>Populus tomentosa</i>	2,00E-73	100
	ITS-C	<i>Populus alba</i>	7,00E-130	99
BQUCHTE012_E2_P	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	1,00E-136	99
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	1,00E-141	99
BQUCHTE012_E3_P	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	1,00E-48	100
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	6,00E-136	99
BQUCHTE013_E1_OA	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	Ilegible	-	-
BQUCHTE013_E1_BM	ITS-A	<i>Lagenaria siceraria</i> / <i>Cucurbita maxima</i>	3,00E-103	95
	ITS-C	<i>Lagenaria siceraria</i> / <i>Cucurbita maxima</i>	1,00E-59	97
BQUCHTE013_E2_BM	ITS-A	<i>Leontodon tingitanus</i> / <i>Leontodon saxatilis</i>	9,00E-159	99
	ITS-C	<i>Leontodon tingitanus</i> / <i>Leontodon saxatilis</i>	3,00E-159	99
BQUCHTE013_E3_BM	ITS-A	<i>Ilegible</i>	-	-
	ITS-C	<i>Ilegible</i>	-	-

*Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'Discontiguous megablast' que permite algunos 'desajustes' en la comparación con la base de datos. **Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'BlastN' que funciona de mejor manera para comparar con la base de datos e identificar secuencias cortas.

Anexo IX (continuación)

Tabla VII. Especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1.

Muestra	Sentido	Especie	E value	% identidad
BQUCHTE013_E02_P	ITS-A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,00E-116	100
	ITS-C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,00E-113	100
BQUCHTE013_E03_P	ITS-A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,00E-101	98
	ITS-C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,00E-106	98
BQUCHTE014_E1_OA	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	2,00E-125	99
BQUCHTE014_E01_P	ITS-A	<i>Citrus maxima</i>	3,00E-149	100
	ITS-C	<i>Citrus maxima</i>	6,00E-151	99
BQUCHTE015_E1_OA	ITS-A	<i>S. lycopersicum/ P. avium</i>	2,00E-125	99
	ITS-C	<i>S. lycopersicum / P. avium**</i>	2,00E-49	89
BQUCHTE015_E01_P	ITS-A	<i>Cupressus sempervirens</i>	0	99
	ITS-C	<i>Cupressus sempervirens</i>	0	99
BQUCHTE015_E02_P	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	4,00E-127	99
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	7,00E-140	99
BQUCHTE015_E03_P	ITS-A	<i>Fagus sylvatica</i>	4,00E-127	100
	ITS-C	<i>Fagus sylvatica</i>	7,00E-140	99

*Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'Discontiguous megablast' que permite algunos 'desajustes' en la comparación con la base de datos. **Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'BlastN' que funciona de mejor manera para comparar con la base de datos e identificar secuencias cortas.

Anexo IX (continuación)

Tabla VII. Especies identificadas mediante la secuenciación de la región ITS-1.

Muestra	Sentido	Especie	E value	% identidad
BQUCHTE016_E1_OA	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	2,00E-52	96
BQUCHTE016_E1_BM	ITS-A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,00E-58	97 150
	ITS-C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,00E-68	99
BQUCHTE016_E2_BM	ITS-A	<i>B. papyrifera</i>	2,00E-45	100
	ITS-C	<i>B. papyrifera</i>	7,00E-120	96
BQUCHTE016_E3_BM	ITS-A	<i>Solanum lycopersicum</i>	3,00E-38	100
	ITS-C	<i>Solanum lycopersicum</i>	3,00E-39	99
BQUCHTE016_E02_P	ITS-A	<i>Triticum sp.</i>	1,00E-136	99
	ITS-C	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-136	99
BQUCHTE016_E03_P	ITS-A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,00E-122	100
	ITS-C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,00E-116	100
BQUCHTE017_E01_P	ITS-A	Ilegible	-	-
	ITS-C	<i>Acer monspessulanum</i>	3,00E-21	90
BQUCHTE017_E02_P	ITS-A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,00E-106	99
	ITS-C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,00E-94	99

*Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'Discontiguous megablast' que permite algunos 'desajustes' en la comparación con la base de datos. **Análisis utilizando la herramienta BLAST con el algoritmo 'BlastN' que funciona de mejor manera para comparar con la base de datos e identificar secuencias cortas.

Anexo X

Tabla VIII. Concentración, razón 260nm/280nm y rendimiento de las extracciones de muestras herbario.

Muestras	[DNA] ng/μL PG	Rendimiento PG (ng DNA/mg hoja)	[DNA] ng/μL Abs	Rendimiento Abs (μg DNA/g hoja)	A 260/280
BISH57308	200,7	2788	56,9	790	1,83
BISH58345	170,2	1025	362,7	2184	1,78
BISH58346	15,1	106	281,6	1983	1,9
BISH58347	71,8	1158	227,5	3669	1,7
BISH58350	25,6	149	440,6	2562	2,03
BISH58351	7,2	77	154,7	1663	1,84
BISH58352	29,8	163	649	3546	1,97
BISH58355	10,5	117	211,7	2352	2
BISH58357(m)	7,4	96	54,1	703	1,94
BISH58357(f)	220	4231	73,9	1421	1,89
BISH58358 (p) (1)	87,6	769	168,8	1535	2,03
BISH58358 (w) (2)	161,,6	1469	348	3166	1,89
BISH58360	64,8	661	862,2	8798	2
BISH58361	15,8	149	386,7	3648	1,69
BISH58362	163,9	1024	330	2062	2,06
BISH58363	2,2	21	102,5	976	1,68
BISH58364	35,6	227	931,1	5931	1,8
BISH58368	54,4	251	1108	5105	1,7
BISH58370	30,9	198	715,8	4588	1,7
BISH58371	312	6000	144,8	2785	2,03
BISH58375	215,4	1381	483,3	3098	1,87
BISH58376	5,9	100	140,6	2383	2

 : Muestra coloreada

Anexo X (continuación)

Tabla VIII. Concentración, razón 260nm/280nm y rendimiento de las extracciones de muestras herbario.

Muestras	[DNA] ng/μL PG	Rendimiento PG (ng DNA/mg hoja)	[DNA] ng/μL Abs	Rendimiento Abs (μg DNA/g hoja)	A 260/280
BISH58377	6,5	89	150,6	2063	1,99
BISH58378	45,9	425	447	4139	2
BISH58380	56,2	1626	120,9	785	1,76
BISH58381	8,8	60	247,3	1682	1,9
BISH58382	35,3	415	268,2	3155	2,05
BISH58384	12,6	104	277,6	2294	1,94
BISH58385	144,7	1626	450	5056	1,7
BISH58386	7,1	148	166	3458	2,02
BISH58387	240,8	1056	1602	7026	1,52
BISH99313	19,8	99	223	1121	1,96
BISH161323	15,8	120	308,6	2338	1,78
BISH161324	15,9	201	143,1	1811	1,43
BISH161326	20,3	294	392,5	5688	2,05
BISH32928	8,6	118	132,6	1816	2,04
BISH413708	44,5	1085	85	2073	2
BISH415045	9,9	51	478,4	2479	1,6
BISH415077	54	360	503,1	3354	2
BISH416666	23,7	167	300,6	2117	1,93
BISH444278	157,3	4494	279,5	7986	1,86
BISH445703	5,4	34	120,6	763	1,92
BISH451763	7,1	74	289,4	3015	1,76
BISH451764	97,7	660	226,9	1533	1,9
BISH451765	107,3	118	381,3	3972	2,05

 : Muestra coloreada

Anexo X (continuación)

Tabla VIII. Concentración, razón 260nm/280nm y rendimiento de las extracciones de muestras herbario.

Muestras	[DNA] ng/ μ L PG	Rendimiento PG (ng DNA/mg hoja)	[DNA] ng/ μ L Abs	Rendimiento Abs (μ g DNA/g hoja)	A 260/280
BISH451766	6,9	133	157,3	3025	1,99
BISH451767	49,22	735	93,9	1401	1,97
BISH505999	225,9	933	1806,4	7464	1,53
BISH668629	23,6	241	176,5	1801	2,04
BISH757984	9,1	74	149,2	1213	1,64
BISH763194	23,3	150	421,2	2717	1,89

 : Muestra coloreada

Anexo XI

Tabla IX. Resumen de la información genética encontrada en 23 muestras de herbarios analizadas con la región ITS-1, un marcador de sexo y 10 SSR.

CÓDIGO	ITS-1	MM	Bro 07		Bro 08		Bro 13		Bro 15		Bropap 2214		Bropap 2801		Bropap 20558		Bropap 25444		Bropap 26985		Bropap 30248	
BISH32928	A	Femenina	248	248	221	225	245	245	229	233	262	270	168	189	236	244	N.A	N.A	194	201	106	112
BISH57308	C>A	Femenina*	-	-	221	225	245	245	N.A	N.A	260	268	168	189	236	240	204	206	196	201	112	112
BISH58345	A>C	N.A.	N.A	N.A		225	245	246	-	-	N.A	N.A	-	-	N.A	N.A	N.A	N.A	194	201	112	112
BISH58352	N.A	Femenina	-	-	221	225	245	245	0	N.A	260	268	168	189	-	-	204	206	196	201	112	112
BISH58385	A>C	Femenina	248	248	221	225	245	245	229	241	260	268	168	189	236	240	204	206	196	201	106	112
BISH58360	NA	Femenina	-	-	221	225	245	245	229	241	260	268	168	189	236	240	204	206	196	201	106	112
BISH58362	A=C	Femenina	-	-	221	225	245	245	229	241	260	268	168	189	236	240	204	206	196	201	112	112
BISH58363	A>C	Femenina	248	248	221	225	245	245	229	241	260	268	168	189	236	240	204	206	196	201	112	112
BISH58370	C>A	N.A.	N.A	N.A	221	225	245	245	229	241	N.A	N.A	168	189	N.A	N.A	N.A	N.A	196	201	112	112
BISH58386	A>C	Femenina*	-	-	221	225	245	245	229	241	260	260	168	189	236	240	204	206	196	201	112	112
BISH161323	A>C	Femenina	N.A	N.A	221	225	245	245	229	233	260	260	-	-	236	240	204	206	196	201	112	112
BISH161324	A*	Femenina	N.A	N.A	221	225	245	245	229	233	-	-	168	191	236	240	N.A	N.A	196	201	112	112
BISH161326	A*	Femenina	N.A	N.A	-	221	245	245	229	233	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	196	201	112	112
BISH415045	C>A	Femenina	N.A	N.A	219	221	N.A	N.A	N.A	N.A	-	-	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
BISH451077	A>C	Femenina	248	248	221	225	245	245	229	241	N.A	N.A	168	189	236	240	-	-	196	201	106	112
BISH416666	C	Femenina	259	261	201	213	240	241	229	229	250	250	159	168	223	236	198	198	192	201	135	142
BISH451764	A>C	Femenina*	N.A	N.A	221	221	245	245	N.A	N.A	260	268	168	168	236	236	N.A	N.A	196	201	112	112
BISH451766	A*	Femenina	-	-	221	225	245	245	229	241	260	268	168	189	236	240	204	206	196	201	112	112
BISH505999	C	N.A.	259	261	201	213	240	241	N.A	N.A	250	258	-	-	230	242	190	198	192	201	142	155
BISH757984	A*	Femenina*	246	248	221	225	245	245	229	233	254	260	168	191	236	240	204	206	196	201	112	112
Genotipo mayoritario en Polinesia	A	Femenino	248	248	221	225	245	245	229	233	260	268	168	189	236	240	203	205	196	201	112	112

N.A: No Amplifica;

- : Amplifica, no hay lectura en el electroferograma.

*: Determinación de sexo utilizando el ensayo rediseñado del marcador de sexo.

A/A: Alelos no observados anteriormente en muestras contemporáneas, ni herbario de *B. papyrifera*.

A/A: Genotipos no observados anteriormente en muestras contemporáneas, ni herbario de *B. papyrifera*.