Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias

DIVERSIDAD GENETICA EN POBLACIONES DE COPIHUE (*LAPAGERIA ROSEA RUIZ ET PAV.*) DETERMINADA A TRAVES DE MARCADORES MOLECULARES

TESIS DOCTORAL

KARIN ALEXA HOFFENS WENZEL

VALDIVIA – CHILE

2008

DIVERSIDAD GENETICA EN POBLACIONES DE COPIHUE (*LAPAGERIA ROSEA RUIZ ET PAV.*) A TRAVES DE MARCADORES MOLECULARES

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrarias

por

KARIN ALEXA HOFFENS WENZEL

Valdivia – Chile

2008

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

La Comisión Evaluadora de Tesis comunica al Dr. José Dörner, Director de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Agrarias que la tesis de doctorado presentada por la candidata

KARIN ALEXA HOFFENS WENZEL

Ha sido aprobada en el examen de defensa de Tesis rendido el día 6 de Marzo del 2009, como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrarias. Y, para que así conste para todos los efectos firman:

Profesor Patrocinante de Tesis:

Dr. Patricio Hinrichsen R. ……

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Ricardo Riegel Sch. ……

Dr. Carlos Ramírez G. ……

Dra. Cecilia Smith – Ramírez ……

I Indice de contenidos

Capítulo		Página
1	RESUMEN	VI
2	SUMMARY	VIII
3	INTRODUCCION	1
3.1	Antecedentes de la especie	1
3.2	Diversidad genética	3
3.3	Determinación de la diversidad genética	5
3.4	Problema a resolver	11
3.5	Hipótesis	13
3.6	Objetivos	14
4	MATERIAL Y METODO	15
4.1	Material Vegetal	15
4.2	Método	17
4.2.1	Extracción de ADN	17
4.2.2	Amplificación de ADN a nivel nuclear	18
4.2.3	Amplificación de ADN a nivel citoplasmático	20
4.2.4	Análisis de datos moleculares a nivel nuclear	22
4.2.5	Análisis de datos moleculares a nivel citoplasmático	25
5	RESULTADOS	26
5.1	Análisis molecular a nivel nuclear	26
5.1.1	Polimorfismo revelado por los partidores	26
5.1.2	Número y porcentaje de fragmentos polimórficos por población	31

Capítulo **Página**

5.1.3	**Número de alelos por locus y diversidad genética de las poblaciones**	**32**
5.1.4	**Distancia genética libre de sesgo entre poblaciones según Nei (1978) para sistemas con sólo dos alelos y sin codominancia (D)**	**34**
5.1.4.1	**Análisis de correlación entre distancia genética y distancia geográfica de las poblaciones**	**35**
5.1.5	**Análisis de relaciones genéticas de las poblaciones a través de un dendograma**	**35**
5.1.6	**Análisis de relaciones genéticas entre individuos a través de un análisis de componentes principales**	**37**
5.1.7	**Distribución de la diversidad genética en las poblaciones**	**39**
5.1.7.1	**Análisis molecular de la Varianza (AMOVA)**	**39**
5.1.7.2	**Coeficiente de diferenciación entre poblaciones Gst**	**40**
5.2	**Análisis molecular a nivel citoplasmático**	**40**
5.2.1	**Identificación de haplotipos**	**40**
5.2.2	**Distribución de la diversidad genética en las poblaciones a nivel citoplasmático**	**45**
6	**DISCUSION**	**47**
6.1	**Análisis molecular a nivel nuclear**	**47**
6.2	**Análisis molecular a nivel citoplasmático**	**54**
6.3	**Implicancias del presente estudio**	**56**
7	**CONCLUSIONES**	**58**
8	**BIBLIOGRAFIA**	**60**

II Indice de Tablas

Tabla		Página
1	Localización geográfica de las poblaciones muestreadas	16
2	Partidores ISSR probados inicialmente	19
3	Partidores universales probados inicialmente en al amplificación de microsatélites del cloroplasto	21
4	Secuencia de partidores LrtnSOrR$_2$-LrtrnSOrF	21
5	Polimorfismo de partidores ISSR seleccionados	26
6	Número y porcentaje de fragmentos polimórficos por población	32
7	Número de alelos por locus (Na), número efectivo de alelos por locus (Ne) y heterocigocidad (H) de cada población de copihue	33
8	Distancia genética entre poblaciones de copihue	34
9	Distancia geográfica (km) medida en línea recta entre poblaciones estudiadas	35
10	Análisis molecular de varianza (AMOVA) considerando 9999 permutaciones	39
11	Haplotipos de copihue determinados por partidores universales del cloroplasto	41
12	Haplotipos de copihue determinados por los partidores específicos LrtrnSOrR$_2$/LrtrnSOrF	42

III Indice de Figuras

Figura		Página
1	Marcador molecular ISSR	7
2	DNA del cloroplasto del tabaco (*Nicotiana tabacum*)	9
3	Patrón de amplificación del partidor ISSR GAC	27
4	Patrón de amplificación del partidor ISSR 27	28
5	Patrón de amplificación del partidor ISSR 29	28
6	Patrón de amplificación del partidor ISSR 32	29
7	Patrón de amplificación del partidor ISSR 825	29
8	Patrón de amplificación del partidor ISSR 834	30
9	Patrón de amplificación del partidor ISSR 826	31
10	Dendograma de las poblaciones de copihue basado en distancias genéticas sin sesgo de Nei	36
11	Análisis de componente principal para determinar relaciones genéticas entre individuos basado en distancias genéticas de Nei	38
12	Región psbKtrnS de Lapageria rosea indicando los partidores Ccmp2 que flanquean el microsatélite $(A)_8$ e indicando la mutación in/del de 18 pb	43
13	Amplificación de fragmentos mediante los partidores LrtnSOrR_2/LrtrnSOrF en las poblaciones de Purranque y Ñielol	44
14	Amplificación de fragmentos mediante los partidores LrtnSOrR_2/LrtrnSOrF en las poblaciones de Purranque y Huilo - Huilo	44
15	Distribución geográfica de haplotipos determinados con microsatélites del cloroplasto y los partidores LrtnSOrR_2/LrtrnSOrF	46

IV Indice de Anexos

Anexo		Página
1	**Matriz de evaluación de geles para análisis molecular nuclear**	**70**
2	**Na, Ne y h por locus**	**91**
3	**Diversidad genética de cultivares de *Lapageria rosea* determinada a través de marcadores moleculares del tipo ISSR**	**109**

1 RESUMEN

La diversidad genética reflejada por la existencia de múltiples alelos en una población, es el requisito necesario para que los individuos evolucionen y se adapten a nuevas condiciones, asegurando la conservación de la especie en el tiempo (Stearns y Hoekstra, 2000).

Considerando lo anterior y que la información sobre la distribución de la diversidad genética ha sido reconocida como una herramienta útil para el diseño de prácticas eficientes de conservación del patrimonio genético (Bekessy et al, 2004), el problema central a resolver con esta investigación fue determinar la diversidad genética en poblaciones de copihue, para dejar sentadas las bases que permitan a futuro crear estrategias de conservación para esta especie. A pesar de que *Lapageria rosea* no es una especie catalogada en peligro de extinción, existen antecedentes que indican la posible reducción de diversidad genética en algunas de sus poblaciones.

El objetivo general de esta investigación fue el de cuantificar la diversidad genética presente en poblaciones de *Lapageria rosea*.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron muestras de copihue pertenecientes a las poblaciones de: Parque Nacional Fray Jorge y Talinay, Centro Experimental Forestal Tanumé, Reserva Nacional Los Queules, Localidad de Armerillo, San Fabián de Alico, Cerro Andalue, Monumento Nacional Contulmo, Reserva Nacional Malleco, Monumento Nacional Ñielol, Villarrica, Curiñanco, San José de la Mariquina, Reserva Nacional Huilo-Huilo y Purranque. Los análisis de diversidad se realizaron mediante los marcadores moleculares del núcleo ISSR, microsatélites universales del cloroplasto y partidores específicos del cloroplasto de copihue.

La información generada con los partidores ISSR fue codificada en un sistema binario a partir del cual se determinó: el polimorfismo de los partidores, nº y porcentaje de fragmentos polimórficos por población, número de alelos por locus, número efectivo de alelos por locus, diversidad genética de cada población, distancia genética entre poblaciones, correlación entre distancia genética y geográfica de la poblaciones, relaciones genéticas entre individuos, relaciones genéticas entre poblaciones y distribución de la diversidad genética. Mediante la información generada por los partidores del cloroplasto se identificaron haplotipos y se determinó la distribución de la diversidad genética en las poblaciones.

Se concluyó que la utilización de ambos tipos de partidores permitió determinar la diversidad genética y su distribución en las poblaciones estudiadas de copihue.

Las poblaciones de copihue que no deberían faltar en un programa de conservación y mejoramiento son Los Queules y Andalue por presentar las mayores diversidades genéticas, Tanumé por presentar alelos únicos y Purranque por presentar un haplotipo distinto al de las otras poblaciones. Sin embargo, para establecer un completo programa de conservación y mejoramiento genético de *Lapageria rosea*, es necesario completar la presente investigación analizando un mayor número de poblaciones con un mayor número de marcadores moleculares tanto del núcleo como del cloroplasto.

2 SUMMARY

The genetic diversity in a population is necessary for the evolution and adaptation of the individuals. Thus, species can ensure their conservation in time.

Since the information of the genetic diversity distribution is a useful tool for the design of strategies for the conservation and the improvement of the genetic patrimony, the main objective of this research was the determination of the genetic diversity in *Lapageria rosea* populations. *Lapageria rosea* is not a threatened species, however there are records that indicate a reduction in genetic diversity in some of their populations.

The *Lapageria* samples that were used to carry out this study belong to; Parque Nacional Fray Jorge y Talinay, Centro Experimental Forestal Tanumé, Reserva Nacional Los Queules, Localidad de Armerillo, San Fabián de Alico, Cerro Andalue, Monumento Nacional Contulmo, Reserva Nacional Malleco, Monumento Nacional Ñielol, Villarrica, Curiñanco, San José de la Mariquina, Reserva Nacional Huilo-Huilo and Purranque. To asses genetic diversity was used nuclear molecular markers ISSR, chloroplast universal microsatellites and chloroplast *Lapageria rosea* markers.

The ISSR markers information was assembled in a binary data matrix table. The analized parameters were: markers polimorfism, number and percentage of polimorfic fragments, number of alleles per locus, number of efective alleles per locus, genetic diversity, genetic distance beetwen populations, correlation between genetic distance and geographic distance, genetic relationships beetwen individuals, genetic relationships beetwen populations and genetic diversity distribution. The chloroplast markers information allowed the determination of haplotypes and genetic diversity distribution.

The use of nuclear and chloroplast markers allowed determine the genetic diversity of copihue populations. The populations that should not miss on a program of conservation and improvement are: Los Queules and Andalue, because they have the great genetic

diversity, Tanume because it has unique alleles and Purranque because it has unique haplotype. However, to establish an appropiate program of conservation and genetic improvement, it is necessary to analyze a larger number of Lapageria populations with more nuclear and chloroplast molecular markers.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE

El copihue *(Lapageria rosea* Ruiz *et* Pav.), fue descrito por primera vez por los botánicos españoles Hipólito Ruiz y José Antonio Pavón en su obra *"Flora peruviana et chilensis"* y fue bautizado como Lapageria en honor a la emperatriz Josefina Tascher de la Pagerie, primera esposa de Napoleón Bonaparte. Fue declarada flor nacional de Chile el día 24 de Febrero de 1977 mediante el decreto supremo N° 62 del Ministerio de Interior (Seemann, 1984).

El copihue es una especie monocotiledónea endémica de Chile perteneciente a la familia Philesiaceae y al género Lapageria, siendo *Lapageria rosea* la única especie de este género (Martínez, 1985).

Se trata de un arbusto trepador de 3 a 4 m de altura, siempreverde, de tallos volubles, leñosos de aproximadamente 0,5 cm de diámetro, flexibles y muy resistentes (Martínez, 1985). Esta especie presenta un rizoma subterráneo blanquecino, corto, a partir del cual se forman estolones subterráneos de 1 a 2 cm de diámetro. Estos estolones presentan nudosidades a partir de las cuales se forman los tallos aéreos y las raíces [1].

Las hojas del copihue son simples, alternas, glabras, coriáceas, ovalado-oblongas, de base acorazonada, de borde engrosado y liso, de color verde oscuro por el haz y verde más claro por el envés, de 4 a 12 cm de largo y 2 a 4 cm de diámetro (Hoffmann, 1982). La nervadura de las hojas es reticulada, siendo ésta una excepción entre las monocotiledóneas (Muñoz, 1966).

---

[1] Ramírez, C. 2003. Doctor Instituto de Botánica, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Comunicación personal.

Las flores de esta especie son de color rojo, colgantes, de hasta 7 cm de largo, su perianto está formado por 6 tépalos (3 internos gruesos y 3 externos más delgados). Las flores se pueden encontrar en forma solitaria o agrupadas en manojos de 2 a 3 en las axilas de las hojas (Grau y Zizka, 1992). El fruto de *L. rosea* es una baya lisa, oblonga - ovalada, algo atenuada en el ápice, de 2,5 cm de largo por 2 a 2,5 cm de ancho, de color verde amarillento, polisperma y de pulpa blanquizca (Hoffmann, 1982).

Humaña (1994) señala que el copihue es una especie protándrica, por lo tanto, a pesar de ser una planta autocompatible no es capaz de autofecundarse. El copihue depende directamente de agentes polinizadores para el transporte del polen, tales como el moscardón *Bombus dahlbomii* y el picaflor común *Sephanoides sephanoides*, ya sea para efectuar geitonogamia y/o polinización cruzada. Bajo condiciones naturales de crecimiento *L. rosea* se reproduce a través de semillas [2].

Esta es una especie que se desarrolla en áreas boscosas y de clima templado. Este hábitat confiere a la planta humedad de suelo y aire constantes y temperaturas que fluctúan entre los 10ºC y 20ºC. Esta es una especie que se desarrolla tanto en la cordillera de la Costa como de los Andes. Maack (1984) indica que el copihue se encuentra distribuído desde Coquimbo hasta aproximadamente Puerto Montt, encontrándose en la zona de Valdivia y Temuco sólo en el valle central y en la cordillera de la costa, a altitudes inferiores a los 700 metros sobre el nivel del mar (Toledo, 1984 ; Gedda y Gedda, 1983).

[2] Ramírez, C. 2003. Doctor Instituto de Botánica, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Comunicación personal.

En la zona central de Chile, *L. rosea* habita en bosques esclerófilos coexistiendo con especies como *Colliguaya odorifera*, *Quillaja saponaria* y *Peumus boldus*; y en bosques caducifolios de Nothofagus. En la zona centro sur de Chile, *L. rosea* habita en bosques de olivillo (*Lapagerio-Aextoxiconetum*), en bosques de coihue-ulmo (Nothofago-Eucryphietum cordifoliae) y en bosques de roble-laurel-lingue (Nothofago-Perseetum) [3].

Es importante destacar que el copihue también prospera en matorrales secundarios originados de la tala de bosques, especialmente Macales (*Rhaphithamno – Aristotelietum*) (Riveros, 1991).

3.2 DIVERSIDAD GENETICA

Diversidad, de acuerdo al Diccionario de la Real Academia Española es equivalente a variedad, disimilitud, diferencia. En otras palabras, cuando un ente es diverso significa que está compuesto de muchas unidades diferentes. La diversidad genética propiamente tal, se presenta en tres grandes niveles; dentro de las poblaciones reproductivas, entre las poblaciones reproductivas y entre las especies (Solbrig et al, 1992).

Existen diversas propuestas para definir el concepto de diversidad genética. Robert y Christine Prescot-Allen (1986) la definen como la variabilidad genética o variedad de diferentes genes en una población reproductiva, dentro de una especie o dentro de todas las especies encontradas en un área dada. Más amplia aún es la definición propuesta por Roche y Dourojeanni (1984), que señala que diversidad genética incluye la totalidad de la variabilidad genética o variabilidad heredable, vegetal o animal de todo el mundo.

[3] Ramírez, C. 2003. Doctor Instituto de Botánica, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Comunicación personal.

La variabilidad genética propiamente tal, se refiere a la variación de genes o aparición de variantes genéticas como alelos, genes o genotipos dentro y entre poblaciones de organismos (Koski et al, 1997 y Jimenez y Collada, 2000). Esta variabilidad es producida por mutación genética espontánea o inducida, por recombinación genética y por migración de individuos desde una población hacia otra. Lo anterior indica que los individuos que carecen de sistemas de reproducción sexual, presentan una menor variabilidad genética (Griffiths et al, 2000).

Hamrick y Godt (1989), señalan que las especies vegetales que presentan una amplia distribución geográfica, tienden a tener mayor variabilidad genética que aquellas escasamente distribuídas. Esto se debe a que al ocupar los individuos diferentes nichos ecológicos se encuentran obligados a adaptarse a diferentes condiciones medioambientales, traduciéndose esta adaptación con el tiempo en diferencias genéticas entre las poblaciones. Por otro lado, estos autores señalan que en especies de amplia distribución geográfica se espera encontrar una elevada variabilidad, debido a que usualmente estas especies poseen poblaciones grandes y contínuas a lo largo de su rango de distribución y por lo tanto sufrirían menos los efectos de la deriva genética que tiende a erosionar la variación genética en las especies.

Por otra parte, según la teoría de Nicolas Vavilov, las plantas que son nativas, y que por lo tanto se encuentran habitando en su centro de origen, han tenido mucho tiempo para acumular mutaciones y por ende presentan una gran diversidad genética en sus poblaciones, ya sea dentro o entre éstas.

La diversidad genética reflejada por la existencia de múltiples alelos en una población, es el requisito necesario para que los individuos evolucionen y se adapten a nuevas condiciones. Esto se debe a que el mecanismo mediante el cual los individuos se adaptan a condiciones ambientales variables, no puede actuar si no existen variables entre las que seleccionar (Jimenez y Collada, 2000).

Lo anterior se fundamenta en el hecho de que una distinta constitución genética de los seres vivos determina una diferente capacidad de dejar descendientes, proceso denominado eficacia biológica. Esto va produciendo con el tiempo la selección de aquellos individuos con una mayor eficacia biológica y que por ende se encuentran mejor adaptados a su ambiente. Sin embargo, puesto que las condiciones ambientales son variables, los genotipos que estaban adaptados pueden dejar de estarlo y la naturaleza buscará entonces favorecer a otros nuevos (Stearns y Hoekstra, 2000).

Por lo tanto, el mantenimiento de altos niveles de diversidad genética provee a las poblaciones naturales la potencialidad de adaptarse a situaciones cambiantes del ambiente en el que habitan (Ayala, 1979). Esto se debe a que poblaciones genéticamente variables presentan una respuesta mucho más plástica frente a diferentes condiciones ambientales, mientras que aquellas en las cuales hay uniformidad genética todos los individuos responden de la misma forma o en el mismo grado. Esto trae como consecuencia que ante determinadas condiciones, todas las plantas sean igualmente susceptibles, generándose graves problemas de conservación, los que pueden en una situación extrema extinguir una población (Stearns y Hoekstra, 2000).

3.3 DETERMINACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA

El uso de marcadores moleculares permite evaluar y monitorear la variabilidad genética existente, con lo que se puede aumentar la eficacia en el manejo y administración de recursos genéticos (Campos, 1995). Los marcadores moleculares presentan distintas características, las cuales deben considerarse a la hora de definir qué marcador utilizar para un objetivo determinado. De acuerdo a lo anterior, para estudios de diversidad genética son especialmente indicados aquellos marcadores que analizan un gran número de loci, logrando así una amplia cobertura del genoma (Pérez de la Vega y García, 2000).

Los marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) son marcadores genotípicos que no requieren de conocimiento previo de secuencias de ADN del individuo en estudio, se basan en la amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de secuencias contenidas entre dos microsatélites. Para ello se usa un cebador de aprox. 16-25 pares de bases que contiene las repeticiones de di, tri o tetranucleótidos habitualmente presentes en los microsatélites (Pradeep et al, 2002). El cebador amplifica varios fragmentos de ADN al mismo tiempo, siempre que las repeticiones se encuentren a una distancia adecuada para obtener un amplicón. Normalmente el cebador lleva un anclaje de 1 a 3 nucleótidos aleatorios distintos al motivo SSR en el extremo 3' o 5' para aumentar su especificidad e incrementar el número de partidores a utilizar. Como resultado de la amplificación se obtienen fragmentos flanqueados por elementos repetitivos inversamente orientados. Estos fragmentos normalmente pueden presentar polimorfismos detectables al separar el producto de PCR en un gel de agarosa o acrilamida (Garcia Mas et al, 2000). Ver Figura 1.

El polimorfismo genético detectado por los marcadores ISSR presenta naturaleza binaria, es decir, el segmento amplificado y visualizado como banda en el gel está presente o ausente. Otra característica fundamental es su comportamiento dominante desde el punto de vista de la interpretación relativa entre genotipo y fenotipo de un individuo, ya que al observar una banda en el gel no es posible distinguir si aquel segmento se originó a partir de una o dos copias de la secuencia amplificada, ya sea que correspondan a dos loci o genes homólogos, o bien a las dos formas alélicas de las cromátidas hermanas de un diploide (Ferreira y Grattapaglia, 1996).

Por lo tanto, la detección de fragmentos ISSR no discrimina entre un individuo diploide heterocigoto y otro homocigoto dominante para el mismo locus ISSR (Ferreira y Grattapaglia, 1996).

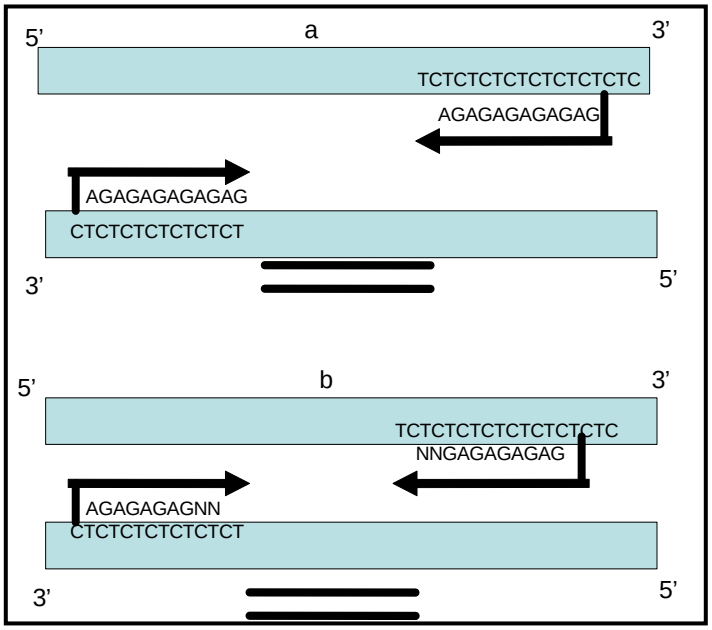

Figura 1. Marcador molecular ISSR.

a: amplificación realizada con partidor (AG)n sin anclaje.

b: amplificación realizada con partidor (AG)n con anclaje de 2 nucléotidos en extremo 3’.

Fuente: Pradeep et al, 2002.

Las principales ventajas de los ISSR son que pueden usarse partidores de cadena larga lo que permite condiciones de PCR que mejoran su reproducibilidad, se dispone de un alto número de marcadores, son altamente polimórficos, es una técnica simple y rápida, no requieren de radioactividad y no requieren información de la secuencia previa al análisis (Galván et al, 2003).

Los marcadores ISSR han sido usados exitosamente para estimar diversidad genética a niveles intra e interespecíficos en una gran cantidad de especies. Algunos ejemplos son el trabajo de Herrera et al (2002), en que caracterizaron la variación genética en cultivares de *Vitis vinifera*, el trabajo de Nan et al (2003), en que estudiaron la diversidad genética en sesenta individuos de *Primula obconica* provenientes de poblaciones naturales del centro y

sureste de China y el trabajo de Galvan et al (2003), en que estudiaron las relaciones genéticas entre diez cultivares de *Phaseolus vulgaris* desarrollados en Argentina y tres cultivares desarrollados en Francia. Por otro lado, Cheng-Jun et al (2004) determinaron la diversidad genética dentro y entre poblaciones de *Oryza granulata* provenientes de la provincia de Yunnan en China. Finalmente se puede mencionar el trabajo realizado por Mehmet (2004), en que se determinó las variaciones genéticas intra e interespecíficas en dos especies perennes y seis especies anuales de garbanzo (*Cicer arietum*).

Es importante considerar que no sólo el ADN nuclear puede ser utilizado eficientemente como marcador genotípico, sino también el ADN contenido en organelos tales como los cloroplastos (Provan et al, 2001).

En relación al ADN del cloroplasto, éste se caracteriza por ser circular y extremadamente conservado (Grivet et al, 2001). Presenta muy bajas tasas de mutación, ausencia de heteroplasmia y recombinación. El genoma del cloroplasto es haploide ya que es de herencia uniparental (maternal en angiospermas y paternal en gimnospermas), por lo tanto individuos que presentan distintos tipos de genoma del cloroplasto son denominados haplotipos (Provan et al, 2001).

Las características del genoma del cloroplasto hacen que su flujo genético sea reducido al compararlo con el flujo genético nuclear, trayendo como consecuencia que las diferencias en las secuencias del ADN persistan en el tiempo (Provan et al, 2001).

El genoma del cloroplasto se encuentra dividido en dos regiones; una región pequeña muy conservada y una región más grande de secuencias menos conservadas, siendo esta última potencialmente más útil para determinar polimorfismos (Grivet et al, 2001). Ver Figura 2.

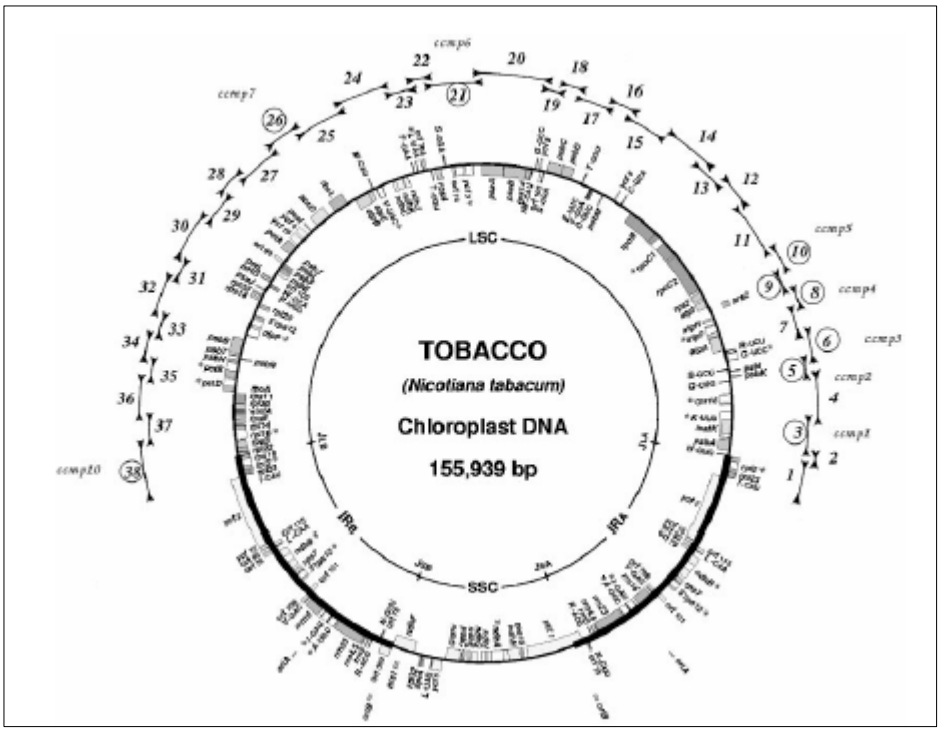

Figura 2. DNA del cloroplasto del tabaco (*Nicotiana tabacum*).

LSC= región menos conservada del genoma

SSC= región más conservada del genoma

Fuente: Grivet et al, 2001.

Respecto a los marcadores genotípicos del cloroplasto, los microsatélites del cloroplasto son ampliamente utilizados para determinar distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones (Grivet et al, 2001). Los microsatélites fueron descritos por primera vez por Hamada et al (1982) como secuencias cortas de ADN constituídas por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem. Esta clase de secuencias simples de ADN se encuentra en forma abundante y uniforme en los genomas de la mayoría de los organismos eucariontes. Entre la amplia variedad de funciones que se les atribuyen, se incluyen la regulación génica y la de actuar como señales para la conversión génica y la recombinación (Garcia Mas et al, 2000).

Generalmente, las repeticiones de dinucleótidos constituyen los microsatélites más comunes, que pueden ser perfectos (ej. $(CA)_{n)}$, imperfectos (ej. $(CA)_n$-CCA-$(CA)_m$) o compuestos (ej. $(CA)_n(TG)_m$), donde n y m son el número de repeticiones del motivo. El número de repeticiones es variable, y en general, el grado de polimorfismo aumenta con la longitud total del microsatélite que no suele superar los 0,1 Kb (Garcia Mas et al, 2000). La base molecular de estos marcadores se debe a diferencias de longitud provocadas por un número distinto de repeticiones y en menor grado a la variabilidad intrasecuencial (Campos, 1995).

Los microsatélites corresponden a secuencias hipervariables, por lo que presentan un alto grado de polimorfismo (Jiménez y Collada, 2000). Estos son marcadores codominantes en el caso de los nucleares, detectan generalmente un solo locus, de modo que los individuos diploides heterocigotos muestran patrones simples de 2 bandas cada una de ellas heredada por cada uno de sus progenitores (Garcia Mas et al, 2000). En el caso de los microsatélites del cloroplasto haploide se detecta solamente una banda, siendo especialmente interesantes en el estudio de historia de las poblaciones, flujo genético, hibridación e identificación de áreas que guardan una alta diversidad genética (Jiménez y Collada, 2000).

Diversos trabajos se han llevado a cabo en forma exitosa utilizando marcadores moleculares del cloroplasto, tal como el trabajo realizado por Demesure et al (1996), quienes determinaron la diversidad y estructura genética a nivel del cloroplasto de *Fagus sylvatica* en el continente europeo mediante marcadores del cloroplasto. Echt et al (1998), determinaron la diversidad genética en *Pinus resinosa Ait*. en Europa mediante microsatélites del cloroplasto, logrando distinguir todas las poblaciones por sus diferentes haplotipos. Interesante es mencionar también el trabajo realizado por Provan et al (1999), quienes examinaron la existencia de variación genética en *Pinus torreyana* mediante microsatélites del cloroplasto encontrando una baja variabilidad genética, confirmando que la especie desciende de una población original altamente monomórfica. Por otro lado, se realizó una investigación acerca de la estructura genética de poblaciones y distribución de

haplotipos en *Abies nebrodensis* y tres especies de Abies vecinas; *Abies alba*, *Abies numídica* y *Abies cephalonica* utilizando microsatélites del cloroplasto (Parducci et al, 2001). Mohanty et al (2002), estudiaron la diversidad genética de poblaciones de *Prunus spinosa* utilizando partidores del cloroplasto, detectando treinta y dos haplotipos y veinticinco poblaciones dispersas a lo largo de Europa.

3.4 PROBLEMA A RESOLVER

Considerando todo lo anterior y que la información sobre la distribución de la diversidad genética ha sido reconocida como una herramienta útil para el diseño de prácticas eficientes de conservación del patrimonio genético (Bekessy et al, 2004), el problema central a resolver con esta investigación fue determinar la diversidad genética en poblaciones de copihue, para dejar sentadas las bases que permitan a futuro crear estrategias de conservación para esta especie.

Lapageria rosea no es una especie catalogada en peligro de extinción, sin embargo, existen antecedentes que indican la posible reducción de diversidad genética en algunas de sus poblaciones, lo que indicaría la urgencia de generar la información necesaria para la elaboración de dichas estrategias.

El primero de estos antecedentes se refiere a la existencia de poblaciones que se encuentran muy aisladas geográficamente de otras poblaciones de copihue. Lo anterior puede provocar aislamientos genéticos, que finalmente llevan a una disminución de la diversidad genética. Un ejemplo de esto es el caso de la población de *Lapageria* que se encuentra en el bosque relicto Fray Jorge y Talinay ubicado en la 4ª región. De hecho, esta población se encuentra clasificada en la categoría de peligro de extinción (Squeo et al, 2001).

El segundo antecedente hace referencia a la fragmentación de los bosques nativos, hábitat natural del copihue, causada por la degradación de aquellos. Considerando que más de un 80% de los bosques chilenos se encuentran dañados (Burschel, 1991), la fragmentación de éstos puede estar generando graves problemas en la conservación de esta especie. La fragmentación puede resultar en aislamientos genéticos para muchas especies de la flora y fauna nativa (Murua, 1994). Estas poblaciones sometidas a fragmentación pueden sufrir una disminución de la diversidad genética debido a que la reducción en sus tamaños poblacionales y el aumento en su grado de aislamiento podrían inducir un aumento en la deriva genética, endogamia, cuellos de botella, efecto fundador o la reducción en el flujo génico entre poblaciones (Barret y Khon, 1991). Teóricamente, las nuevas sub-poblaciones formadas sufrirían la pérdida de heterocigotos con la consecuente disminución de la adecuación biológica y disminución de la probabilidad de sobrevivencia de las poblaciones a largo plazo (Ellstrand y Elam, 1993).

El tercer antecedente se refiere a la parcial fiscalización que regula o restringe la recolección y utilización de este recurso a pesar de existir el Decreto Supremo Nº 129 del año 1971, perteneciente a la Ley de Bosques, que restringe la comercialización de plantas y flores de copihue (Iriarte, 1994). Esta situación podría llevar a una indiscriminada extracción de germoplasma de copihue con la consecuente disminución del tamaño de las poblaciones y de su diversidad genética. Ejemplo de lo anterior es la usual comercialización ilegal de flores de copihue a orillas de la carretera Panamericana de la IX región.

El problema a resolver en forma anexa con esta investigación, fue la determinación de la variabilidad genética existente en copihue como información previa y básica para el establecimiento de programas de mejoramiento genético en esta especie. Lo anterior se debe a que la diversidad genética es necesaria para dirigir el proceso de mejora genética por selección de caracteres (Nuez et al, 2000). El conocimiento de la diversidad genética facilitaría la identificación de accesiones que permitan conservar la riqueza génica y

seleccionar individuos genéticamente distintos para optimizar la heterosis en cruzamientos dirigidos (Qiu et al, 1995).

Es indiscutible el hecho de que *Lapageria rosea* posee un gran potencial ornamental, siendo necesario su mejoramiento y la creación de nuevos cultivares de manera de darle un mayor valor a este material genético nativo. Lo anterior permitiría hacerla más atractiva a los diferentes mercados, transformándola en un producto de exportación y abriendo la posibilidad de registrar y proteger los cultivares obtenidos producto de tal mejoramiento.

Es importante destacar que en Chile se han realizado iniciativas destinadas a establecer programas de mejoramiento genético de copihue y nuevas tecnologías para su producción. Es así como el vivero perteneciente al Instituto Agrícola el Vergel de Angol ha obtenido, tras largos años de trabajo, aproximadamente 20 cultivares de copihue. Por otro lado, la empresa Vitrogen de Temuco ha implementado un sistema de cultivo *in vitro* logrando multiplicar y enraizar plántulas provenientes de 13 cultivares de copihue originados en el vivero anteriormente mencionado. Sin embargo, aún no se han realizado estudios moleculares en esta especie, por lo que no se sabe cuánto de su potencial genético se está efectivamente utilizando.

3.5 HIPOTESIS

Dado que *Lapageria rosea* es una especie nativa, de polinización cruzada y que posee una amplia distribución geográfica, presenta una alta diversidad genética, aunque no igual para todas sus poblaciones.

3.6 OBJETIVOS

El objetivo general de esta investigación fue cuantificar la diversidad genética presente en poblaciones de *Lapageria rosea*.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1.- Establecer un protocolo eficiente para la extracción de ADN de copihue, que permita aplicar marcadores moleculares nucleares del tipo ISSR y marcadores moleculares del cloroplasto.

2.- Determinar la diversidad genética en poblaciones de copihue mediante marcadores moleculares nucleares.

3.- Identificar posibles correlaciones entre la distancia genética determinada con marcadores ISSR y su dispersión geográfica.

4.- Establecer relaciones de similitud genética a nivel nuclear entre poblaciones de copihue.

5.- Determinar la distribución de la diversidad genética a nivel nuclear.

6.- Diferenciar poblaciones de copihue a nivel citoplasmático a través de microsatélites universales del cloroplasto y partidores específicos de copihue.

4 MATERIAL Y METODO

4.1 MATERIAL VEGETAL

Para los estudios de diversidad genética nuclear y citoplasmática se trabajó con material vegetal proveniente de poblaciones de *Lapageria rosea* distribuidas a lo largo de Chile. La localización geográfica de las poblaciones muestreadas y el tipo de análisis realizado en éstas se señala en la tabla 1.

Para el estudio a nivel nuclear se trabajó con 25 individuos de cada población. Este número de individuos es adecuado para detectar los alelos de importancia adaptativa y con frecuencias superiores al 10% (Pérez de la Vega y García, 2000). En el parque Nacional Fray Jorge sólo se encontraron dos plantas de copihue, por lo tanto sólo se analizaron dos individuos en esta localidad. Para el estudio a nivel citoplasmático se trabajó sólo con 6 y 10 individuos por población (microsatélites y partidores específicos respectivamente). Como se trata de ADN de herencia uniparental no presenta recombinación, y por lo tanto, es poco polimórfico dentro de las poblaciones. Se consideró una distancia de 10 m entre individuos a muestrear, de manera de asegurarse de que cada planta fuera un individuo distinto. El material a muestrear fue de 2 a 3 hojas nuevas por planta, las cuales fueron almacenadas a - 80°C de manera de poder conservarlas hasta el momento de los análisis.

Tabla 1. Localización geográfica de las poblaciones muestreadas.

Población	Región	Provincia	Lat. (S)	Long. (W)	Alt. (m)	Análisis
Parque Nacional Fray Jorge	4ª	Limarí	30°41’	71°39’	667 msnm	Nuclear y citoplasmático
Centro Experimental Forestal Tanume	6ª	Cardenal Caro	34°12’	71°56’	368 msnm	Nuclear y citoplasmático
Reserva Nacional Los Queules	7ª	Cauquenes	35°59’	72°41’	180 msnm	Nuclear y citoplasmático
Localidad de Armerillo	7ª	Talca	35º25’	71º40’	102 msnm	Citoplasmático
San Fabián de Alico	8ª	Ñuble	36º36’	72º26’	124 msmn	Citoplasmático
Cerro Andalué	8ª	Concepción	36°47’	73°7’	15 msnm	Nuclear y citoplasmático
Monumento Natural Contulmo	8ª	Arauco	38º00’	73º13’	147 msnm	Citoplasmático
Reserva Nacional Malleco	9ª	Malleco	38’27’	71º50’	850 msnm	Citoplasmático
Monumento Natural Ñielol	9ª	Temuco	38°46’	72°38’	115-322 msnm	Nuclear y citoplasmático
Predio ubicado en Villarica	9ª	Villarica	39°24’	71°56’	227 msnm	Citoplasmático
Curiñanco orilla de camino	14ª	Valdivia	39°45’	73°23’	14 msnm	Citoplasmático
Predio ubicado en San José de la Mariquina	14ª	Valdivia	39°32’	72°58’	29 msnm	Citoplasmático
Reserva Natural Huilo-Huilo	14ª	Valdivia	40º00’	71º40’	650 msnm	Citoplasmático
Predio ubicado en Purranque	10ª	Osorno	40°56’	73°09’	122 msnm	Nuclear y citoplasmático

4.2 MÉTODO

4.2.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir de hojas nuevas de copihue. El método a usar para la extracción total de ADN fue aquel originalmente descrito por Murray y Thompson (1980) y modificado por Doyle y Doyle (1990).

La extracción consistió de los siguientes pasos: a un trozo de hoja se le agregó 100 ul de tampón de extracción. Luego éste fue sumergido en Nitrógeno líquido y luego el tejido fue disgregado mediante un pistón estéril. Se le agregó al tejido disgregado 400 ul de tampón de extracción y se mezcló por inversión. Luego se incubó la mezcla a Baño María a 65°C por 30 minutos mezclando por inversión ocasionalmente. Se agregó 500 ul de cloroformo:fenol:alcohol isoamílico (24:25:1) en cámara de seguridad. Se agitó la mezcla en un vórtex. Se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm. Se traspasaron los 400 ul de sobrenadante a un nuevo tubo de microfuga. Se agregaron 400 ul de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se agitó la mezcla en un vórtex. Se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm. Se traspasaron 300 ul de sobrenadante a un nuevo tubo de microfuga. Se agregaron 200 ul de isopropanol frio (-18°C). Se centrifugó 10 minutos a 14.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 100 ul de etanol al 70%. Se centrifugó 1 minuto a 5.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 30 minutos a t° ambiente. Se resuspendió el ADN en 80 ul de agua destilada. El tampón de extracción consistió en una solución compuesta por ß-mercaptoetanol 0,4%, $NaOHSO_3$ 0,38%, NaOH 8M y CTAB 2%.

Luego se realizó la purificación del ADN extraído mediante un Kit de purificación marca Fermentas. Como resultado de la purificación se obtuvo 40 ul de solución de ADN para cada muestra. Finalmente el ADN purificado fue diluido en una razón 1/100, de manera de disminuir los fenoles y polisacáridos que inhiben las reacciones de amplificación.

La calidad del ADN extraído fue chequeada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %. La cantidad de ADN extraído fue determinada mediante absorción a 260 nm usando un espectrofotómetro Spectromic Genesys^{TM} 8 .

4.2.2 Amplificación de ADN a nivel nuclear.

Se realizó mediante marcadores moleculares del tipo "*Inter Simple Sequense Repeats*" (ISSR). En la tabla 2 se detallan los partidores ISSR probados inicialmente.

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó mediante reacciones PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en un termociclador PTC-1196 de MJ Research. La solución PCR consistió en; 2,5 ul de tampón 10X $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 ul de $MgCl_2$ 50mM, 1,5 ul dNTP´s 100 mM c/u, 1,0 ul partidor ISSR 100 pmol/ul, 2,0 ul de ADN y 0,6 ul Taq polimerasa en un volumen final de 25 ul. El programa del termociclador para realizar las reacciones PCR fue el siguiente: 94°C x 3 minutos - 94°C x 3 segundos - T° media específica del partidor x 1 minuto - 72°C x 1 minuto - repetir de paso 2 a 4, 39 veces - 72°C por 5 minutos - 4°C por 18 horas.

Los fragmentos amplificados fueron separados en una cámara de electroforesis a 50 Volt por 2,0 horas. Para lograr una buena resolución se utilizaron geles de agarosa al 1,5%. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador Vilber Lourmat EXT-20M tras teñir los geles con una solución de bromuro de etidio al 0,05% durante 30 minutos.

Tabla 2. Partidores ISSR probados inicialmente.

Partidores ISSR	Secuencia	T° annealing	Referencia
UBC 826	$(AC)_8C$	52,8° C	Ajibade et al, 2000; Mehmet, 2004; Herrera et al, 2002.
UBC 848	$(CA)_8AGC$	56,7° C	Ajibade et al, 2000; Herrera et al, 2002; Nan et al, 2003.
UBC 834	$(AG)_8CTT$	53,7° C	Ajibade et al, 2000; Mehmet, 2004; Nan et al, 2003.
ISSR 845	$(CT)_8AGG$	56,7° C	Nan et al, 2003.
ISSR 27	$VHV(GTG)_5$ V= A,C,G H= A,C ,T	59,7° C	Menzies et al, 2003.
ISSR 29	$BDB(CCA)_5$ B= C,G ,T D= A,G,T	59,7° C	Menzies et al, 2003.
ISSR GAC	$(GA)_9C$	56,7° C	Liu, y Wendel, , 2001.
ISSR 825	$(AC)_8T$	50,4° C	Ajibade et al, 2000; Mehmet, 2004; Herrera et al, 2002.
UBC 821	$(GT)_8T$	50,4° C	Mehmet, 2004.
ISSR 818	$(CA)_8G$	52,8° C	Herrera et al, 2002.
ISSR 858	$(TG)_8AG$	54,5°C	Nan et al, 2003.
ISSR 31	$HBH(AGC)_5$ H= A,C ,T B= C,G ,T	59,0°C	Menzies et al, 2003.
ISSR 852	$(TC)_8AGA$	54,5°C	Nan et al, 2003.
ISSR 32	$DBD(AAC)_5$ D= A,G,T B= C,G,T	47,6°C	Menzies et al, 2003.

4.2.3 Amplificación de ADN a nivel citoplasmático.

La amplificación de ADN a nivel citoplasmático se realizó inicialmente a través de partidores universales utilizados para la amplificación de regiones microsatélites del cloroplasto y posteriormente mediante partidores específicos del cloroplasto de copihue.

Para la amplificación de regiones microsatélites se probaron siete pares de partidores universales del cloroplasto desarrollados por Weising y Gardner (1999) a partir de secuencias del tabaco. En la tabla 3 se detallan los partidores probados inicialmente.

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó mediante reacciones PCR utilizando los siguientes compuestos por reacción: 1,5 ul tampón 10X $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1mM dNTP´s (c/u), 0,2 mM partidor (c/u), 0,10 ng ADN y 0,4 U Taq polimerasa.

Estas reacciones de PCR consistieron de los siguientes ciclos de temperatura; 94ºC x 4 min. – 30 ciclos de 94ºC x 1 min., 50ºC x 1 min., 72ºC x 1 min. – 72ºC x 8 min.

Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un secuenciador Alf Express, utilizando geles de acrilamida al 6%.

Las poblaciones analizadas con estos marcadores corresponden a Fray Jorge, Tanume, Los Queules, Andalue, Ñielol, Villarrica, San José de la Mariquina, Curiñanco y Purranque.

Tabla 3. Partidores universales probados inicialmente en la amplificación de microsatélites del cloroplasto.

Nombre partidor	Secuencia partidor
ccmp2f	GATCCCGGACGTAATCCTG
ccmp2r	ATCGTACCGAGGGTTCGAAT
ccmp3f	CAGACCAAAAGCTGACATAG
ccmp3r	GTTTCATTCGGCTCCTTTAT
ccmp4-F	AATGCTGAATCGAYGACCTA
ccmp4-R	CCAAAATATTBGGAGGACTCT
ccmp5-F	TGTTCCAATATCTTCTTGTCATTT
ccmp5-F	AGGTTCCATCGGAACAATTAT
ccmp6-f	CGATGCATATGTAGAAAGCC
ccmp6-r	CATTACGTGCGACTATCTCC
ccmp7-f	CAACATATACCACTGTCAAG
ccmp7-r	ACATCATTATTGTATACTCTTTC
ccmp10-f	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA
ccmp10-r	TTCGTCGDCGTAGTAAATAG

La amplificación mediante partidores específicos del cloroplasto de copihue se realizó mediante los partidores desarrollados por Quitral (2008), los cuales permitieron amplificar una mutación tipo in/del de 18 pb en la región psbKrnS del gen psbk del cloroplasto de *Lapageria*. En la tabla 4 se señalan los partidores específicos del cloroplasto y su secuencia.

Tabla 4. Secuencia de partidores LrtrnSOrR_2 - LrtrnSOrF

Partidor	Secuencia
LrtrnSOrR_2	5’-CTA ATG ATC CAG GAC GCA ATC-3’
LrtrnSOrF	5’-GGG TTC GAA TCC CTC TCT CT-3’

A modo de complementar las poblaciones de copihue analizadas con los marcadores universales del cloroplasto, se trabajó en este caso con las poblaciones de copihue de Armerillo, San Fabián de Alico, Contulmo, Malleco, Ñielol, Huilo-Huilo y Purranque.

La amplificación de los fragmentos de ADN mediante los partidores LrtrnSOrR$_{2/}$ LrtrnSOrF se realizó mediante reacciones PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en un termociclador PTC-1196 de MJ Research. La solución PCR consistió en; 2,5 ul de tampón 10X $(NH_4)_2SO_4$, 2,0 ul de $MgCl_2$ 25mM, 1,5 ul dNTP´s 100 mM c/u, 1,0 ul partidor LrtrnSOR$_2$ 100 pmol/ul, 1,0 ul partidor LrtrnSOrF 100 pmol/ul, 2,0 ul de ADN y 0,3 ul Taq polimerasa en un volumen final de 25 ul. El programa del termociclador para realizar las reacciones PCR fue el siguiente: 94°C x 4 minutos - 94°C x 45 segundos – 64,5ºC por 45 segundos - 72°C x 45 segundos - repetir de paso 2 a 4, 35 veces - 72°C por 5 minutos - 4°C por 18 horas.

Los fragmentos amplificados fueron separados en una cámara de electroforesis a 50 Volt por 1,0 hora llevando incorporada una solución de bromuro de etidio al 0,05% . Para lograr una buena resolución se utilizaron geles de agarosa al 1,5%. Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador Vilber Lourmat EXT-20M.

4.2.4 Análisis de datos moleculares a nivel nuclear.

Los fragmentos de ADN polimórficos obtenidos del núcleo se evaluaron con 1 y 0 dependiendo de su presencia o ausencia en la accesión respectiva. Con ello se obtuvo una matriz de datos que constituyó el registro genético de cada accesión y la base de los descriptores de diversidad genética analizados. Ver Anexo 1.

Los parámetros analizados fueron los siguientes:

Polimorfismo revelado por los partidores: Se determinó con el porcentaje de fragmentos polimórficos respecto al total de fragmentos evaluados por cada partidor.

Nº de fragmentos polimórficos por población: Se determinó por conteo simple.

Porcentaje de fragmentos polimórficos por población: Fue calculado por la división del número de fragmentos polimórficos por el número total de fragmentos analizados.

Número de alelos por locus (Na) por población: Se determinó por la suma de alelos para todos los loci polimórficos y dividido por el número total de loci. Se utilizó el software POPGENE versión 1,32 (Yeh y Boyle, 1997).

Número efectivo de alelos por locus (Ne) por población: Fue calculado para cada locus según la fórmula: $Ne= 1\sum pi^2$, donde pi es la frecuencia media del alelo i. Se utilizó el software POPGENE versión 1,32 (Yeh y Boyle, 1997).

Diversidad genética de cada población (H): Fue calculada como el promedio aritmético de los valores de la diversidad genética para cada locus (h). Se calculó según la fórmula: $H=1-\sum pi^2$. Se utilizó el software POPGENE versión 1,32 (Yeh y Boyle, 1997).

Distancia genética libre de sesgo entre las poblaciones según Nei (1978) para sistemas con sólo dos alelos y sin codominancia (D): La distancia genética de Nei se calculó según la fórmula: $D=-1n \{ 2N_{(1,1)}/(N_{(1,-)}+N_{(-,1)}) \} <D<\infty$, donde $N_{(1,-)}$ es el número de fragmentos que presentan una banda en la primera accesión y $N_{(-,1)}$ es el número de fragmentos que presentan una banda en la segunda accesión y n es el número total de fragmentos. Se utilizó el software POPGENE versión 1.32 (Yeh y Boyle, 1997).

Correlación entre distancia genética y distancia geográfica de las poblaciones: Para determinar esta correlación se realizó un Test de Mantel utilizando el software TPFGA versión 1.3 (Miller, 1997).

Análisis de relaciones genéticas entre las poblaciones: Se realizó a través de la elaboración de un dendograma, para lo cual se utilizó el algoritmo UPGMA (Método no balanceado de pares con media aritmética) basándose en las distancias genéticas sin sesgo de Nei calculadas anteriormente y utilizando el software TPFGA versión 1.3 (Miller, 1997).

Análisis de relaciones genéticas entre individuos: Se realizó a través de un análisis de componentes principales utilizando el software GenAlex 6 (Peakall y Smouse, 2006).

Distribución de la diversidad genética en las poblaciones: Se determinó mediante el análisis de la Varianza molecular (AMOVA) utilizando el software GenAlex 6 (Peakall y Smouse, 2006) y mediante el cálculo del coeficiente de diferenciación relativo a la diversidad total Gst (Nei, 1978). Este coeficiente fue calculado como Dst/Ht, donde Dst es la heterocigocidad entre las poblaciones y es igual a Ht (diversidad genética total) - $\sum H/n$, donde H corresponde a la diversidad de cada población y n es el número de poblaciones. El valor de Ht fue calculado como $\sum h/n$, donde h es la diversidad genética para cada locus y n es el número de locus evaluado. El valor de H fue calculado como $1-\sum pi^2$, donde pi es la frecuencia media del alelo i. Los valores de Ht y H fueron determinados mediante el software POPGENE versión 1,32 (Yeh y Boyle, 1997).

4.2.5 Análisis de datos moleculares a nivel citoplasmático. Para diferenciar las poblaciones a nivel citoplasmático se realizaron dos análisis:

Identificación de haplotipos: Los haplotipos fueron establecidos de acuerdo a los fragmentos amplificados con los partidores universales del cloroplasto y con los partidores específicos del cloroplasto de copihue. La distribución geográfica de los haplotipos y su frecuencia, se establecieron mediante observación y cálculo simple.

Distribución de la diversidad genética en las poblaciones: Se determinó mediante el coeficiente de diferenciación relativo a la diversidad total Gst (Nei, 1978). Los valores de Ht y H utilizados en el cálculo de este coeficiente fueron determinados con el software POPGENE versión 1,32 (Yeh y Boyle, 1997).

5 RESULTADOS

5.1 ANALISIS MOLECULAR A NIVEL NUCLEAR

5.1.1 Polimorfismo revelado por los partidores.

Para determinar eficientemente la diversidad genética a través de marcadores ISSR, se debió evaluar la amplificación lograda por un número importante de partidores, a objeto de seleccionar aquellos que presenten un mayor grado de polimorfismo, nitidez y reproducibilidad.

La evaluación de partidores permitió seleccionar 7 partidores, los cuales representaron un 50% del total de partidores evaluados. Los partidores constituídos por una secuencia simple repetida de dinucleótidos presentaron anclaje en el extremo 3' y aquellos partidores constituídos por secuencias compuestas de trinucléotidos presentaron anclaje en el extremo 5'. En la tabla 5 se presentan los partidores seleccionados y su polimorfismo.

Tabla 5. Polimorfismo de partidores ISSR seleccionados.

Partidor	Total fragmentos amplificados	N° fragmentos polimórficos	% fragmentos polimórficos	Rango de banda amplificada (pb)
ISSR 29	12	12	100	400-2000
ISSR 27	7	7	100	750-2400
ISSR 32	12	12	100	400-2000
ISSR GAC	11	11	100	400-2000
ISSR 825	12	12	100	250-2000
ISSR 834	12	12	100	250-2000
ISSR 826	12	12	100	300-1500

Los partidores seleccionados generaron un total de 78 bandas, siendo su totalidad polimórficas considerando todas las poblaciones analizadas. El análisis con estos partidores reveló la presencia de fragmentos amplificados de ADN en el rango de 250-2400 pb. En las figuras 3 a 9 se observan los patrones de amplificación de los distintos partidores.

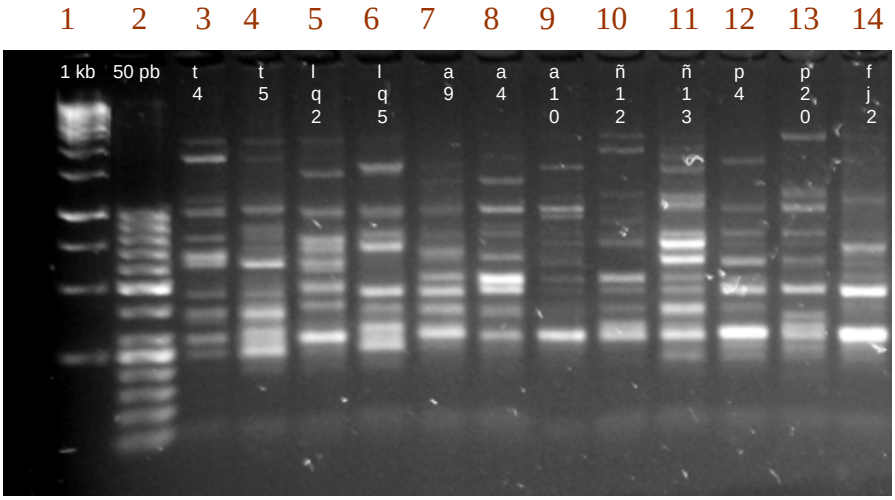

Figura 3. Patrón amplificación del partidor ISSR GAC.

carril 1 y 2: marcador de peso de 1 kb y 50 pb, carril 3 y 4: individuos población Tanumé
carril 5 y 6: individuos población los Queules, carril 7-9: individuos población Andalue
carril 10 y 11:individuos población Ñielol, carril 12 y 13: individuos población Purranque
carril 14: individuo población Fray Jorge

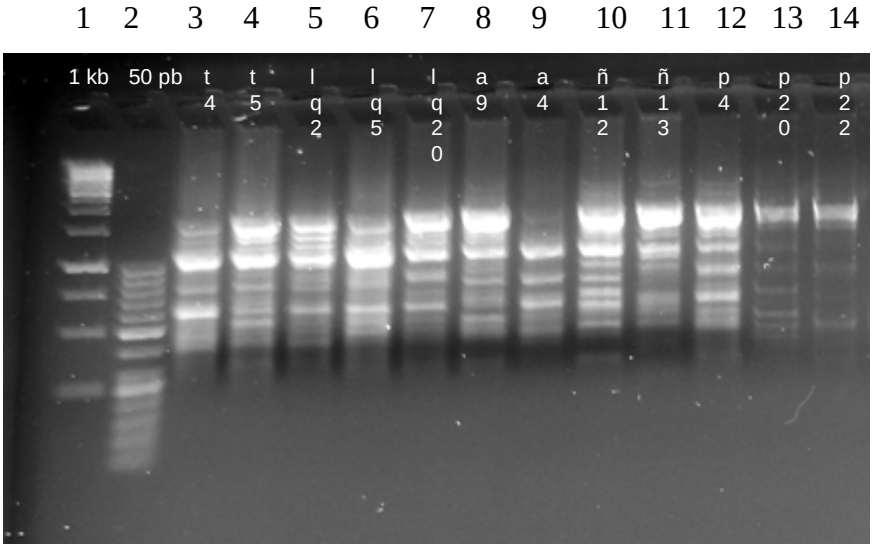

Figura 4. Patrón amplificación del partidor ISSR 27.

carril 1 y 2: marcador de peso de 1 kb y 50 pb, carril 3 y 4: individuos población Tanume
carril 5-7: individuos población Los Queules, carril 8 y 9: individuos población Andalue
carril 10 y 11: individuos población Ñielol, carril 12-14: individuos población Purranque

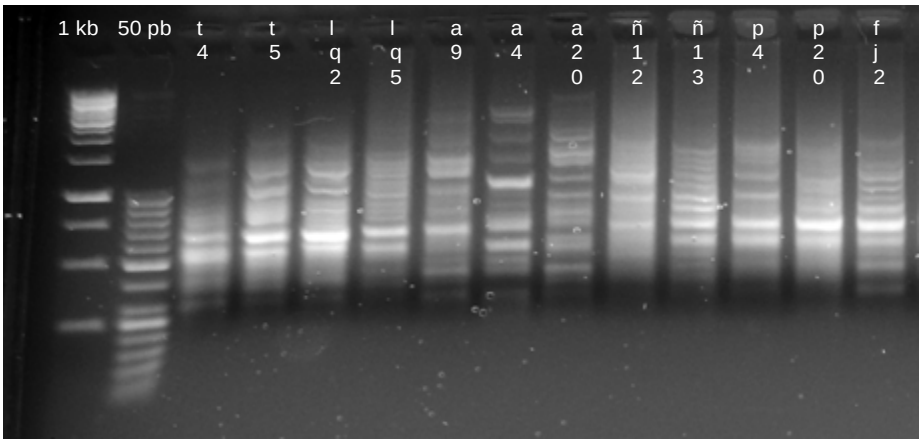

Figura 5. Patrón amplificación del partidor ISSR 29.

carril 1 y 2: marcador de peso de 1 kb y 50 pb, carril 3 y 4: individuos población Tanume
carril 5 y 6: individuos población Los Queules, carril 7-9: individuos población Andalue
carril 10 y 11:individuos población Ñielol, carril 12 y 13: individuos población Purranque
carril 14: individuo población Fray Jorge

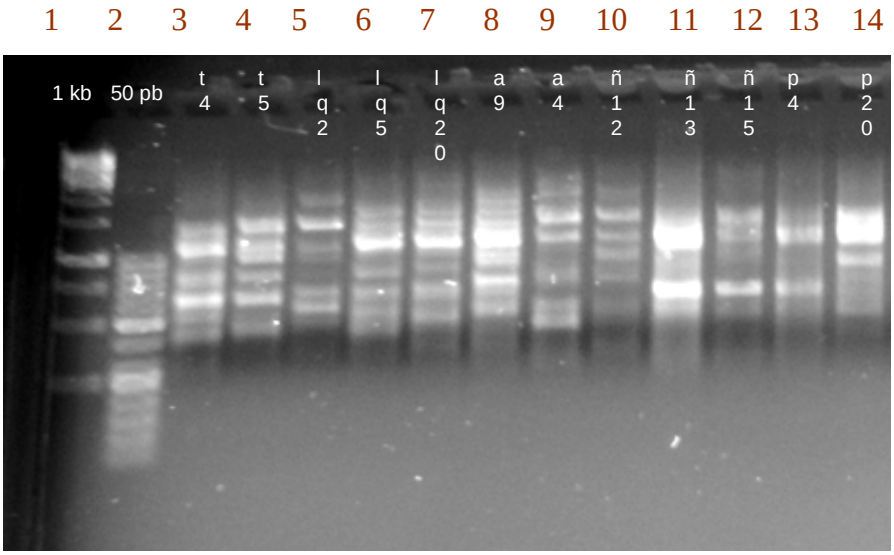

Figura 6. Patrón amplificación del partidor ISSR 32.

carril 1 y 2: marcador de peso de 1 kb y 50 pb, carril 3 y 4: individuos población Tanume
carril 5-7: individuos población Los Queules, carril 8 y 9: individuos población Andalue
carril 10-12:individuos población Ñielol, carril 13 y 14: individuos población Purranque

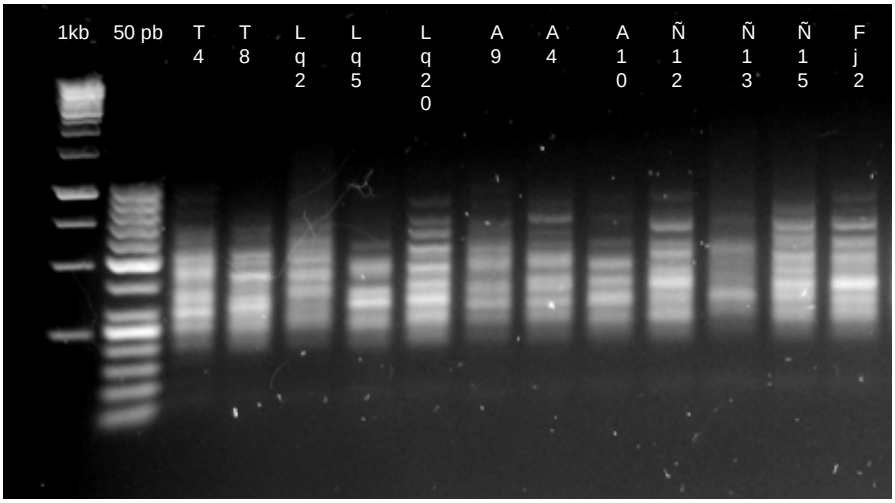

Figura 7. Patrón amplificación del partidor ISSR 825.

carril 1 y 2: marcador de peso de 1 kb y 50 pb, carril 3 y 4: individuos población Tanume
carril 5-7: individuos población Los Queules, carril 8-10: individuos población Andalue
carril 11-13: individuos población Ñielol, carril 14: individuo población Fray Jorge

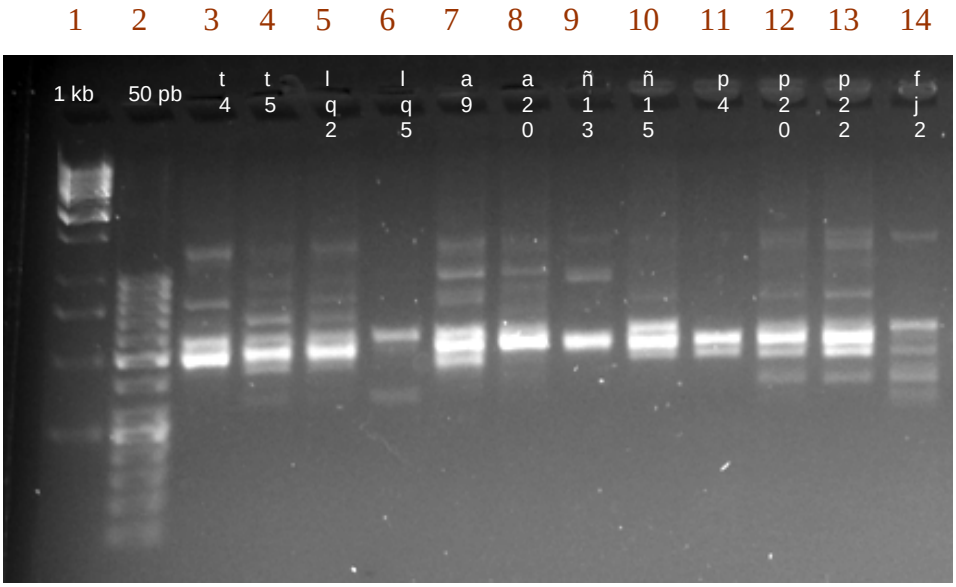

Figura 8. Patrón amplificación del partidor ISSR 834.

carril 1: marcador de peso de 1 kb, carril 2-5: individuos población de Tanume

carril 6-9: individuos población de Purranque, carril 10-13: individuos población Andalue

carril 14-17:individuos población de los Queules, carril 18-19: individuo población Fray Jorge

carril 20-21: individuos población de Ñielol

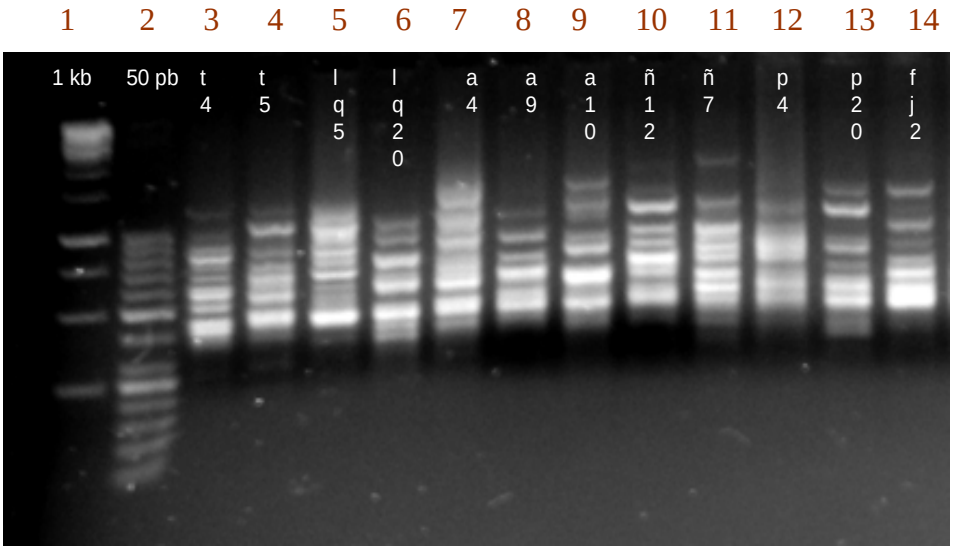

Figura 9. Patrón amplificación del partidor ISSR 826.

carril 1y 2: marcador de peso de 1 kb y 50 pb, carril 3 y 4: individuos población Tanume
carril 5 y 6: individuos población Los Queules, carril 7-9: individuos población Andalue
carril 10 y 11: individuos población Ñielol, carril 12 y 13: individuos población Purranque
carril 14: individuo población Fray Jorge

5.1.2 Número y porcentaje de fragmentos polimórficos por población.

El número promedio de fragmentos polimórficos por población fue de 36, mientras que el porcentaje promedio de fragmentos polimórficos para las 6 poblaciones fue de 45 %. La tabla 6 presenta el número y porcentaje de fragmentos polimórficos por población.

El rango del valor de fragmentos polimórficos dentro de las poblaciones fluctuó de 7% a 66% (Fray Jorge y Los Queules respectivamente). El bajo número de fragmentos polimórficos observados en Fray Jorge se debió a que fueron sólo dos los individuos analizados.

Tabla 6. Número y Porcentaje de fragmentos polimórficos por población.

Población	N° individuos muestreados	Nº de fragmentos polimórficos	% de fragmentos polimórficos
Fray Jorge	2	6	7
Tanume	25	36	46
Los Queules	25	52	66
Andalue	25	47	60
Ñielol	25	36	46
Purranque	25	37	47

5.1.3 Número de alelos por locus y diversidad genética de las poblaciones.

Otros descriptores empleados en el estudio de poblaciones son el número de alelos por locus (Na) y el número efectivo de alelos por locus (Ne), los cuales adquieren igual valor cuando todos los alelos presentan la misma frecuencia. Por tratarse en este caso del análisis de un marcador dominante, los valores de Na y Ne se encuentran entre el 1 y 2. El inconveniente de utilizar estos descriptores como medida de variabilidad genética es su dependencia con el tamaño de la muestra, lo cual dificulta la comparación entre estudios con diferente tamaño de muestra (Nei, 1987). Es por ello que se utiliza también el parámetro de heterocigocidad o diversidad genética de manera de obtener valores de variabilidad genética independientes al tamaño de la muestra utilizada. En la tabla 7 se observa el número de alelos por locus, el número efectivo de alelos por locus y la diversidad de cada una de las poblaciones.

Tabla 7. Número de alelos por locus (Na), número efectivo de alelos por locus (Ne) y heterocigocidad (H) de cada población de copihue.

Población	Na	Ne	H
Fray Jorge	1,07	1,05	0,031
Tanume	1,47	1,29	0,170
Los Queules	1,60	1,34	0,203
Andalue	1,66	1,31	0,185
Ñielol	1,46	1,31	0,177
Purranque	1,48	1,21	0,130
Promedio	**1,45**	**1,25**	**0,14**

El promedio del número de alelos por locus (Na) para todas las poblaciones analizadas fue de 1,45 y su rango fue de 1,07 a 1,66 (los individuos de Fray Jorge y Andalue respectivamente).

Por otro lado, el promedio del número efectivo de alelos por locus (Ne) para todas las poblaciones fue de 1,25 con un rango entre 1,05 y 1,34 (los individuos de Fray Jorge y Los Queules respectivamente).

El promedio del valor de diversidad genética para todas las poblaciones fue de 0,14 siendo los dos individuos de Fray Jorge los que presentaron la menor diversidad genética (0,031) y la población de Los Queules la mayor (0,2).

5.1.4 Distancia genética libre de sesgo entre poblaciones según Nei (1978) para sistemas con sólo dos alelos y sin codominancia (D).

Se observa en la tabla 8 que el rango de distancia genética entre poblaciones se encontró entre 0,15 y 0,48, siendo las poblaciones más cercanas genéticamente Andalue y los Queules y las más lejanas Fray Jorge y Purranque.

Tabla 8. Distancia genética entre poblaciones de copihue.

Población	Fray Jorge	Tanume	Los Queules	Andalue	Ñielol	Purranque
Fray Jorge	0					
Tanume	0,4147	0				
Los Queules	0,3649	0,1892	0			
Andalue	0,3016	0,2368	0,1527	0		
Ñielol	0,3961	0,2313	0,1734	0,2282	0	
Purranque	0,4833	0,2318	0,2256	0,2205	0,1816	0

Al analizar la distancia genética población por población se puede observar que la mayor distancia genética para todas las poblaciones se encontró con los dos individuos de Fray Jorge. La población de copihues de Tanume presentó la menor distancia genética con la población de copihues de los Queules.

Para la población de los Queules, la menor distancia genética se observó con Andalue, la que a su vez presentó la menor distancia genética con los individuos de los Queules.

Por otro lado, la población de copihues de Ñielol presentó la menor distancia genética con la población de Los Queules. En la población de Purranque la menor distancia genética se encontró con la población de Ñielol.

Finalmente, para los copihues de Fray Jorge, la menor distancia genética se encontró con la población de Andalue.

5.1.4.1 Análisis de correlación entre distancia genética y distancia geográfica de las poblaciones. Este análisis se realizó mediante un Test de Mantel considerando 9999 permutaciones. Ver tabla 9.

Tabla 9. Distancia geográfica medida en línea recta (Km) entre poblaciones.

Población	Fray Jorge	Tanume	Los Queules	Andalue	Ñielol	Purranque
Fray Jorge	0					
Tanume	391	0				
Los Queules	596	209	0			
Andalue	690	306	97	0		
Ñielol	902	511	309	224	0	
Purranque	1146	755	551	461	245	0

El análisis arrojó una correlación positiva de R^2 = 0,66 entre las distancias genéticas y geográficas de las poblaciones con un nivel de significancia estadística de $p< 0.005$. Por lo tanto, en general a medida que las poblaciones se encuentran más cercanas geográficamente, la distancia genética entre ellas es menor.

5.1.5 Análisis de relaciones genéticas de las poblaciones a través de un dendograma.

Este análisis se realizó mediante la elaboración de un dendograma utilizando el algoritmo UPGMA basándose en las distancias genéticas sin sesgo de Nei y considerando un valor de bootstrap o remuestreo de 1000 permutaciones. En la figura 10 se puede observar el dendograma de las poblaciones copihue.

Phylip_1

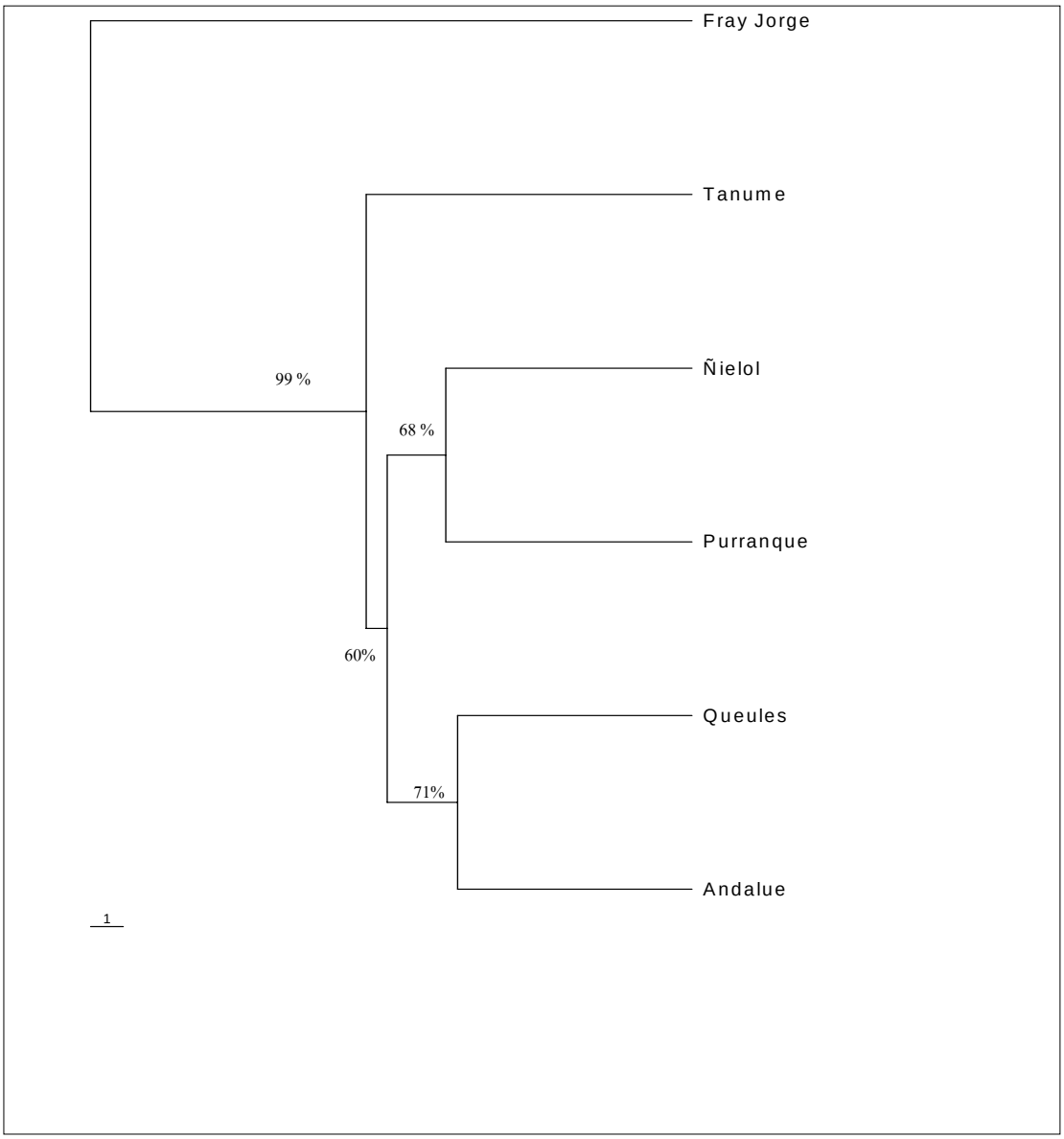

Figura 10. **Dendograma de las poblaciones de copihue basado en distancias genéticas sin sesgo de Nei.**

Se observa la formación de 4 grupos; un primer grupo con un valor de bootstrap de 71% que se encuentra formado por las poblaciones Andalue y los Queules, un segundo grupo formado por las poblaciones Ñielol y Purranque con valor de bootstrap de 68% y un tercer

grupo conformado por la población de Tanume con un valor de bootstrap de 60%. Finalmente se observa un grupo conformado por los dos individuos de Fray Jorge con un valor de bootstrap de 99%.

5.1.6 Análisis de relaciones genéticas entre individuos a través de un análisis de componentes principales.

En la Figura 11 se puede observar el análisis de componentes principales entre individuos. Los dos individuos de Fray Jorge se encuentran muy cercanos genéticamente a los individuos de la población de Andalue. Por otro lado, se puede observar que la población más cercana genéticamente a Andalue es la población de los Queules. Esta última población se encuentra también genéticamente cercana a la población de Ñielol y además presenta claramente en la gráfica la mayor dispersión de puntos lo que concuerda con la mayor diversidad genética dentro de esta población.

Por otro lado, la población de copihues de Tanume fue la más aislada genéticamente respecto de las otras poblaciones, siendo la más cercana a ésta la población de los Queules. Se puede observar también, que la población de Purranque se encontró más cercana genéticamente a la población de Ñielol, y esta última se encontró a su vez cercana a la población de los Queules.

En forma anexa, se consideró también a las distancias genéticas de un grupo de 16 cultivares de copihue provenientes del Vivero el Vergel de Angol determinadas en el trabajo desarrollado por Hoffens y Riegel (Ver Anexo 3). Se puede observar que los puntos en la gráfica que representan al grupo de cultivares se superponen parcialmente con los puntos de la población de Andalue, lo que significaría que estos individuos se encuentran muy cercanos genéticamente a los individuos de la población de Andalue.

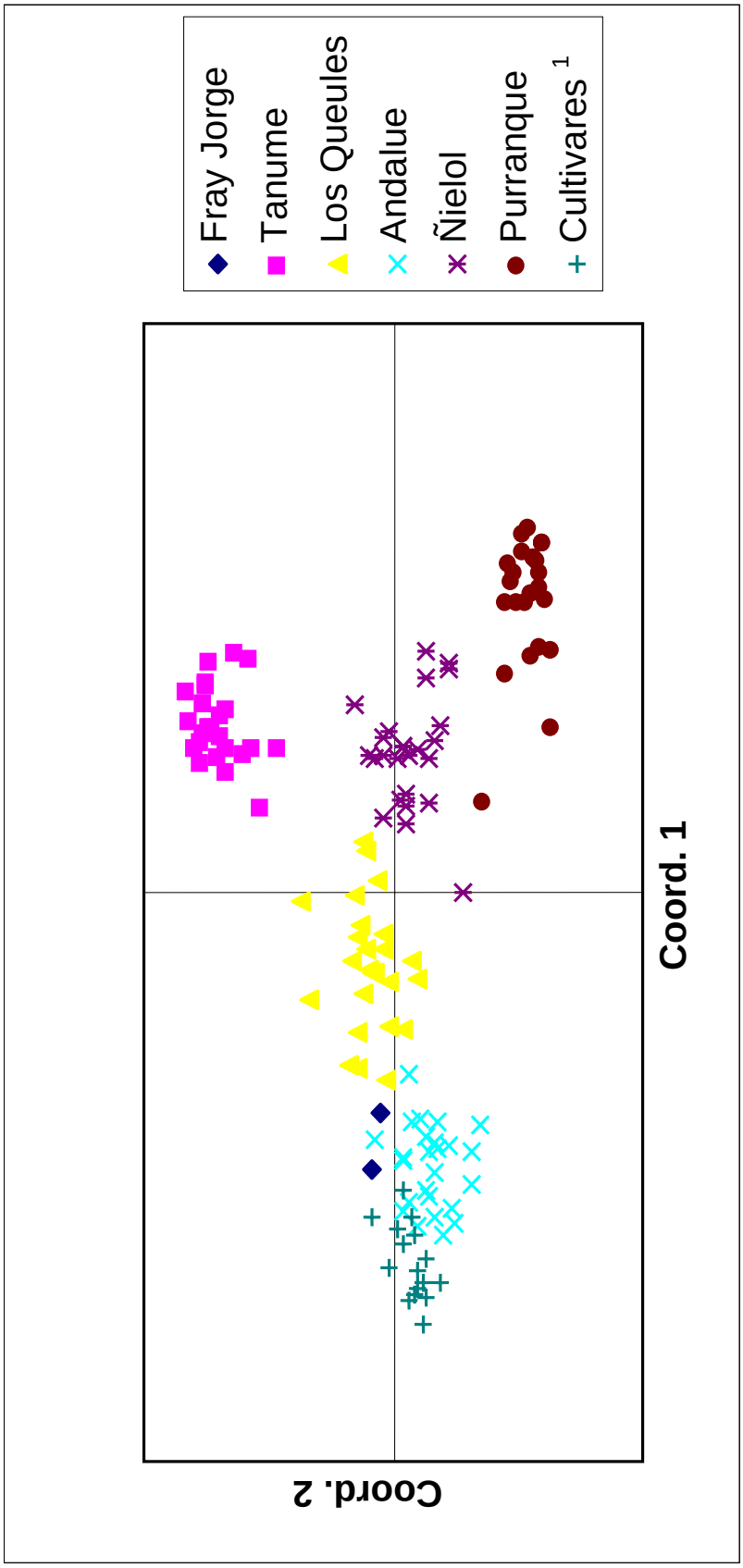

Figura 11. Análisis de componentes principales para determinar relaciones genéticas entre individuos basado en distancias genéticas de Nei.

[1] Hoffens y Riegel, 2008.

5.1.7 Distribución de la diversidad genética en las poblaciones.

Se determinó mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA) y el coeficiente de diferenciación entre poblaciones Gst.

5.1.7.1 Análisis molecular de la Varianza (AMOVA). Este análisis permitió subdividir la variabilidad molecular observada mediante los marcadores ISSR en distintas estratas o niveles. En este caso la estratificación se efectuó en tres niveles; “entre grupos”, “entre poblaciones dentro de los grupos” y “entre individuos dentro de las poblaciones”. La agrupación de individuos se efectuó en base al número de grupos de poblaciones verdaderas que resultaron del dendograma de las poblaciones, y en consecuencia se establecieron 3 grupos: Tanumé, Los Queules-Andalue y Ñielol-Purranque. La tabla 10 presenta los resultados del análisis molecular de la varianza.

Tabla 10. Análisis molecular de varianza (AMOVA), considerando 9999 permutaciones.

Fuente de variación	g.l.	Varianza	% del total de la varianza	Valor-P
Entre grupos	2	0,078	8%	< 0,001
Entre poblaciones dentro de los grupos	2	0,53	43%	< 0,001
Dentro de las poblaciones	120	0,567	49%	< 0,001

Los resultados del análisis molecular de la varianza indican que la mayor diversidad genética en las poblaciones de copihue analizadas se encontró principalmente dentro de las poblaciones con un 49% del total varianza observada. Luego le siguió la diversidad genética presente entre las poblaciones con un 43% del total de la varianza observada y

finalmente la variabilidad genética presente entre los 3 grupos correspondió sólo a un 8% del total de la varianza observada.

5.1.7.2 Coeficiente de diferenciación entre poblaciones Gst. Los valores de Gst más próximos a cero indican que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones y valores de Gst más próximos a uno, indican que la variabilidad se encuentra principalmente entre las poblaciones (Perez de la Vega y García, 2000).

En este trabajo el valor de Ht fue de 0,25 y la $\sum H/n$ fue de 0,14, por lo tanto el valor de Gst fue de 0,44, lo que indica que la mayor variabilidad genética se encontró dentro de las poblaciones.

5.2 ANALISIS MOLECULAR A NIVEL CITOPLASMATICO

5.2.1 Identificación de haplotipos.

Debido a la naturaleza uniparental del genoma del cloroplasto, los marcadores que se deriven de él serán siempre menos polimórficos que los derivados del núcleo, manifestando una baja diversidad genética dentro de las poblaciones pero alta entre éstas, permitiendo diferenciarlas unas de otras (Grivet et al, 2001). Individuos con distintos tipos de genoma del cloroplasto son denominados haplotipos. La identificación de haplotipos en las poblaciones, permitiría la diferenciación de éstas a nivel citoplasmático (Provan et al, 2001).

En el presente estudio, la identificación de haplotipos se realizó a través de microsatélites universales del cloroplasto y partidores específicos del cloroplasto de *Lapageria rosea*.

De los 7 marcadores universales utilizados, sólo el marcador microsatélite Ccmp2 amplificó de buena forma y presentó una variante de polimorfismo entre individuos. Este partidor fue desarrollado para detectar al microsatélite $(A)_8$ ubicado en la región psbKtrnS del gen "Photosystem II protein K" (psbk) del cloroplasto de plantas dicotiledóneas (Weising y Gardner, 1999). En el presente trabajo el partidor originó productos de 244 y 262 pb, debiéndose esta variación a una mutación tipo inserción o deleción de 18 pb por fuera de la secuencia repetitiva.

En consecuencia, mediante el marcador Ccmp2 se identificaron dos haplotipos de copihue. En la tabla 11 se señalan los haplotipos obtenidos.

Tabla 11. Haplotipos de copihue determinados por partidores universales del cloroplasto.

Haplotipo	Ccmp2
1	244 pb
2	262 pb

Puesto que el partidor Ccmp2 es un partidor universal creado para plantas dicotiledóneas, puede en general dar resultados variables en la obtención de los productos amplificados, condición dada porque los partidores pueden no ser 100% homólogos a la secuencia blanco de *Lapageria rosea*.

En consideración a lo anterior, Quitral (2008) desarrolló un par de partidores para amplificar la mutación específica tipo in/del de 18 pb ubicada en la región psbKtrnS del gen psbk del cloroplasto de *Lapageria rosea*.

En la figura 12, basada en la secuenciación de la región psbKtrnS del gen psbk del cloroplasto de copihue realizada por Quitral (2008) en un individuo proveniente de la

población de Purranque y otro proveniente de la población de Ñielol, se observa el microsatélite $(A)_8$ y los partidores Ccmp2r y Ccmp2f alineados en las zonas flanqueantes para la amplificación de éste. Se observa también, que estos partidores no coinciden 100% con la secuenciación de *Lapageria rosea*. De igual manera se encuentra señalada la mutación tipo in/del de 18 pb amplificada con los partidores específicos LrtrnSOr2/LrtrnSOrF.

La utilización del par de partidores específicos LrtrnSOrR_2/LrtrnSOrF originó fragmentos de 250 pb y 232 pb. Puesto que esta mutación se encuentra dentro del fragmento amplificado por el partidor universal Ccmp2, el polimorfismo de 18 pb detectado por el partidor microsatélite corresponde a la misma mutación tipo in/del de 18 pb amplificada con los partidores especie-específicos. Por lo tanto, los dos haplotipos detectados con el partidor específico son los mismos dos haplotipos detectados con el partidor Ccmp2. En la tabla 12 se señalan los haplotipos obtenidos.

Tabla 12. Haplotipos de copihue determinados por los partidores específicos LrtrnSOrR_2/LrtrnSOrF.

Haplotipo	Ccmp2
1	232 pb
2	250 pb

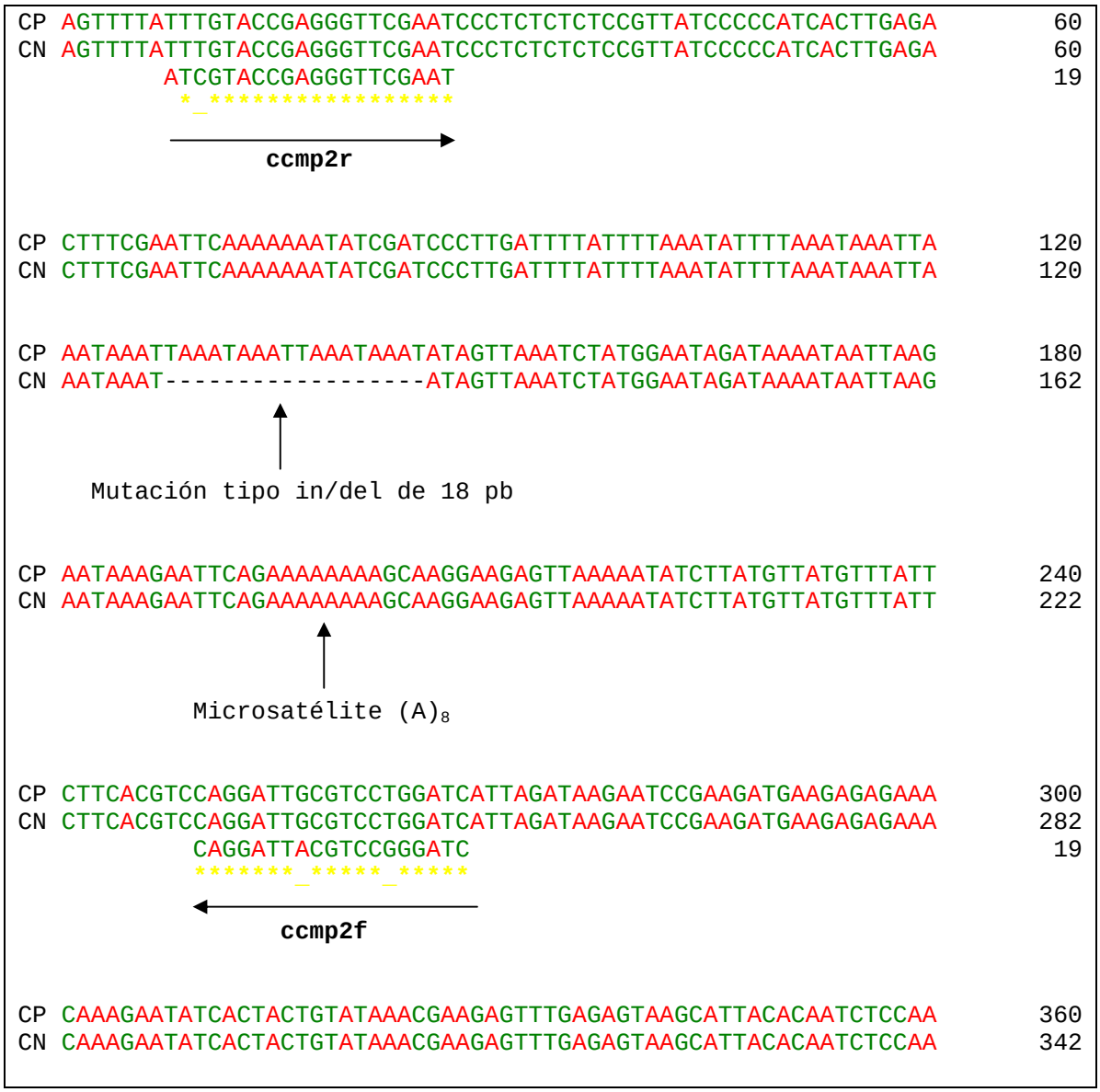

Figura 12. Región psbKtrnS del cloroplasto de *Lapageria rosea* indicando la región reconocida por los partidores Ccmp2 que flanquean el microsatélite $(A)_8$ e indicando la mutación de tipo in/del de 18 pb.

Fuente: Quitral, (2008)

En las figuras 13 y 14 se pueden observar los fragmentos amplificados mediante el par de partidores LrtrnSOrR_2/LrtrnSOrF en las poblaciones de Purranque, Ñielol y Huilo-Huilo.

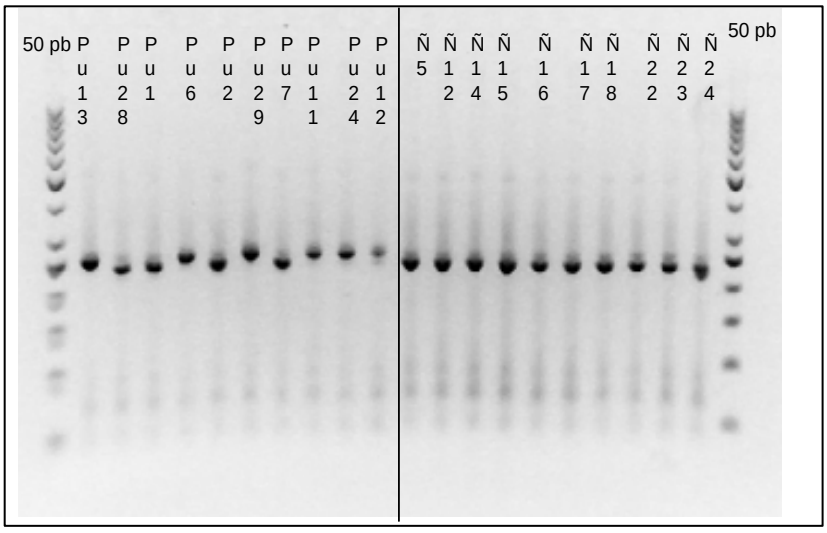

Figura 13. Amplificación de fragmentos mediante los partidores LrtrnSOrR$_2$/LrtrnSOrF en las poblaciones de Purranque y Ñielol.

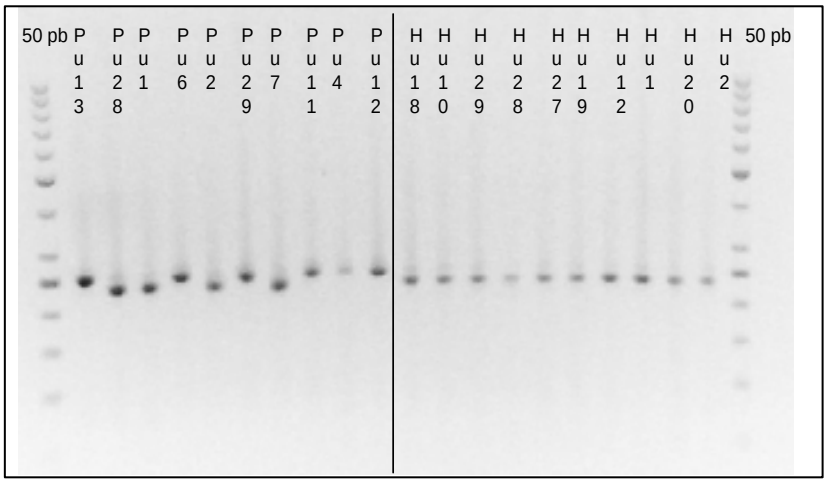

Figura 14. Amplificación de fragmentos mediante los partidores LrtrnSOrR$_2$/LrtrnSOrF en las poblaciones de Purranque y Huilo-Huilo.

Considerando los haplotipos obtenidos mediante el partidor universal y el partidor específico, se observa que existe una clara correlación entre los haplotipos de copihue obtenidos y su distribución geográfica. En las poblaciones muestreadas desde la novena región al norte se encontró sólo el haplotipo 1, a excepción de Contulmo que presentó

también el haplotipo 2 pero sólo en una frecuencia de 0,1. Desde la décimo cuarta región hacia el sur se encontraron ambos haplotipos, pero aumentando claramente la frecuencia del haplotipo 2 y disminuyendo la frecuencia del haplotipo 1 a medida que se avanza hacia el sur. La población de copihues de Villarrica presentó el haplotipo 1 en una frecuencia de 0,9 y el haplotipo 2 en una frecuencia de 0,1, por otro lado, la población de San José de la Mariquina presentó el haplotipo 1 en una frecuencia de 0,55 y el haplotipo 2 en una frecuencia de 0,45, los individuos ubicados en Curiñanco presentaron el haplotipo 1 en una frecuencia de 0,45 y el haplotipo 2 en una frecuencia de 0,55. Finalmente, la población de Purranque presentó el haplotipo 1 en una frecuencia de 0,4 y el haplotipo 2 en una frecuencia de 0,6. La excepción fue la población de Huilo-Huilo ya que sólo presentó el haplotipo 1.

Considerando lo anterior, se pueden diferenciar dos tipos de poblaciones de copihue, las poblaciones desde la novena región al norte teniendo presente sólo el haplotipo 1 y las poblaciones de copihue de la décimo cuarta región (entre los 39º24’ y 39º40’) al sur, teniendo presente ambos haplotipos con un claro aumento del haplotipo 2 hacia el sur. En la figura 15 se señala la distribución geográfica de los haplotipos determinados con los microsatélites del cloroplasto y con los partidores LrtrnSOrR$_2$/LrtrnSOrF.

5.2.2 Distribución de la diversidad genética en las poblaciones a nivel citoplasmático.

Como se había señalado anteriormente, los valores de Gst más próximos a cero indican que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones y valores de Gst más próximos a uno, indican que la variabilidad se encuentra principalmente entre las poblaciones (Perez de la Vega y García, 2000).

El valor de Ht fue de 0,245 y la $\sum H/n$ fue de 0,106, por lo tanto el valor de Gst fue de 0,56, lo que indica que la mayor variabilidad genética a nivel citoplasmático se encontró entre las poblaciones.

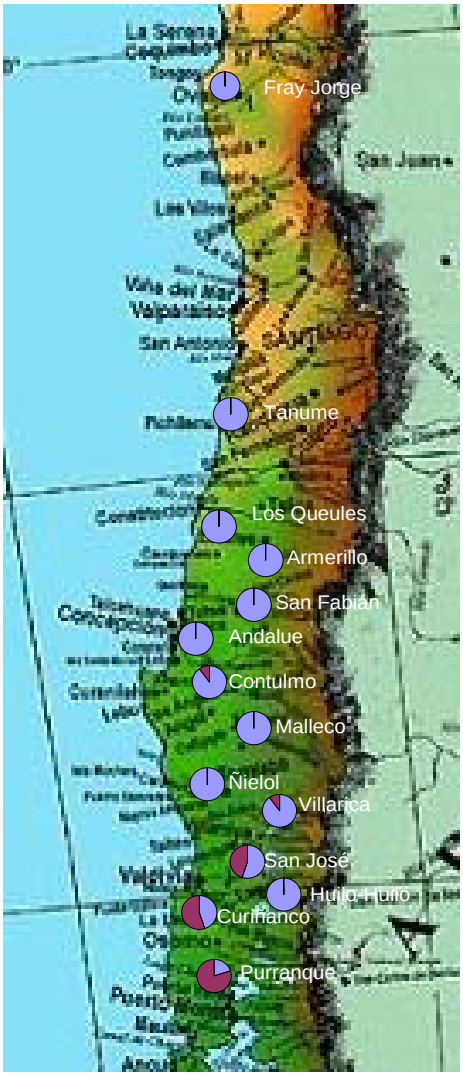

Figura 15. Distribución geográfica de haplotipos determinados con microsatélites del cloroplasto y los partidores LrtrnSOrR$_2$/LrtrnSOrF.

Haplotipo 1 (244 pb – 232 pb)

Haplotipo 2 (262 pb – 250 pb)

6 DISCUSION

6.1 ANALISIS MOLECULAR A NIVEL NUCLEAR

En el presente trabajo, la utilización de marcadores ISSR ha permitido determinar la diversidad genética y su distribución dentro y entre poblaciones de copihue, siendo esta información un requisito necesario para el establecimiento de estrategias de conservación y mejoramiento genético de esta especie.

Considerando a todas las poblaciones analizadas, los 7 partidores ISSR seleccionados generaron un total de 78 bandas, las cuales fueron en un 100% polimórficas. Esto representa un promedio de 11 bandas polimórficas por partidor. Estos valores son superiores a los obtenidos por Galván et al (2003) en la determinación de la diversidad genética de *Phaseolus vulgaris* mediante ISSR, ya que ellos seleccionaron 9 partidores ISSR que revelaron un total de 75 bandas, siendo sólo un 44% de ellas polimórficas, con un promedio de sólo 4 bandas polimórficas por partidor. Esta diferencia de polimorfismo podría deberse a que Galván et al (2003), trabajaron con 13 accesiones de *Phaseulus vulgaris*, desarrollados en su mayoría a partir de un estrecho pool de genes originario del norte de Argentina.

En el trabajo realizado por Wu et al (2004), en la determinación de diversidad genética en poblaciones silvestres de *Oryza granulata* utilizando ISSR, el porcentaje de fragmentos polimórficos obtenidos se acerca al obtenido en el presente estudio, ya que ellos seleccionaron 12 partidores polimórficos obteniendo un total de 114 bandas, de las cuales un 64% son polimórficas, y por lo tanto, se generaron 9,5 bandas por partidor.

En el presente estudio los partidores polimórficos seleccionados estaban constituídos por secuencias compuestas de 5 repeticiones trinucleotídicas (GTG), (CCA) y (AAC), con

anclaje en el extremo 5' y por secuencias simples de 8 repeticiones dinucleotídicas (AC), (AG) y (GA) con anclaje en el extremo 3'. Esto último coincide con el trabajo de Nan et al (2003), en la determinación de diversidad genética en poblaciones naturales de *Primula obconica* mediante ISSR, en el cual los partidores que generaron un mayor número de bandas polimórficas estaban constituídos por secuencias simples de 8 repeticiones dinucleotídicas de (CT), (TC), (CA) y (GT) con anclaje tanto en el extremo '3 como en el extremo '5. Esta idea ya había sido expuesta por Pradeep et al (2002), quienes señalaron que partidores con repeticiones dinucleotídicas como (AG), (GA), (CT), (AC) y (CA) presentan en general mayores polimorfismos que partidores con repeticiones trinucleotídicas.

Por otro lado, en el trabajo de Galván et al (2003) ya mencionado y a diferencia de lo expuesto por Pradeep et al (2002), el mayor porcentaje de bandas polimórficas fueron generadas por partidores compuestos por 5 repeticiones trinucleotídicas (CCA), (GCC) y (GAA) sin anclaje y por el partidor compuesto por 5 repeticiones trinucleotídicas (CAA) con anclaje en el extremo 5'.

En relación al porcentaje de fragmentos polimórficos presente dentro de las poblaciones, se puede observar que aquellas poblaciones ubicadas en el centro de la distribución geográfica de la zona de muestreo, presentan los mayores porcentajes de fragmentos polimórficos y número de alelos, lo que se ve reflejado en una mayor diversidad genética dentro de estas poblaciones. Existe además una tendencia a la disminución de la diversidad genética en las poblaciones de norte a sur, escapando a esta tendencia los individuos de Fray Jorge y Tanume.

Para explicar lo anterior, hay que considerar que las características estructurales y los patrones de distribución de los bosques chilenos están estrechamente vinculados a las transformaciones que experimentó el área boscosa como consecuencia de las repetidas glaciaciones que afectaron gran parte del territorio durante el cuaternario (Armesto et al,

1995). Las características geográficas del extremo sur de Sudamérica, entre las que se cuenta una gran influencia oceánica, junto a una elevada heterogeneidad ambiental debida a la presencia de numerosos cordones montañosos que separan valles, habrían determinado la creación de micrositios libres de hielo favorables para la sobrevivencia de las especies y especimenes particulares de cada una, llamados refugios de glaciación (Bekessy et al, 2004).

De acuerdo a los antecedentes que se tienen hoy en Chile, se postula que habrían habido dos refugios glaciarios durante el último máximo glacial, por una parte las zonas ubicadas en la Cordillera de la Costa y Depresión intermedia entre los 30 y 39º lat. Sur y más al sur otro refugio correspondiente a la Cordillera de la Costa entre los 39º y 44º lat. Sur (Villagrán, 1990). Por lo tanto, los individuos estudiados que se ubican en Fray Jorge, Tanumé, Los Queules, Andalue y Ñielol, se encuentran en el que fuera el refugio glaciario comprendido entre los 30º-39º lat. Sur. Sólo la población de copihues de Purranque no se encontraría en territorio que alguna vez fuera refugio glaciario.

La tendencia general a la disminución de la diversidad genética de norte a sur puede ser explicada por dos hechos; el primero es que debido a que la recolonización postglacial del bosque se desarrolló de norte a sur (Villagrán y Armesto, 1993), es probable que esta especie haya migrado hacia el sur, lo que conllevó a una pérdida de alelos producto de cuellos de botella ocurridos durante el proceso migratorio (Wheeler y Guries, 1982).

El segundo hecho es que el copihue es una especie termófila (Humaña, 1994), y por lo tanto, las poblaciones ubicadas más al sur presentan una mayor presión de selección debido a la disminución de las temperaturas. Lo anterior conlleva a que mientras más al sur se encuentren las poblaciones de copihue, menor es su diversidad genética.

Sin embargo, la población de Tanumé no se ajusta a la tendencia señalada, lo que puede ser explicado por un menor flujo de genes hacia esa población por estar ubicada en el borde del área de distribución de la especie. Por otro lado, los resultados podrían estar indicando que la población de copihues de Tanumé se encuentran altamente fragmentada.

Puesto que la población de copihues analizada en el bosque relicto Fray Jorge en la 4ª región sólo estaba conformada por dos individuos, presentó la menor diversidad genética de entre todas las poblaciones analizadas.

Resultados similares a este trabajo se han encontrado en estudios realizados con *Nothofagus obliqua* en Argentina, encontrando una tendencia a la disminución de la diversidad genética de norte a sur y de este a oeste, concordando con posibles refugios alejados de la región cubierta por los hielos en el último máximo glacial (Donoso et al, 2004).

Por otro lado, al analizar la distancia genética de las poblaciones y su correlación con la distancia geográfica, se observa una correlación positiva entre ambas, lo que ratificaría lo expuesto por Solbrig (1970). Este autor señala, que en general, siempre y cuando exista una distribución continua de la especie, como lo es el copihue desde la 6ª a la 10ª región, se espera que a una menor distancia geográfica entre las poblaciones, menor debería ser la distancia genética entre ellas, puesto que habría un mayor flujo de genes, haciendo menos probable la ocurrencia de diferenciación entre éstas. Lo anterior se debe a que el flujo de genes es una fuerza de cohesión que actúa para mantener uniformes a las poblaciones entre sí. Sin embargo, existen algunas excepciones como el hecho de que para Tanume la mayor distancia genética se encuentra con Andalue siendo su mayor distancia geográfica con la población de Purranque, al mismo tiempo que para Andalue su mayor distancia genética se encuentra con la población de Tanume siendo su mayor distancia geográfica con la población de Purranque. Ambos casos podrían ser explicados debido a que Tanume como se mencionó anteriormente se encuentra ubicado en el borde del área de distribución de la

especie lo que conllevaría a un aislamiento de esta población y por ende a un menor flujo de genes hacia ella, diferenciándola genéticamente de las otras.

En el trabajo de Nuñez y Armesto (2006) sobre la determinación de la diversidad genética en la especie endémica de Sudamérica *Aetoxicon punctatum*, también se obtuvo una alta correlación entre diversidad genética y distancia geográfica al considerar el rango total de distribución geográfica de esta especie en Chile.

El análisis de relaciones genéticas de las poblaciones a través de un dendograma basado en distancias genéticas, reflejó la existencia de 4 grupos, tres de ellos corresponden a poblaciones propiamente tal y un grupo corresponde a los 2 individuos de Fray Jorge. En el caso del grupo formado por las poblaciones de Los Queules y Andalue y el grupo formado por las poblaciones de Ñielol y Purranque se ratificó la correlación positiva entre distancia genética y geográfica arrojada por el Test de Mantel. El grupo conformado sólo por la población de Tanume graficó el hecho de que esta población, debido probablemente a que se encuentra en el borde del área de distribución, presentó un aislamiento genético respecto de las otras poblaciones. Finalmente, el grupo conformado por los dos individuos de Fray Jorge es el que se encuentra más alejado genéticamente de los tres grupos de poblaciones, ratificando el hecho de que para todas las poblaciones la mayor distancia genética se encontró con los dos individuos de este grupo, lo cual se explicaría porque en este caso se analizaron sólo dos individuos y no una población propiamente tal.

Respecto a la relación genética entre los individuos a través de un análisis de componentes principales, se observa que en general existe una coincidencia con los resultados arrojados en el dendograma, observándose que la población de Andalue se encuentra genéticamente cercana a la población de Los Queules; la población de Purranque se encuentra cercana genéticamente a la población de Ñielol, y ésta a su vez se encuentra cercana a Los Queules. Por otro lado, la población de Tanumé es la más aislada genéticamente. El hecho de que en Fray Jorge se presenten sólo dos plantas de copihue, las que además se

encontraron muy cercanos genéticamente a los individuos de la población de Andalue, podría estar indicando que estas fueron introducidas desde el sector de Andalue o sectores cercanos a éste. Finalmente, el grupo de cultivares se presentó muy cercano genéticamente a la población de Andalue, lo que podría estar indicando que las plantas madres originadoras de los cultivares provendrían de sectores cercanos a la población de Andalue. Lo anterior coincide con antecedentes históricos que existen acerca de los inicios de la colección de plantas de copihue del Vivero El Vergel, los que indican que la mayoría de las plantas madres utilizadas provendrían principalmente de sectores cercanos a Cobquecura, zona ubicada en la cordillera de la costa de la 8ª región, al igual que Andalue.

Otro punto analizado en este trabajo, fue la distribución de la diversidad genética en las poblaciones de copihue, mediante el análisis molecular de la varianza y el coeficiente de diferenciación. Ambos análisis coinciden en que la diversidad genética se encuentra principalmente dentro de las poblaciones. Esto es el resultado de la interacción de varias fuerzas evolutivas, tales como las mutaciones y migraciones, las que aumentan o mantienen la variación genética dentro de las poblaciones e impiden la variación entre éstas (Gonzales y Hamrick, 2005). Además, la distribución de la variabilidad genética está estrechamente ligada al modo de dispersión y reproducción de las especies. En aquellas especies como el copihue, que son capaces de dispersar genes (ya sea a través de semillas o de polen debido a que presentan polinización abierta) se espera que haya flujo de genes entre las poblaciones, aumentando las posibilidades de recombinación y por lo tanto, de variabilidad dentro de éstas. Lo anterior conlleva además que las poblaciones presenten el mismo complemento de alelos en frecuencias equivalentes, lo que disminuye la variabilidad genética entre éstas (Gonzales y Hamrick, 2005).

Por otro lado, ambos análisis coinciden también en que la diversidad genética dentro de las poblaciones es bastante cercana a la diversidad genética entre las poblaciones. Esto podría deberse por un lado, a que *Lapageria rosea* presenta también reproducción vegetativa a través de sus estolones subterráneos, con la subsecuente ausencia de recombinación y por

ende una disminución de la diversidad genética dentro de la población (Griffiths et al, 2000).

Otra razón por la cual el porcentaje de distribución de la diversidad genética dentro de las poblaciones es sólo un 6% superior a la diversidad genética presente entre éstas, podría deberse a que cuando existe fragmentación, como sucede en gran parte de los bosques que son el hábitat natural del copihue, se produce una disminución en el tamaño de las poblaciones y por ende, también de su diversidad genética. Lo anterior se debe, a que en fragmentos de bosque disminuye la frecuencia de las visitas de los polinizadores, lo que trae como consecuencia un aumento de los cruzamientos entre plantas vecinas generalmente emparentadas. Esto lleva a un aumento de la depresión por endogamia, la que se traduce finalmente en semillas de menor calidad y por lo tanto, en un menor número de plántulas por población. Lo anterior conlleva a un aumento de la deriva genética y por lo tanto, a poblaciones con una menor diversidad genética. Por otra parte, en general en fragmentos de bosque hay una tendencia al aumento de la luz, humedad y temperatura del aire y a una disminución de la humedad del suelo, lo que afecta negativamente a la germinación de semillas y por ende al tamaño de las poblaciones. Lo anterior deriva en poblaciones con una menor diversidad genética (Barrett y Kohn, 1991).

El trabajo realizado por Henriquez (2004), acerca del efecto de la fragmentación del hábitat sobre la calidad de las semillas en *Lapageria rosea* en el bosque maulino costero de Chile central, coincide con lo anteriormente señalado, ya que en los fragmentos de bosque observó poblaciones de copihue con inferior calidad de semilla y una menor diversidad genética.

6.2 ANALISIS MOLECULAR A NIVEL CITOPLASMATICO

La deficiente amplificación de los cpSSR utilizados en la identificación de haplotipos se debería a que los partidores usados fueron desarrollados para plantas dicotiledóneas y no monocotiledóneas, como lo es el copihue (Weising y Gardner, 1999).

La correlación positiva entre los dos haplotipos identificados y su distribución geográfica, podría ser explicada a través de dos teorías. La primera de ellas es que debido a la herencia uniparental y ausencia de recombinación del genoma del cloroplasto, la identificación de haplotipos mediante el análisis molecular de éste, permite inferir rutas de migración post glaciación y ubicación de refugios glaciarios. Es decir, haplotipos distintos se originan en refugios glaciarios distintos (Provan et al, 2001). Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, se podría inferir la existencia de dos refugios glaciarios. Esto coincide con lo expuesto por Villagrán (1990), quien señala la existencia de un refugio ubicado en la Cordillera de la Costa y Depresión intermedia entre los 30 y 39º lat. Sur y otro en la Cordillera de la Costa entre los 39º y 44º lat. Sur. Por lo tanto, el haplotipo 1 tendría su origen en el refugio ubicado más al norte, desde el cual fue migrando hacia el sur, y el haplotipo 2 tendría su origen en el refugio ubicado más al sur, desde el cual fue migrando hacia el norte a pesar de que la recolonización postglacial fuera de norte a sur (Villagrán y Armesto, 1993). Lo anterior se debería a que el copihue es una especie termófila y como tal prefiere migrar hacia lugares más cálidos y no hacia lugares tan fríos como lo son aquellos que se encuentran al sur de los 40º lat Sur. Por lo tanto, la diferenciación de las poblaciones estaría dada por la ubicación del refugio glaciario desde el cual se originaron los individuos presentes en éstas.

La línea divisoria entre los dos haplotipos de copihue determinados en esta investigación, concuerda con los estudios realizados por Marchelli y Gallo (2006), en la identificación de haplotipos de *Nothofagus nervosa* en Chile y Argentina, encontrándose para poblaciones

ubicadas en la cordillera de los Andes una línea divisoria para diferentes haplotipos de esta especie similar altura que la encontrada para el copihue.

Por otro lado, la segunda teoría que de alguna forma podría explicar la distribución geográfica de los haplotipos de copihue identificados en este trabajo, sería el fenómeno de las ingresiones marinas ocurridas durante el mioceno hace aprox. 18-12 millones de años atrás. La geología convencional afirma que las ingresiones marinas cubrieron la mayor parte de Sudamérica, como consecuencia de un movimiento basculante de los continentes que los elevó y luego sumergió (Pino y Martínez, 1979). Existen antecedentes de que las transgresiones marinas depositaron extensas capas de sedimentos tanto en la depresión intermedia como la naciente cordillera de la costa en distintos sectores de la provincia de Valdivia, como es el caso de la particular presencia de fósiles marinos en la cuesta Santo Domingo ubicada en las coordenadas 39º56’ lat. Sur y 73º6’ long. Oeste (Pino y Martínez, 1979). Puesto que esta ingresión marina coincide aproximadamente con la zona en que los haplotipos de copihue se diferencian, este fenómeno pudo haber generado un aislamiento de las poblaciones de copihue, provocando una diferenciación genética entre éstas, la que a nivel citoplasmático se ve reflejada en la presencia de distintos haplotipos en las poblaciones. Por lo tanto, es posible que los individuos con el haplotipo 2 tengan su origen en las poblaciones aisladas al sur de la ingresión marina ocurrida en la provincia de Valdivia y los individuos con el haplotipo 1 tengan su origen en las poblaciones aisladas al norte de esta ingresión. En el trabajo realizado por Formas et al (2000) en la determinación de relaciones filogenéticos de las ranas del género *Telmatobuto*, también se menciona la teoría de que ingresiones marinas del mioceno aislaron geográficamente individuos de este género en Chile, promoviendo la especiación de éstos.

El hecho de que la diversidad genética se encuentre principalmente entre las poblaciones es esperable, puesto que debido a la naturaleza uniparental del genoma del cloroplasto, los marcadores que se deriven de éste serán siempre menos polimórficos que los derivados del núcleo, manifestando una baja diversidad genética dentro de las poblaciones pero alta entre

éstas (Grivet et al, 2001). Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en el trabajo de King y Ferris (1998), en la determinación de la phylogeografía de *Albus glutinosa* a través de DNA del cloroplasto, quienes obtuvieron un coeficiente de diferenciación genética de 0,82. Similares resultados se obtuvieron también en el trabajo de Demesure et al (1996), quienes obtuvieron valores Gst de 0,73 en la determinación de la phylogeografía de *Fagus sylvatica* a través del DNA del cloroplasto. En el trabajo de Rendell y Ennos (2003), se obtuvo también un alto valor de Gst (0,59) en la determinación de la diversidad del DNA del cloroplasto de la especie *Ilex aquifolium*. Finalmente, en el trabajo de Marchelli y Gallo (2006) en la determinación de la distribución de diversidad genética a nivel de cloroplasto en *Nothofagus nervosa* se obtuvo un valor de Gst de 0,93.

6.3 IMPLICANCIAS DEL PRESENTE ESTUDIO

A pesar de que no es objetivo de este trabajo establecer estrategias de conservación ni de mejoramiento genético, es importante señalar a modo de comentario algunos aspectos relacionados a estos puntos. Una eficiente estrategia de conservación y mejoramiento requiere preservar la integridad del acervo genético de las especies a través de la inclusión en áreas protegidas de poblaciones que contengan una elevada diversidad genética o variantes genéticas únicas (Lara y Veblen, 1993). Considerando lo anterior, las poblaciones que no deberían faltar en un programa de conservación y mejoramiento genético son, en primer lugar; Los Queules y Andalue ya que presentan la mayor riqueza alélica, en segundo lugar la población de Tanumé puesto que presentan alelos únicos y la población de Purranque por presentar un haplotipo distinto al de las otras poblaciones.

El hecho de que las áreas silvestres del estado se encuentran distribuidas en forma desigual, concentrándose fuertemente en la zona andina de la XI y XII regiones y escasamente entre las regiones IV y X, ha provocado la casi total degradación de los bosques costeros de Chile continental, especialmente en la cordillera de la costa de la 7ª y 8ª región (Armesto et

al, 1994). Puesto que es allí donde se encuentran las poblaciones de copihue con la mayor riqueza alélica, el establecimiento de estrategias de conservación para las poblaciones de copihue ubicadas en el centro de su distribución geográfica es de carácter urgente.

Finalmente, es importante destacar que una estrategia de conservación (*in situ*) debe poder insertarse en los planes regionales de desarrollo y uso sustentable de los recursos naturales, de manera de generar intereses comunes entre la conservación de la naturaleza y su utilización (Cubillos, 1998).

7 CONCLUSIONES

El establecimiento en *Lapageria rosea* de las técnicas de extracción de ADN, de marcadores moleculares nucleares de tipo ISSR, de microsatélites universales del cloroplasto y de partidores específicos del cloroplasto de copihue, permitió determinar la diversidad genética y su distribución en las poblaciones estudiadas de esta especie.

La población de copihues de Los Queules presentó la mayor diversidad genética.

Los dos individuos de copihue de Fray Jorge presentaron la menor diversidad genética.

Existe una correlación positiva entre la distancia genética y geográfica en las poblaciones analizadas.

Puesto que los individuos de Fray Jorge y los cultivares se encuentran genéticamente cercanos a los individuos de Andalue, tanto las plantas de copihue de Fray Jorge como las plantas madres que dieron origen a los cultivares provendrían de sectores cercanos a Andalue.

De acuerdo a su similitud genética se distingue un grupo conformado por las poblaciones de Andalue y Los Queules, un segundo grupo conformado por las poblaciones de Ñielol y Purranque, un tercer grupo conformado por la población de Tanumé y finalmente un cuarto grupo conformado por los dos individuos de Fray Jorge.

La diversidad genética nuclear se encuentra distribuída principalmente dentro de las poblaciones.

Mediante la amplificación de fragmentos utilizando marcadores moleculares del cloroplasto se diferenciaron dos haplotipos con distinta frecuencia.

La diversidad genética citoplasmática se encuentra distribuída principalmente entre las poblaciones.

De acuerdo a los resultados de esta investigación, las poblaciones prioritarias en un programa de conservación y mejoramiento genético son: Tanumé, Los Queules, Andalue y Purranque.

Para establecer un completo programa de conservación y mejoramiento genético de *Lapageria rosea*, es necesario completar la presente investigación analizando un mayor número de poblaciones con un mayor número de marcadores moleculares tanto del núcleo como del cloroplasto.

8 BIBLIOGRAFIA

Ajibade, S., Weeden, N. y Chite, S. 2000. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. Euphytica. III: 47-55.

Armesto, J., Villagrán, C. y Donoso, C. 1994. Desde la era glacial a la industrial. La historia del bosque templado. Ambiente y Desarrollo. 10: 66 -72.

Armesto, J., Rozzi, R. y León-Lobos, P. 1995. Ecología de los bosques chilenos: síntesis y proyecciones. En: Ecología de los bosques nativos de Chile. Armesto, J., Villagrán, C. y Kalin, M. (Eds.). Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 470 p.

Ayala, F. 1979. Mecanismos de la evolución. En: Evolución. Editorial Labor S.A. Barcelona. 173 p.

Barrett, Sch. y Kohn, J. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation: 3-30. En: Falk DA&KE Holsinger (eds). Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, Oxford.

Bekessy, S., Lara, A., González, M., Cortés, M., Gallo, L., Premoli, A., Newton, A, e Izquierdo, F. 2004. Variación en *Araucaria aracucana (Molina)* K. Koch. En: Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Donoso, C., Premoli, A., Gallo, L. e Lipinza, R. (Eds.). Editorial Universitaria. Santiago-Chile. 420 p.

Burschel, P. 1991. Informe técnico sobre política de explotación de bosque nativo en Chile. FAO, Roma.

Campos, H. 1995. Marcadores moleculares: Conceptos. Agro Sur 23 (1): 68 – 75.

Cubillos, A. 1998. Principios para la conservación *in situ* de parientes silvestres de plantas cultivadas: el caso de las especies de Lycopersicon en Chile. Serie la Platina. 68: 1-15.

Cheng-Jun, W.2004. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species. Plant Science. 167: 35-42.

Demesure, B., Comps, B. y Petit, R. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica L.*) in Europe. Evolution. 50(6): 2515 – 2520.

Donoso, C., Gallo, L, Donoso, P. y Azpilicueta, M. 2004. Variación en *Nothofagus obliqua (Mirb.)* Oerst. En: Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Donoso, C., Premoli, A., Gallo, L. e Lipinza, R. (Eds.). Editorial Universitaria. Santiago-Chile. 420 p.

Doyle, J. y Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.

Echt, C., DeVerno, L., Anzidei, M. y Vendramin, G. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa Ait*. Molecular Ecology. 7: 307-316.

Ellstrand, N. y Elam, D. 1993. Population genetic of small population size: implication for plant conservation. Annual Review of Ecology and Systematics. 24:217-242.

Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1996. Introducao ao uso de marcadores moleculares en análise genética. 2ª ed. Brasilia D.F. EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.

Formas, R. y Nuñez, J. 2000. Evolutionary history of the chilean frog Telmatobuto: an inmunological approach. Amphibia-Reptilia. 21: 351-356.

Galván, M., Bornet, B., Balatti, P. y Branchard, M. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (Phaseolus vulgaris L.) Euphytica. 132: 297 – 301.

Garcia-Mas, J., Graciano, E., Amanzana, M., Monforte, A., Oliver, M., Ballester, J. y Arús, P. 2000. Marcadores de ADN: concepto, tipos y protocolos. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Nuez, F. y Carrillo, J. (Eds.). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 579 p.

Gedda, J y Gedda, M. 1983. El copihue flor nacional de Chile. Geomundo. 7(9): 232 – 240.

Gonzales, E. y Hamrick, J. 2005. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum*. Heredity. 2005: 1-9.

Grau, J.y Zizka, G.1992. Flora silvestre de Chile. Palmengarten. Frankfurt, Alemania.154 p.

Griffiths, A., Gelbart, W., Miller, J. y Lewontin, R. 2000. Genética moderna. Editorial McGraw - Hill - Interamericana. España. Pp 676.

Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G. y Petit, R. 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. Molecular Ecology notes. 1: 345 – 349.

Hamada, H., Petrino, M. y Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA – forming potencial is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 6465-6469.

Hamrick, J. y Godt, M. 1989. Allozyme diversity in plants. In: Population genetics, breeding and genetic resources. Brown, A., Cleegg, A. y Weir, B. (Eds.). Sinacur Press, Sunderland, Mass. Pp 43 – 63.

Henriquez, C. 2004. Efecto de la fragmentación del hábitat sobre la calidad de las semillas en *Lapageria rosea*. Revista Chilena de Historia Natural. 77: 177 – 184.

Herrera, R., Cares, V., Wilkison, M. y Caligari P. 2002. Characterisation of genetic variation between Vitis vinifera cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. Euphytica. 124: 139-145.

Hoffmann, A. 1982. Flora silvestre de Chile, Zona central. Ediciones Fundación Claudio Gay. Chile. 258 p.

Humaña, A. y Riveros, M. 1994. Biología de la reproducción en la especie trepadora *Lapageria rosea* R. ET P. (Philesiaceae). Gayana Bot. 51(2): 49 – 55.

Iriarte, E. 1994. Estado de conservación de la fauna silvestre en el cono sur Sudamericano. Proyecto FAO/PNUMA de América Latina y el Caribe (Edición y Recopilación). RLAC/94/08 Documento Nº13. 122 p.

Jimenez, P. y Collada, C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Investigación Agraria. 2: 237 - 248.

King, R. y Ferris, C. 1998. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Molecular Ecology. 7: 1151 - 1161.

Koski, V., Skroppa, T., Paule, L., Wolf, H. y Turok, J. 1997. Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies L.*). European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).

Lara, A. y Veblen, T. 1993. Forest plantations in Chile: a succesful model? In afforestation policies, planning and progress. Mather, A. (Ed.) Belhaven Press. London. Pp 118-139.

Liu, B. y Wendel, J. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes. 1: 205-208.

Maack, E. 1984. El copihue y su cultivo. Renacimiento Ltda. Concepción, Chile. 48 p.

Marchelli, P. y Gallo, L. 2006. Multiple ice-age refugia in a souhtern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. Conservation Genetics. 7: 591-603.

Martínez, O. 1985. Plantas trepadoras del bosque chileno. Editorial Albuda. Conaf (Corporación Nacional Forestal X región). 132 p.

Mehmet, A. 2004. Inter and intra-species Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) variations I the genus Cicer. Euphytica. 135: 229-238.

Menzies, J., Bakkeren, G., Matheson, F., Procunier, J. y Woods, S. 2003. Use of Intersimple sequence repeats and amplified fragment lenght polymorfisms to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of *Ustilago*. Ecology and Population Biology. 93:2.

Miller, M. 1997. Tools for population genetic analises, TPFGA 1.3: A windows programs for the analisis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Mohanty, A., Martín, J. y Aguinagalde, I. 2002. Population genetic analysis of european Prunus spinosa (Rosaceae) using chloroplast DNA markers. American Journal of Botany. 89(8): 1223-1228.

Muñoz, C. 1966. Flora silvestre de Chile. Ediciones Universidad de Chile. Santiago, Chile. 245 p.

Murray, M. y Thompson,W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321 – 4325.

Murua, R. 1994. Fragmentación del bosque nativo y los cambios en la biodiversidad de los micromamíferos tema nº 2 documento nº 3, en Seminario medio ambiente, biodiversidad y actividades productivas, Diego Portales, Santiago.

Nan, P., Shi, S., Peng, S., Tian, C. y Zhong, Y. 2003. Genetic diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from central and south-west China revealed by ISSR markers. Annals of Botany. 91: 1-5.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterocigosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89: 583 - 590.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. 450 p.

Nuez, F., Carrillo, J.y Ron De AM. 2000. Introducción. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Nuez, F. y Carrillo, J. (Eds.). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 579 p.

Nuñez, M. y Armesto J. 2006. Relict islands of the temperate rainforest tree *Aextoxicon punctatum* (Aextoxicaceae) in semi-arid – Chile: genetic diversity and biogeographic history. Australian Journal of Botany. 54: 733 – 743.

Parducci, L., Szmidt, A., Madaghiele, A., Anzidei, M. y Vendramin, G. 2001. Theoretical Applied Genetics. 102: 733 – 740.

Peakall, R. y Smouse, P. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6: 288-295.

Pérez de la Vega, M. y García, P. 2000. Análisis de la variación genética en las poblaciones. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Nuez, F. y Carrillo, J. (Eds.). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 579 p.

Pino, M. y Martínez, R. 1979. Edad, paleología y sedimentología del mioceno marino de la cuesta Santo Domingo, Provincia de Valdivia, X Región. Segundo Congreso Geológico Chileno. Instituto de Investigaciones Geológicas. Arica – Chile. Actas – Tomo 3.

Pradeep, M., Sarla, N. y Siddiq, E. 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica. 128: 9-17.

Prescot-Allen, R. y Prescot-Allen, Ch. 1986. First Resource. Wild species in the North American Economy. Yale University Press. New Haven, USA. 306 p.

Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N., Goldstein, D. y Powell, W. 1999. A low mutation rate for chloropast microsatellites. Genetics. 153: 943-947.

Provan, J., Powell, W. y Hollingsworth, P. 2001. Chloroplast microsatellite: new tools for studies in plant ecology and evolution. Trends in Ecology & Evolution. 16 (3): 142-147.

Qiu, J., Santen, E. y Tuzun, S. 1995. Optimization of DNA amplification fingerprinting techniques to study genetic relationships of white lupin germplasm. Plant Breeding. 114: 525 – 529.

Quitral Y. 2008. Identificación y distribución geográfica de haplotipos del cloroplasto en *Lapageria rosea*. Tesis Título Bioquímico. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 75 p.

Rendell, S. y Ennos, R. 2003. Chloroplast DNA diversity of the dioecious European tree *Ilex aquifolium*. Molecular Ecology. 12 (10): 2681 – 8.

Riveros, M. 1991. Biología reproductiva en especies vegetales de dos comunidades de la zona templada del sur de Chile, 40º S. Tesis entregada para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Roche, L. y Dourojeanni, M. 1984. A guide to in situ conservation of genetic resources of tropical wood species. FORGEN/MISC/84/2.

Seemann, P. 1984. Variedades cultivadas de copihue. Campo Sureño. Diario Austral. Valdivia, Chile. 26:12.

Solbrig, O. 1970. Principles and Methods of plant biosystematics. The Macmillan Biology Series. Giles and Torrey, J.D. (Eds). USA.

Solbrig, O., Van Emden, H. y Van Oordt, P. 1992. Biodiversity and global change. International Union of Biological Sciences (IUBS). Monograph Nº 8. Paris. ISBN 92-9046-0799.

Squeo, F., Arancio, G., Marticorena, C. y Muñoz, M. 2001. Listado de las especies en categoría de extinta, en peligro y vulnerable de la flora nativa de Coquimbo. En: Libro rojo de la flora nativa y suelos prioritarios para su conservación. Región de Coquimbo. Squeo, F., Arancio, C y Gutierrez, J. (Eds.). Ediciones Universidad de la Serena. La Serena, Chile. Pp 41 – 32.

Stearns, S. y Hoekstra, R. 2000. Evolution an Introduction. Oxford University Press. Inc. New York. 381 p.

Toledo, M. 1984. Dinámica de crecimiento, estructura y antecedentes ecológicos de trepadoras comunes en la región valdiviana. Tesis Prof. De Biol. y Quim. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Filosofía y Humanidades. 86 p.

Villagrán, C. 1990. Glacial climates and their effects on the history of vegetation of Chile. A synthesis based on palynologycal evidence from Isla de Chiloé. Review of Paleobotany and Palynology. 65: 17-24.

Villagrán, C. y Armesto, J. 1993. Full and late glacial paleoenvironmental scenarios for the west coast of southern South America. Earth systems responses to global change. Contrasts between North and South America. Mooney, H., Fuentes, E. y Kronberg, B. (Eds.). Academic Press. New York. Pp 195-207.

Wheeler, N. y Guries, R. 1982. Biogeography of lodgepole pine. Canadian Journal of Botany. 60: 1805-1814.

Weising, K. y Gardner, R. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome. 42: 9 –19.

Wu, C., Cheng, Z. y Huang, X., Yin, S., Cao, K. y Sun, C. 2004. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of endangered species. Plant Science. 167: 35-42.

Yeh, F. y Boyle, T. 1997. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and cuantitative traits. Belgian Journal of Botany. Pp 129 – 157.

ANEXO 1

Matriz de evaluación de geles para análisis molecular nuclear

ISSR 29

tamaño loci (pb)	2.000	1.700	1500	1.300	1.200	1.000	800	750	700	600	500	400
individuo												
Ñ1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
Ñ2	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ3	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
Ñ4	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
Ñ5	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ6	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ7	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ8	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
Ñ9	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ10	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ11	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ12	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
Ñ13	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
Ñ14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Ñ15	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
Ñ16	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Ñ17	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ18	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Ñ19	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ20	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ21	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ22	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ23	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Ñ24	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
Ñ25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
P2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
P6	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
P7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P10	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P12	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
P13	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
P14	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P15	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P16	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
P17	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
P18	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
P19	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
P20	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
P21	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P22	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
P23	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
P24	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
P25	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1

ISSR 29

tamaño loci (pb)	2.000	1.700	1500	1.300	1.200	1.000	800	750	700	600	500	400
individuo												
T1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
T2	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
T3	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
T4	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
T5	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
T6	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
T7	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
T8	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
T9	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
T10	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
T11	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
T12	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
T13	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	*	0
T14	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	*	0
T15	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	*	0
T16	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	*	0
T17	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	*	0
T18	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	*	0
T19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T20	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T21	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
T22	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
T23	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
T24	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
T25	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
Q1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Q2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Q3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Q4	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
Q5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Q6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Q7	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Q8	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Q9	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Q10	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
Q11	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Q12	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
Q13	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Q14	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q15	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Q16	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
Q17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Q18	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Q19	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Q20	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Q21	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
Q22	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
Q23	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
Q24	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
Q25	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0

ISSR 29

tamaño loci (pb)	2.000	1.700	1.500	1.300	1.200	1.000	800	750	700	600	500	400
individuo												
A1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A2	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
A3	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A4	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
A5	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
A6	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A7	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
A8	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A9	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A10	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A11	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A12	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
A13	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A14	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A15	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A16	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
A17	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A18	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A19	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A20	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A21	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A22	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A23	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
A24	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A25	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
FJ1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
FJ2	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0

ISSR 27

tamaño loci (pb)	2.400	2.000	1.700	1.500	1.000	800	750
Individuo							
T1	1	1	1	1	1	0	0
T2	0	1	1	0	1	0	0
T3	1	1	1	1	1	0	0
T4	1	1	1	1	1	0	0
T5	1	1	1	1	1	0	0
T6	1	1	1	1	1	0	0
T7	1	1	1	1	1	0	0
T8	1	1	1	1	1	0	0
T9	0	1	1	0	1	0	0
T10	1	1	1	1	1	0	0
T11	1	1	1	1	1	0	0
T12	1	1	1	1	1	0	0
T13	1	1	1	1	1	0	0
T14	0	0	1	0	1	0	0
T15	1	1	1	1	1	0	0
T16	1	1	1	1	1	0	0
T17	1	1	1	1	1	0	0
T18	1	1	1	1	1	0	0
T19	1	1	1	1	1	0	0
T20	1	1	1	1	1	0	0
T21	1	1	1	1	1	0	0
T22	1	1	1	1	1	0	0
T23	0	1	1	0	1	0	0
T24	1	1	1	1	1	0	0
T25	1	1	1	1	1	0	0
Q1	1	1	1	1	1	1	0
Q2	0	0	0	0	1	1	0
Q3	0	0	1	1	1	0	0
Q4	0	0	0	1	1	1	0
Q5	0	0	1	1	1	1	0
Q6	0	0	1	1	1	1	0
Q7	0	1	1	1	1	1	0
Q8	0	0	0	1	1	1	0
Q9	0	1	1	1	1	1	0
Q10	0	1	1	1	1	1	0
Q11	0	0	0	0	1	0	0
Q12	0	0	0	0	1	0	0
Q13	0	0	0	1	1	0	0
Q14	0	0	0	1	1	1	1
Q15	0	0	0	1	1	0	0
Q16	0	0	0	0	1	0	0
Q17	0	0	0	1	1	1	1
Q18	0	0	0	1	1	1	0
Q19	0	0	0	1	1	1	0
Q20	0	0	0	1	1	1	0
Q21	0	0	0	1	1	1	1
Q22	1	1	1	1	1	0	0
Q23	0	0	1	1	1	1	1
Q24	0	0	0	0	1	1	1
Q25	*	*	*	*	*	*	*

ISSR 27

tamaño loci (pb)	2.400	2.000	1.700	1.500	1.000	800	750
Individuo							
Ñ1	1	1	1	1	1	1	1
Ñ2	1	1	1	1	1	1	1
Ñ3	1	1	1	1	1	1	1
Ñ4	1	1	1	1	1	1	1
Ñ5	1	1	1	1	1	1	1
Ñ6	1	1	1	1	1	1	1
Ñ7	1	1	1	1	1	1	1
Ñ8	1	1	1	1	1	1	1
Ñ9	1	1	1	1	1	1	1
Ñ10	1	1	1	1	1	1	1
Ñ11	1	1	1	1	1	1	1
Ñ12	1	1	1	1	1	1	1
Ñ13	1	0	1	1	1	1	1
Ñ14	0	0	0	0	1	1	1
Ñ15	1	0	1	1	1	1	1
Ñ16	1	0	1	1	1	1	1
Ñ17	1	0	1	1	1	1	1
Ñ18	0	0	0	1	1	1	1
Ñ19	1	0	1	1	1	1	1
Ñ20	0	0	1	1	1	1	1
Ñ21	0	0	1	1	1	1	1
Ñ22	0	0	1	1	1	1	1
Ñ23	1	1	1	1	1	1	1
Ñ24	1	1	1	1	1	1	1
Ñ25	1	1	1	1	1	1	1
P1	0	0	1	1	1	1	1
P2	0	0	1	1	1	1	1
P3	0	0	0	0	1	1	1
P4	0	0	1	1	1	1	0
P5	0	0	1	1	1	1	0
P6	0	0	1	1	1	1	1
P7	0	0	1	1	1	1	1
P8	0	0	1	1	1	1	0
P9	0	0	1	1	1	1	1
P10	0	0	1	1	1	1	1
P11	0	0	0	0	1	1	1
P12	0	0	1	1	1	1	1
P13	0	0	1	1	1	1	1
P14	0	0	1	1	1	1	1
P15	0	0	1	1	1	1	1
P16	0	0	1	1	1	1	1
P17	0	0	1	1	1	1	1
P18	0	0	1	1	1	1	1
P19	*	*	*	*	*	*	*
P20	0	0	1	1	1	1	1
P21	0	0	1	1	1	1	1
P22	0	0	1	1	1	1	1
P23	0	0	1	1	1	1	1
P24	0	0	1	1	1	1	1
P25	0	0	1	1	1	1	1

ISSR 27

tamaño loci (pb)	2400	2000	1.700	1.500	1.000	800	750
individuo							
FJ1	0	0	1	1	1	1	0
FJ2	0	0	1	1	1	0	0
A1	0	0	1	0	1	0	0
A2	0	0	0	0	1	0	0
A3	0	0	1	1	1	0	0
A4	0	0	0	0	1	0	0
A5	0	0	0	0	1	1	0
A6	0	0	0	0	1	1	0
A7	0	0	0	0	1	0	0
A8	0	0	0	0	1	0	0
A9	0	0	0	0	1	0	0
A10	*	*	*	*	*	*	*
A11	0	0	0	1	1	0	0
A12	0	0	0	1	1	0	0
A13	0	0	0	1	1	0	0
A14	0	0	1	1	1	0	0
A15	0	0	1	1	1	0	0
A16	0	1	0	1	1	0	0
A17	0	0	0	1	1	0	0
A18	*	*	*	*	*	*	*
A19	0	0	0	0	1	1	0
A20	0	1	0	0	1	0	0
A21	0	0	0	0	1	1	0
A22	0	0	0	0	1	1	0
A23	0	0	0	0	1	0	0
A24	*	*	*	*	*	*	*
A25	0	0	0	0	0	0	0

ISSR GAC

tamaño loci (pb)	2000	1700	1.500	1.300	1.000	800	750	700	600	500	400	250
nombre de loci												
A1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
A2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
A3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
A4	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
A5	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
A6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
A7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A8	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
A9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
A10	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
A11	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A13	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A14	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A15	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
A16	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
A17	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A18	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
A19	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A20	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A21	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A22	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
A23	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A25	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
T1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
T5	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
T8	0	0	0	0	0	1	0	*	0	1	1	0
T9	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T10	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T12	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T13	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T14	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
T15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T16	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
T17	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T18	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T19	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T20	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T21	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T22	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T23	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T24	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
T25	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0

ISSR GAC

tamaño loci (pb)	2000	1700	1.500	1.300	1.000	800	750	700	600	500	400	250
individuo												
Q1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Q2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Q4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Q5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Q6	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Q7	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Q8	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Q9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Q10	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Q11	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Q12	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
Q13	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Q14	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Q15	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Q16	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Q17	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Q18	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Q19	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Q20	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Q21	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Q22	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Q23	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
Q24	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Q25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
P3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
P4	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
P5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
P6	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P7	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P8	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P9	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P10	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P11	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P12	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P13	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P14	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
P15	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
P16	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
P17	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
P18	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
P19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P20	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
P21	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
P22	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
P23	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
P24	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
P25	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0

ISSR GAC

tamaño loci (pb)	2000	1700	1.500	1.300	1.000	800	750	700	600	500	400	250
individuo												
Ñ1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ4	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
Ñ5	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ6	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Ñ8	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ9	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ10	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ11	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Ñ12	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ13	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
Ñ14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ15	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
Ñ16	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
Ñ17	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
Ñ18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Ñ19	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ20	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ21	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ23	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ24	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
FJ1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
FJ2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0

ISSR 825

tamaño loci (pb)	2000	1500	1300	1200	1000	800	750	700	600	500	400	250
individuo												
A1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
A2	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
A3	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
A4	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
A5	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
A6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
A9	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
A10	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
A11	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
A12	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
A13	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
A14	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
A15	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
A16	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
A17	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
A18	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
A19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A20	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A21	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
A22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
A23	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
A24	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
A25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
T1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T2	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
T4	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
T5	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T6	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T7	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
T8	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
T9	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
T10	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
T11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
T12	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T13	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T14	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T15	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T16	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
T17	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T18	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T19	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
T20	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T21	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T22	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
T23	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
T24	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
T25	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

ISSR 825

tamaño loci (pb)	2000	1500	1300	1200	1000	800	750	700	600	500	400	250
individuo												
Q1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
Q2	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Q3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
Q4	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
Q5	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
Q6	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
Q7	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Q8	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Q9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Q10	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Q11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Q12	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
Q13	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
Q14	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Q15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Q16	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Q17	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Q18	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
Q19	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Q20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Q21	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Q22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Q23	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Q24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Q25	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
P1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
P2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
P3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
P4	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
P5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
P6	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
P7	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
P8	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
P9	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
P10	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
P11	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
P12	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
P13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P14	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P15	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P16	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
P17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P18	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	*	*
P19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	*	*
P20	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P21	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P22	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P23	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
P24	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
P25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0

ISSR 825

tamaño loci (pb)	2000	1500	1300	1200	1000	800	750	700	600	500	400	250
individuo												
Ñ1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Ñ3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Ñ4	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
Ñ5	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
Ñ6	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Ñ7	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ8	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ9	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ10	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ11	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ12	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ13	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Ñ15	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Ñ16	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ17	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ18	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Ñ19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ20	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Ñ21	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Ñ22	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ23	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ24	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Ñ25	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
FJ1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
FJ2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0

ISSR 834

tamaño loci (pb)	2000	1500	1300	1200	1000	800	750	600	500	400	250
individuo											
P1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
P3	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P4	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P5	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P6	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P7	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P8	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P9	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P10	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P12	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P13	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P14	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P15	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P16	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P17	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P18	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P20	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
P21	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P22	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P23	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
P24	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
P25	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A2	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
A3	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
A4	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A5	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
A6	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A9	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A10	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A11	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A12	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A13	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
A14	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
A15	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
A16	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
A17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A18	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
A19	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A20	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
A21	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A23	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A24	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
A25	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0

ISSR 834

tamaño loci (pb)	2000	1500	1300	1200	1000	800	750	600	500	400	250
individuo											
Q1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q2	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q3	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q4	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q5	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q6	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q7	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q8	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q9	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q10	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q11	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q12	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q13	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q14	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Q15	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q16	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q17	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q18	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q19	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Q20	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q21	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q22	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q23	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Q24	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q25	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
T1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
T2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
T3	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
T4	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
T5	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
T6	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
T7	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
T8	*	*	*	*	*	*	*	*	1	*	*
T9	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
T10	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
T11	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
T12	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
T13	0	0	1	0	|	0	1	0	1	0	0
T14	0	0	1	0	|	0	1	0	1	0	0
T15	0	0	1	0	|	0	1	0	1	0	0
T16	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
T17	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
T18	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
T19	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
T20	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
T21	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
T22	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
T23	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
T24	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
T25	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0

ISSR 834

tamaño loci (pb)	2000	1500	1300	1200	1000	800	750	600	500	400	250
individuo											
Ñ1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ2	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ3	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ5	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ6	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ7	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ8	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ9	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ10	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ11	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ12	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ13	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ15	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ16	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ17	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ18	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ19	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Ñ20	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ21	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ22	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ23	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ24	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Ñ25	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
FJ1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
FJ2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1

ISSR 826

tamaño loci (pb)	1500	1300	1200	1000	900	800	750	600	550	500	400	300
individuo												
P1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P3	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P4	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P5	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P6	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P7	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P8	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P9	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P10	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P11	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P12	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P13	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P14	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P15	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P16	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P17	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P18	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P20	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P21	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P22	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P23	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P24	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
P25	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
A1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
A2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
A4	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
A5	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
A6	0	0	1	1		0	1	0	1	0	1	0
A7	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
A8	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
A9	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
A10	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
A11	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
A12	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
A13	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
A14	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
A15	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
A16	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
A17	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
A18	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
A19	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
A20	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
A21	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
A22	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
A23	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
A24	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
A25	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0

ISSR 826

tamaño loci (pb)	1500	1300	1200	1000	900	800	750	600	550	500	400	300
individuo												
Q1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Q2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Q3	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q4	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q5	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q6	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q7	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q8	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
Q9	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q10	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q11	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q12	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Q13	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q14	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q15	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q16	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q17	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q18	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q19	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q20	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q21	*	*	*	*	*	*	*	1	*	*	*	*
Q22	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q23	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0
Q24	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Q25	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
T1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	|	0	1	0	0
T3	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
T5	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
T6	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
T7	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
T8	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
T9	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
T10	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
T11	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
T12	*	*	*	*	*	*	*	1	*	*	*	*
T13	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
T14	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
T15	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
T16	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
T17	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
T18	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
T19	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
T20	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
T21	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
T22	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
T23	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
T24	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
T25	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0

ISSR 826

tamaño loci (pb)	1500	1300	1200	1000	900	800	750	600	550	500	400	300
individuo												
Ñ1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ2	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ3	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ4	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ5	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ6	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ7	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ8	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ9	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ10	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ11	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ12	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ13	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ñ15	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ16	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ17	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ18	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ19	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ20	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ21	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ22	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ23	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ24	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Ñ25	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
FJ1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
FJ2	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0

ISSR 32

tamaño loci (pb)	2000	1800	1500	1300	1200	1000	900	800	750	550	500	400
individuo												
P1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P2	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P3	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P4	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
P5	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
P6	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P7	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P8	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P9	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
P10	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P11	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P12	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P13	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P14	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
P15	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
P16	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
P17	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
P18	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
P19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
P20	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
P21	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
P22	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
P23	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
P24	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
P25	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A3	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A4	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A5	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A6	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A7	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A8	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A9	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A10	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A11	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A12	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A13	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A14	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A15	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A16	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A17	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A18	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A19	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A20	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A21	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A22	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A23	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A24	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A25	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0

ISSR 32

tamaño loci (pb)	2000	1800	1500	1300	1200	1000	900	800	750	550	500	400
individuo												
Q1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q2	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
Q3	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q4	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
Q5	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q6	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Q7	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Q8	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q9	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q10	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Q11	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Q12	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Q13	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q14	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Q15	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q16	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q17	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q18	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q19	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q20	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q21	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q22	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q23	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q24	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Q25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T2	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T3	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T4	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T5	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T6	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T7	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T8	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T9	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T10	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T11	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T12	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T13	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T14	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T15	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T16	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T17	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T18	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T19	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T20	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T21	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T22	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T23	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T24	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
T25	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0

ISSR 32

tamaño loci (pb)	2000	1800	1500	1300	1200	1000	900	800	750	550	500	400
individuo												
Ñ1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
Ñ2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
Ñ3	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
Ñ4	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Ñ5	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
Ñ6	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
Ñ7	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
Ñ8	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
Ñ9	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Ñ10	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Ñ11	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Ñ12	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Ñ13	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Ñ14	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
Ñ15	0	0	1	0	1	1	0	0	1	|	0	1
Ñ16	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
Ñ17	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
Ñ18	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Ñ19	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Ñ20	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Ñ21	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Ñ22	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Ñ23	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
Ñ24	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
Ñ25	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
FJ1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
FJ2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

ANEXO 2

Na, Ne, h por locus

Andalue

Locus	tamaño muestra	na	ne	h
1	25	2.0000	1.9780	0.4944
2	25	2.0000	1.6043	0.3767
3	25	2.0000	1.4069	0.2892
4	25	2.0000	1.8276	0.4528
5	25	2.0000	1.9231	0.4800
6	25	2.0000	1.9932	0.4983
7	25	1.0000	1.0000	0.0000
8	25	2.0000	1.4706	0.3200
9	25	1.0000	1.0000	0.0000
10	25	1.0000	1.0000	0.0000
11	25	1.0000	1.0000	0.0000
12	25	1.0000	1.0000	0.0000
13	22	1.0000	1.0000	0.0000
14	22	2.0000	1.0974	0.0887
15	22	2.0000	1.2088	0.1727
16	22	2.0000	1.4765	0.3227
17	22	2.0000	1.5049	0.3355
18	22	2.0000	1.2701	0.2126
19	22	1.0000	1.0000	0.0000
20	24	1.0000	1.0000	0.0000
21	24	1.0000	1.0000	0.0000
22	24	2.0000	1.0888	0.0815
23	24	2.0000	1.5646	0.3609

24	24	2.0000	1.9533	0.4880
25	24	1.0000	1.0000	0.0000
26	24	2.0000	2.0000	0.5000
27	24	1.0000	1.0000	0.0000
28	24	2.0000	1.2441	0.1962
29	24	2.0000	1.9348	0.4832
30	24	1.0000	1.0000	0.0000
31	24	1.0000	1.0000	0.0000
32	24	2.0000	1.7071	0.4142
33	24	2.0000	1.6357	0.3886
34	24	2.0000	1.1374	0.1208
35	24	2.0000	2.0000	0.5000
36	24	2.0000	1.5646	0.3609
37	24	1.0000	1.0000	0.0000
38	24	2.0000	1.7071	0.4142
39	24	2.0000	2.0000	0.5000
40	24	2.0000	1.6969	0.4107
41	24	1.0000	1.0000	0.0000
42	24	1.0000	1.0000	0.0000
43	24	2.0000	1.0888	0.0815
44	24	2.0000	1.7071	0.4142
45	24	2.0000	1.3635	0.2666
46	24	1.0000	1.0000	0.0000
47	24	2.0000	1.5646	0.3609
48	24	1.0000	1.0000	0.0000
49	24	2.0000	1.1374	0.1208
50	24	2.0000	1.9533	0.4880
51	24	1.0000	1.0000	0.0000
52	24	2.0000	1.6969	0.4107
53	24	1.0000	1.0000	0.0000
54	24	1.0000	1.0000	0.0000
55	24	2.0000	1.1374	0.1208
56	24	2.0000	1.9872	0.4968
57	24	2.0000	1.4951	0.3311
58	24	2.0000	1.6969	0.4107

59	24	1.0000	1.0000	0.0000
60	24	1.0000	1.0000	0.0000
61	24	1.0000	1.0000	0.0000
62	24	2.0000	1.0430	0.0412
63	24	2.0000	1.3635	0.2666
64	24	1.0000	1.0000	0.0000
65	24	2.0000	1.9872	0.4968
66	24	2.0000	1.6357	0.3886
67	25	2.0000	1.0412	0.0396
68	25	1.0000	1.0000	0.0000
69	25	2.0000	1.6043	0.3767
70	25	2.0000	1.0412	0.0396
71	25	1.0000	1.0000	0.0000
72	25	2.0000	1.9231	0.4800
73	25	1.0000	1.0000	0.0000
74	25	1.0000	1.0000	0.0000
75	25	2.0000	1.9780	0.4944
76	25	1.0000	1.0000	0.0000
77	25	2.0000	1.8276	0.4528
78	25	1.0000	1.0000	0.0000

Fray Jorge

Locus	tamaño muestra	na	ne	h
1	2	1.0000	1.0000	0.0000
2	2	1.0000	1.0000	0.0000
3	2	2.0000	1.7071	0.4142
4	2	1.0000	1.0000	0.0000
5	2	1.0000	1.0000	0.0000
6	2	1.0000	1.0000	0.0000
7	2	1.0000	1.0000	0.0000
8	2	1.0000	1.0000	0.0000
9	2	1.0000	1.0000	0.0000
10	2	1.0000	1.0000	0.0000
11	2	1.0000	1.0000	0.0000
12	2	1.0000	1.0000	0.0000
13	2	1.0000	1.0000	0.0000
14	2	1.0000	1.0000	0.0000
15	2	1.0000	1.0000	0.0000
16	2	1.0000	1.0000	0.0000
17	2	1.0000	1.0000	0.0000
18	2	2.0000	1.7071	0.4142
19	2	1.0000	1.0000	0.0000
20	2	1.0000	1.0000	0.0000
21	2	1.0000	1.0000	0.0000
22	2	1.0000	1.0000	0.0000
23	2	1.0000	1.0000	0.0000
24	2	1.0000	1.0000	0.0000
25	2	1.0000	1.0000	0.0000
26	2	1.0000	1.0000	0.0000
27	2	1.0000	1.0000	0.0000
28	2	1.0000	1.0000	0.0000
29	2	1.0000	1.0000	0.0000
30	2	1.0000	1.0000	0.0000
31	2	1.0000	1.0000	0.0000

32	2	1.0000	1.0000	0.0000
33	2	1.0000	1.0000	0.0000
34	2	1.0000	1.0000	0.0000
35	2	1.0000	1.0000	0.0000
36	2	1.0000	1.0000	0.0000
37	2	1.0000	1.0000	0.0000
38	2	1.0000	1.0000	0.0000
39	2	1.0000	1.0000	0.0000
40	2	1.0000	1.0000	0.0000
41	2	1.0000	1.0000	0.0000
42	2	1.0000	1.0000	0.0000
43	2	1.0000	1.0000	0.0000
44	2	1.0000	1.0000	0.0000
45	2	1.0000	1.0000	0.0000
46	2	1.0000	1.0000	0.0000
47	2	1.0000	1.0000	0.0000
48	2	1.0000	1.0000	0.0000
49	2	1.0000	1.0000	0.0000
50	2	2.0000	1.7071	0.4142
51	2	1.0000	1.0000	0.0000
52	2	1.0000	1.0000	0.0000
53	2	1.0000	1.0000	0.0000
54	2	1.0000	1.0000	0.0000
55	2	1.0000	1.0000	0.0000
56	2	1.0000	1.0000	0.0000
57	2	1.0000	1.0000	0.0000
58	2	1.0000	1.0000	0.0000
59	2	1.0000	1.0000	0.0000
60	2	1.0000	1.0000	0.0000
61	2	1.0000	1.0000	0.0000
62	2	1.0000	1.0000	0.0000
63	2	1.0000	1.0000	0.0000
64	2	1.0000	1.0000	0.0000
65	2	1.0000	1.0000	0.0000
66	2	1.0000	1.0000	0.0000

67	2	2.0000	1.7071	0.4142
68	2	1.0000	1.0000	0.0000
69	2	1.0000	1.0000	0.0000
70	2	2.0000	1.7071	0.4142
71	2	1.0000	1.0000	0.0000
72	2	1.0000	1.0000	0.0000
73	2	1.0000	1.0000	0.0000
74	2	1.0000	1.0000	0.0000
75	2	2.0000	1.7071	0.4142
76	2	1.0000	1.0000	0.0000
77	2	1.0000	1.0000	0.0000
78	2	1.0000	1.0000	0.0000

Ñielol

Locus	tamaño muestra	na	ne	h
1	24	2.0000	1.9348	0.4832
2	24	2.0000	1.7071	0.4142
3	24	1.0000	1.0000	0.0000
4	24	2.0000	1.9348	0.4832
5	24	1.0000	1.0000	0.0000
6	24	2.0000	1.9348	0.4832
7	24	1.0000	1.0000	0.0000
8	24	1.0000	1.0000	0.0000
9	24	1.0000	1.0000	0.0000
10	24	2.0000	2.0000	0.5000
11	24	2.0000	1.1892	0.1591
12	24	1.0000	1.0000	0.0000
13	25	2.0000	1.9780	0.4944
14	25	2.0000	1.8688	0.4649
15	25	2.0000	1.6826	0.4057
16	25	2.0000	1.4706	0.3200
17	25	1.0000	1.0000	0.0000
18	25	1.0000	1.0000	0.0000
19	25	1.0000	1.0000	0.0000
20	18	2.0000	1.3427	0.2552
21	18	2.0000	1.8000	0.4444
22	18	2.0000	1.8000	0.4444
23	18	2.0000	1.8000	0.4444
24	18	2.0000	1.9533	0.4880
25	18	1.0000	1.0000	0.0000
26	18	2.0000	1.9348	0.4832
27	18	1.0000	1.0000	0.0000
28	18	2.0000	1.5632	0.3603
29	18	2.0000	1.9942	0.4985
30	18	2.0000	1.3427	0.2552
31	23	1.0000	1.0000	0.0000

32	23	2.0000	1.5220	0.3430
33	23	1.0000	1.0000	0.0000
34	23	1.0000	1.0000	0.0000
35	23	2.0000	1.9375	0.4839
36	23	2.0000	1.0449	0.0430
37	23	2.0000	1.9909	0.4977
38	23	1.0000	1.0000	0.0000
39	23	2.0000	1.9464	0.4862
40	23	2.0000	1.4927	0.3301
41	23	1.0000	1.0000	0.0000
42	23	2.0000	1.0449	0.0430
43	24	1.0000	1.0000	0.0000
44	24	1.0000	1.0000	0.0000
45	24	2.0000	1.4813	0.3249
46	24	1.0000	1.0000	0.0000
47	24	2.0000	1.5646	0.3609
48	24	1.0000	1.0000	0.0000
49	24	1.0000	1.0000	0.0000
50	24	1.0000	1.0000	0.0000
51	24	2.0000	1.0430	0.0412
52	24	1.0000	1.0000	0.0000
53	24	1.0000	1.0000	0.0000
54	24	1.0000	1.0000	0.0000
55	24	1.0000	1.0000	0.0000
56	24	1.0000	1.0000	0.0000
57	24	1.0000	1.0000	0.0000
58	24	1.0000	1.0000	0.0000
59	24	1.0000	1.0000	0.0000
60	24	1.0000	1.0000	0.0000
61	24	1.0000	1.0000	0.0000
62	24	1.0000	1.0000	0.0000
63	24	1.0000	1.0000	0.0000
64	24	1.0000	1.0000	0.0000
65	24	1.0000	1.0000	0.0000
66	24	1.0000	1.0000	0.0000

67	25	1.0000	1.0000	0.0000
68	25	1.0000	1.0000	0.0000
69	25	2.0000	1.9780	0.4944
70	25	2.0000	1.6729	0.4022
71	25	2.0000	1.9992	0.4998
72	25	2.0000	1.4706	0.3200
73	25	1.0000	1.0000	0.0000
74	25	1.0000	1.0000	0.0000
75	25	2.0000	1.8072	0.4466
76	25	2.0000	1.4706	0.3200
77	25	1.0000	1.0000	0.0000
78	25	2.0000	1.9932	0.4983

Purranque

Locus	tamaño muestra	na	ne	h
1	24	1.0000	1.0000	0.0000
2	24	1.0000	1.0000	0.0000
3	24	2.0000	1.0430	0.0412
4	24	1.0000	1.0000	0.0000
5	24	1.0000	1.0000	0.0000
6	24	2.0000	1.1374	0.1208
7	24	2.0000	1.0430	0.0412
8	24	1.0000	1.0000	0.0000
9	24	2.0000	1.9849	0.4962
10	24	2.0000	1.8420	0.4571
11	24	2.0000	1.1374	0.1208
12	24	2.0000	1.5646	0.3609
13	24	1.0000	1.0000	0.0000
14	24	1.0000	1.0000	0.0000
15	24	2.0000	1.6969	0.4107
16	24	2.0000	1.6969	0.4107
17	24	1.0000	1.0000	0.0000
18	24	1.0000	1.0000	0.0000
19	24	2.0000	1.8420	0.4571
20	24	1.0000	1.0000	0.0000
21	24	1.0000	1.0000	0.0000
22	24	2.0000	1.1374	0.1208
23	24	2.0000	1.6969	0.4107
24	24	2.0000	1.0430	0.0412
25	24	2.0000	1.0430	0.0412
26	24	2.0000	2.0000	0.5000
27	24	2.0000	1.4951	0.3311
28	24	2.0000	1.6969	0.4107
29	24	1.0000	1.0000	0.0000
30	24	1.0000	1.0000	0.0000
31	23	1.0000	1.0000	0.0000

32	23	1.0000	1.0000	0.0000
33	23	2.0000	1.9991	0.4998
34	23	2.0000	1.0449	0.0430
35	23	2.0000	1.3828	0.2768
36	23	2.0000	1.0929	0.0850
37	23	2.0000	1.7440	0.4266
38	23	1.0000	1.0000	0.0000
39	23	2.0000	1.4510	0.3108
40	25	1.0000	1.0000	0.0000
41	23	1.0000	1.0000	0.0000
42	23	1.0000	1.0000	0.0000
43	23	1.0000	1.0000	0.0000
44	23	2.0000	1.1440	0.1259
45	23	2.0000	1.5954	0.3732
46	23	2.0000	1.7119	0.4159
47	23	2.0000	1.0449	0.0430
48	23	1.0000	1.0000	0.0000
49	23	1.0000	1.0000	0.0000
50	23	2.0000	1.4927	0.3301
51	23	1.0000	1.0000	0.0000
52	23	1.0000	1.0000	0.0000
53	23	1.0000	1.0000	0.0000
54	23	1.0000	1.0000	0.0000
55	24	1.0000	1.0000	0.0000
56	24	1.0000	1.0000	0.0000
57	24	1.0000	1.0000	0.0000
58	24	1.0000	1.0000	0.0000
59	24	1.0000	1.0000	0.0000
60	24	1.0000	1.0000	0.0000
61	24	1.0000	1.0000	0.0000
62	24	2.0000	1.0430	0.0412
63	24	1.0000	1.0000	0.0000
64	24	1.0000	1.0000	0.0000
65	24	1.0000	1.0000	0.0000
66	24	1.0000	1.0000	0.0000

67	25	2.0000	1.0412	0.0396
68	25	2.0000	1.0412	0.0396
69	25	2.0000	1.6826	0.4057
70	25	2.0000	1.2879	0.2236
71	25	2.0000	1.6826	0.4057
72	25	2.0000	1.0412	0.0396
73	25	2.0000	1.9661	0.4914
74	25	1.0000	1.0000	0.0000
75	25	1.0000	1.0000	0.0000
76	25	2.0000	1.3460	0.2571
77	25	2.0000	1.8688	0.4649
78	25	1.0000	1.0000	0.0000

Los Queules

Locus	tamaño muestra	na	ne	h
1	25	2.0000	1.9661	0.4914
2	25	2.0000	1.0412	0.0396
3	25	1.0000	1.0000	0.0000
4	25	2.0000	1.4069	0.2892
5	25	2.0000	1.0412	0.0396
6	25	2.0000	1.2328	0.1889
7	25	2.0000	1.9231	0.4800
8	25	2.0000	1.0412	0.0396
9	25	2.0000	1.6043	0.3767
10	25	2.0000	1.9932	0.4983
11	25	1.0000	1.0000	0.0000
12	25	1.0000	1.0000	0.0000
13	24	2.0000	1.0888	0.0815
14	24	2.0000	1.2441	0.1962
15	24	2.0000	1.4951	0.3311
16	24	2.0000	1.9849	0.4962
17	24	1.0000	1.0000	0.0000
18	24	2.0000	1.9872	0.4968
19	24	2.0000	1.2441	0.1962
20	20	1.0000	1.0000	0.0000
21	20	2.0000	1.1079	0.0974
22	20	2.0000	1.2328	0.1889
23	20	1.0000	1.0000	0.0000
24	20	2.0000	2.0000	0.5000
25	20	2.0000	1.0519	0.0494
26	20	2.0000	1.9033	0.4746
27	20	2.0000	1.0519	0.0494
28	20	2.0000	1.3022	0.2321
29	20	2.0000	1.3761	0.2733
30	20	1.0000	1.0000	0.0000

31	24	1.0000	1.0000	0.0000
32	24	2.0000	1.0888	0.0815
33	24	1.0000	1.0000	0.0000
34	24	2.0000	1.4951	0.3311
35	24	2.0000	1.5646	0.3609
36	24	1.0000	1.0000	0.0000
37	24	2.0000	1.8439	0.4577
38	24	1.0000	1.0000	0.0000
39	24	2.0000	2.0000	0.5000
40	24	2.0000	1.9533	0.4880
41	24	2.0000	1.1374	0.1208
42	24	2.0000	1.3635	0.2666
43	25	1.0000	1.0000	0.0000
44	25	1.0000	1.0000	0.0000
45	25	2.0000	1.9231	0.4800
46	25	1.0000	1.0000	0.0000
47	25	2.0000	1.6826	0.4057
48	25	1.0000	1.0000	0.0000
49	25	2.0000	1.0412	0.0396
50	25	2.0000	1.7411	0.4256
51	25	2.0000	1.0412	0.0396
52	25	1.0000	1.0000	0.0000
53	25	1.0000	1.0000	0.0000
54	25	1.0000	1.0000	0.0000
55	24	2.0000	1.0430	0.0412
56	24	2.0000	1.9872	0.4968
57	24	1.0000	1.0000	0.0000
58	24	2.0000	1.4813	0.3249
59	24	2.0000	1.0430	0.0412
60	24	2.0000	1.4813	0.3249
61	24	2.0000	1.0430	0.0412
62	25	2.0000	1.8276	0.4528
63	24	2.0000	1.0430	0.0412
64	24	2.0000	1.6969	0.4107
65	24	2.0000	1.0430	0.0412

66	24	1.0000	1.0000	0.0000
67	24	1.0000	1.0000	0.0000
68	24	2.0000	1.4813	0.3249
69	24	2.0000	1.5646	0.3609
70	24	2.0000	1.6969	0.4107
71	24	2.0000	1.1892	0.1591
72	24	1.0000	1.0000	0.0000
73	24	1.0000	1.0000	0.0000
74	24	2.0000	1.6969	0.4107
75	24	1.0000	1.0000	0.0000
76	24	2.0000	1.9872	0.4968
77	24	1.0000	1.0000	0.0000
78	24	1.0000	1.0000	0.0000

Tanume

Locus	tamaño muestra	na	ne	h
1	23	2.0000	1.8568	0.4614
2	23	2.0000	1.5954	0.3732
3	23	1.0000	1.0000	0.0000
4	23	2.0000	1.9991	0.4998
5	23	1.0000	1.0000	0.0000
6	23	2.0000	1.9464	0.4862
7	23	2.0000	1.5220	0.3430
8	23	1.0000	1.0000	0.0000
9	23	1.0000	1.0000	0.0000
10	23	1.0000	1.0000	0.0000
11	17	2.0000	1.8513	0.4598
12	23	1.0000	1.0000	0.0000
13	25	2.0000	1.9231	0.4800
14	25	2.0000	1.4706	0.3200
15	25	1.0000	1.0000	0.0000
16	25	2.0000	1.9231	0.4800
17	25	1.0000	1.0000	0.0000
18	25	1.0000	1.0000	0.0000
19	25	1.0000	1.0000	0.0000
20	25	1.0000	1.0000	0.0000
21	25	1.0000	1.0000	0.0000
22	25	1.0000	1.0000	0.0000
23	25	1.0000	1.0000	0.0000
24	25	1.0000	1.0000	0.0000
25	25	2.0000	1.7411	0.4256
26	25	1.0000	1.0000	0.0000
27	24	2.0000	1.6969	0.4107
28	25	1.0000	1.0000	0.0000
29	25	2.0000	1.4706	0.3200
30	25	2.0000	1.9231	0.4800

31	25	2.0000	1.1807	0.1530
32	25	2.0000	1.6043	0.3767
33	25	1.0000	1.0000	0.0000
34	25	1.0000	1.0000	0.0000
35	25	2.0000	1.9661	0.4914
36	25	1.0000	1.0000	0.0000
37	25	1.0000	1.0000	0.0000
38	25	2.0000	1.4706	0.3200
39	25	1.0000	1.0000	0.0000
40	25	2.0000	1.9992	0.4998
41	25	1.0000	1.0000	0.0000
42	25	1.0000	1.0000	0.0000
43	24	2.0000	1.0430	0.0412
44	24	2.0000	1.0888	0.0815
45	24	2.0000	1.8439	0.4577
46	24	2.0000	1.0430	0.0412
47	24	2.0000	1.6969	0.4107
48	24	1.0000	1.0000	0.0000
49	24	2.0000	1.2441	0.1962
50	24	2.0000	1.6357	0.3886
51	24	2.0000	1.9038	0.4747
52	25	2.0000	1.6826	0.4057
53	24	1.0000	1.0000	0.0000
54	24	1.0000	1.0000	0.0000
55	24	1.0000	1.0000	0.0000
56	24	1.0000	1.0000	0.0000
57	24	2.0000	1.7773	0.4373
58	24	2.0000	1.9038	0.4747
59	24	1.0000	1.0000	0.0000
60	24	2.0000	1.7071	0.4142
61	24	2.0000	2.0000	0.5000
62	25	2.0000	1.9231	0.4800
63	24	1.0000	1.0000	0.0000
64	24	2.0000	1.4813	0.3249
65	24	2.0000	1.1374	0.1208

66	24	1.0000	1.0000	0.0000
67	25	1.0000	1.0000	0.0000
68	25	1.0000	1.0000	0.0000
69	25	1.0000	1.0000	0.0000
70	25	2.0000	1.4706	0.3200
71	25	2.0000	1.4706	0.3200
72	25	2.0000	1.0412	0.0396
73	25	1.0000	1.0000	0.0000
74	25	1.0000	1.0000	0.0000
75	25	1.0000	1.0000	0.0000
76	25	1.0000	1.0000	0.0000
77	25	1.0000	1.0000	0.0000
78	25	1.0000	1.0000	0.0000

ANEXO 3

DIVERSIDAD GENETICA DE CULTIVARES DE L*apageria rosea* DETERMINADA A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO ISSR

Hoffens, K[1]. y Riegel R.[1]

[1] *Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Campus Isla Teja, Valdivia, Chile. Karin@Hoffens.cl.*

Abstract. *Lapageria rosea* is an endemic species of Chile, that has a great ornamental potencial, because it has flowers with a wide variation in color, size and shape. The plant nursery of the Instituto Agrícola El Vergel de Angol, has created approximately 20 copihue cultivars very different from each other. However, it is not known genetic diversity of this group of cultivars, and hence it is not known how much of their genetic potential is being used. The aim of this study is to determine the genetic diversity of 16 copihue cultivars from the plant nursery of the Instituto Agrícola El Vergel de Angol. To do this work we used 7 ISSR molecular markers. Data generated were analyzed with software POPGENE version 1,32 and TPFGA version 1,3.We obtained 4 cultivar groups, and cultivars of white color, proveed to be the most genetically diverse. In general, the group of cultivars analyzed presents a certain genetic diversity, which would use to continue with breeding programs.

Introducción

El copihue es una especie monocotiledónea, endémica de Chile perteneciente a la familia Philesiaceae y al género Lapageria, siendo *Lapageria rosea* la única especie de este género

(Martínez, 1985). El copihue posee un gran potencial ornamental dado por la gran variación de tamaño, color y forma de sus flores.

El conocimiento de la diversidad genética existente en copihue es una información previa y básica para el establecimiento de futuros programas de mejoramiento genético , ya que ésta es necesaria para dirigir el proceso de mejora genética por selección de caracteres (Nuez et al, 2000). Además, el conocimiento de la diversidad genética facilita la identificación de accesiones que permitan conservar la riqueza génica y seleccionar individuos genéticamente distintos para optimizar la heterosis en cruzamientos dirigidos (Qiu et al, 1995).

En Chile se han realizado iniciativas destinadas a establecer programas de mejoramiento genético de copihue y nuevas tecnologías para su producción. Es así como el vivero perteneciente al Instituto Agrícola el Vergel de Angol ha obtenido, tras largos años de trabajo, aproximadamente 20 cultivares de copihue fenotípicamente muy diversos. Sin embargo, aún se desconoce la diversidad genética de este grupo de cultivares y por lo tanto, no se sabe cuánto de su potencial genético se está efectivamente utilizando.

Actualmente, los avances en biología molecular han incorporado nuevas herramientas, denominadas marcadores moleculares, que permiten la obtención de perfiles genéticos de individuos, facilitando el análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones de una especie determinada.

El objetivo de este estudio es determinar la diversidad genética de 16 cultivares de copihue provenientes del Vivero El Vergel de Angol a través de la utilización de marcadores moleculares del tipo ISSR, de manera de generar la información básica necesaria para establecer a futuro programas de mejoramiento utilizando el máximo potencial genético disponible.

Material y Método

Características del material analizado

Para realizar el presente estudio se trabajó con hojas provenientes de 16 cultivares de copihue del Vivero el Vergel de Angol. En la tabla 1 se señalan los cultivares analizados y sus características principales.

Tabla 1. Nombre y características principales de cultivares de copihue analizados.

Nombre del cultivar	Nº del cultivar	Características principales
Ligtromu	1	Flor de color blanco puro
Nahuelbuta	2	Flor de color blanco con pétalos interiores morados
Colcopiu	3	Flor de color rojo común
Collingue	4	Flor de color blanco con bordes jaspeados de rojo y morado; flor mediana pero producidas en abundancia
Relmutral	5	Flor de color blanco con ribetes rojos y de tamaño grande
Contulmo	6	Flor de color rojo muy intenso
Raimilla	8	Flor de color crema
El Vergel	9	Flor de color rosado carne
Cobquecura	10	Flor de color blanco teñido de rojo salmón
Rayen	11	Flor grande y ancha de color rosado
Toqui	13	Flor grande y alargada de color blanco puro
Ongol	14	Flor de color rosado salmón y muy grande
Caupolican	16	Flor de color rojo fuerte y gran tamaño
Cheuquecura	19	Flor de color rosado
Malleco	20	Flor de color rojo con pintas blancas y gran tamaño
n		Cultivar no identificado

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de hojas nuevas de copihue. El método a usar para la extracción total de ADN fue aquel originalmente descrito por Murray y Thompson (1980) y modificado por Doyle y Doyle (1990). La extracción consistió de los siguientes pasos: a un trozo de hoja se le agregó 100 ul de tampón de extracción. Luego éste fue sumergido en Nitrógeno líquido y luego el tejido fue disgregado mediante un pistón estéril. Se le agregó al tejido disgregado 400 ul de tampón de extracción y se mezcló por inversión. Luego se incubó la mezcla a Baño María a 65°C por 30 minutos mezclando por inversión ocasionalmente. Se agregó 500 ul de cloroformo:fenol:alcohol isoamílico (24:25:1) en cámara de seguridad. Se agitó la mezcla en vórtex. Se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm. Se traspasaron los 400 ul de sobrenadante a un nuevo tubo de microfuga. Se agregaron 400 ul de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se agitó la mezcla en vórtex. Se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm. Se traspasaron 300 ul de sobrenadante a un nuevo tubo de microfuga. Se agregaron 200 ul de isopropanol frio (-18°C). Se centrifugó 10 minutos a 14.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 100 ul de etanol al 70%. Se centrifugó 1 minuto a 5.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 30 minutos a t° ambiente. Se resuspendió el ADN en 80 ul de agua destilada. El tampón de extracción consistió en una solución compuesta por ß-mercaptoetanol 0,4%, $NaOHSO_3$ 0,38%, NaOH 8M y CTAB 2%.

Luego se realizó la purificación del ADN extraído mediante un Kit de purificación marca Fermentas. Como resultado de la purificación se obtuvo 40 ul de solución de ADN para cada muestra. Finalmente el ADN purificado fue diluido en una razón 1/100, de manera de disminuir la concentración de fenoles y polisacáridos, las que podrían inhibir las reacciones de amplificación.

Amplificación con marcadores ISSR

La amplificación de ADN se realizó con marcadores moleculares del tipo “Inter Simple Sequence Repeats” (ISSR) mediante reacciones PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en un termociclador PTC-1196 de MJ Research. En la tabla 2 se señalan los partidores ISSR utilizados.

Tabla 2. Partidores ISSR utilizados en el análisis de los cultivares.

Partidores ISSR	Secuencia	T° annealing	Referencia
UBC 826	$(AC)_8C$	52,8° C	Ajibade et al, 2000; Ali, M. 2004; Herrera et al, 2002.
UBC 834	$(AG)_8CTT$	53,7° C	Ajibade et al, 2000; Ali, M. 2004; Nan et al, 2003.
ISSR 27	$VHV(GTG)_5$ V= A,C,G H= A,C ,T	59,7° C	Menzies et al, 2003.
ISSR 29	$BDB(CCA)_5$ B= C,G ,T D= A,G,T	59,7° C	Menzies et al, 2003.
ISSR GAC	$(GA)_9C$	56,7° C	Liu, B. y Wendel, J., 2001.
ISSR 825	$(AC)_8T$	50,4° C	Ajibade et al, 2000; Ali, M. 2004; Herrera et al, 2002.
ISSR 32	$DBD(AAC)_5$ D= A,G,T B= C,G,T	47,6°C	Menzies et al, 2003.

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó mediante reacciones PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en un termociclador PTC-1196 de MJ Research. La solución PCR consistió en; 2,5 ul de tampón 10X $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 ul de $MgCl_2$ 50mM, 1,5 ul dNTP´s 100 mM c/u, 1,0 ul partidor ISSR 100 pmol/ul, 2,0 ul de ADN y 0,6 ul Taq polimerasa en un volumen final de 25 ul. El programa del termociclador para realizar las reacciones PCR fue el siguiente: 94°C x 3 minutos - 94°C x 3 segundos - T° media específica del partidor x 1 minuto - 72°C x 1 minuto - repetir de paso 2 a 4, 39 veces - 72°C por 5 minutos - 4°C por 18 horas.

Los fragmentos amplificados fueron separados en una cámara de electroforesis a 50 Volt por 2,0 horas. Para lograr una buena resolución se utilizaron geles de agarosa al 1,5%. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador Vilber Lourmat EXT-20M tras teñir los geles con una solución de bromuro de etidio al 0,05% durante 30 minutos.

Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó a partir de la evaluación de los fragmentos obtenidos con un 1 y un 0 dependiendo de su presencia o ausencia en la accesión respectiva. Los parámetros evaluados fueron; nº de loci polimórficos determinados por conteo simple, porcentaje de fragmentos polimórficos calculado como la división del número de loci polimórficos por el nº total de loci analizados. Mediante el software POPGENE versión 1,32 (Yeh y Boyle, 1997) se determinó el nº alelos por locus (na) , nº efectivo de alelos por locus (ne) y diversidad genética del grupo de cultivares (H). Finalmente, mediante el software TPFGA se determinó la distancia genética entre cultivares y relaciones genéticas de éstos a través de un dendograma.

Resultados

De los fragmentos evaluados, 37 presentaron polimorfismo entre los cultivares, lo cual corresponde al 79% del total de los amplicones visualizados. El número de alelos por locus fue de 1,78 y el número efectivo de alelos por locus fue de 1,47. La diversidad genética presente en el grupo de cultivares fue de 0,27.

Los marcadores ISSR 27 e ISSR 29 fueron los más informativos presentando 8 fragmentos polimórficos cada uno. En la Figura1 se observa el patrón de amplificación del partidor ISSR 27.

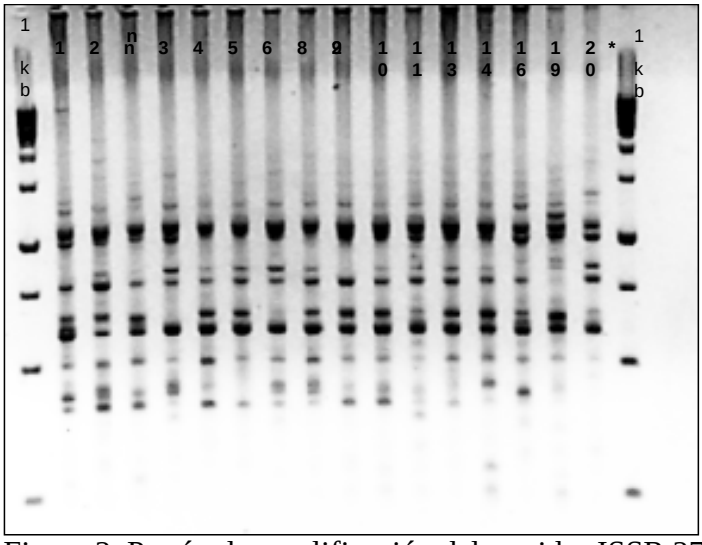

Figura 2. Patrón de amplificación del partidor ISSR 27.

* Número de los cultivares

En relación a las distancias genéticas entre genotipos (ver tabla 3), los cultivares Malleco (rojo) y Raimilla (blanco) fueron los que más se diferenciaron entre sí (0,63) y los cultivares Cobquecura (rosado) y Ongol (rosado) presentaron la menor distancia genética (0,11), aún así, ambos cultivares se diferencian en cinco loci. Entre los cultivares de flor blanca la mayor distancia genética la presentaron Raimilla y Ligtromu (0,55). Por otro lado, entre los cultivares de flor roja la mayor distancia genética la presentaron los cultivares Colcopiú y Malleco (0,51). La mayor distancia genética entre los cultivares de flor rosada se presentó entre Ongol y Cheuquecura (0,29) y finalmente, los cultivares Nahuelbuta y Relmutral presentaron la mayor distancia genética entre los cultivares de flor blanca jaspeada con rojo (0,44).

Tabla 3. Distancia genética entre cultivares de copihue según Nei (1978) para sistemas con sólo dos alelos y sin codominancia.

Nº cultivar	1	2	n	3	4	5	6	8	9	10	11	13	14	16	19	20
1	-															
2	0,23	-														
n	0,44	0,44	-													
3	0,35	0,29	0,38	-												
4	0,16	0,26	0,48	0,32	-											
5	0,44	0,44	0,41	0,32	0,29	-										
6	0,35	0,29	0,26	0,29	0,38	0,26	-									
8	0,55	0,35	0,32	0,48	0,44	0,26	0,35	-								
9	0,38	0,26	0,48	0,59	0,23	0,35	0,44	0,32	-							
10	0,41	0,35	0,38	0,41	0,32	0,38	0,29	0,48	0,21	-						
11	0,38	0,51	0,35	0,51	0,41	0,48	0,38	0,51	0,48	0,38	-					
13	0,38	0,32	0,41	0,38	0,35	0,29	0,21	0,38	0,29	0,21	0,29	-				
14	0,32	0,26	0,48	0,38	0,29	0,29	0,21	0,38	0,23	0,11	0,48	0,18	-			
16	0,41	0,35	0,38	0,41	0,26	0,44	0,35	0,48	0,32	0,29	0,38	0,32	0,38	-		
19	0,38	0,32	0,41	0,51	0,29	0,48	0,44	0,51	0,29	0,26	0,35	0,35	0,29	0,16	-	
20	0,35	0,41	0,51	0,55	0,26	0,44	0,41	0,63	0,21	0,13	0,32	0,26	0,26	0,23	0,21	-

En la figura 2 se pueden observar las relaciones genéticas entre cultivares a través de la elaboración de un dendograma basado en las distancias genéticas de Nei (1978) para sistemas con sólo dos alelos y sin codominancia.

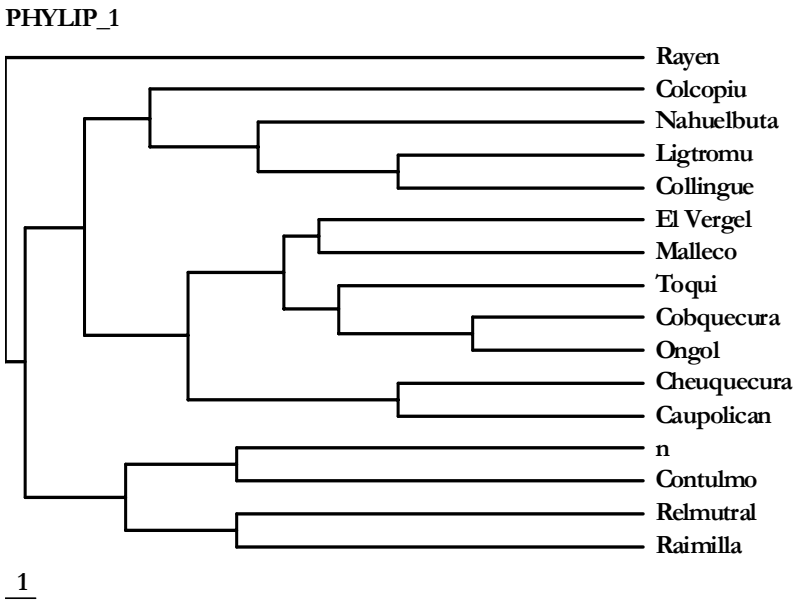

Figura 2. Dendograma de cultivares basado en distancias genéticas de Nei (1978) para sistemas con sólo dos alelos y sin codominancia.

Puesto que los valores de bootstrap (no publicados) de este dendograma son bajos, no se observa en forma clara la formación de grupos de cultivares, pero sí se puede distinguir una tendencia de éstos a asociarse en 4 grupos distintos. Un primer grupo se encuentra formado por el cultivar Rayen (blanco), un segundo grupo se encuentra conformado por los cultivares Colcopiu (rojo), Nahuelbuta (jaspeado), Ligtromu (blanco) y Collingue (jaspeado). El tercer grupo se encuentra conformado por el cultivar El Vergel (rosado), Malleco (rojo), Toqui (blanco), Cobquecura (rosado), Ongol (rosado), Cheuquecura (rosado) y Caupolicán (rojo). El último grupo de cultivares se encuentra conformado por el cultivar n (no identificado), Contulmo (rojo), Relmutral (jaspeado) y Raimilla (blanco).

Discusión

En el presente trabajo la utilización de marcadores ISSR ha permitido diferenciar en forma eficiente los 16 cultivares de copihue.

Respecto al porcentaje de fragmentos polimórficos y diversidad genética encontrada en el grupo de cultivares, éstos fueron superiores a los observados por Hoffens (2008) en poblaciones naturales de copihue, donde la población que presentó el mayor porcentaje de loci polimórficos y diversidad genética fue Los Queules con valores de un 66% y un 0,2 respectivamente. La amplia diversidad genética del grupo de cultivares podría deberse a que en el desarrollo de éstos estarían involucradas plantas madres muy distintas genéticamente unas de otras.

A pesar de no haber una agrupación clara de los cultivares, el origen de la tendencia a agruparse en 4 grupos distintos de acuerdo a sus distancias genéticas, podría deberse a que cada grupo habría evolucionado a partir de plantas madres distintas. Lamentablemente, no existe información en el Vivero el Vergel, respecto a los cruzamientos que dieron origen a los diferentes cultivares que hoy día existen.

Los cultivares de color blanco son los más diversos genéticamente, puesto que se encuentran distribuídos entre los 4 grupos de cultivares observados. Por otro lado, los cultivares de color rosado son los menos diversos genéticamente ya que se presentan sólo en uno de los grupos.

Conclusiones

La utilización de marcadores moleculares del tipo ISSR permitió determinar la diversidad genética de 16 cultivares de copihue y además diferenciarlos genéticamente.

Los cultivares más diferentes genéticamente son; Malleco de color rojo y Raimilla de color blanco.

El grupo de cultivares analizados presenta una cierta diversidad genética, lo que permitiría utilizar este germoplasma para continuar con programas de mejoramiento.

Bibliografía

Ali, M. 2004. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) variations in the genus Cicer. Euphytica 135: 229-238.

Ajibade, S., Weeden, N. y Chite, S. 2000. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. Euphytica. III: 47-55.

Doyle, J. y Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.

Herrera, R., Cares, V., Wilkison, M. y Caligari P. 2002. Characterisation of genetic variation between Vitis vinifera cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. Euphytica. 124: 139-145.

Hoffens, K. 2008. Diversidad genética en poblaciones de copihue (*Lapageria rosea* Ruiz *et* Pav.) determinada a través de marcadores moleculares. Tesis Doctorado en Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 107 p.

Liu, B. y Wendel, J. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes. 1: 205-208.

Martínez, O. 1985. Plantas trepadoras del bosque chileno. Editorial Albuda. Conaf (Corporación Nacional Forestal X región). 132 p.

Menzies, J., Bakkeren, G., Matheson, F., Procunier, J. y Woods, S. 2003. Use of Intersimple sequence repeats and amplified fragment lenght polymorfisms to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of *Ustilago*. Ecology and Population Biology. 93:2.

Murray, M. y Thompson,W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321 – 4325.

Nan, P., Shi, S., Peng, S., Tian, C. y Zhong, Y. 2003. Genetic diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from central and south-west China revealed by ISSR markers. Annals of Botany. 91: 1-5.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterocigosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583 - 590.

Nuez, F., Carrillo, J.y Ron De AM. 2000. Introducción. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Nuez, F. y Carrillo, J. (Eds.). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 579 p.

Qiu, J., Santen, E. y Tuzun, S. 1995. Optimization of DNA amplification fingerprinting techniques to study genetic relationships of white lupin germplasm. Plant Breeding. 114: 525 – 529.

Yeh, F. y Boyle, T. 1997. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and cuantitative traits. Belgian Journal of Botany. Pp 129 – 157.