



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Agronomía

Aplicación de métodos de inferencia filogenética para el estudio de la variabilidad y la filogenia del avellano chileno, *Gevuina avellana* Molina.

Memoria presentada como parte
de los requisitos para optar al
título de Ingeniero Agrónomo

Roberto Javier Bahamonde Andrade

Valdivia - Chile

2009

PROFESOR PATROCINANTE:

Ricardo Riegel S.
Ing. Agr., M. Agr., Dr. Rer. Silv.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

PROFESORES INFORMANTES:

Fernando Medel S.
Ing. Agr., Dr. Ing. Agr.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

José Núñez N.
Bioq., Dr. Cs. Zool.
Instituto de Zoología

*A Tadea Andrade Oyarzún y a
Candelaria Oyarzún Gallardo.*

AGRADECIMIENTOS

Hoy me encuentro casi al final de un periodo que duró 8 años, varios más de los que hubiera debido durar, y veo que el trabajo que está a punto de concluir solamente fue posible gracias a la ayuda de muchas personas que estuvieron a mi lado; para todas ellas, va mi gratitud en esta página. Si a alguien debo agradecer por la realización de esta tesis, es a mi profesor patrocinante, el Sr. Ricardo Riegel, quien siempre tuvo la mayor disposición para encauzar mi labor y mostró una paciencia encomiable en todos los momentos en que yo no estuve a la altura. Profesor, mil gracias por todo, no tengo más palabras para expresarle mi gratitud. También deseo agradecer a los profesores informantes, el Sr. José Núñez y el Sr. Fernando Medel, por la valiosa ayuda e información entregada y por todos los consejos que permitieron mejorar esta investigación y llevarla a buen término.

En el trabajo de recolección de muestras, es mi deber recordar y agradecer a los tres compañeros que recorrieron junto a mí el centro sur de Chile, por caminos accidentados y a bordo de vehículos que tenían por costumbre dejar de funcionar. Gracias, Nolberto Arismendi, Gonzalo Medel y Leonardo San Martín. Y al llegar al laboratorio, otras personas con más experiencia me brindaron su apoyo y conocimientos, especialmente Yerko Quitral, Karin Hoffens, Débora Véliz y Manuel Muñoz; gracias, donde estén.

Pero fuera de lo académico hubo otras tantas personas que me dieron lo que estuviera en su mano cuando lo necesité. Gracias sobre todo a ti, Mamá, por tu amor, comprensión y cuidados, te debo demasiado. Gracias a ustedes, chicos del Hogar Villa Virginia, su compañía ha [de]formado mi ser; en especial gracias Coto por ser un hermano, Tito, Manuel, Felipe, Fito y Cami por toda la amistad, Mariana por el tiempo compartido, Poly por salvarme con Lukas y... hay 50 o 60 villanos más, espero que entiendan que no los nombre a todos, ustedes saben que los recuerdo siempre.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	3
1	INTRODUCCIÓN	4
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1	Especie	6
2.1.1	Descripción	6
2.1.2	Distribución	6
2.1.3	Taxonomía	8
2.1.4	Variación intraespecífica	9
2.2	Variabilidad genética y técnicas moleculares	10
2.2.1	Uso del ADN del cloroplasto	10
2.2.2	Uso de la región ITS	12
2.3	Métodos de inferencia filogenética	13
2.3.1	Parsimonia	13
2.3.2	Máxima verosimilitud	14
2.3.3	Análisis bayesiano	15
3	MATERIAL Y MÉTODO	16
3.1	Material	16
3.1.1	Material vegetal	16
3.1.2	Utensilios de colecta	17
3.1.3	Material de laboratorio	17
3.1.4	Reactivos	17
3.1.5	Programas computacionales	18
3.2	Método	18
3.2.1	Obtención de material vegetal	18
3.2.2	Protocolo de extracción de ADN	19
3.2.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20

3.2.3.1	Amplificación de la región trnS-psbK	22
3.2.3.2	Amplificación de la región ITS	22
3.2.3.3	Electroforesis	22
3.2.4	Secuenciación y alineamiento	23
3.2.5	Análisis de las secuencias del cloroplasto	23
3.2.6	Análisis filogenético de la región ITS	24
3.2.6.1	Alineamiento	24
3.2.6.2	Inferencia filogenética	24
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
4.1	Extracción del ADN	26
4.2	PCR	27
4.3	Alineamiento de secuencias del cloroplasto	29
4.4	Diseño de partidores	30
4.5	Amplificación con partidores específicos	34
4.6	Análisis filogenético de la región ITS	36
4.6.1	Inferencia por máxima parsimonia	38
4.6.2	Inferencia por máxima verosimilitud	41
4.6.3	Inferencia por análisis bayesiano	42
5	CONCLUSIONES	45
6	BIBLIOGRAFÍA	46
7	ANEXOS	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Secuencia de los partidores usados para amplificar las regiones de interés en el genoma de <i>G. avellana</i> .	21
2	Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa.	22
3	Secuencia de los partidores específicos diseñados para amplificar las regiones de interés en el cloroplasto de <i>G. avellana</i>	34
4	Resumen de la inferencia por máxima parsimonia para el análisis de 83 secuencias ITS.	39
5	Resumen de la inferencia por máxima verosimilitud para el análisis de 83 secuencias ITS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa de distribución de la especie	7
2	Clasificación de la tribu Macadamieae obtenida con el uso del análisis bayesiano de secuencias ITS	9
3	Mapa de los sitios de colecta	16
4	Esquema del ADN ribosomal y de los sitios que amplifican la región ITS	20
5	Electroforesis de ADN total en un gel de agarosa al 1%.	26
6	Alineamiento de secuencias del interior de la región trnS0r-psbK obtenidas de cuatro individuos de <i>G. avellana</i> .	31
7	Alineamiento de secuencias flanqueadas por ccmp2 obtenidas de seis individuos de <i>G. avellana</i> .	32
8	Secuencias preliminares de la región trnS-psbK de <i>G. avellana</i> , con resalte de los fragmentos escogidos para el diseño de partidores específicos para la especie.	33
9	Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados con los partidores GatrnS0rF1 y GatrnS0rR1 en un gel de agarosa 1%.	34
10	Alineamiento de un fragmento de la región ITS de 5 ejemplares de <i>G. avellana</i> .	37
11	Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima parsimonia, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 10 para la apertura de un <i>gap</i> y 5 para su extensión	40
12	Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima verosimilitud, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 25 para la apertura de un <i>gap</i> y 10 para su extensión.	43
13	Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de	

análisis bayesiano, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 10 para la apertura de un *gap* y 5 para su extensión.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Lista de especies usadas en las inferencias filogenéticas	53
2	Árboles filogenéticos	56

RESUMEN

El avellano (*Gevuina avellana*) es una especie arbórea nativa de Chile, de creciente interés económico, principalmente por sus frutos comestibles y por su madera. Desde un punto de vista científico y económico, puede resultar útil conocer más datos acerca de su variabilidad genética y de su filogenia, ambos ámbitos hasta hoy relativamente poco estudiados en especies chilenas.

Se desarrolló una investigación con ADN del núcleo y del cloroplasto de individuos procedentes de 11 localidades del país y se emplearon técnicas moleculares y análisis con el objetivo de buscar variabilidad genética en estas regiones del genoma, desarrollar partidores específicos para la especie a partir de la región trnS-psbK del cloroplasto y usar la región ITS para establecer la posición del avellano dentro de la familia Proteaceae mediante tres métodos de inferencia filogenética: máxima parsimonia, máxima verosimilitud y análisis bayesiano.

La presencia de polifenoles y problemas metodológicos durante la extracción de ADN y la PCR condujeron a trabajar con un número bajo de muestras. Se concluyó que la región ITS no es lo suficientemente variable para el objetivo planteado y que la región trnS-psbK presenta variabilidad, pero la cantidad de muestras disponibles no permitió evaluarla ni desarrollar partidores óptimos. De los tres partidores diseñados, cumplen con su objetivo el partidor Ga-trnS0-F1 y Ga-trnS0r-R1, no así el partidor Ga-trnS0r-R2.

El estudio filogenético se realizó con secuencias de la región ITS del avellano y de 78 géneros de la familia Proteaceae disponibles en bases de datos internacionales. Las conclusiones de estas pruebas son que al alinear las secuencias, el variar las penalizaciones por apertura y por extensión de un *gap* se producían diferencias en la posición y soporte de los grupos de taxones proporcionados por cada método de inferencia. A pesar de ello, los tres métodos corroboran la información obtenida por

otros investigadores con distintas regiones del genoma, que sitúan a *Gevuina* junto a otros siete géneros dentro de la subtribu Geuininae y a esta dentro de la tribu Macadamieae.

SUMMARY

Chilean hazelnut (*Gevuina avellana*) is a tree-species native of Chile, with a growing economic interest, caused for its edible fruits and its wood. Knowledge about its genetic variability and phylogeny is relevant for scientists and growers, and these issues are a scarcely studied field for Chilean species.

A research was developed using nuclear and chloroplast DNA from samples of 11 populations of *G. avellana*. It were used molecular techniques and phylogenetic analysis and their objectives were to search for genetic variation in two DNA regions; to design specific primers for the species using trnS-psbK chloroplast-region; and to use ITS region for stablishing position of *G. avellana* in family Proteaceae through three methods of phylogenetic inference: Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Analysis.

Polyphenolics and methodological problems during DNA extraction and PCR caused a poor quantity of work samples. It was concluded that ITS region of *G. avellana* is insufficiently variable for proposed objective, but trnS-psbK region has more variability; however, it was not possible to carry an evaluation nor develop optimal primers because sample number was low. Of three designed primers, two worked properly.

Phylogenetic study was carried using sequences of ITS region of *G. avellana* and sequences of other 78 genera of family Proteaceae obtained from international databases. In aligning sequences, it were seen differences in position and support of groups for each method when varied penalizations for gap opening and gap extension. However, all three methods does not contradicts with preexistent data from another researchers telling *Gevuina* and seven more genera compound subtribe Gevuininae in tribe Macadamieae.

1 INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la diversidad genética de una especie, complementado por el conocimiento de su evolución, es un aspecto importante al encarar tareas como el mejoramiento genético o el diseño de estrategias de protección de poblaciones naturales. En Chile, el estudio de la filogenia y la variabilidad genética existente en las especies nativas de plantas y animales es un campo de investigación todavía poco abordado.

El avellano chileno (*Gevuina avellana*) es una especie arbórea nativa de la zona centro-sur de Chile, que se distribuye entre la VII y la XI Región, con presencia reducida en algunas áreas limítrofes del suroeste de Argentina. Posee importancia agronómica y forestal, a causa de sus frutos comestibles, la calidad de su madera y su uso como planta ornamental y melífera. La especie tiene una importancia económica creciente, pero todavía no se han publicado estudios acerca de su diversidad genética basados en técnicas de análisis moleculares. Existen en cambio varias investigaciones que incluyen al avellano al intentar dilucidar las relaciones que existen entre los miembros de la familia Proteaceae; en ellas se han empleado marcadores fenotípicos tanto como genotípicos, siendo estos últimos los que han permitido la construcción de árboles filogenéticos que sitúan de forma consistente a *Gevuina*, junto a otros siete géneros, dentro de la subtribu Gevuininae, perteneciente a su vez a la tribu Macadamieae, dentro de la cual también se halla el género *Macadamia*, poseedor de especies cultivadas en varias regiones del planeta por sus nueces comestibles.

Los análisis de secuencias nucleotídicas acoplados a técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han resultado ser una herramienta eficaz para determinar la variabilidad genética y las relaciones de parentesco entre taxones y dentro de ellos. Una región del ADN nuclear que se usa ampliamente en estudios filogenéticos en plantas es la región ITS, a causa de la alta variabilidad de las secuencias ITS-1 e ITS-2 que flanquean el gen 5.8S, cuyas secuencias son más

conservadas y que codifica ADN ribosomal. Por su parte, el ADN del cloroplasto se utiliza en estudios genéticos a causa de su menor tasa de cambio relativa a través del tiempo, que se debe a su transmisión por herencia uniparental (materna en el caso de la mayoría de las angiospermas) y a la ausencia de recombinación.

Al hacer estudios filogenéticos con secuencias de ADN se requiere procesar una enorme cantidad de información y a la vez realizar muchos cálculos matemáticos. El hacer esto a gran escala solamente es practicable mediante el uso de programas computacionales que incluyen algoritmos para resolver la búsqueda de relación entre las secuencias. El uso de estos programas en conjunto con una provisión adecuada de datos de entrada y de parámetros de trabajo ha permitido que durante los últimos años haya ido surgiendo un número creciente de información acerca de la filogenia de los seres vivos. Si bien estas herramientas han resultado eficaces en la investigación, todavía queda una vasta cantidad de taxones sin investigar o estudiados de forma somera, como es el caso del avellano chileno.

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar la filogenia y la variabilidad de *Gevuina avellana* aplicando métodos de inferencia filogenética al análisis de secuencias de la región ITS del núcleo y de la región trnS-psbK del cloroplasto. Los objetivos específicos fueron obtener secuencias de las regiones en estudio, desarrollar partidores específicos para la especie a partir de las secuencias del cloroplasto y determinar las relaciones filogenéticas de la especie con el resto de la familia Proteaceae a través de los métodos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y análisis bayesiano.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Especie

La especie *Gevuina avellana* Molina, llamada comúnmente “avellano”, “avellano chileno” o “gevuin”, es un árbol de la familia Proteaceae nativo de las regiones templadas de Chile y Argentina. Tiene uso como especie maderera, frutal y ornamental. (HOFFMANN, 1997)

2.1.1 Descripción. De copa globosa y muy ramificada, crece hasta unos 18 m de altura, El tronco puede alcanzar hasta 50-60 cm de diámetro y tanto él como las ramas adultas son de color ceniciento, con la corteza algo rugosa; los brotes nuevos y las ramitas tienen un aspecto ferruginoso y pubescente (RODRÍGUEZ *et al.*, 1983). Las hojas son compuestas e imparipinadas, aunque a veces también pueden ser bipinadas; sus folíolos son coriáceos con borde aserrado (RODRÍGUEZ *et al.* 1983 y DIMITRI, 1977). Produce una inflorescencia en racimo recto, formada por flores hermafroditas de cuatro tépalos fusionados con la base de los estambres y con ovario simple, súpero. (HALLOY *et al.*, 1996)

Existen mecanismos que impiden o dificultan la autofecundación, como la protandria y la existencia de estructuras polifenólicas, La polinización es hecha por insectos y la diseminación de los frutos ocurre por gravedad (YÁÑEZ, 2004, MEDEL *et al.*, 2004).

El fruto, llamado avellana, es una drupa leñosa de entre 1,2 y 2,3 cm de diámetro, que se habría originado a partir de un folículo indehiscente (HALLOY *et al.*, 1996). La coloración de las avellanas va desde el verde en los frutos inmaduros, pasando por el rojo, hasta llegar finalmente al negro violáceo cuando ya han madurado (DONOSO *et al.*, 2006).

2.1.2 Distribución. Según RODRÍGUEZ *et al.* (1983), el avellano crece abundantemente desde la Región del Maule hasta la de Aisén, particularmente en los

faldeos de la Cordillera de los Andes y de la Costa. Muñoz (1956), citado por MARTÍNEZ (2001) indica que *G. avellana* se encontraría por el norte hasta la costa de Valparaíso. Información más reciente, de MEDEL *et al.* (2004), fija los límites entre los 35° y los 44° lat. S, indicando como límites septentrionales el sur del río Mataquito por la Cordillera de los Andes, mientras que en la Cordillera de la Costa empezaría a presentarse algo al norte del río Teno; en cuanto al límite sur, llega hasta las Islas Guaitecas. INTEC - CHILE (1983), citado por YÁÑEZ (2004), aclara que se trata de una distribución discontinua, ya que la especie está asociada a siete tipos forestales chilenos que ocurren en esa área, a saber: Tipo Forestal “Roble-Hualo”, “Ciprés de la Cordillera”, “Roble-Raulí-Coigüe”, “Coigüe-Raulí-Tepa”, “ Siempreverde”, “Alerce” y “Ciprés de las Guaytecas”. En su área de distribución los rangos de precipitación varían desde 500 mm anuales por el norte hasta 2500 mm anuales por el sur y es capaz de resistir temperaturas extremas, tanto bajas como altas, aunque para soportar estas últimas requiere que siga existiendo humedad ambiental (Donoso 1978 y Medel y Medel, 2000, citados por DONOSO *et al.*, 2006).

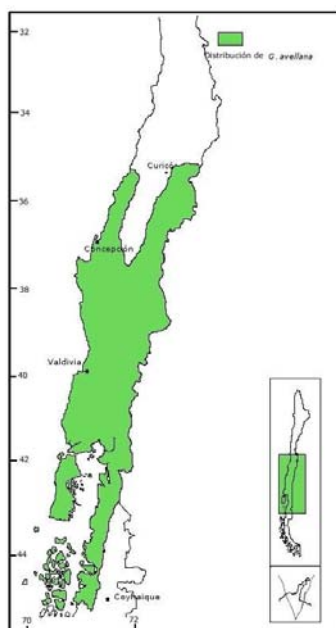


FIGURA 1 Mapa de distribución de la especie.

FUENTE: MEDEL *et al.* (2004)

2.1.3 Taxonomía. De acuerdo a lo señalado por HALLOY *et al.* (1996), la posición taxonómica de *G. avellana* dentro de la familia de las Proteáceas es la subfamilia Grevilleoidae, tribu Macadamieae y subtribu Gevuininae. Los mismos autores señalan que Baines 1981 incluye en el género *Gevuina* a una especie de la isla de Nueva Guinea (*Gevuina papuana*) y a otra del territorio australiano de Queensland (*Gevuina bleasdalei*), mientras que los estudios de Morley y Toelken (1983) ponen a estas dos especies dentro del género *Bleasdalea*, manteniéndolo dentro de la subtribu Gevuininae. WESTON y BARKER (2006), llevaron a cabo una reclasificación completa de la familia en el nivel supragenérico basándose en los datos moleculares existentes; de acuerdo a ese estudio, el género monoespecífico *Gevuina* está dentro de la subtribu Gevuininae junto a otros siete géneros distribuidos en Oceanía, América del Sur y Nueva Guinea.

Un trabajo posterior de WILLIS (2007) acerca de las relaciones entre los géneros de la tribu Macadamieae por medio del estudio de secuencias del núcleo (PHYA, *waxy* 1 y *waxy* 2) y del cloroplasto (*matK*, *atpB* y *NHF*), corrobora estos resultados y añade información sobre las relaciones de parentesco dentro de la subtribu, y al combinar todos los datos el árbol filogenético se resuelve con *Gevuina* como una línea separada de los otros cuatro géneros muestreados de Gevuininae.

Relacionado con el trabajo anterior, MAST *et al.* (2008) publicaron un estudio más completo de la tribu Macadamieae, en que se investigaron las relaciones filogenéticas de más géneros y especies, sus tiempos de divergencia y la forma en que ocurrió la dispersión a través de los genes nucleares PHYA, *waxy* 1, *waxy* 2, ITS 1 e ITS 2, de los genes del cloroplasto *matK*, *atpB* y *NHF* y de 53 caracteres morfológicos. Para estudiar la filogenia se empleó el método de análisis bayesiano y de máxima parsimonia en los caracteres morfológicos y el análisis bayesiano en las secuencias. Al analizar en conjunto los tres genes del cloroplasto se obtuvo una politomía para 7 de los 8 géneros de la subtribu, quedando *Cardwellia* en una rama aparte; en cuanto a los genes nucleares, sin incluir la región ITS, la politomía de Gevuininae fue completa; en tanto, la región ITS (Figura N° 2) nuevamente dejó a *Cardwellia* como un género aparte de los otros siete. El análisis bayesiano de todas las secuencias y caracteres morfológicos arrojó como resultado que el árbol de la subtribu tendría una topología en

que *Cardwellia* es una rama individual y que dentro del grupo formado por los otros siete géneros, *Gevuina* queda aparte, pero algunos nodos tuvieron bajos porcentajes de confianza.

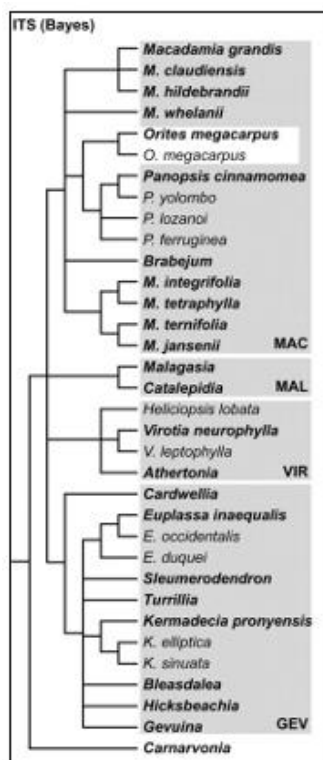


FIGURA 2 Clasificación de la tribu Macadamieae obtenida con el uso del análisis bayesiano de secuencias ITS.

FUENTE: MAST *et al.* (2008)

2.1.4 Variación intraespecífica. La especie se halla adaptada a condiciones ambientales muy dispares dentro de un área de distribución amplia. Este hecho permitiría suponer que existe una diferenciación genética entre sus poblaciones. Sin embargo, este supuesto puede resultar difícil de determinar dada la amplia variabilidad fenotípica observable incluso dentro de una misma población. Se ha encontrado que el índice de área foliar muestra una tendencia a disminuir de norte a sur, que la floración también varía de norte a sur y que el tamaño y peso de los frutos es mayor en el norte.

Sin embargo, también hay alta variabilidad para estas características dentro de las poblaciones y entre clones particulares (MEDEL *et al.*, 2004; DONOSO *et al.*, 2006).

2.2 Variabilidad genética y técnicas moleculares

Las poblaciones vegetales se ordenan dentro de sus comunidades de acuerdo a características inherentes a la especie, tales como su tipo de reproducción o el sistema de polinización, pero también su distribución está condicionada por las interacciones con otros organismos y con el medio. La combinación de estos factores determina la estructura genética de una población (Jain, 1990, citado por DEL HOYO, 2006).

En la estructura genética se encuentran los rastros de eventos evolutivos pasados, sin embargo, hacer afirmaciones cuantitativas acerca de tales eventos es difícil porque los genes son intrínsecamente muy variables (Nordborg, 2001, citado por PALMÉ y VENDRAMIN, 2002).

Las técnicas moleculares están convirtiéndose en herramientas de importancia cada vez mayor para la observación de procesos demográficos y para la comprensión de eventos históricos que inciden sobre las poblaciones (Haig, 1998 y Moritz, 1995, citados por BEKESSY *et al.*, 2002).

DEL HOYO (2006) indica que entre estas técnicas ha aparecido una gran diversidad de métodos que usan el ADN y están basados en la PCR, tales como los RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar) o los microsatélites. Tales técnicas han resultado de gran utilidad y su uso ha proporcionado muchos datos acerca de la estructura genética de las poblaciones y el grado y distribución de su variabilidad genética.

2.2.1 Uso del ADN del cloroplasto. El ADN del cloroplasto (ADNcp) es una molécula circular, de un tamaño comprendido entre 120 y 217 Kb (Palmer, 1987 citado por DONOSO *et al.*, 2004). Se detectó por primera vez en 1909 gracias a que su herencia no cumplía con las leyes de Mendel. Esta herencia no mendeliana del cloroplasto (y también de la mitocondria) se manifiesta en la segregación rápida de los alelos durante la reproducción vegetativa y en que se heredan de tan solo uno de los progenitores (BIRKY, 1995). En la revisión de PROVAN *et al.* (2001) se señala que “el

genoma de los organelos típicamente es no recombinante, heredado de forma uniparental y efectivamente haploide.”

El cloroplasto es heredado generalmente por vía materna en las angiospermas y esta herencia uniparental disminuye el tamaño efectivo de la población y, junto con el hecho de que el cloroplasto se dispersa sólo a través de las semillas, produce un potencial más alto para la formación de una estructura genética geográficamente determinada. Además, la herencia uniparental del genoma del cloroplasto implica evolución clonal, un factor que en gran medida facilita la reconstrucción genética en el nivel intraespecífico (Dumolin *et al.* 1995; Rajora y Dancik 1992, citados por PALMÉ y VENDRAMIN, 2002).

Su tasa de mutación es variable para las diferentes regiones del genoma y se estima que es mayor en la región larga de una sola copia o LSC (SCHAAL *et al.*, 1998; Clegg, 1991, citado por GRIVET *et al.*, 2001).

Se ha convertido en una herramienta para los estudios genéticos en plantas a causa de su orden conservado de genes, la disponibilidad amplia de partidores y una ausencia general de heteroplasmia y recombinación (PROVAN *et al.* 2001).

Se han encontrado varios “partidores universales” que amplifican separadores no codificantes del genoma del cloroplasto, la mayoría de ellos proceden de separadores entre genes del ARNt, en los que se ha demostrado la existencia de variabilidad entre poblaciones o especies (Demesure *et al.*, 1996, citados por CHIANG *et al.*, 1998).

El uso conjunto de marcadores citoplasmáticos y fósiles ha ayudado a desentrañar las principales rutas migratorias seguidas por un gran número de plantas y animales después de la última glaciación en el norte de Europa (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 2000 citados por PALMÉ y VENDRAMIN, 2002).

Tales estudios se han llevado a cabo considerando las relaciones de congruencia que se dan entre haplotipos y su distribución geográfica. Estas relaciones son más fáciles de advertir cuando se reduce el flujo de genes entre las poblaciones, de modo que las mutaciones más recientes permanecen restringidas a la zona en que se originan

(Neigel *et al.*, 1991; Slatkin, 1991 y Templeton *et al.*, 1995, citados por SCHAAL *et al.*, 1998).

2.2.2 Uso de la región ITS. BALDWIN *et al.* (1995) señalan que hechos como los conflictos entre los árboles filogenéticos obtenidos con base en los datos que proporciona el ADNcp frente a otras evidencias y el alcance limitado de la información filogenética que se consigue con él, hicieron evidente la necesidad de complementar estos datos con otros obtenidos a partir del ADN nuclear. Una de las regiones del ADN nuclear que resultó de interés para este fin fue la región ITS del ADN ribosomal (ADNr).

Dentro del ADN ribosomal (ADNr) existen dos regiones no codificantes y altamente variables que se transcriben conjuntamente con los genes que codifican el ARN de los ribosomas. Estas regiones reciben el nombre de ITS-1 e ITS-2 (*internal transcribed spacer*, “espaciador transcrito interno”) y flanquean al gen 5,8S. La gran variabilidad y rápida evolución de las regiones ITS resultan útiles para estudios filogenéticos intraespecíficos e interespecíficos (YANG *et al.*, 2001).

Entre las características favorables que tienen las secuencias ITS para su amplificación, secuenciación y análisis se encuentran su “tamaño reducido, regiones flanqueantes altamente conservadas, alto número de copias, rápida evolución concertada y el mantenimiento de su longitud en las angiospermas” (BALDWIN *et al.*, 1995).

De acuerdo a YOCKTENG y NADOT (2004), si bien esta región ha resultado ser útil, tiene limitaciones cuando se usa en especies muy próximas entre sí y, en particular, cuando se han producido radiaciones recientes.

Se considera que la filogenia de un organismo es mejor estimada al usar una combinación de marcadores nucleares y citoplasmáticos (Doyle, 1992; Moritz y Hillis, 1996, citados por YOCKTENG y NADOT, 2004).

En el estudio de BARKER *et al.* (2002), acerca de la filogenia de los géneros de proteáceas del Sur de África se emplearon secuencias ITS para determinar las relaciones existentes entre ellos. Si bien los resultados fueron congruentes en parte

con los agrupamientos previos basados en caracteres morfológicos y en secuencias del cloroplasto, hubo otros resultados que, a juicio de los autores, llevan a un replanteamiento de las relaciones dentro del grupo y a la necesidad de complementar los datos con otros análisis moleculares.

WESTON y BARKER (2006) en una nueva propuesta de clasificación supragenérica de la misma familia mencionan además diversos estudios que se han servido del ADN del cloroplasto (Douglas, 1998; Mast y Givnish, 2002), y que se hallan en preparación dos estudios más de Weston, Barker y Downs que emplean secuencias ITS y rbcL (ADNcp) obtenidas de muestras de la mayoría de los géneros de proteáceas.

2.3 Métodos de inferencia filogenética

Para reconstruir la filogenia de un grupo de taxones a través de secuencias de nucleótidos o aminoácidos se requiere usar un método de inferencia y raramente es posible verificar que el árbol resultante sea el verdadero (VANDAMME, 2003).

A grandes rasgos, los métodos existentes pueden dividirse entre aquéllos que funcionan con una matriz de caracteres discretos en que cada carácter asume uno de entre varios estados posibles (para secuencias de ADN, los estados posibles son los nucleótidos A, C, G y T) y aquéllos que emplean una matriz de distancia entre pares de taxones. En el primer caso los caracteres son analizados por separado y usualmente de forma independiente, en el segundo se establece una medida de la disimilaridad entre taxones y luego se evalúa la relación de cada uno con la matriz (VANDAMME, 2003 y SWOFFORD y SULLIVAN, 2003).

Según SWOFFORD y SULLIVAN (2003), entre los métodos que usan caracteres discretos, los más empleados son la parsimonia y la máxima verosimilitud. Ambos métodos emplean una función que asignan un puntaje a cada árbol filogenético obtenido y buscan encontrar aquél cuya topología cumpla mejor con el criterio de optimización establecido.

2.3.1 Parsimonia. El método de inferencia por parsimonia se basa en el principio conocido como “navaja de Occam” cuya noción básica es que si dos hipótesis proveen

explicaciones válidas de un fenómeno, debiera preferirse la más simple. Aplicado al análisis filogenético esto quiere decir que se preferirá un árbol o un conjunto de ellos que hagan mínimo el número de cambios mutacionales requeridos para explicar los datos observados (SWOFFORD y SULLIVAN, 2003).

Existen críticas a este método, entre las cuales se cuentan las de quienes estiman que hace supuestos implícitos sobre el proceso de evolución y que estos supuestos no necesariamente son plausibles (SOBER, 2005).

Por otra parte, SWOFFORD y SULLIVAN (2003) indican que el método tiene limitaciones al existir escenarios en que conduce a resultados erróneos, como por ejemplo, en el fenómeno conocido como “atracción de las ramas largas”. Sin embargo, el mismo autor explica que a pesar de la preferencia de muchos investigadores por el método de la máxima verosimilitud y otros relacionados, la parsimonia continúa siendo un enfoque válido y útil por ser rápido, tener menores requisitos computacionales y ser muy efectivo en muchos casos.

2.3.2 Máxima verosimilitud. De acuerdo a VON HAESELER y STRIMMER (2003), la función de verosimilitud es la probabilidad condicional de los datos dada una hipótesis, vale decir que en el método de inferencia por máxima verosimilitud se busca “determinar la topología, longitud de ramas y parámetros del modelo evolutivo que maximicen la probabilidad de observar las secuencias disponibles”.

Al hacer una inferencia por máxima verosimilitud es necesario indicar explícitamente un modelo de evolución para que según eso se establezcan los parámetros que describen los cambios de estado en las secuencias. Se sabe que los modelos más complejos incrementan el error al aumentar la cantidad de parámetros evaluados y por ellos se busca elegir un modelo con el mejor ajuste posible a través de criterios estadísticos (POSADA y CRANDALL, 2001).

Debido a la cantidad de datos que hay que procesar, no es posible evaluar cada uno de los árboles que podrían existir y se opta por métodos heurísticos que dan posibilidades razonables de hallar un árbol óptimo (VON HAESELER y STRIMMER, 2003).

2.3.3 Análisis bayesiano: Este método guarda semejanzas con el anterior, pero trata los parámetros del modelo de evolución como variables que pueden tomar sus valores por azar para incluir la incertidumbre. La inferencia se realiza calculando la probabilidad posterior de observar los parámetros y el resultado es la probabilidad de que ese parámetro sea correcto dado un modelo correcto de sustitución. Como restricciones técnicas no permiten calcular las probabilidades de cada árbol, se emplea un método heurístico llamado “cadena de Markov Montecarlo”, MCMC por su sigla en inglés (HUELSENBECK y RONQUIST, 2004).

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Material

Para la realización del estudio se requirió material vegetal, utensilios de colecta, instrumental y equipos de laboratorio, programas computacionales, diversas clases de reactivos y otros materiales accesorios.

3.1.1 Material vegetal. Correspondió a hojas verdes y sanas provenientes de avellanos adultos colectados en febrero y marzo de 2007 como parte del proyecto FONDECYT 106019210 en 8 localidades de la zona centro-sur de Chile, entre la Región del Maule y la Región de Los Lagos (Figura N° 3). Antes de la colecta, en Chillán y Angol se obtuvieron plantas para calibrar la técnica de extracción y de amplificación del material genético.

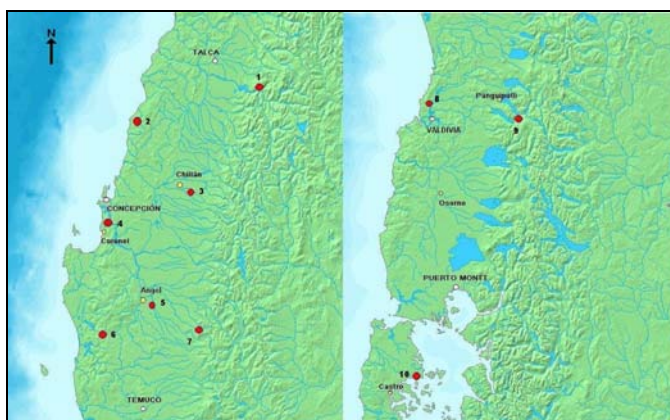


FIGURA 3 Mapa de los sitios de colecta. 1. Armerillo, 2. Reserva Nacional Los Queules, 3. Chillán, 4. Parque Jorge Alessandri, 5. Angol, 6. Monumento Natural Contulmo, 7. Reserva Nacional Malleco, 8. Parque Oncol, 9. Saltos de Huilo-huilo, 10. Colegual,

FUENTE: Adaptado de Demis World Map

3.1.2 Utensilios de colecta. Para la colecta y conservación de las ramas cortadas se emplearon tijeras de podar, cajas de material aislante, bolsas plásticas, agua y papel absorbente. Para el marcado e identificación de los árboles seleccionados se utilizó pintura en *spray* y se dibujó un mapa del sitio. Para llevar un registro de sus características morfológicas relevantes se usaron planillas de anotación. La identificación del material colectado se hizo mediante cintas rotuladas.

3.1.3 Material de laboratorio. Hasta la extracción de ADN, el material vegetal se conservó dentro de bolsas plásticas húmedas guardadas en un refrigerador a 4° C. Antes de la extracción de ADN, las hojas se trituraron en morteros de porcelana usando pistilos del mismo material y se almacenaron en un congelador a -80 °C. El proceso de extracción se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar y como equipo auxiliar se empleó una estufa para baño María, un agitador tipo Vortex y una centrífuga. El ADN extraído se conservó en un congelador a -20 °C. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se efectuó en un termociclador Thermo[®] y la electroforesis de los fragmentos amplificados se hizo en una cámara de electroforesis horizontal Mupid-ex[®]. Para observarlos se empleó un transiluminador Vilber-Lourmat[®] y para crear el registro fotográfico, una cámara Kodak DC-180[®].

Las muestras se manipularon dentro de tubos Eppendorf de 1,5 mL y de 0,2 mL y se trasvasijaron usando micropipetas monocanal con puntas de plástico desechables de volumen variable. Adicionalmente, durante las diversas etapas del estudio se emplearon otros materiales complementarios para la manipulación del material y la preparación de soluciones, tales como vasos de precipitados, gradillas plásticas, probetas, espátulas de metal, balanzas analíticas y un horno de microondas. El material se esterilizaba en un autoclave manual o por medio de luz UV y los objetos se manipularon usando guantes de látex.

3.1.4 Reactivos. Para realizar la extracción de ADN se requirió de nitrógeno líquido, *buffer* de extracción CTAB (CTAB 2% ((C₁₆H₃₃)N(CH₃)₃Br); NaOH 8 M; Na₂HSO₃; β-mercaptoetanol), cloroformo-octanol (24:1), acetato de amonio 7,5 M, isopropanol a -20°C, etanol 70% frío a -20°C, *buffer* TE pH 8.0 (tris-HCl 10mM, EDTA 0,5M, H₂O dd).

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó *buffer* PCR 10x, $MgCl_2$ 25 mM, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), polivinilpirrolidona (PVP) 1,5 % v/v, *Taq*-ADN polimerasa 5u/ μ L (Fermentas[®]) y partidores que amplifican la región ITS y la región trnS-psbK del cloroplasto.

Para la electroforesis se empleó agarosa, *buffer* SB 1x, marcador de peso Gene ruler 1Kb DNA ladder Fermentas[®] (0,5 μ g/ μ L), bromuro de etidio Gibco BRL[®] (10mg/mL) y azul de bromofenol como *buffer* de carga.

3.1.5 Programas computacionales. Las secuencias se leyeron usando el programa Chromas[®] v2.33 y los alineamientos con ClustalX[®] v2.0.9 (THOMPSON *et al.*, 2003). El diseño de partidores se realizó con el programa Primer3[®] v0.4.0 (ROZEN y SKALETSKY, 2000). Para el análisis de máxima parsimonia se empleó el programa PAUP[®] v4.0b10 (SWOFFORD, 2002); para el de máxima verosimilitud, GARLI[®] v0.951 (ZWICKL, 2006) y para el análisis bayesiano, MrBayes[®] v3.1.2 (RONQUIST y HUELSENBECK, 2003), obteniendo los parámetros del modelo de evolución mediante jModelTest[®] v0.1.1 (POSADA y CRANDALL, 1998). Para construir los árboles de consenso se empleó PAUP[®] v4.0b10 y para verlos y modificar aspectos gráficos, Dendroscope[®] v2.2 (HUSON *et al.*, 2007).

3.2 Método

3.2.1 Obtención de material vegetal. Se colectaron ramillas de avellano en sitios previamente identificados para abarcar la mayor parte del área de distribución de la especie, quedando excluido sólo parte del extremo austral y las pequeñas poblaciones de Argentina. Antes de realizar una colecta general, se emplearon muestras procedentes de Chillán (VIII Región) y de Angol (IX Región) para ensayar el procedimiento.

En cada uno de los sitios se eligió al azar 3 individuos adultos, procurando mantener una separación superior a 30 m de distancia entre cada uno, que permitiera suponer que no se trataba de árboles que tuvieran parentesco directo entre sí. Se cortaron ramas jóvenes con brotes y se marcó el tronco con pintura para identificarlo posteriormente. Paralelamente se registraron en una planilla algunos datos

morfológicos de interés (altura, diámetro de copa, diámetro de corona, fructificación) y se marcaron las coordenadas del sitio con un GPS.

3.2.2 Protocolo de extracción de ADN. Las ramas cortadas para la extracción de ADN se guardaron rotuladas con el número del árbol y el código de la población de origen. Para llevarlas hasta el laboratorio se usaron bolsas plásticas y cuando fue necesario conservarlas por unos días antes de la extracción, se almacenaron refrigeradas para prevenir su deterioro.

De cada hoja se tomó un trozo pequeño, que se trituroó en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido para reducirlo a un polvo fino y se guardó hasta el momento de la extracción en un congelador a -80° C dentro de tubos Eppendorf de 1,5 mL debidamente rotulados.

Para extraer ADN se siguió el protocolo de Almeyda (1999), citado por VILLAGRA (2001), con modificaciones menores. A cada tubo con muestras de tejido de un individuo se agregaron 500 μ L de tampón de extracción CTAB previamente calentado a 60° C, que contenía 1 μ L (0,2%) de β -mercaptoetanol. El tubo se incubó a 65° C durante 30 minutos, agitándolo manualmente cada 5 minutos.

Luego se retiraron los tubos del baño María y se le agregó a cada uno cloroformo - octanol (24:1) en la misma cantidad que se usó de tampón CTAB, se mezclaron por inversión y luego se llevaron a una centrífuga durante 3 minutos a 8.000 rpm y 4° C. Al concluir el centrifugado, se recuperó un volumen conocido de la fase transparente que contiene el material genético y luego se desechó lo restante.

Se añadió el mismo volumen de cloroformo - octanol (24:1) a cada tubo y se agitaron antes de introducirlos a la centrífuga durante 5 minutos a 8.000 rpm y 4° C. Se traspasó a un tubo nuevo un volumen determinado del líquido sobrenadante y se agregó acetato de amonio 7,5 M hasta lograr que se hallara a una concentración de 2,5 M. Acto seguido, se añadió isopropanol mantenido enfriado a -20° C en un volumen correspondiente al 70% de la cantidad de líquido existente en el tubo. Luego de este paso se esperó que precipitaran los ácidos nucleicos durante 4 horas.

Cumplido el tiempo establecido, se hizo un centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 ° C. Después de este paso apareció un *pellet* blanquecino en el fondo del tubo, que correspondía a los ácidos nucleicos precipitados en el paso anterior. Se desechó el líquido sobrenadante y se añadieron 500 µL de etanol al 70%, conservado a -20° C, y en seguida se llevaron los tubos a la centrífuga, por 5 minutos a 12.000 rpm y 18° C. Pasada esta etapa, se prosiguió extrayendo el alcohol y centrifugando hasta que tan solo quedó el *pellet* en los tubos. Para asegurarse de que quedara la menor cantidad posible de alcohol, se esperó media hora a que se evaporara lo que pudiera haber quedado adherido a las paredes y luego el material obtenido se resuspendió en 100 µL de buffer TE pH 8.0

3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar el material disponible de las regiones de interés del genoma se llevó a cabo una PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se utilizó un termociclador Thermo[®], en el que se configuraron programas específicos para cada par de partidores.

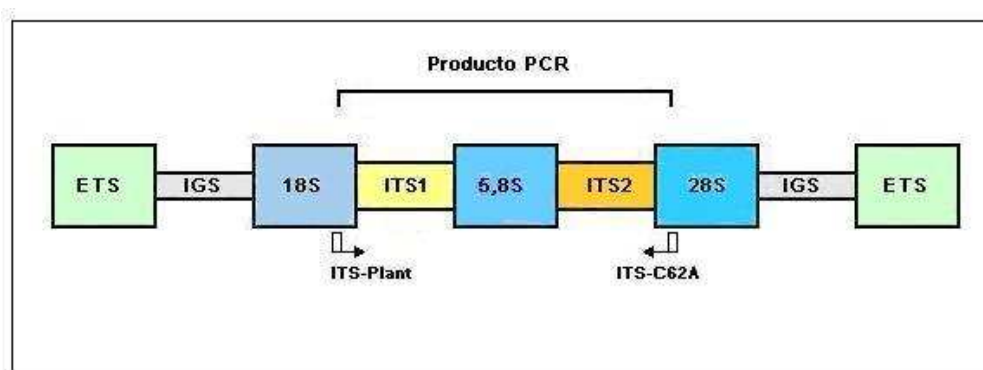


FIGURA 4 Esquema del ADN ribosomal y de los partidores que amplifican la región ITS.

FUENTE: Adaptado de YANG *et al.* (2001)

Los partidores empleados (Cuadro N° 1) para las regiones ITS-1 e ITS-2 fueron ITS-PLANT e ITS-C26A (WEN y ZIMMER, 1996), específicos para vegetales. Los partidores usados en la región trnS del cloroplasto fueron trnS0r (GRIVET *et al.*, 2001), psbK-p1 (HEINZE, 2007), ccmp2f y ccmp2r (WEISING y GARDNER, 1999). En todos

los casos, se trata de partidores apropiados para dicotiledóneas y existen trabajos previos que avalan su uso.

En un tubo de 0,2 mL de volumen, se añadió 1,0 µL de la suspensión de ADN. Se preparó una mezcla (Cuadro N° 2) en un tubo y se agregaron 24,0 µL de ella a cada uno de los tubos que contenían el ADN en suspensión.

CUADRO 1 Secuencia de los partidores usados para amplificar las regiones de interés en el genoma de *G. avellana*.

Región	Partidores	Secuencia de nucleótidos (5' – 3')	Fuente
ITS-1e ITS-2, (núcleo)	ITS-PLANT	CGCGAGAAGTCCACT	VARGHESE <i>et al.</i> (2003)
	ITS-C26A	GTTTCTTTTCCTCCGCT	WEN y ZIMMER (1996)
psbK - trnS (cloroplasto)	psbK-P1	GCCTTTGTTTGGCAAGCTGCTGTAAG	HEINZE (2007)
	trnS0r	GGGAGAGATGGCTGAGTGGAC	GRIVET <i>et al.</i> (2001)
ccmp2 (cloroplasto)	ccmp2f	GATCCCGGACGTAATCCTG	WEISING y GARDNER (1999)
	ccmp2r	ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	WEISING y GARDNER (1999)

CUADRO 2 Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa.

Reactivo	Volumen (µL)
dNTP's	1,5
buffer PCR 10x	2,5
MgCl ₂ 25 mM	2,0
Partidor 1	1,0
Partidor 2	1,0
PVP 1,5 % v/v	15,8
Taq-polimerasa	0,2
Total	24,0

3.2.3.1 Amplificación de la región trnS-psbK. El programa para amplificar la región trnS consistía en un ciclo de denaturación de la hebra a 94° C por 3 minutos, seguido por 39 ciclos de 94° C por 30 s de denaturación, 50 ° C por 1 minuto de hibridación y 72 ° C por 1 minuto de extensión; finalizando con un ciclo de elongación de 72 ° C por 5 minutos, para luego permanecer las muestras a 4° C hasta que se retiraran de la máquina y se refrigeraran.

3.2.3.2 Amplificación de la región ITS. Para amplificar la región ITS se usó un programa que constaba de un ciclo inicial de denaturación de la hebra de ADN a 94° C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de 94° C por 35 s de denaturación, 57,5 ° C por 45 s de hibridación y 72 ° C por 45 s de extensión; para terminar con un ciclo de elongación de 72 ° C por 4 minutos y concluir bajando la temperatura a 4° C.

3.2.3.3 Electroforesis. Para observar las diferencias existentes en el largo de los fragmentos de ADN pertenecientes a individuos distintos, de cada tubo se tomaron 5 µL del producto de la PCR y se sometieron a una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % p/v con bromuro de etidio (10mg/mL), durante 30 minutos a 100 V. Como patrón de comparación del largo de los fragmentos, se añadió a uno de los

pocillos 5 μ L de Gene ruler 1Kb DNA ladder Fermentas[®] (0,5 μ g/ μ L). Transcurrida la media hora de migración a través del gel, el tamaño de los fragmentos se observó en un transiluminador de luz ultravioleta, y se tomaron fotografías de cada uno de los geles. Los productos de la PCR se almacenaron a -20 ° C para poder utilizarlos nuevamente si fuera necesario.

3.2.4 Secuenciación y alineamiento. Mediante las imágenes obtenidas se seleccionaron para su secuenciación aquellos individuos que exhibieran fragmentos de ADN de buena calidad y que aparentemente fueran de longitud diferente; además se agregaron otros adicionales que no exhibían diferencias de longitud en búsqueda de mutaciones puntuales. El trabajo de secuenciar los fragmentos se encargó a un laboratorio externo.

Los resultados de la secuenciación se presentaron como un espectrograma acompañado de la secuencia de bases, que pudo observarse y ajustarse mediante el programa computacional Chromas[®] v.2.33. El alineamiento entre las secuencias se hizo usando el programa ClustalX[®] v2.0.9 que realiza alineamientos múltiples de secuencias y presenta propuestas de árboles de distancia para ellas.

3.2.5 Análisis de las secuencias del cloroplasto. Conocidos los datos de alineamiento, se buscaron porciones de las secuencias amplificadas por trnS0r-psbK-p1 que tuvieran una longitud de alrededor de 18-28 pb y que fueran comunes a más de dos individuos para, a partir de ellas, diseñar partidores que puedan usarse como una herramienta de identificación de haplotipos. Las especificaciones óptimas se buscaron con el programa Primer3[®] v 0.4.0 y su elaboración se encargó a una empresa especializada.

Para probar la idoneidad de los partidores así obtenidos se llevó a cabo una PCR en las condiciones descritas anteriormente y se empleó el material genético disponible; los resultados obtenidos se contrastaron con los que entregaron previamente las PCRs efectuadas con los partidores trnS0r-psbK-p1 y ccmp2f-ccmp2r. Del mismo modo que antes, los resultados se observaron realizando una electroforesis horizontal del producto PCR en geles de agarosa al 1% p/v con bromuro de etidio y se guardó registro fotográfico de ellos.

3.2.6 Análisis filogenético de la región ITS. En cuanto a la región ITS, se realizó un alineamiento de las secuencias de la especie y luego se agregaron otras pertenecientes a 77 especies de la familia Proteaceae (incluyendo una secuencia de *G. avellana*) y a una especie de la familia Platanaceae que se encontraban almacenadas en la base de datos de GenBank (Anexo N° 1). La búsqueda de secuencias relacionadas se hizo a través de la herramienta BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, disponible en la página web http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome.

3.2.6.1 Alineamiento. Usando el programa Clustal X[®] para alinear este grupo de secuencias, se establecieron cuatro valores diferentes para dos parámetros de alineamiento múltiple: “*gap opening*”, apertura de un *gap* (“vacío”, espacio sin nucleótidos en relación a otra secuencia), y “*gap extension*”, extensión de un *gap*, con el fin de observar cómo variaban los resultados según esas condiciones. Los valores establecidos fueron, de más restrictivos a más permisivos, 10 - 5, 15 - 6,66, 25 - 10 y 40 - 15.

3.2.6.2 Inferencia filogenética. Una vez alineadas las secuencias bajo estos cuatro criterios, se usó el programa PAUP[®] para efectuar en el análisis de máxima parsimonia mediante una búsqueda heurística. En cada caso se hicieron 2000 réplicas de *bootstrap*.

Para el análisis por máxima verosimilitud se empleó GARLI[®] y en cada caso se hicieron 2000 réplicas de *bootstrap*.

Para llevar a cabo el análisis bayesiano, previamente se buscó un modelo de evolución adecuado para los datos mediante el programa jModelTest[®] y luego las secuencias y los parámetros del modelo se introdujeron en el programa MrBayes[®]. En cada caso se probaron 1×10^7 topologías, muestreando cada 1000 pasos y se hicieron 3 repeticiones. Se eliminaron los primeros 2500 árboles guardados para evitar distorsiones en la probabilidad final y con los 7500 restantes se hizo un árbol de consenso en PAUP[®].

Para terminar, se estudió la influencia que tiene el alineamiento inicial sobre los resultados, se comparó la topología de los árboles filogenéticos obtenidos a través de estos tres métodos y el grado de confianza que entrega cada uno.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Extracción de ADN

En los 5 procesos de extracción de ADN efectuados con el método de Almeyda (1999), se trabajó con 30 individuos distintos, y en cada caso se repitieron algunas muestras, ya fuera a modo de control o para reponer material de trabajo. Hubo dificultades con la metodología empleada, pues no se pudo obtener ADN de todos los individuos y el comportamiento de algunas muestras fue errático, dando resultados positivos en unas ocasiones y no en otras. Sin embargo, entre aquéllas de las que sí se extrajo ADN, la cantidad de éste fue aceptable para las necesidades de la investigación.

Hubo una baja cantidad de resultados positivos y resultaron erráticos, viéndose que en un mismo proceso de extracción y bajo condiciones uniformes había muestras con una gran cantidad de ácido nucleico y otras que prácticamente no lo tenían (Figura N° 5). Asimismo, se advierte la necesidad de conocer mejor la composición química de un tejido antes de someterlo a análisis moleculares. No puede descartarse del todo la deshidratación y deterioro de las hojas durante su traslado desde el sitio de colecta, pero el protocolo se desarrolló teniendo siempre presente ese evento y las medidas que se tomaron para aminorar sus efectos fueron las adecuadas.

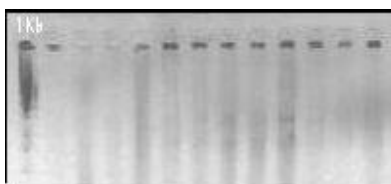


FIGURA 5 Electroforesis de ADN total en un gel de agarosa al 1%.

4.2 PCR. La amplificación del ADN también presentó problemas y no fue posible resolver todos ellos haciendo ajustes al procedimiento. Se encontraron las causas para algunos de los fallos, tales como el uso de reactivos contaminados y errores experimentales, sin embargo, una vez subsanados estos inconvenientes, persistió la ocurrencia de amplificaciones fallidas.

Existen razones para creer que los problemas ocurridos durante la extracción pueden deberse en parte a la presencia en las hojas del avellano de sustancias inhibidoras que interfieran con la PCR, tales como los polifenoles y otros metabolitos secundarios que mencionan Weishing *et al.* (1995), citados por KHANUJA *et al.* (1999). Se sabe que la presencia de tales compuestos, en particular de los polifenoles, puede ser un causante de la disminución de la cantidad y la pureza del ADN que se extraiga (Loomis, 1974 y Porebski *et al.*, 1997, citados por KHANUJA *et al.*, 1999; KOONJUL *et al.*, 1999).

No se realizaron análisis del contenido de polifenoles de las muestras, pero en las investigaciones acerca de herbivoría sobre plántulas de avellano, llevadas a cabo por CHACÓN y ARMESTO (2006), se encontraron entre 2 y 22% de compuestos fenólicos por cada mg de hoja seca. Si bien se procuró que el material colectado perteneciera principalmente a hojas jóvenes, hubo individuos en que tan solo pudieron colectarse hojas adultas y otros en que trozos de hojas de diferentes edades se molieron y mezclaron. De acuerdo a POREBSKI *et al.* (1997), el contenido de polifenoles, taninos y polisacáridos se incrementa con la edad del tejido.

Se consiguió amplificar fragmentos de ADN del cloroplasto mediante el uso de los partidores trnS0r - psbK-p1 y ccmp2f - ccmp2r y de la región ITS del núcleo mediante los partidores ITS-PLANT - ITS-C26A a través de los métodos ya descritos. De acuerdo a las observaciones de las bandas que se visualizan luego de la electroforesis, los fragmentos que pudieron amplificarse con trsnS0r - psbK-p1 y con los partidores de la región ITS tenían longitudes de entre 650-750 pb; mientras que los fragmentos obtenidos con los partidores ccmp2f – ccmp2r tenían longitudes de alrededor de 200 pb. Si bien en todos los casos era posible ver las bandas con nitidez, no fue posible obtener una cantidad óptima de amplicones y sólo se contó con un número reducido de muestras positivas para el proceso de secuenciación.

Al preparar las muestras y el *mix* para la reacción en cadena de la polimerasa se procuró realizar todos los pasos con la mayor celeridad y limpieza posibles y ambos factores contribuyeron a obtener buenos resultados. En particular, se cuidó el procedimiento relacionado con la adición de *Taq* polimerasa para mantener la cadena de frío hasta el momento de iniciar la reacción.

Ante la sospecha de la existencia de polifenoles interfiriendo con las reacciones, se optó por emplear polivinilpirrolidona (PVP) al 1,5% en vez del agua destilada del protocolo original y se observó una diferencia en el número de muestras positivas y en la nitidez de las bandas de electroforesis; tal resultado concuerda con los antecedentes que se tienen sobre el efecto neutralizador de los polifenoles que tiene esta sustancia al unirse a ellos mediante puentes de hidrógeno (MALIYAKAL, 1992). Este autor reportó haber obtenido resultados positivos en el aislamiento de ADN y ARN de algodón, especie con una cantidad relevante de terpenoides fenólicos y taninos, mediante una modificación del protocolo de extracción de CHIRGWIN *et al.* (1979), que consistía principalmente en la adición de PVP. KHANUJA *et al.* (1999) también indican que obtuvieron concentraciones satisfactorias de ADN de diversas especies de plantas al emplear un protocolo de extracción en que la polivinilpirrolidona y el β -mercaptoetanol estaban destinados a remover los polifenoles presentes en las muestras. Por su parte, KOONJUL *et al.* (1999) señalan haber conseguido neutralizar hasta 500 ng. de polifenoles mediante el empleo de PVP a una concentración de entre 1 y 2%.

No se observaron diferencias apreciables entre el uso de unos u otros partidores, pero sí hubo diferencia entre muestras, especialmente la muestra PO29 (Parque Oncol), que en sucesivas extracciones y PCRs dio resultados positivos, incluso en casos en que no se pudo obtener ácidos nucleicos de las demás muestras. Este hecho también es un indicador de que la calidad del material de origen incide de forma apreciable sobre el resultado final.

Para los tres tipos de fragmentos que se amplificaron, las electroforesis no proporcionaron información inequívoca sobre diferencias de longitud y hubo que esperar a tener los datos de secuenciación para observarlas.

4.3 Alineamiento de secuencias del cloroplasto. De las muestras amplificadas con éxito, se eligió aquellas cuyas bandas podían verse con más nitidez durante la electroforesis y que procedían de localidades diferentes. El material se envió a un laboratorio externo junto a los partidores que se habían empleado y se recibió un archivo con los resultados de la secuenciación de una hebra.

Para la región trnS-psbK solamente se obtuvieron secuencias de calidad regular de 4 individuos, procedentes del Parque Jorge Alessandri, VIII Región (Es03); Chillán, VIII Región (Cn01); Angol, IX Región (An01); y Colegual, X Región (Co23), respectivamente. Las 2 secuencias obtenidas más tarde con los partidores ccmp2f – ccmp2r fueron de mejor calidad y pertenecían a 1 individuo procedente de la Reserva Los Queules, VII Región (Qu22) y a otro procedente de la Reserva Huilo-huilo, XIV Región (HH23). Para alinearlas, se usó la aplicación para alineamientos múltiples ClustalW2, disponible en la página web del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).

Al alinear las secuencias de los fragmentos amplificados con trnS0r y psbK-p1, se observó que sus porciones iniciales y finales diferían demasiado como para analizarlas con ClustalW2 y se optó por recortar sus extremos para disminuir distorsiones, reduciendo la longitud en unos 240 pb. El resultado (Figura 6) hizo patente que existía una alta homología en la porción central de los fragmentos, no así en las partes distales.

Al incluir en el análisis las secuencias amplificadas mediante ccmp2f y ccmp2r (Figura 7), se advirtió una delección/inserción que en el individuo Qu22 se manifiesta con la presencia del fragmento TTTTATTC a partir de la posición 172 (contando desde la primera base alineada), en el individuo Es03 es el fragmento TTATTC en la posición 169 y en el resto de individuos no están presentes estas bases.

El bajo número de muestras en estudio y el tipo de diferencias observadas no permiten inferir la existencia de mutaciones circunscritas a alguna zona geográfica o determinar grados de similitud entre los individuos.

Olsen (1988) y Olsen y Woese (1993), citados por MORRISON y ELLIS (1997), señalan que es una labor de rutina el retirar porciones de las secuencias alineadas y aconsejan hacerlo cuando no se puedan alinear de forma confiable, en particular si se presentan muchos *gaps*, porque existe la probabilidad de que sean filogenéticamente no informativas. Asimismo, CASTRESANA (2000) considera que el remover segmentos no conservados de un alineamiento tiene la ventaja de que se eliminan muchas posiciones no homólogas y se mitiga el problema de la saturación.

Tanto Qu22 como Es03 pertenecen a poblaciones de la parte norte del área de distribución de la especie y la presencia de esta delección/inserción en esta región puede resultar de utilidad para identificar poblaciones o para inferir relaciones filogenéticas entre ellas, pero se requiere contar con un mayor número de individuos para contrastar estos resultados y saber si el rasgo se presenta de forma consistente entre las poblaciones y dentro de ellas.

4.4 Diseño de partidores. Se usaron las secuencias de An01 y Cn01 para ubicar porciones que no variaran y pudieran usarse para el diseño de partidores específicos para la especie. Se seleccionaron 3 secuencias de estas características (Figura N° 8), que se ubicaban a intervalos espaciados dentro del fragmento, y se diseñaron partidores mediante el programa Primer3. Su construcción se encargó a una empresa especializada.

El uso de un número reducido de secuencias para diseñar partidores específicos tiene la desventaja de que se tiene poca información acerca de la variabilidad que puede existir entre individuos o poblaciones. Al disponer de más secuencias de la misma región y de las secuencias amplificadas con *ccmp2f* – *ccmp2r* se hizo evidente el error cometido con este procedimiento, pues los fragmentos escogidos inicialmente para construir los partidores no eran de buena calidad y sus secuencias no estaban presentes en idéntica forma en los otros individuos, por lo que es de suponer que su eficacia en otros ejemplares de la especie no sea óptima.


```

An01  TGACTTGAGATTTTTCTTTTCCAATTCGAAAGAAAAATCTTGAAGTTGTTTTATCTTTTAT 60
Co23  TGACTTGAGATTTTTCTTTTCCAATTCGAAAGAAAAATCTC-AAGTTTTTTTTATCTTTTAT 59
Cn01  TGACTTGTTATTTTTATTTATCTTTTT-----TTTCAAAACCTTT----CCTTTGT 46
Es03  TCACTTGAGG----ACTTTTCCAATTCAA---AAAAATATCGATCCCTTG----ATTTTAT 49
* ***** ** ** * * * **

An01  CATACTTAAATGTCCTTCATCGGTTATCGTTAAATCTAAATCTATCAGATACATAAAATC-- 118
Co23  CATACTTAAATGTCCTTCATCGGTTATCGTTAAATCTAAATCTATCAAATANATAAAATC-- 117
Cn01  TTTTGTTTTTAT---TTCAT----ATAAT-AAATAAGGATGTAC--AATAGATAAAATCCT 96
Es03  TTTAAATATTTTAAATAAAATTAATAAAATATAGTTAAATCTATCGAATACATAAAATAAT 109
* * * * * ** * * * * * ** * * * * * ** * * * * *

An01  -----ATAAGAAAAATTCGGAAATCAAGCACGGAAAC---CGAGAAATCCCTTTTT---GT 167
Co23  -----ATAAGAAAAATTCATAAATCAAGCAAAGCAAAC---CGAGAAATCCCTTTTT---TT 166
Cn01  ---AAGTAAGAAACATTGAAAAATTAAGCAAAGTAAAA---AGAAAGCC-----TT---TT 142
Es03  TAAGAATAAACAATTCAGAAAAAAAAGCAAAGGAAGACTTAAAAATATCTTTATGTTATGT 169
*** * * ** * * * * * * * * * * * * * * *

An01  TATTCTCCGCTCCAGGATTACGCTCTGGATCATTAGATAGGAATCCGAAGAGCGAAGAGC 227
Co23  TATTCTCCGCTCCAGGATTACGCTCTGGATCATTAGATAGGAATCCGAAGATCAAGAGC 226
Cn01  TATTCTCACGTCAGGATTACGCTCTGGATCATTAGATAGGAATCCAAAGATGAAGAGA 202
Es03  TATTCTCACGTCAGGATTGCGCTCTGGATCATTAGATAAGAATCCGAAGATCAAGAGA 229
***** ** *****

An01  GAAGCAAAACATATCACTACTGTGTA AACGAAGAGTTTGAGAGTAAGCATTACA--ATCT 285
Co23  GAAACAAAAATATCACTACTGTGTA AACGAAGAGTTTGAGAGTAAGCATTACA--ATCT 284
Cn01  GAAACAAAAATATCACTACTGTGTA AACGAAGAGTTTGAGAGTAAGCATTACACAATCT 262
Es03  GAAACAAAAATATCACTACTGTGTA AACGAAGAGTTTGAGAGTAAGCATTACACAATCT 289
*** **** *****

An01  CCAAGATA---TTTTTT---GAGGCAAAGCGGAATAGATTATCTATTTTATACCACA 338
Co23  CCAAGATA---TTTTTT---GAGGCAAAGCGGAATAGATTATCTATTTTATACCACA 337
Cn01  CCAAGATC---TTTTTTTTCAAAAAAAAAAGAGAAATAGATTCCCATTTTTATACCACA 319
Es03  CCAAGATAAGATCATTTTTATTTTTTTGAAAGCGGGAATAGATTACCTATTTTTTTTTCG 346
***** * ** ** * * * * * * * * * *

An01  TATCCATTTTGAACCCAAAGAAATCCAGTAGTTTCTAGAAAA-----GAAAGCAATT 390
Co23  TATCCTATTTTGAACCCAAAGAAATCCAGTAGTTTCTAGAAAA-----GAAAGCAATT 389
Cn01  TATCCTATTTTGAACCCAAATAAACAAAAGGTTTCNCGAAATCAAAAATCAAAAAGAAAT 379
Es03  -ANCCCNNTNG--CTTTTTTGACATAACATATATCAAAAAT-----AAAAAAT 393
* * * * * * * * * * * * * * * *

An01  CGCAGAAATTCAGTTGTAATAAGATTCTT-TCGCTACCTAAATTAT--- 435
Co23  CGCAGAAATTCAGTTGTAATAAGATTCTT-TCGCTACCTAAATTAT--- 434
Cn01  TTCAGAAATTCNTTTGCAATAAGAGTCCAGTCTTTCATTAAAAAAAAT 428
Es03  TGAGGGTTTTTTTTTTTTTNAAGTTTTTCCCATTTTTGGGG----- 436
* ** ** * * * * *

```

FIGURA 6. Alineamiento de secuencias del interior de la región trnS0r-psbK obtenidas de cuatro individuos de *G. avellana*.

```

Qu22_ccmp2f-ccmp2r      TGACTTCAGATTTTTCTTTTCGAATTCGAAAAGAAAAATCTC-AAGTTTTTTTATCTTTTAT 59
HH23_ccmp2f-ccmp2r      TGACTTCAGATTTTTCTTTTCGAATTCGAAAAGAAAAATCTC-AAGTTTTTTTATCTTTTAT 59
Co23_trnS0r-psbKp1      TGACTTCAGATTTTTCTTTTCGAATTCGAAAAGAAAAATCTC-AAGTTTTTTTATCTTTTAT 59
An01_trnS0r-psbKp1      TGACTTCAGATTTTTCTTTTCGAATTCGAAAAGAAAAATCTTGAAGTTGTTTTATCTTTTAT 60
Es03_trnS0r-psbKp1      TCACTTCAGCA----CTTTTCGAATTCAAAAAATATCCGATCCCTTGATTTTATTTAAAAAT 56
Cn01_trnS0r-psbKp1      TGACTTCGTTATTTTATTTATCTTTTTCAAAAACCTTTC-CTTTGTTTTTCTTTTATTT 59
* ***** ** ** ** * ***** **

Qu22_ccmp2f-ccmp2r      CATAGTTAAATGTCCTTCA-TGGTTATGGTTAAATGTA---AATGTATCAAATAGATAAAA 115
HH23_ccmp2f-ccmp2r      CATAGTTAAATGTCCTTCA-TGGTTATGGTTAAATGTA---AATGTATCAAATAGATAAAA 115
Co23_trnS0r-psbKp1      CATAGTTAAATGTCCTTCA-TGGTTATGGTTAAATGTA---AATGTATCAAATAGATAAAA 115
An01_trnS0r-psbKp1      CATAGTTAAATGTCCTTCA-TGGTTATGGTTAAATGTA---AATGTATCAGATAGATAAAA 116
Es03_trnS0r-psbKp1      ATT--TTAAATAAATTAATAAATATAGTTAAATCTATGGAATAGATAAAAAATTAAGA 114
Cn01_trnS0r-psbKp1      CATA--TAA-----TAAATAAGG---ATGTAC--AATAGATAAAAT-CCTAAG- 99
- *** * ** * ** ** * ** * ** * **

Qu22_ccmp2f-ccmp2r      TCATAAGAAAATTCATAAATCAAGCAAGGAAACCGAGAAAATCCCTTTTTTTTATCTTTT 175
HH23_ccmp2f-ccmp2r      TCATAAGAAAATTCATAAATCAAGCAAGGAAACCGAGAAAATCCCTTTTTTTTATCTTTT 171
Co23_trnS0r-psbKp1      TCATAAGAAAATTCATAAATCAAGCAAGGAAACCGAGAAAATCCCTTTTTTTTATCTTTT 171
An01_trnS0r-psbKp1      TCATAAGAAAATTCGGAATCAAGCACGGAAACCGAGAAAATCCCTTTTTGTTATTC 172
Es03_trnS0r-psbKp1      --ATAAGAAATTCAGAAAAAAAAGCAAGCAAGACTTAAAAATATCTTATGTTATGTTT-- 170
Cn01_trnS0r-psbKp1      ---TAAGCAACATTCAAAAATTAAGCAAGTAAAAAGAAAGGCC-----TTTTTATTC 147
*** * * ** ***** * ** * **

Qu22_ccmp2f-ccmp2r      ATTCTCGCGTCCAGGATTACGTCCTGGGAT 205
HH23_ccmp2f-ccmp2r      ----CTCGCGTCCAGGATTACGTCCTGGGAT 197
Co23_trnS0r-psbKp1      ----CTCGCGTCCAGGATTACGTCCTGGGAT 197
An01_trnS0r-psbKp1      ----CTCGCGTCCAGGATTACGTCCTGGGAT 198
Es03_trnS0r-psbKp1      ATTCTCACGTCAGGATTGCGTCCTGGGAT 200
Cn01_trnS0r-psbKp1      ----TTCACGTCAGGATTACGTCCTGGGAT 173
** ***** **

```

FIGURA 7. Alineamiento de secuencias flanqueadas por ccmp2 obtenidas de seis individuos de *G. avellana*.

```

Cn01  CGAGTTTTTCGTACCCAGGGTTTCGAATCCCTCTCTTTCCGTTTCCGTTGATGACTTGTTA 60
An01  CGAGTTATTTCGTACCCAGGGTTTCGAATCCCTCTCTTTCCGTTTNGGTTGCTCNMATGACT 60
*****

Cn01  TTTTATTTATTCTTTT--TTTCAAAACCTTTCCTTTTGTTTTGTATTTTCAT-ATAAT 117
An01  TGAGATTTTTCCTTCCGAATNCGAAAGAAANNTCTTGAAGTTTGTATTTATCTTNTTATCAT 120
* **** * *** * *** ** * **** * * * * *

Cn01  AAATAAGGATGTACA---ATA-----GATAAAA---TCC----TAAGTAAACAACATTGA 161
An01  ACNTAANTGTGTTTCATGGNTATGGTTCNATGNAAATGCTCTCAGATAGATAAAAATCANAAG 180
* *** ** * * * ** ** * * * ** * * *

Cn01  AAAATTAAG-----CAAGTAAAAAGAAAGGCC-----TTTTTATTCTTCACGTCCA 207
An01  AAANTTCGGACATCATTGCACCGMAACCGAGMNATCCCTTTTGTATTCTCGCGNCCA 240
*** ** * ** * * * * * * * * * * * * *

Cn01  GCATTACCTCTCGGATCATTAGATAGGAATCCAAAGATGAAGACAGAAACAAAAAATATC 267
An01  GCATTACCTCTCGGNTCATTAGATAGGAATCCGAANAGGGACAGCGAAGCGNANGANANC 300
*****

Cn01  ACTACTGTGTAAACAAAGAGTTTGAGAGTAAGCATTACACAATCTCCAAGATCTTTTTTT 327
An01  ACNNCTGTGTAAACNACGAGTNTGAGAGTAAGCATTACA--ATCTCCAAGATATTTTTT- 357
** ***** * **** ***** ***** *****

Cn01  TTCAAAAAAAGACAATAGATTCCCCATTTTTTATACCCCATATCCTATTTTGACCCCA 387
An01  ---GAGGAAAGGGGNAATAGATTATCTATTTTATACCCATATCCGATTTTGAACCCA 414
* *** * ***** * ***** ***** ***** *****

Cn01  ATAAACAAAAGGTTTTTCNCGAAATCAAAA-ATCAAAAAGAAATTTTCAG-----AAATT 439
An01  ACAAATCCAGTAGTTTCTAGAAAAGAAAGCANTNCGCAGAAATTCAGNTGTAATAAGATT 474
* *** * ***** ** * * * * * * * * * * *

Cn01  CNTTTGGAATAAGAGTCGAGTCTTTCATTAATAAAAAAATCT--TTCCTATTTTG-AAAAG 496
An01  CTTTCGCTACCTAAATTATCTTTTCGTACCTACCCCGGATTAGATAAAGATNTTGTGGGG 534
* ** * * * * * * * * * * * * * * * *

Cn01  ACTCTAAAAGGTTTTT-TCAATAAATGAAAAANAATCCGAATGAGGAAAGGAAANAGGGG 555
An01  ACCCTAATAGGTCCTTGTTTACTGGAAGTAGAAGGTCAGGATGGGAAA---TGAGGTG 590
** **** * * * * * * * * * * * * * * * *

Cn01  AGTCAAATTTTTTGCANCTATCTAAAAATT-----GTTTGAATCCAGGGTTCATGCT--- 607
An01  ATCCAGACTTATTGCTGCTATCCAACAGTTTCAATGTTTCNNTCGGGGCTCATAATATA 650
* ** * * * * * * * * * * * * * * * *

Cn01  --GTAAGACTTATCCGATCTTATCCATTGTTCCCATTTTTTTTTTTT----- 651
An01  ATGTAAGACTTATCTAATCTTATCAATTGTTATAATTTTTTTTTTTTTTT 701
*****

```

FIGURA 8 Secuencias preliminares de la región trnS-psbK de *G. avellana*, con resalte de los fragmentos escogidos para el diseño de partidores específicos para la especie.

4.5 Amplificación con partidores específicos. Los partidores diseñados para la especie fueron nombrados GatrnS0rF1, GatrnS0rR1 y GatrnS0rR2 (Cuadro N° 3) y se evaluó su idoneidad con el ADN extraído en el curso de la investigación.

CUADRO 3 Secuencia de los partidores específicos diseñados para amplificar las regiones de interés en el cloroplasto de *G. avellana*.

Partidor	Secuencia de nucleótidos
GatrnS0rF1	5' GGG TTC GAA TCC CTC TCT TT 3'
GatrnS0rR1	5' TCT AAT GAT CCA GGA CGT AAT CC 3'
GatrnS0rR2	5' AAC AAT GGA TAA GAT CGG ATA AGT C 3'

En la PCR se mantuvieron las condiciones de la reacción y las proporciones de los reactivos. Al usar los partidores específicos GatrnS0rF1 y GatrnS0rR1 se consiguió amplificar ADNcp de muestras procedentes de Armerillo, Colegual, Los Queules y Malleco, si bien las bandas de electroforesis eran poco nítidas (Figura N° 9) y el resultado no pudo replicarse.

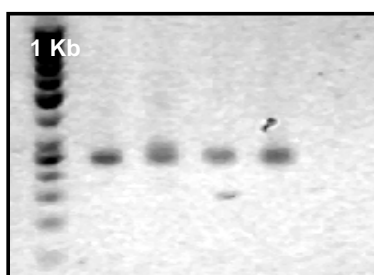


FIGURA 9 Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados con los partidores GatrnS0rF1 y GatrnS0rR1 en un gel de agarosa 1%.

Luego de conocer las secuencias restantes de la región trnS0r - psbK y de los fragmentos ccmp2, resultó comprensible que los partidores diseñados funcionaran de forma deficiente. En el caso del partidor GatrnS0rR2 no se consiguió amplificar ninguna muestra y es entendible, puesto que se basaba en un fragmento que no era

coincidente ni siquiera entre las dos secuencias que se usaron como base para su diseño.

4.6 Análisis filogenético de la región ITS. Para la región ITS se siguió el mismo procedimiento y fue posible obtener 7 secuencias de individuos procedentes de Armerillo, VII Región (Ar13), Reserva Nacional Los Queules, VII Región (Qu22), Parque Jorge Alessandri, VIII Región (Es19), Monumento Natural Contulmo, VIII Región (Ct06), Reserva Nacional Malleco, IX Región (Ma05), Parque Oncol, XIV Región (PO29) y Colegual, X Región (Co04). De estos 7 individuos, hubo que descartar para los análisis las secuencias procedentes del Parque Jorge Alessandri y la de Colegual, por haber porciones importantes que se encontraban ilegibles, de modo que se trabajó con los cinco restantes.

El alineamiento en ClustalW2 se llevó a cabo con las cinco secuencias de mejor calidad y dejando de lado sus extremos, más expuestos a errores, por lo que en la práctica las secuencias tuvieron un largo de 574 nucleótidos. En este caso, las cinco secuencias no presentaron variación, a excepción de dos sitios de la secuencia procedente de Malleco en que no hay una adenina (A) presente en las otras cuatro secuencias; y de dos bases de la secuencia de Malleco que no se pudieron leer (Figura N° 10).

Usando Clustal X con 4 parámetros de alineamiento distintos, se construyeron matrices de datos con las cinco secuencias obtenidas en este estudio y otras 78 secuencias procedentes de bases de datos. A estas matrices de datos no se les eliminaron las porciones con *gaps* ni se les hizo alguna otra clase de modificación del resultado antes de hacer funcionar los programas de inferencia filogenética. Al observar los datos a simple vista, no se vieron diferencias entre emplear las dos parejas de parámetros menos restrictivos, pero sí se observaron variaciones en la longitud y el aspecto de los alineamientos con más restricciones. Empleando los valores 10-5 y 15-6,66, la longitud total fue de 867 caracteres; al usar penalizaciones de 25 y 10, el alineamiento tuvo 868 caracteres; finalmente, con 40-15, hubo 846 caracteres.

La alta homología de esta región es un hecho conocido y se considera que su utilidad en el análisis filogenético dentro de géneros o especies es muy limitado y esto pudo comprobarse a través del alineamiento.

Por otra parte, la región ITS fue una elección adecuada para trabajar en niveles taxonómicos superiores pues cumple con el criterio mencionado por CASTRESANA (2000), de no ser ni tan similar que no provea información filogenética, ni tan divergente que sus posiciones se encuentren saturadas por múltiples sustituciones.

Los programas de la serie Clustal son de los más populares para realizar alineamientos múltiples (MORRISON y ELLIS, 1997; CHENNA *et al.*, 2003). Sin embargo, para autores como LUNTER *et al.* (2005) el hacer el alineamiento de secuencias como un paso aparte de la inferencia filogenética es un error, pues puede considerarse que ambos procesos son mutuamente dependientes; a su juicio, el uso en Clustal de un árbol guía que emplea el método *neighbour-joining* sesga los datos que son el punto de partida de las inferencias posteriores y al ignorar la incertidumbre del proceso la inferencia subsiguiente posee un exceso de confianza.

Las secuencias de avellano se alinearon empleando la versión en línea ClustalW2 que ofrece posibilidades de tratamiento gráfico superiores a la versión ClustalX que se empleó para alinear el conjunto de secuencias de la familia Proteaceae, pero no existen inconvenientes en hacer esto, porque los resultados que producen ambos programas son exactamente iguales (THOMPSON *et al.*, 2003).

Las penalizaciones por apertura y extensión de *gaps* produjeron variaciones importantes en los alineamientos y, por consiguiente, en las inferencias que se efectuaron con ellos. De acuerdo a diversos estudios (Tyson, 1992; Vingron y Waterman, 1994; Wheeler, 1995, citados por MORRISON y ELLIS, 1997) estos parámetros serían los más importantes de entre los parámetros de alineamiento múltiple de secuencias, pero hasta el momento no existiría manera de determinar analíticamente los costos óptimos y todos los programas trabajan con valores predefinidos que tienen como unidad base el costo de una sustitución. Los valores empleados como punto de partida para esta investigación fueron los predeterminados

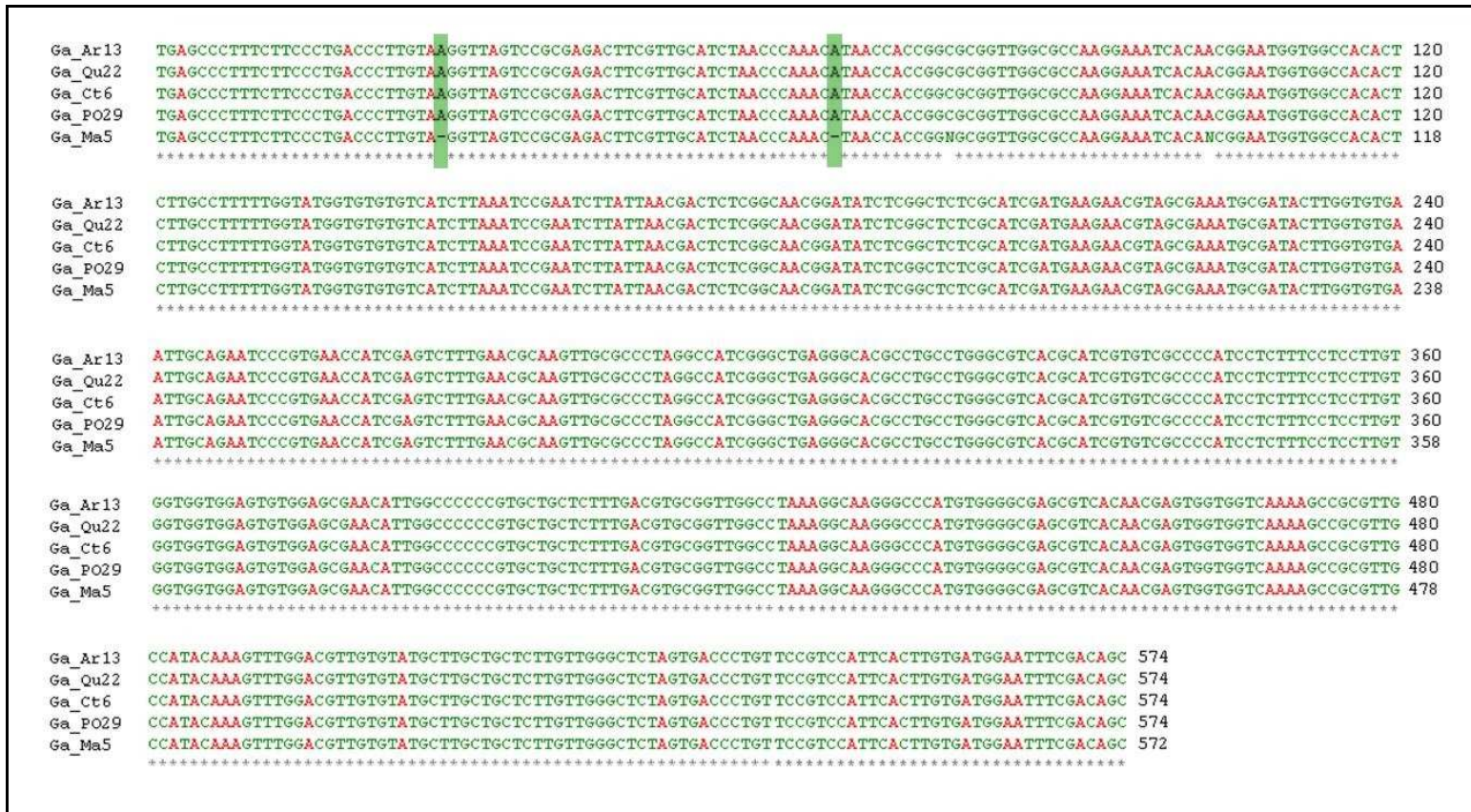


FIGURA 10 Alineamiento de un fragmento de la región ITS de 5 ejemplares de *Gevuina avellana*. En verde los sitios con variación

por ClustalX, 15 para la apertura de un *gap* y 6,66 para su extensión, y las tres parejas restantes fueron establecidas de forma arbitraria.

WHEELER (1995) y MORRISON y ELLIS (1997) probaron diversos valores para ambos parámetros, evaluaron todas las combinaciones posibles entre ellos y observaron que era posible obtener topologías equivalentes con pares de valores en apariencia no relacionados. Así, resulta difícil identificar cuáles serían los valores óptimos para estos parámetros en el caso de las secuencias ITS de las proteáceas y solamente puede decirse por el momento que los resultados que se obtienen usando los valores predeterminados de ClustalX son coherentes con la información existente en la bibliografía. No obstante, hay que tener en cuenta que buena parte de esta información procede de estudios que a su vez emplearon Clustal u otros programas semejantes para realizar los alineamientos.

Se espera que al aumentar las penalizaciones, en particular el costo por la apertura de un *gap*, la longitud total de las secuencias alineadas disminuya (SANCHÍS *et al.*, 2001; MORRISON y ELLIS, 1997). A pesar de eso, al usar los valores 25 para la apertura de un *gap* y 10 para su extensión, el alineamiento obtenido tuvo un carácter más que al usar los parámetros menos restrictivos.

Un antecedente para esta situación se encuentra en el estudio de MORRISON y ELLIS (1997), quienes usaron ADN ribosomal de animales para llevar a cabo una comparación entre programas y en algunos casos al usar ClustalX obtuvieron alineamientos de casi idéntica longitud a pesar de haber variado las penalidades por *gaps*. Estos mismos autores llaman la atención sobre el hecho de que alineamientos similares no necesariamente traen como consecuencia similares resultados al realizar una inferencia filogenética.

4.6.1 Inferencia por máxima parsimonia. El programa PAUP construyó un árbol filogenético para cada una de las matrices de datos proporcionadas y requirió alrededor de 4 días en cada caso para evaluar el soporte de *bootstrap*. Los resultados se resumen en el cuadro N° 4 y se presenta un filograma de consenso en la Figura 11.

CUADRO 4 Resumen de la inferencia por máxima parsimonia para el análisis de 83 secuencias ITS.

Parámetro de alineamiento		Número de caracteres				Puntaje de mejor árbol	Árboles guardados
Apertura de gap	Extensión de gap	Total	Constantes	No informativos	Informativos		
10	5	867	324	99	444	2712	300
15	6,66	867	324	99	444	2712	300
25	10	868	329	88	451	2983	60
40	15	846	279	69	498	3500	720

Puede verse en la tabla que los cambios en los alineamientos traen consigo variaciones en la información que proporcionan los caracteres y que al emplear parámetros más restrictivos aumentó el número de caracteres parsimoniosamente informativos y también el número de pasos de los árboles más parsimoniosos. Esta diferencia no puede tomarse como un mayor apoyo para los alineamientos menos restrictivos, porque se caería en un razonamiento circular, al ser el árbol un resultado de las secuencias proporcionadas.

Los árboles filogenéticos obtenidos en los cuatro casos (Anexo N° 2) dejan al avellano y a 7 géneros más en un grupo particular con un soporte de 100 %, en consonancia con los resultados expuestos por investigaciones previas que han llevado a la clasificación de estos 8 géneros como la subtribu Gevuinae (WESTON y BARKER, 2006; WILLIS, 2007; MAST *et al.*, 2008). Además el representante del género *Cardwellia* queda aparte del resto, si bien 72% de soporte es un valor muy cercano a 70%, que es lo que normalmente se considera el límite para aceptarlo como información confiable (ALFARO *et al.*, 2003).

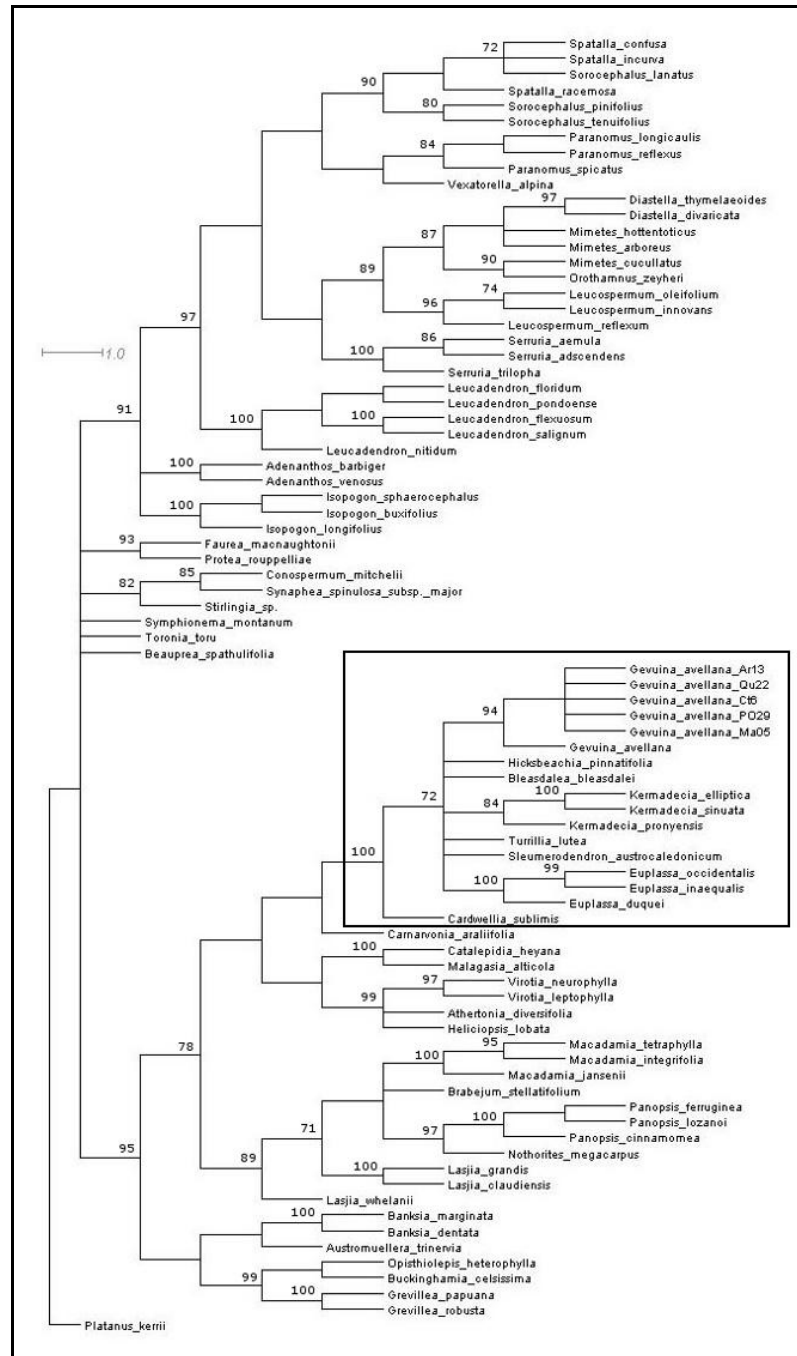


FIGURA 11 Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima parsimonia, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 10 para la apertura de un *gap* y 5 para su extensión. Se resalta la subtribu Geuininae

4.6.2 Inferencia por máxima verosimilitud. El programa Garli tardó alrededor de 10 días en efectuar un análisis completo de los datos. Los resultados se resumen en el cuadro N° 5 y se presenta un filograma de consenso en la figura N° 12.

CUADRO 5 Resumen de la inferencia por máxima verosimilitud para el análisis de 83 secuencias ITS.

Parámetro de alineamiento		Número de caracteres				InL
Apertura de <i>gap</i>	Extensión de <i>gap</i>	Total	Constantes	Autoapomórficos	Informativos	
10	5	867	324	52	491	-12884,7509
15	6,66	867	324	52	491	-12885,6449
25	10	868	329	48	491	-13810,4899
40	15	846	279	44	523	-15394,3898

Los alineamientos más restrictivos condujeron a árboles con una verosimilitud menor, pero como ya se dijo para el caso de la máxima parsimonia, los árboles resultantes están directamente influenciados por los datos de origen y por ello los valores del logaritmo natural de la verosimilitud no son directamente comparables.

La subtribu Gevuininae aparece con un 100% de soporte *bootstrap*, pero a diferencia del caso anterior, el representante de *Cardwellia* queda en la misma politomía que los géneros restantes del grupo y tan solo se resuelven sin inconsistencias las relaciones dentro de estos.

Es importante destacar que hay soporte para la separación entre los ejemplares de *G. avellana* empleados en este estudio y las secuencias procedentes del estudio de MAST *et al.* (2008). No existe información sobre el origen de las secuencias empleadas por estos autores, pero más que atribuir el resultado a diferencias genéticas, se puede buscar su causa en el hecho de que la secuencia que queda aparte está completa, con 645 pares de bases, mientras las demás fueron recortadas porque sus extremos eran ilegibles.

4.6.3 Inferencia por análisis bayesiano. Los datos de los modelos de evolución para el análisis bayesiano se obtuvieron mediante jModeltest y en tres casos el modelo seleccionado fue el GTR + G, excepto cuando los alineamientos se hicieron con penalizaciones de 40-15, en que se seleccionó el modelo más complejo GTR + I + G. El programa MrBayes empleó alrededor de 3 días en cada análisis y se muestra un árbol de consenso en la figura N° 13.

Según ALFARO *et al.* (2003), los valores de *bootstrap* no son equiparables directamente a las probabilidades posteriores del análisis bayesiano y así, aunque varios internodos contaron con más de un 70% de probabilidad, a diferencia del *bootstrap* estos valores no se consideran un buen porcentaje de confianza y solamente se aceptan aquellos que superen el 95% de probabilidad posterior.

Al igual que en los métodos anteriores, los resultados continúan entregando una topología en que el avellano se halla dentro de un grupo coincidente con la de la subtribu Gevuinae de la literatura. En el árbol presentado en la figura N° 12, con penalizaciones de alineamiento 10-5 se puede ver que hay un 98% de probabilidad posterior para situar a *Cardwellia* como un grupo aparte de los otros siete géneros y que las secuencias de *G. avellana* de este estudio quedan separadas de la secuencia de MAST *et al.* (2008). Usando los otros parámetros de alineamiento (Anexo N° 2), no hubo soporte para la separación de *Cardwellia*, pero se mantuvo la diferencia para *Gevuina avellana*.

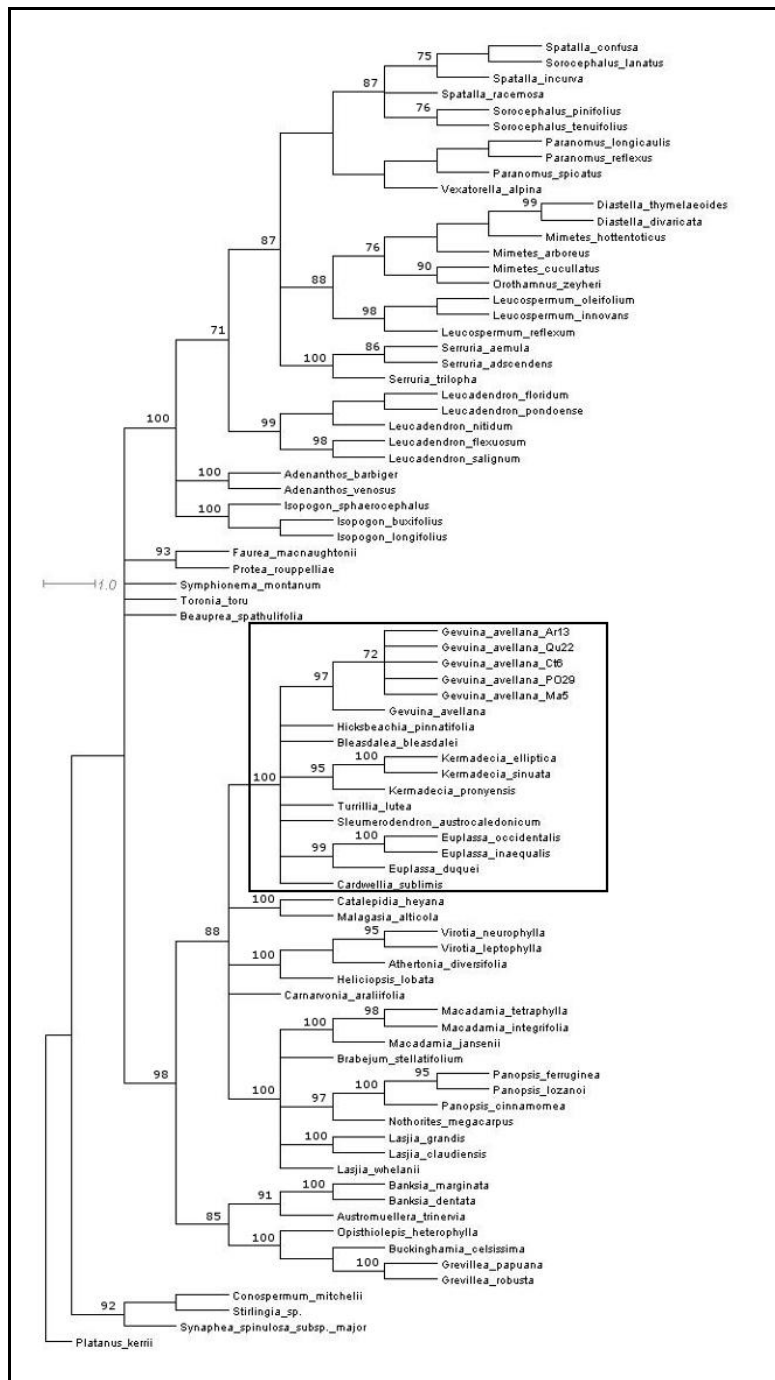


FIGURA 12 Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima verosimilitud, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 25 para la apertura de un *gap* y 10 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.

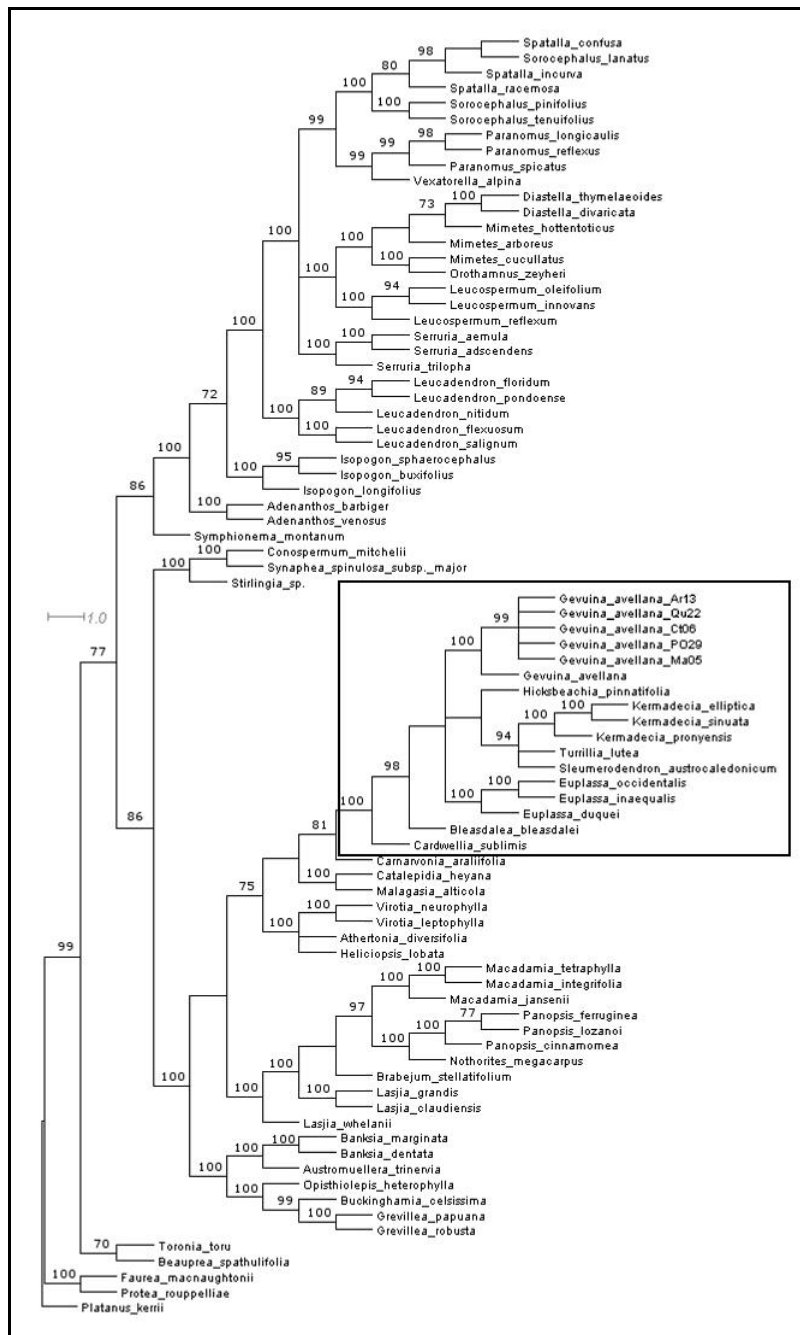


FIGURA 13 Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de análisis bayesiano, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 10 para la apertura de un *gap* y 5 para su extensión. Se resalta la subtribu **Gevuininae**,

5 CONCLUSIONES

- La región trnS-psbK del cloroplasto de *Gevuina avellana* presenta variabilidad entre individuos, lo que permite usarla para estudiar la variabilidad genética de la especie.
- Se diseñaron tres partidores específicos para amplificar la región trnS-psbK del cloroplasto, llamados Ga-trnS0r-F1, Ga-trnS0r-R1 y Ga-trnS0r-R2; de ellos, los dos primeros funcionaron correctamente.
- La región ITS del núcleo no presenta suficiente variabilidad en esta especie y por eso no es de interés para estudios de variación intraespecífica en avellano.
- Los tres métodos de inferencia filogenética usados para analizar secuencias ITS (máxima parsimonia, máxima verosimilitud y análisis bayesiano) entregaron resultados similares en cuanto a la posición de *G. avellana* dentro de la familia Proteaceae y concuerdan con la información bibliográfica preexistente, que sitúa a esta especie y a los géneros *Cardwellia*, *Turrillia*, *Sleumerodendron*, *Kermadecia*, *Euplassa*, *Hicksbeachia* y *Bleasdalea* dentro de la subtribu Gevuininae.
- Se observaron diferencias en los porcentajes de soporte de las ramas de los árboles filogenéticos al modificar en los parámetros de alineamiento de las secuencias las penalizaciones por la apertura y la extensión de un *gap*.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ALFARO, M., ZOLLER, S. y LUTZONI, F. 2003. Bayes or Bootstrap? A Simulation Study Comparing the Performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and Bootstrapping in Assessing Phylogenetic Confidence. *Molecular Biology and Evolution*. 20 (2). 255-266.
- BALDWIN, B., SANDERSON, M., PORTER, M., WOJCIECHOWSKI, M., CAMPBELL, C. y DONOGHUE, M. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82 (2). pp. 247-277 (On line) <<http://www.jstor.org/stable/2399880>> 12 mar. 2008
- BARKER, N., WESTON, P., ROURKE, J. y REEVES, G. 2002. The relationships of the southern African Proteaceae as elucidated by internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence data. *Kew Bulletin*. 57. pp. 867-883.
- BEKESSY, S., ALLNUTT, T., PREMOLI, A., LARA, A., ENNOS, R., BURGMAN, M., CORTES, M. y NEWTON, A. 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity*. 88. pp 243-249.
- BIRKY, W. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. Vol. 92, pp. 11331-11338
- CASTRESANA, J. 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 17. 540 - 552.

- CHACÓN, P. y ARMESTO, J. 2006. Do carbon-based defences reduce foliar damage? Habitat-related effects on tree seedling performance in a temperate rainforest of Chiloé Island, Chile. *Oecologia*. 146 (4). 555-565.
- CHENNA, R., SUGAWARA, H., KOIKE, T., LOPEZ, R., GIBSON, T., HIGGINS, D. y THOMPSON, J. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31 (13). 3497-3500. (On line) <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/31/13/3497>> 25 abr. 2009
- CHIANG, T., SCHAAL, B. y PENG, C. 1998. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39 245-250 (On line) <<http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1998/4/bot94-10.pdf>> 5 may. 2007
- DEL HOYO, A. 2006. Filogenia y genética poblacional del género *Androcymbium* (Colchicaceae). Memoria Doctor en Biología. Universitat de Girona. 295 p. (On line) <http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UdG/AVAILABLE/TDX-0207107-104150/tahl.pdf> (20 feb. 2008)
- DIMITRI, M. 1977. Pequeña flora ilustrada de los parques nacionales andino - patagónicos. Publicación técnica Nº 46. Servicio Nacional de Parques Nacionales, República Argentina. Buenos Aires, 2ª ed. 31 p.
- DONOSO, C., PREMOLI, A., GALLO, L. e IPINZA, R. 2004. Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Santiago: Universitaria. 420 p.
- DONOSO, C., ESCOBAR, B. y MEDEL, F. 2006. Gevuina avellana. In: Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Marisa Cuneo. Valdivia (Chile). pp. 264-276.
- 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. pp. 345-349

- HALLOY, S., GRAU, A. y MCKENZIE, B. 1996. Gevuina nut (Gevuina avellana, Proteaceae), a cool climate alternative to Macadamia. *Economic botany*. 50 (2) 224-235
- HEINZE, B. 2007. A Data Base of PCR Primers for the Study of the Chloroplast Genome in Plants. *Plant Methods*. 3: 4.
- HOFFMANN, A. 1997. Flora silvestre de Chile. Zona araucana: Una guía ilustrada para la identificación de las especies de plantas leñosas del sur de Chile (entre el río Maule y el seno de Reloncaví). *El Mercurio*. Santiago de Chile. 4ª ed. 258 p.
- HUSON, D., RICHTER, D., RAUSCH, C., DEZULIAN, T., FRANZ, M. y RUPP, R. 2007. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*.
- HUELSENBECK, J y RONQUIST, F. 2004. Bayesian Analysis of Molecular Evolution using MrBayes. In: *Statistical Methods in Molecular Evolution*. Springer. pp. 183-232.
- KHANUJA, S., SHASANY, A., DAROKAR, M., y KUMAR, S. 1999. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1–7. (On line) <<http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ispmb/ispmb17/17074-1.pdf>> 12 jun. 2008
- KOONJUL, P., BRANDT, W., FARRANT, J. y LINDSEY, G. 1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research*. 27 (3). 915-916. (On line) <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/27/3/915>> 6 jun. 2008
- LUNTER, G., MIKLÓS, I., DRUMMOND, A., JENSEN, J. y HEIN, J. 2005. Bayesian coestimation of phylogeny and sequence alignment. *BMC Bioinformatics*. (On

line) <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2105-6-83.pdf>> 23 abr. 2009

- MALIYAKAL, J. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*. 20 (9)
- MARTÍNEZ, C. 2001. Evaluación de la producción de nueces de once clones de *Gevuina avellana* Mol. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 87 h.
- MAST, A., WILLIS, C., JONES, E., DOWNS, K. y WESTON, P. 2008. A smaller *Macadamia* from a more vagile tribe: inference of phylogenetic relationships, divergence times, and diaspore evolution in *Macadamia* and relatives (tribe Macadamieae; Proteaceae). *American Journal of Botany* 95 (7). 843–870.
- MEDEL, F., DONOSO, C. y HALLOY, S. 2004. Variación en *Gevuina avellana* Mol. (Gevuin, Avellano chileno, Chile nut). In: Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Universitaria. Santiago de Chile. pp. 321-344.
- MORRISON, D. y ELLIS, J. 1997. Effects of Nucleotide Sequence Alignment on Phylogeny Estimation: A Case Study of 18s rDNAs of Apicomplexa. *Molecular Biology and Evolution* 14 (4) 428-441
- PALMÉ, A. y VENDRAMIN, G. 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology* 11 (9), 1769–1779.
- POREBSKI, S., BAILEY, G. y BAUM, B. 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15 (1). 8-15.
- POSADA, D. y CRANDALL, K. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.

- POSADA, D. y CRANDALL, K. 2001. Selecting Models of Nucleotide Substitution: An Application to Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1). *Molecular Biology and Evolution*. 18 (6). (On line) <<http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/full/18/6/897>> pp. 897-906
- PROVAN, J., POWELL, W. y HOLLINGSWORTH, P. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*. 16 (3). 142-147
- RONQUIST, F. y HUELSENBECK, J. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19 (12) 1572–1574 (On line) <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/reprint/19/12/1572>> 07 oct. 2008
- RODRÍGUEZ, R., MATHEI, O., y QUEZADA, M. 1983. Flora arbórea de Chile. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 408 p.
- ROZEN, S y SKALETSKY, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **In:** Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 365-386
- SANCHÍS, A., MICHELENA, J., LATORRE, A., QUICKE, D., GÄRDENFORT, U. y BELSHAW, R. 2001. The Phylogenetic Analysis of Variable-Length Sequence Data: Elongation Factor-1a Introns in European Populations of the Parasitoid Wasp Genus *Pauesia* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Molecular Biology and Evolution*. 18 (6). 1117-1131.
- SCHAAL, B., HAYWORTH, D., OLSEN, K., RAUSCHER, J. y SMITH, W. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Biology*. 7. 465-474
- SOBER, E. 2005. Parsimony and its presuppositions. **In:** *Parsimony, Phylogeny and Genomics*. Oxford University Press. pp. 43-56

- SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 142 p.
- SWOFFORD, D y SULLIVAN, J. 2003. Phylogeny Inference based on parsimony and other methods using PAUP*. In: The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny. Cambridge University Press. Cambridge. pp 160-181
- THOMPSON, J., GIBSON, T. y HIGGINS, D. 2003. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX In: Current Protocols in Bioinformatics. (On line) <<http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780471250951/cp/cpbi/article/bi0203/current/pdf>> 16 mar. 2009
- VANDAMME, A. 2003. Basic concepts of molecular evolution. In: The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 1-23
- VARGHESE, R., CHAUHAN, V. y MISRA, A. 2003. Hypervariable spacer regions are good sites for developing specific PCR-RFLP markers and PCR primers for screening actinorhizal symbionts. Journal of Bioscience. 28. 437-442.
- VILLAGRA, M. 2001. Identificación del agente causal de la escoba de bruja en murta (*Ugni molinae* Turcz.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 95 p.
- VON HAESELER, A. y STRIMMER, K. 2003. Phylogeny Inference based on maximum-likelihood methods with TREE-PUZZLE. Theory. In: The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 137-152
- WESTON, P. y BARKER, N. 2006. A new suprageneric classification of the Proteaceae, with an annotated checklist of genera. Telopea. 11 (3). 314-344

- 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. pp 9-19
- WEN, J., y ZIMMER, E. 1996. Phylogeny of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 167–179.
- WHEELER, W. 1995. Sequence Alignment, Parameter Sensitivity, and the Phylogenetic Analysis of Molecular Data. *Systematic Biology*. 44 (3). 321-331.
- WILLIS, C. 2007. Inference of phylogenetic relationships in *Macadamia* and relatives (tribe Macadamieae; Proteaceae) using three chloroplast and three nuclear DNA regions. Tesis Florida State University. Department of Biological Sciences. 30 p.
- YANG, D., YANG, K. y YOON, E. 2001. Comparison of ITS (Internal Transcribed Spacer) and 5.8S rDNA Sequences among Varieties and Cultivars in *Panax ginseng*. *Journal of Photoscience* 8 (2). 55-60. (On line) <<http://www.photos.or.kr/journal/issues/8-1-55.pdf>> 27 mar. 2008
- YÁÑEZ, L. 2004. Prospección del comercio del fruto de la avellana y sus productos derivados, en la Región Metropolitana. Tesis Lic. Agr. Santiago. Universidad de Chile. 62 p.
- YOCKTENG, R. y NADOT, S. 2004. Infrageneric phylogenies: a comparison of chloroplast-expressed glutamine synthetase, cytosol-expressed glutamine synthetase and cpDNA maturase K in *Passiflora*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31. pp. 397-402
- ZWICKL, D. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph. D. dissertation. University of Texas. Austin.

7 ANEXOS

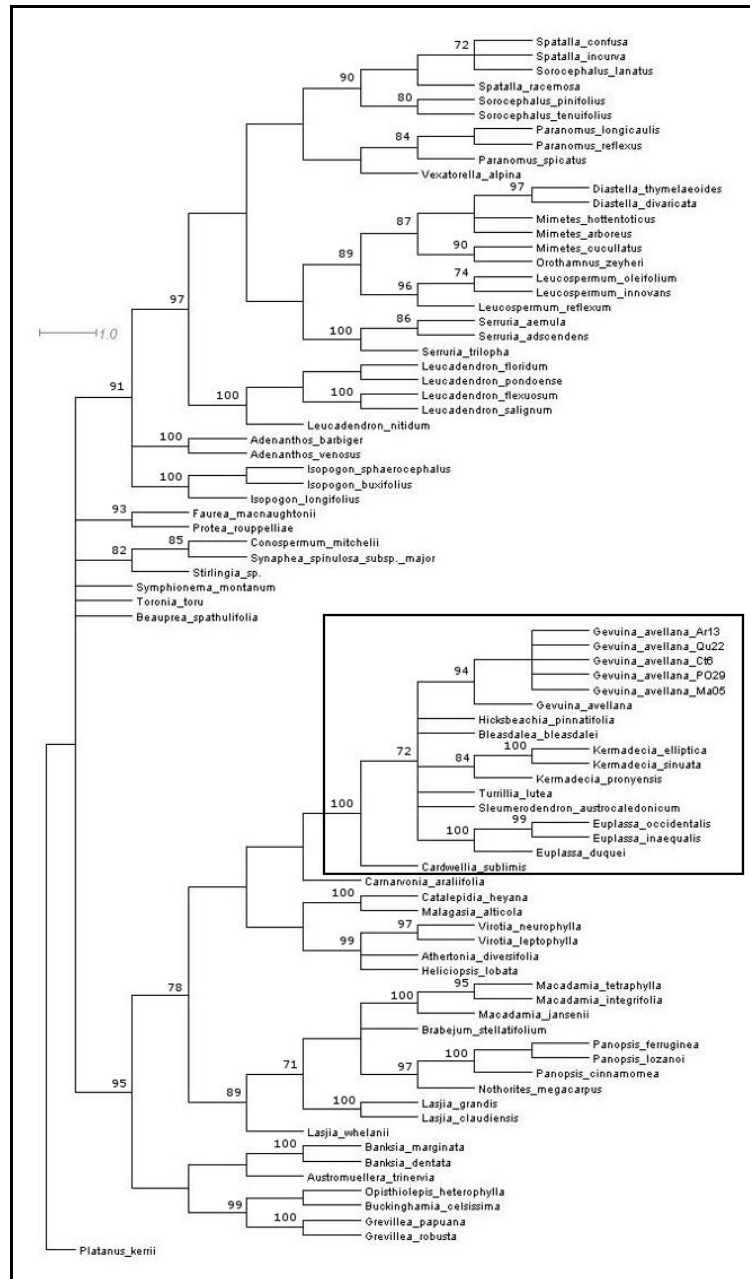
ANEXO 1 Lista de especies usadas en las inferencias filogenéticas

Especie	Accesión
<i>Adenanthos barbiger</i>	AF508822
<i>Adenanthos venosus</i>	AF508821
<i>Athertonia diversifolia</i>	EU642793
<i>Austromuelleria trinervia</i>	DQ499130
<i>Banksia dentata</i>	DQ499128
<i>Banksia marginata</i>	DQ499129
<i>Beauprea spathulifolia</i>	AF508815
<i>Bleasdalea bleasdalei</i>	EU642786
<i>Brabejum stellatifolium</i>	EU642803
<i>Buckinghamia celsissima</i>	DQ499133
<i>Cardwellia sublimis</i>	EU642777
<i>Carnarvonian araliifolia</i>	EU642774
<i>Catalepidia heyana</i>	EU642794
<i>Conospermum mitchellii</i>	AF508814
<i>Diastella divaricata</i>	AF508836
<i>Diastella thymelaeoides</i>	AF508841
<i>Euplassa duquei</i>	EU642779
<i>Euplassa inaequalis</i>	EU642778
<i>Euplassa occidentalis</i>	EU642780
<i>Faurea macnaughtonii</i>	AF508817
<i>Gevuina avellana</i>	EU642787
<i>Grevillea papuana</i>	DQ499131
<i>Grevillea robusta</i>	AY864893
<i>Heliciopsis lobata</i>	EU642789

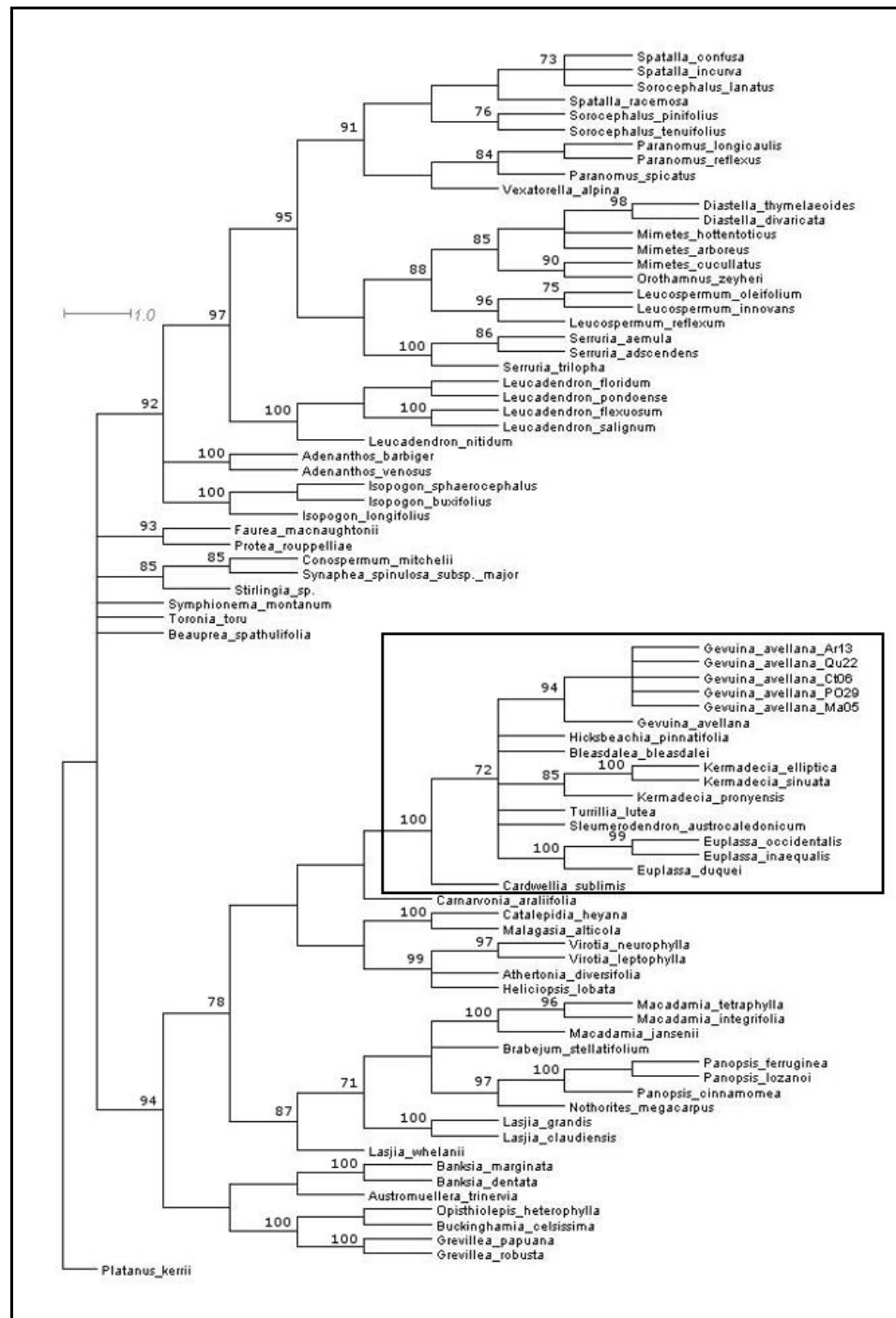
<i>Hicksbeachia pinnatifolia</i>	EU642790
<i>Isopogon buxifolius</i>	AF508818
<i>Isopogon longifolius</i>	AF508819
<i>Isopogon sphaerocephalus</i>	AF508820
<i>Kermadecia elliptica</i>	EU642784
<i>Kermadecia pronyensis</i>	EU642783
<i>Kermadecia sinuata</i>	EU642785
<i>Lasjia claudiensis</i>	EU642799
<i>Lasjia grandis</i>	EU642796
<i>Lasjia whelanii</i>	EU642797
<i>Leucadendron flexuosum</i>	AY692169
<i>Leucadendron floridum</i>	AY692188
<i>Leucadendron nitidum</i>	AY692183
<i>Leucadendron pondoense</i>	AY692187
<i>Leucadendron salignum</i>	AY692172
<i>Leucospermum innovans</i>	AF508845
<i>Leucospermum oleifolium</i>	AF508846
<i>Leucospermum reflexum</i>	AF508844
<i>Macadamia integrifolia</i>	EU642798
<i>Macadamia janseni</i>	EU642802
<i>Macadamia tetraphylla</i>	EU642800
<i>Malagasia alticola</i>	EU642788
<i>Mimetes arboreus</i>	AF508840
<i>Mimetes cucullatus</i>	AF508837
<i>Mimetes hottentoticus</i>	AF508838
<i>Nothorites megacarpus</i>	EU642776
<i>Orothamnus zeyheri</i>	AF508810
<i>Opisthiolepis heterophylla</i>	DQ499134
<i>Panopsis cinnamomea</i>	EU642804
<i>Panopsis ferruginea</i>	EU642807
<i>Panopsis lozanoi</i>	EU642806
<i>Paranomus longicaulis</i>	AF508852

<i>Paranomus reflexus</i>	AF508851
<i>Paranomus spicatus</i>	AF508849
<i>Platanus kerrii</i>	AM491999
<i>Protea roupelliae</i>	AF508816
<i>Serruria adscendens</i>	AF508823
<i>Serruria aemula</i>	AF508825
<i>Serruria trilopha</i>	AF508824
<i>Sleumerodendron austrocaledonicum</i>	EU642781
<i>Sorocephalus lanatus</i>	AF508834
<i>Sorocephalus pinifolius</i>	AF508829
<i>Sorocephalus tenuifolius</i>	AF508826
<i>Spatalla confusa</i>	AF508832
<i>Spatalla incurva</i>	AF508833
<i>Spatalla racemosa</i>	AF508830
<i>Stirlingia</i> sp.	AF508835
<i>Symphionema montanum</i>	AF508813
<i>Synaphea spinulosa</i> subsp. <i>major</i>	AF508812
<i>Toronia toru</i>	AF508811
<i>Turrillia lutea</i>	EU642782
<i>Vexatorella alpina</i>	AF508853
<i>Viotia leptophylla</i>	EU642792
<i>Viotia neurophylla</i>	EU642791

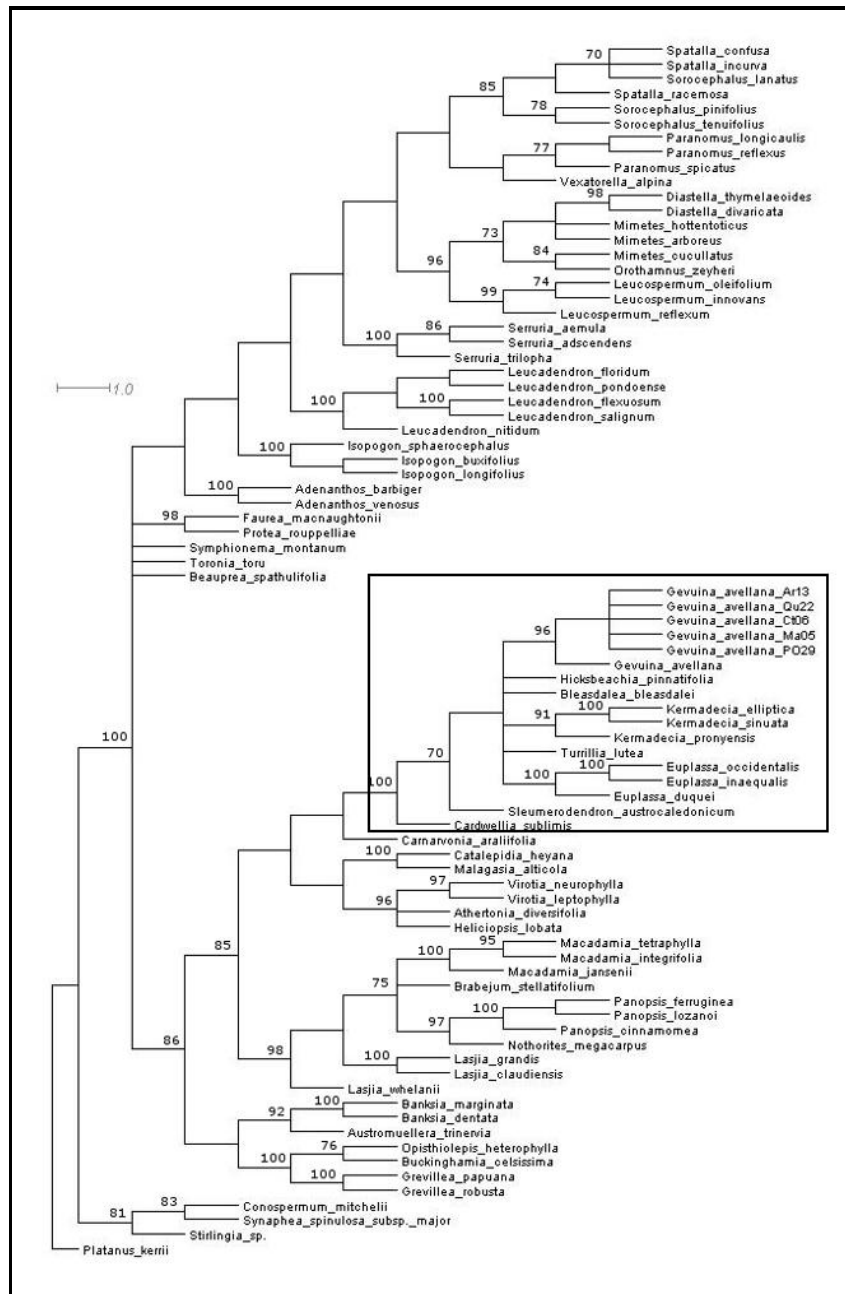
ANEXO 2 Árboles filogenéticos.



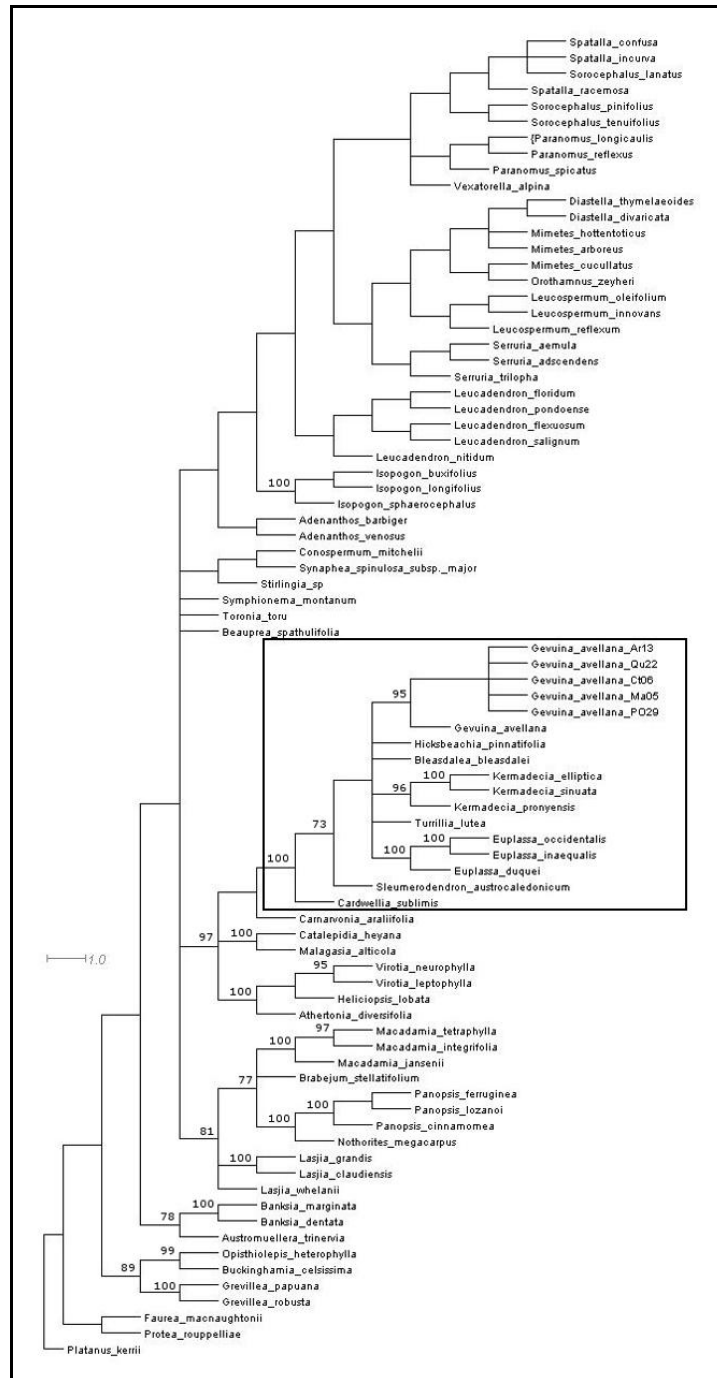
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima parsimonia, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 10 para la apertura de un *gap* y 5 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



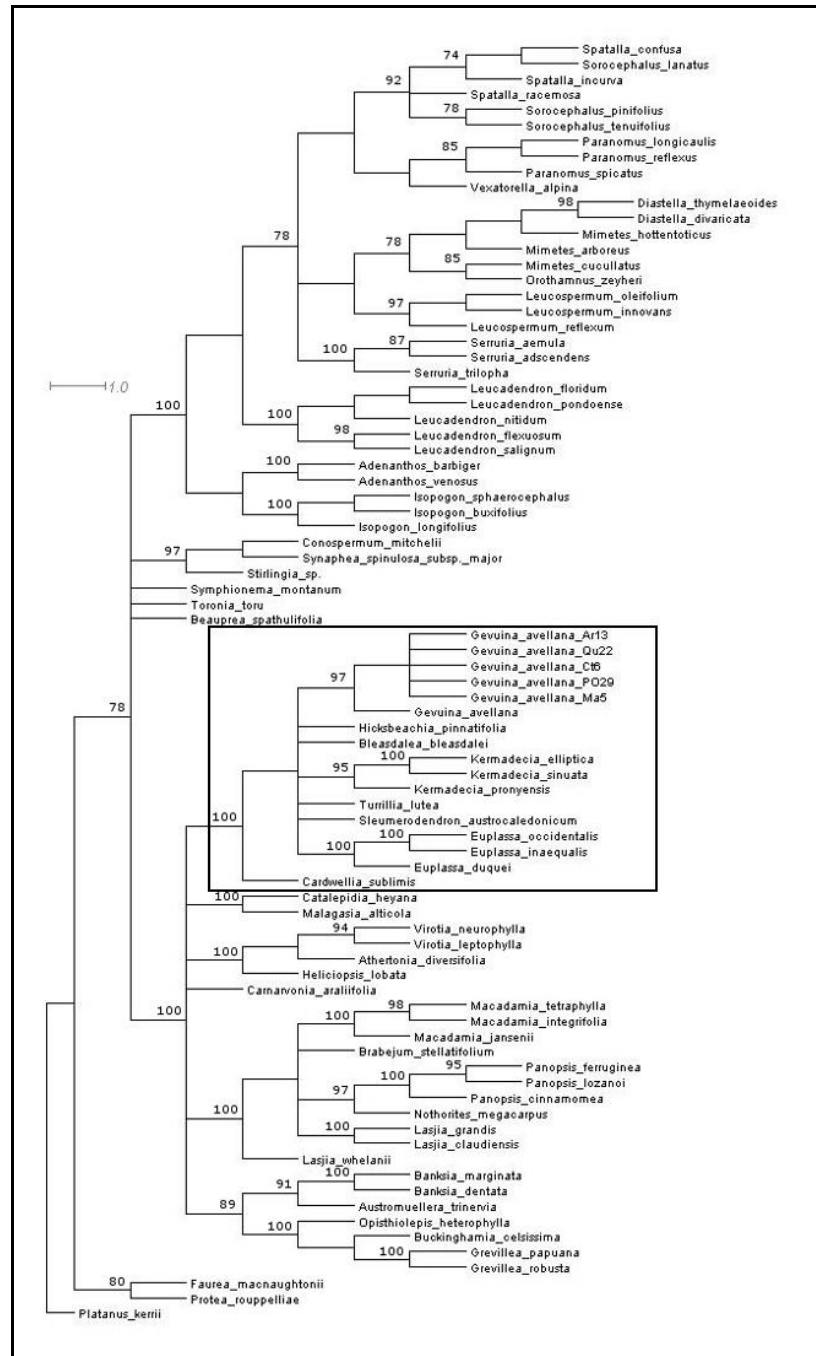
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima parsimonia, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 15 para la apertura de un *gap* y 6,66 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



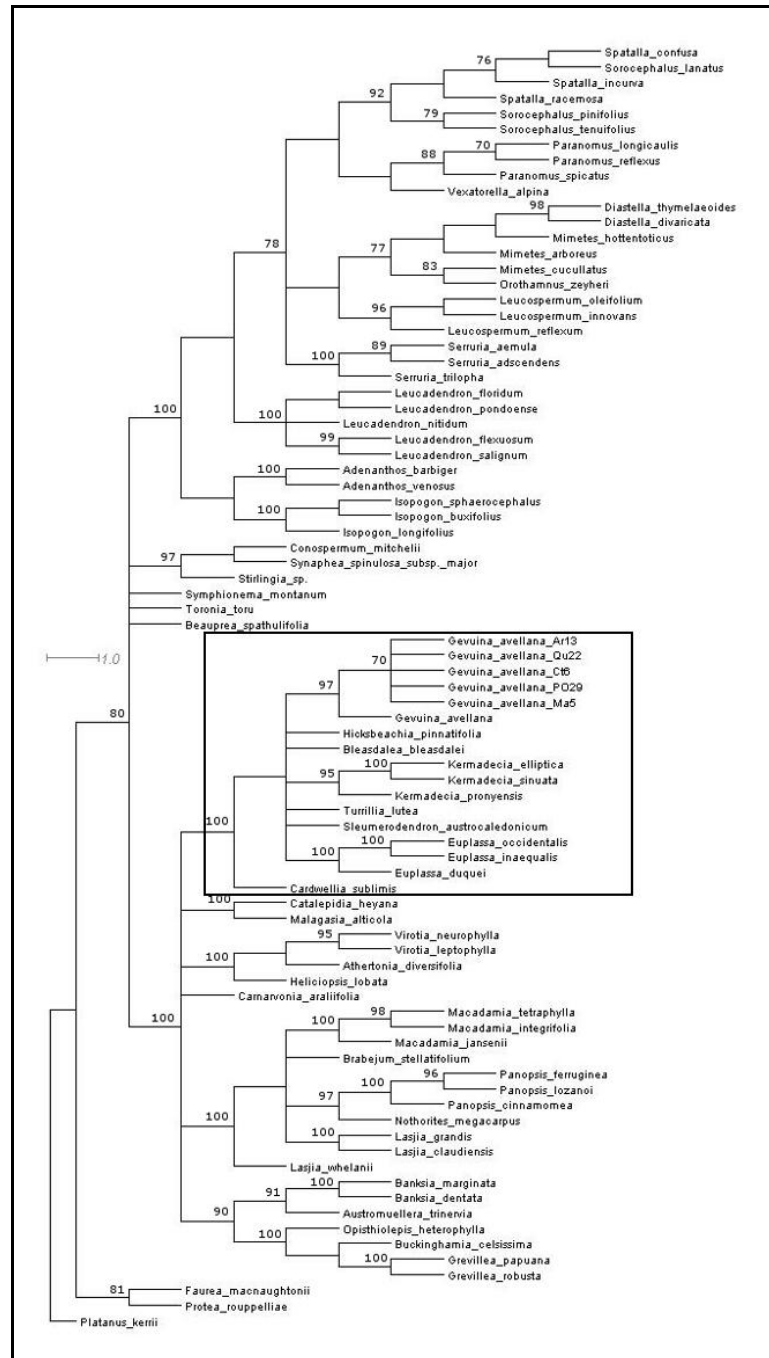
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima parsimonia, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 25 para la apertura de un *gap* y 10 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



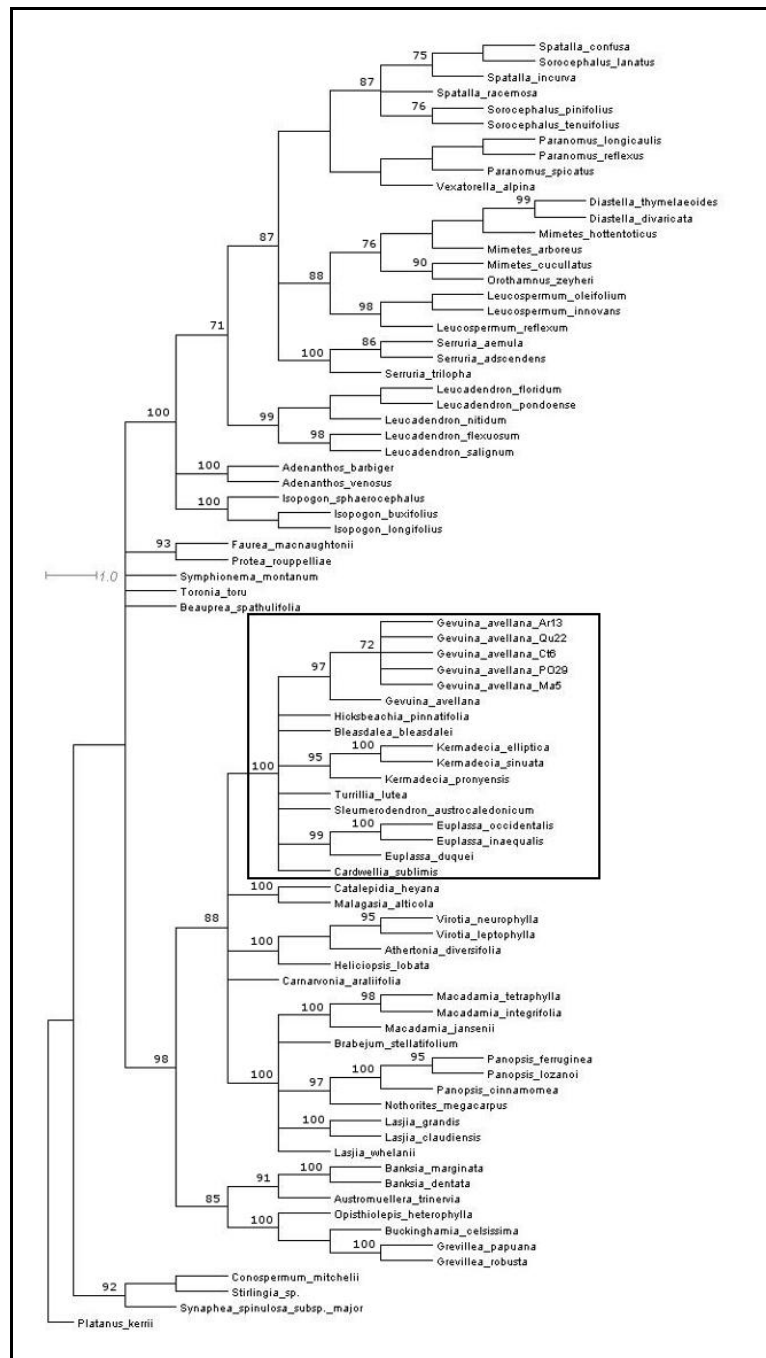
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima parsimonia, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 40 para la apertura de un *gap* y 15 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



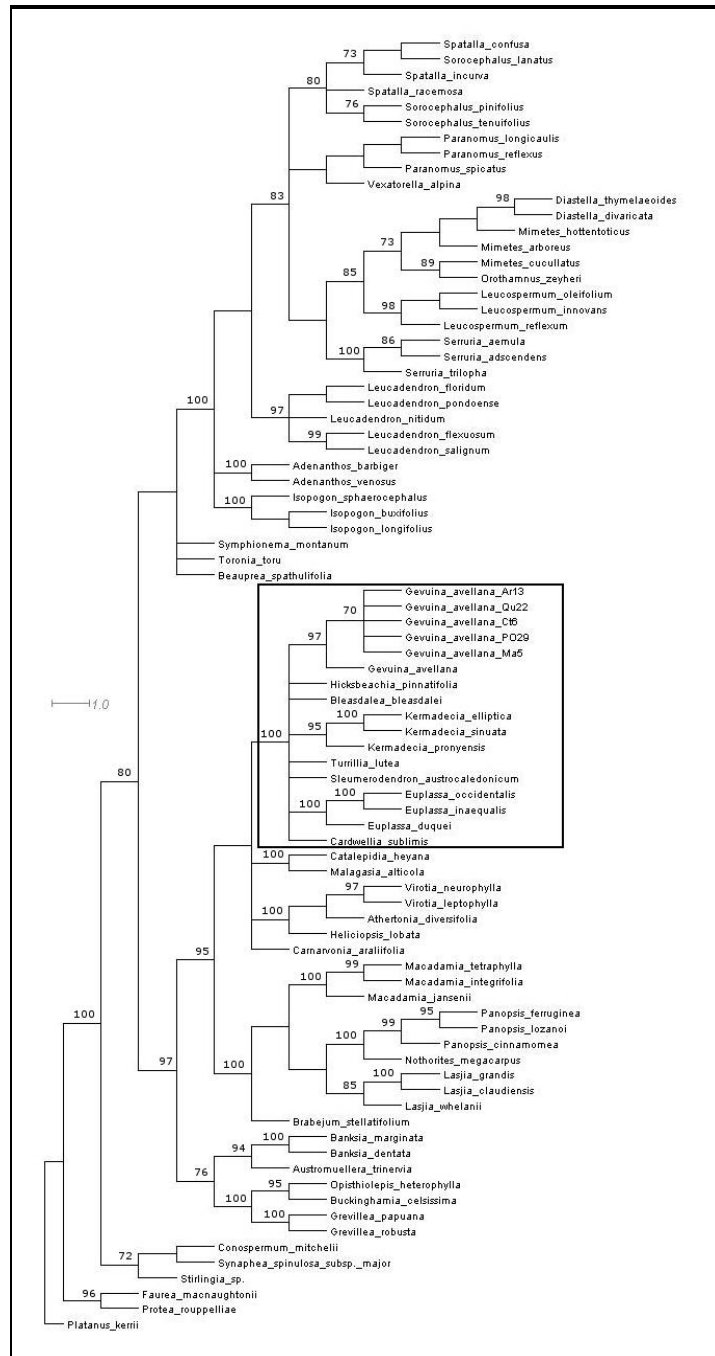
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima verosimilitud, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 10 para la apertura de un *gap* y 5 para su extensión. Se resalta la subtribu Geuininae.



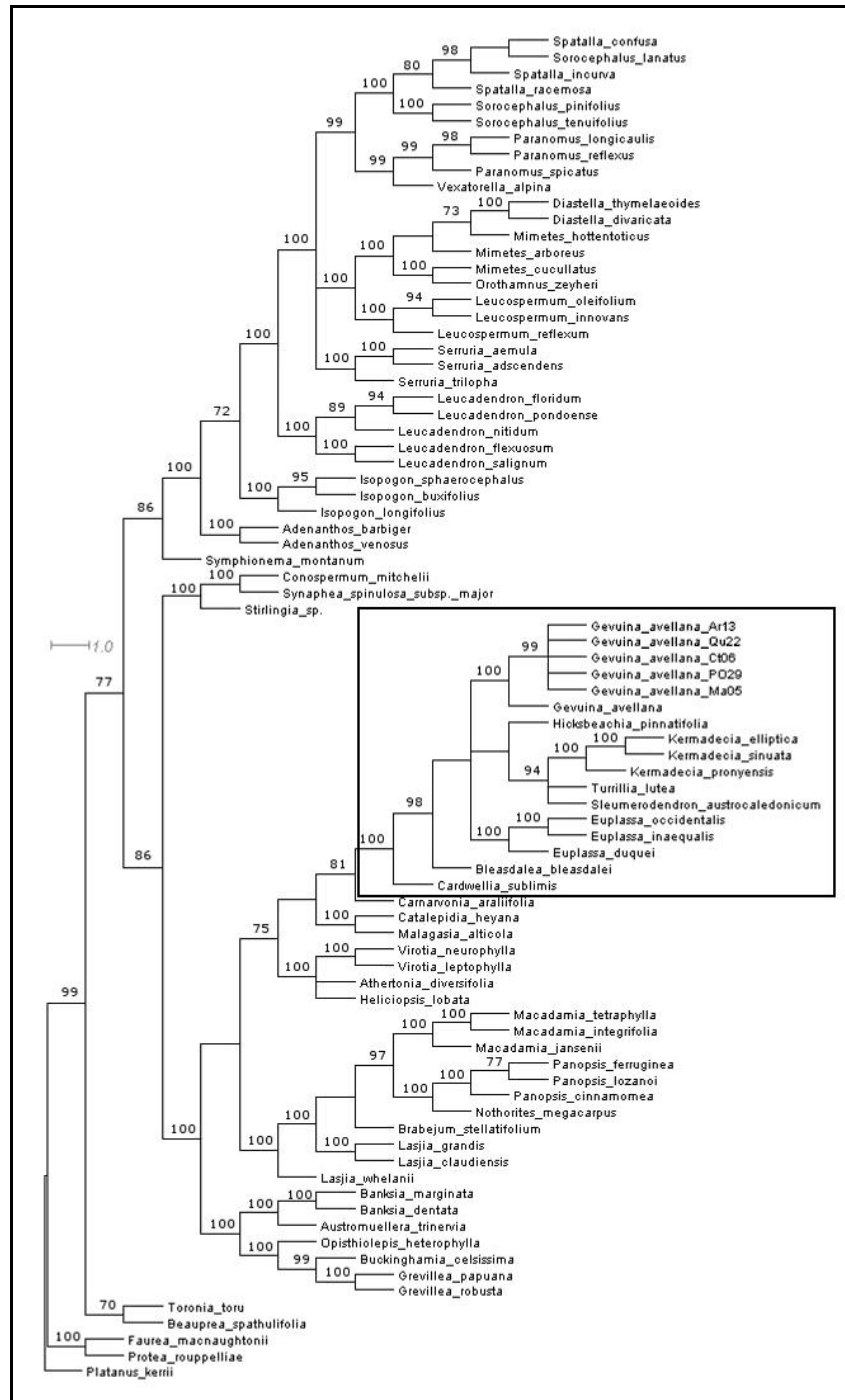
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima verosimilitud, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 15 para la apertura de un *gap* y 6,66 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



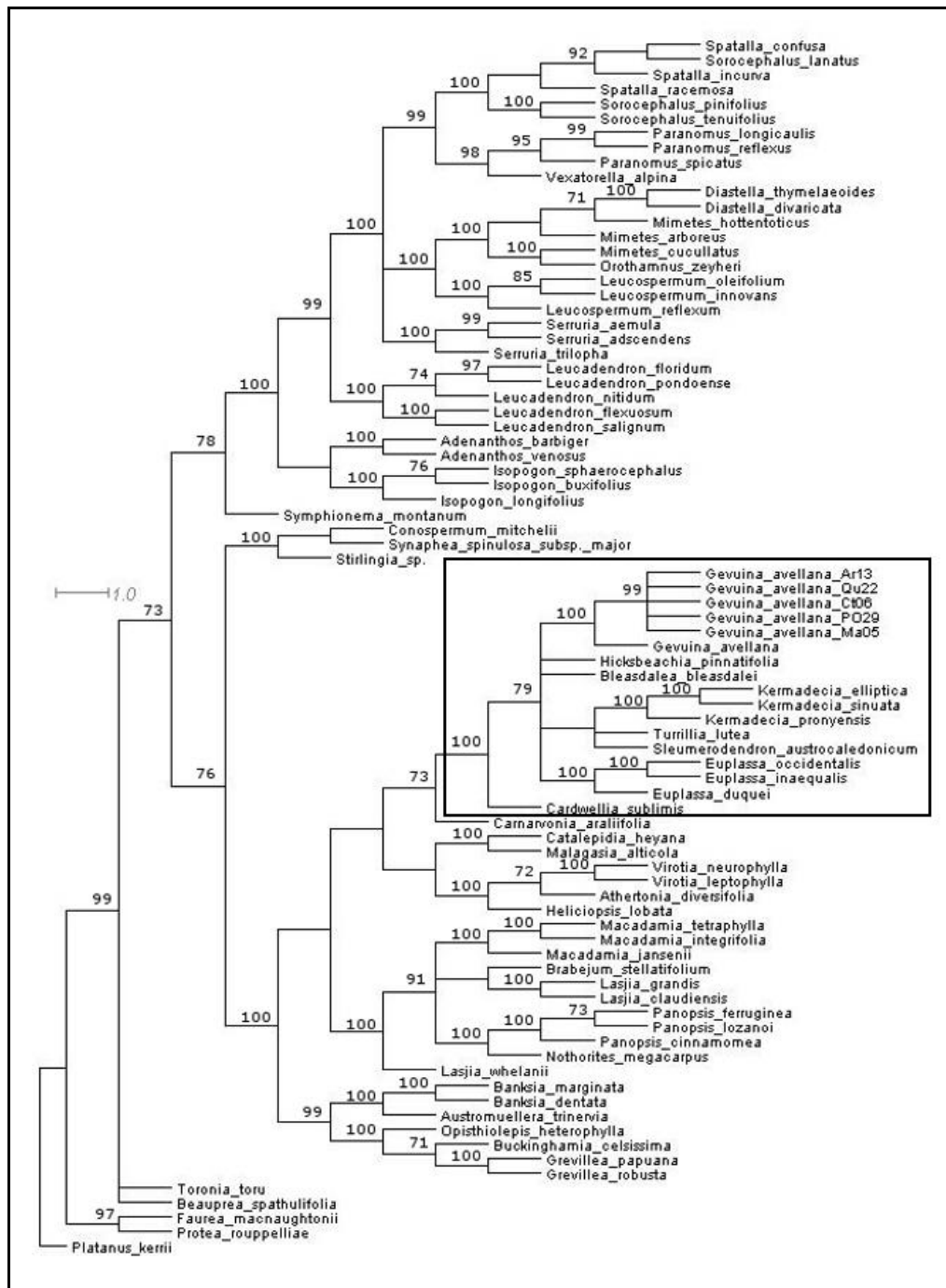
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima verosimilitud, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 25 para la apertura de un *gap* y 10 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



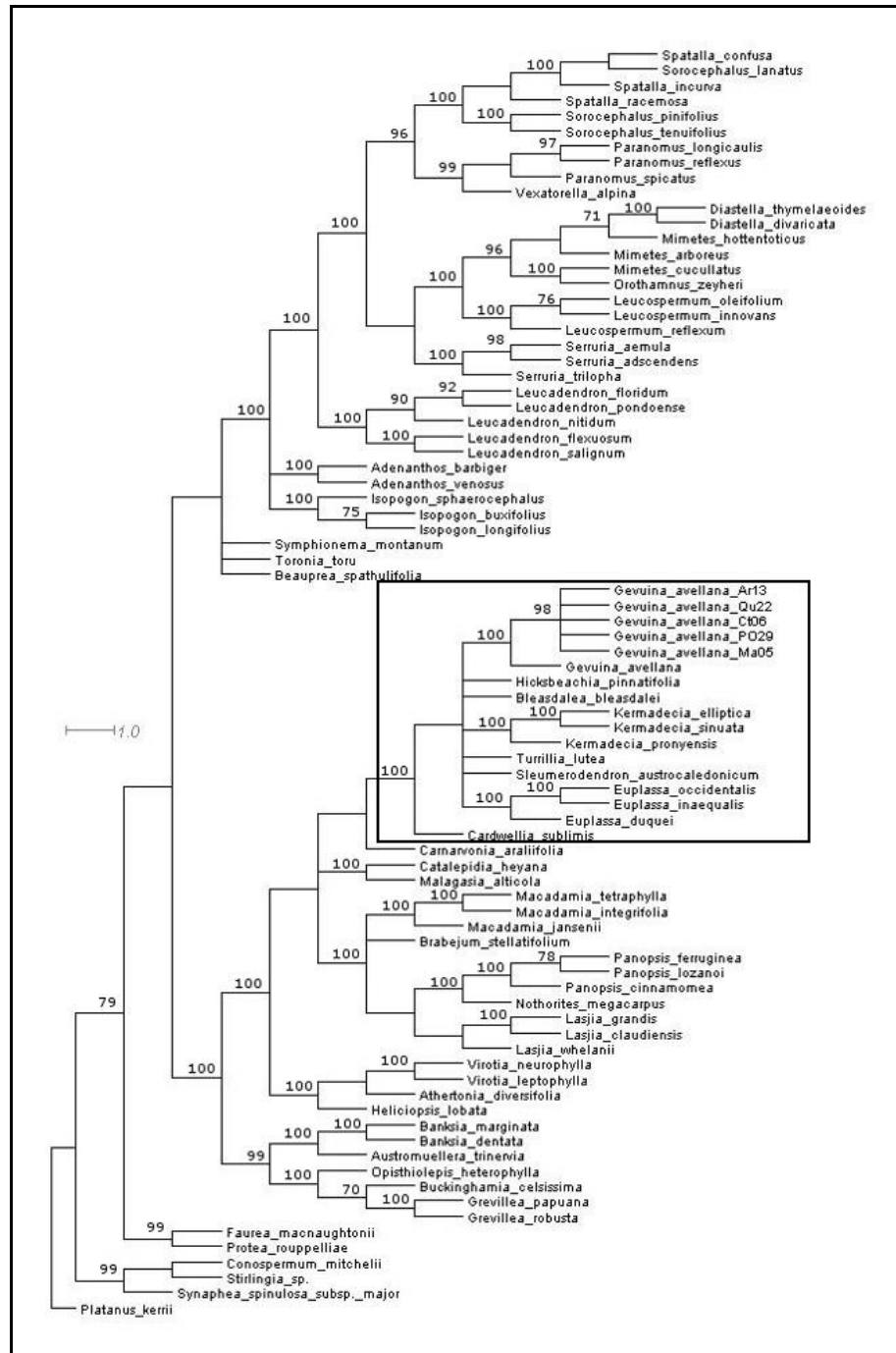
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de máxima verosimilitud, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 40 para la apertura de un *gap* y 15 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



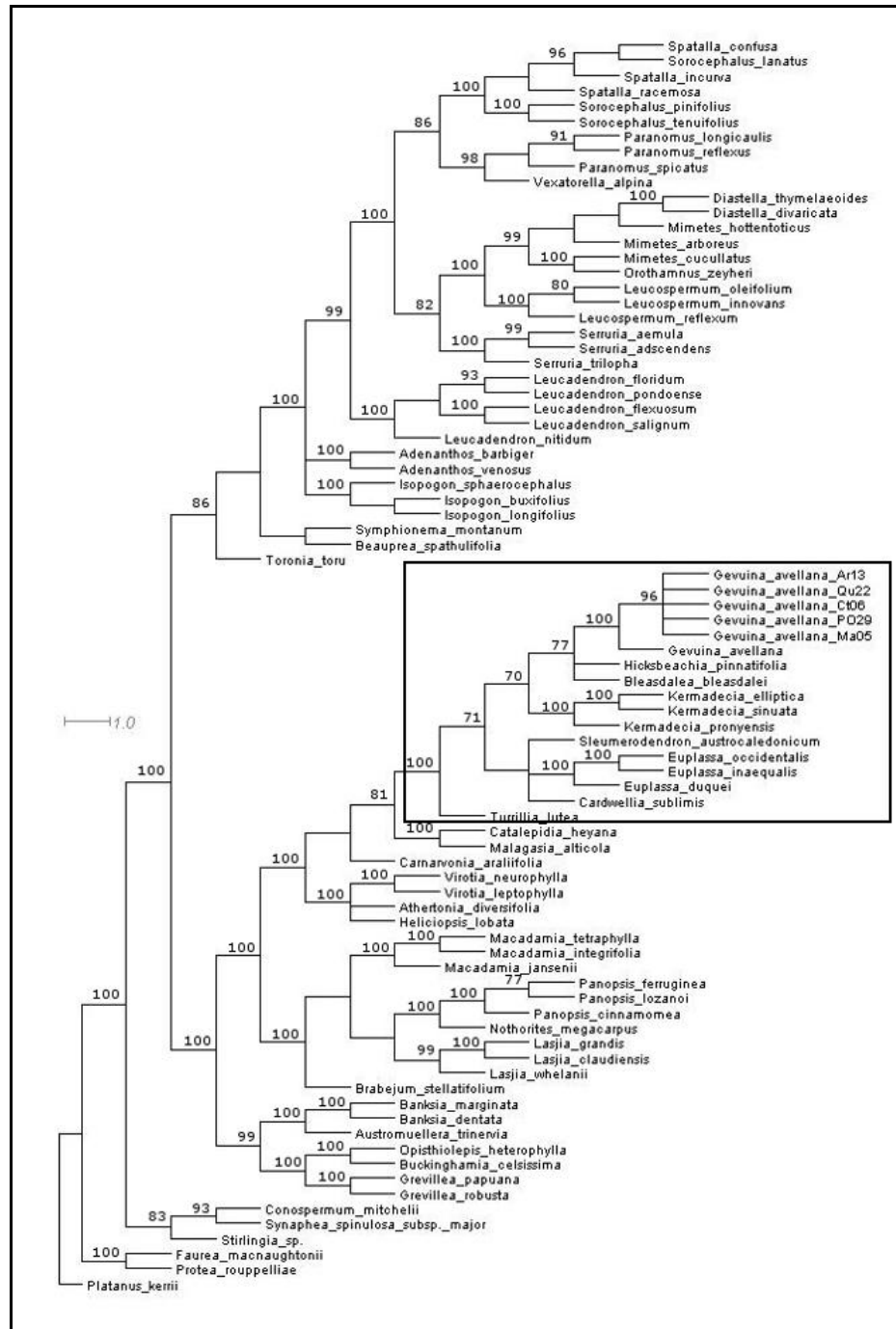
Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de análisis bayesiano, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 10 para la apertura de un gap y 5 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de análisis bayesiano, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 15 para la apertura de un *gap* y 6,66 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuinae.



Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de análisis bayesiano, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 25 para la apertura de un *gap* y 10 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.



Filograma de la familia Proteaceae inferido por el método de análisis bayesiano, usando secuencias ITS y empleando un alineamiento con penalidad de 40 para la apertura de un *gap* y 15 para su extensión. Se resalta la subtribu Gevuininae.