



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

**Dr. Ricardo Riegel Schlegel**

Instituto de Producción y

Sanidad Vegetal

Facultad de Ciencias Agrarias

**DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMO E IDENTIFICACIÓN  
DE HAPLOTIPOS EN *Gevuina avellana* Y *Embothrium coccineum*  
(MAGNOLIÓPSIDA: PROTEACEAE), ESPECIES NATIVAS DE  
CHILE, UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES EN  
cpDNA**

Tesis de Grado presentada como parte de  
los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**PAULINA VALERIA FERRADA ERNST**

**Valdivia – CHILE**

**2011**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia especialmente a mis padres, por la preocupación y el apoyo que he recibido de ellos en diversos ámbitos, lo cual ha sido fundamental en estos años de estudio. A Rodrigo, que desde hace varios años ha estado junto a mí, quien ha sido un pilar importante en mi vida y una gran compañía.

Al Dr. Ricardo Riegel S., de la Universidad Austral de Chile, por permitirme desarrollar este trabajo dentro de su grupo de investigación y por apoyarme e instarme siempre a seguir adelante.

Al Dr. José Nuñez N., por formar parte de la comisión evaluadora y por sus consejos, ayuda y disponibilidad durante el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Alejandra Zúñiga F., por aceptar formar parte de la comisión de mi tesis y por facilitar material vegetal para el desarrollo de la misma.

Además quiero agradecer a mis compañeros e integrantes del laboratorio por su buena disposición y generosidad con sus conocimientos cuando era necesario. A Manuel Ortiz por su asistencia en el desarrollo de una parte del trabajo y a Karin Hoffens por la guía inicial en el laboratorio.

También un agradecimiento muy especial a todos mis amigos y amigas que he conocido en Valdivia, ya que junto a ellos he compartido grandes alegrías como también nos hemos apoyado en las dificultades. Un cariño muy especial a cada uno de ellos, así como también a mis amigas de Temuco.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1060192 en conjunto con el proyecto FONDECYT de Iniciación 11080162.

## INDICE GENERAL

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>1.1 SUMMARY</b> .....	2
<b>2. INTRODUCCION</b> .....	3
<b>2.1 ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES</b> .....	3
<b>2.2 GENOMA DEL CLOROPLASTO</b> .....	7
<b>2.3 DIVERSIDAD GENETICA</b> .....	10
<b>2.3.1 DIVERSIDAD EN EL GENOMA DEL CLOROPLASTO</b> .....	11
<b>2.4 MARCADORES MOLECULARES</b> .....	13
<b>2.5 TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA</b> .....	14
<b>2.5.1 TÉCNICAS DE ESTUDIO</b> .....	16
<b>2.6 UTILIDAD PARA LA CONSEVACIÓN</b> .....	19
<b>2.7 HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	20
<b>2.8 OBJETIVO GENERAL</b> .....	20
<b>2.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	20
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b> .....	21
<b>3.1 MATERIALES</b> .....	21
<b>3.1.1 REACTIVOS QUÍMICOS</b> .....	21
<b>3.1.2 EQUIPOS UTILIZADOS</b> .....	21
<b>3.1.3 SOFTWARES UTILIZADOS</b> .....	22
<b>3.2 MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.2.1 MUESTRAS</b> .....	23

3.2.2	EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.....	27
3.2.3	DISEÑO Y SELECCIÓN DE PARTIDORES.....	28
3.2.4	ESTANDARIZACIÓN DE LAS AMPLIFICACIONES EN NOTROS Y AVELLANOS.....	28
3.2.5	SECUENCIACIÓN.....	29
3.2.6	TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN NOTROS Y AVELLANOS.....	31
3.2.6.1	AMPLIFICACIÓN POR PCR DE FRAGMENTOS DE cpDNA.....	31
3.2.6.2	ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	33
3.2.6.3	GENOTIPIFICACIÓN.....	33
3.2.6.4	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE UN PRODUCTO DE PCR.....	34
4.	RESULTADOS.....	36
4.1	DISEÑO Y SELECCIÓN DE PARTIDORES.....	36
4.2	IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE INTERÉS.....	36
4.3.	TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS.....	43
4.3.1	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE cpDNA DE NOTROS.....	43
4.3.2	GENOTIPIFICACIÓN.....	47
4.3.3	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN.....	51
4.3.4	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE cpDNA DE AVELLANOS.....	55
4.4	IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE NOTROS MEDIANTE LA RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS.....	58

<b>4.5 IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE AVELLANOS MEDIANTE</b>	
<b>LA RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS.....</b>	<b>58</b>
<b>4.6 RELACIÓN ENTRE LOS HAPLOTIPOS Y SU DISTRIBUCIÓN</b>	
<b>GEOGRÁFICA.....</b>	<b>61</b>
<b>4.6.1 MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE POBLACIONES Y HAPLOTIPOS</b>	
<b>DE <i>Embothrium coccineum</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>4.6.2 MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE POBLACIONES Y HAPLOTIPOS</b>	
<b>DE <i>Gevuina avellana</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>5 DISCUSION.....</b>	<b>68</b>
<b>5.1 CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>78</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>92</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización del genoma del cloroplasto de <i>Oryza sativa</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Área de distribución y localizaciones geográficas en Chile de las poblaciones de A) <i>Embothrium coccineum</i> y B) <i>Gevuina avellana</i> estudiadas.....	24
<b>Figura 3.</b> Fragmento del alineamiento múltiple de las secuencias de distintos notros amplificados utilizando los partidores trnH-f/psbA-r.....	39
<b>Figura 4.</b> Fragmento del alineamiento múltiple de las secuencias de distintos notros amplificados utilizando los partidores psbKf-GA/ trnS0r.....	40
<b>Figura 5.</b> Fragmento del alineamiento múltiple de las secuencias de distintos avellanos amplificados utilizando los partidores trnH-f/psbA-r.....	41
<b>Figura 6.</b> Fragmento del alineamiento múltiple de las secuencias de distintos avellanos amplificados utilizando los partidores psbKf-GA/ trnS0r.....	42
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% de los fragmentos de amplificación de notros utilizando los partidores trH-f/psbA-r.....	45
<b>Figura 8.</b> Secuencia de un fragmento polimórfico de la región intergénica psbK-trnS de cpDNA de notro y los partidores diseñados para su amplificación. ....	48
<b>Figura 9.</b> Ejemplo muestras del mismo tamaño analizadas con el equipo ABI Prism 310.....	49
Figura 10. Análisis de restricción.....	52
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% de los fragmentos de amplificación de avellanos utilizando los partidores ccmp2-F/ccmp2-R.....	56
<b>Figura 12.</b> Haplotipos y localización de las poblaciones de notros analizadas.....	62

**Figura13.** Haplotipos y localización de las poblaciones de avellanos analizadas.....65

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Interacción de las fuerzas evolutivas.....	12
<b>Tabla II.</b> Características y aplicación de los marcadores genéticos.....	18
<b>Tabla III.</b> Ubicación geográfica y número de individuos de las poblaciones de <i>Embothrium coccineum</i> estudiadas.....	25
<b>Tabla IV.</b> Ubicación geográfica y número de individuos de las poblaciones de <i>Gevuina avellana</i> estudiadas.....	26
<b>Tabla V.</b> Individuos de ambas especies en los cuales se realizó amplificación y secuenciación... .....	30
<b>Tabla VI.</b> Protocolos de la concentración de los reactivos para los distintos partidores utilizados.....	32
<b>Tabla VII.</b> Partidores utilizados para la amplificación de fragmentos de cpDNA dentro de las regiones intergénicas trnH-psbA y psbK-trnS.....	37
<b>Tabla VIII.</b> Técnicas utilizadas para la identificación de los polimorfismos en cada especie.....	44
<b>Tabla IX.</b> Tipo de polimorfismo en notro asociado a cada individuo en los fragmentos amplificados con los partidores trhH-f/psbA-r.....	46
<b>Tabla X.</b> Tipo de polimorfismo asociado a cada individuo de notro en la detección mediante genotipificación.....	50
<b>Tabla XI.</b> Tipo de polimorfismo en avellanos asociado a cada individuo en el análisis de restricción.....	54
<b>Tabla XII.</b> Tipo de polimorfismo en avellanos asociado a cada individuo en los fragmentos amplificados con los partidores ccmp2-F/ccmp2-R.....	57



<b>Tabla XIII.</b> Identificación de los haplotipos en notros mediante la relación de los polimorfismos encontrados.....	59
<b>Tabla XIV.</b> Identificación de los haplotipos en avellanos mediante la relación de los polimorfismos encontrados.....	60
<b>Tabla XV.</b> Frecuencia de los haplotipos presentes en las distintas poblaciones de notros.....	63
<b>Tabla XVI.</b> Frecuencia de los haplotipos presentes en las distintas poblaciones de notros.....	66

**ABREVIATURAS**

<b>AFLP</b>	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<b>DAP</b>	Distancia a la altura del pecho
<b>EDTA</b>	Acido etiléndiamino tetraacético
<b>EST</b>	Marcador de secuencia expresada
<b>ITS</b>	Espaciador de transcripción interno de DNAr
<b>LGM</b>	Last Glacial Maximum (Último Máximo Glaciar)
<b>LSC</b>	Región de copia única larga
<b>Msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reacción de la polimerasa en cadena
<b>PET</b>	Fluorocromo rojo
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone
<b>RAPD</b>	Polimorfismo del DNA amplificado al azar
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción
<b>SSC</b>	Región de copia única corta
<b>SSR</b>	Secuencias simples repetidas
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIC</b>	Fluorocromo verde

## 1. RESUMEN

En Chile, *Gevuina avellana* y *Embothrium coccineum* son especies endémicas de los bosques costeros templados lluviosos y comparten gran parte de su área de distribución.

Mediante la amplificación de regiones polimórficas del genoma del cloroplasto en individuos de distintas poblaciones en ambas especies y la identificación de algunos polimorfismos de interés, se pudieron relacionar en haplotipos, asociándolos a su distribución geográfica. Para la identificación de los polimorfismos, primero fue necesario realizar un alineamiento múltiple entre especies relacionadas en regiones en las cuales se tenía antecedentes de ser polimórficas. Luego se determinaron y diseñaron los partidores más adecuados para la amplificación de las regiones polimórficas en las especies de interés. Se utilizaron distintas técnicas para la identificación de polimorfismos, como: Secuenciación, PCR seguido de electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, PCR con posterior genotipificación y PCR con análisis de restricción.

En *Embothrium coccineum*, el análisis de dos regiones polimórficas dentro de los fragmentos amplificados permitieron la identificación de cuatro haplotipos. En *Gevuina avellana*, tres regiones polimórficas dentro de los fragmentos amplificados permitieron la identificación de cuatro haplotipos.

Debido a la distribución de los haplotipos en *Embothrium coccineum*, se plantea a Loncoche y Coyhaique como posibles refugios durante el Último máximo glacial. Además hay un predominio del haplotipo III en la región de los Andes y del haplotipo I en la región de la Costa. En las poblaciones de *Gevuina avellana* estudiadas, se observa que la mayor diversidad se encuentra en la zona norte de su área de distribución entre los 35°S y 36°S, siendo la población Los Queules la que presenta la mayor diversidad intraespecífica.

## 1.1.SUMMARY

In Chile, *Gevuina avellana* and *Embothrium coccineum* are endemic species of coastal temperate rain forests and share much of their range of distribution.

By amplifying chloroplast genome's polymorphic regions in individuals of diverse populations of both species and identifying some polymorphisms of interest, we were able to relate them in haplotypes, associating them with the geographical distribution. For the identification of polymorphisms, first it was necessary to carry out a multiple alignment among related species in regions which had a history of being polymorphic. Then the most appropriate primers for the amplification of polymorphic regions were determined and designed in the species of interest. Different techniques were used for the identification of polymorphisms, like: Sequencing, PCR followed by agarose gel electrophoresis in 2.5%, PCR with subsequent genotyping and PCR with restriction analysis.

In *Embothrium coccineum*, the analysis of two polymorphic regions within the amplified fragments allowed for the identification of four haplotypes. In *Gevuina avellana*, three polymorphic regions within the amplified fragments allowed for the identification of four haplotypes.

Because of the distribution of haplotypes in *Embothrium coccineum*, is proposed to Loncoche and Coyhaique as potential refugia during the Last Glacial Maximum. Also there is predominance of haplotype III in Andes region, and of haplotype I in Coastal range. In the studied populations of *Gevuina avellana*, is observed that the greatest diversity is in the north of its range between 35°S and 36°S, being Los Queules population which has greater intraspecific diversity.

## 2. INTRODUCCION

### 2.1. ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES

*Embothrium coccineum* y *Gevuina avellana* pertenecen a la división de las Magnoliophytas, la cual constituye el grupo más importante y diverso de plantas con semillas y el último en aparecer en la escala evolutiva. Son las plantas que presentan mayor complejidad en sus órganos vegetativos y reproductores, y su carácter más llamativo es la presencia de flores.

A esta división, pertenece la clase Magnoliópsida, la que posee aproximadamente 170.000 especies que abarcan aproximadamente el 75% de la biodiversidad conocida en el grupo (Izco, 1997; Strasburger, 1994). Junto a las gimnospermas condicionan la fisonomía de la mayor parte de las formaciones vegetales terrestres. La mayor parte de las plantas cultivadas o de interés para el hombre se incluyen entre las dicotiledóneas (Izco, 1997).

Dentro de ésta clase se encuentra el orden Proteales que se caracteriza por tener perigonio sencillo, pero vivamente coloreado y cuadripartido, cuatro estambres superpuestos al mismo y pistilos monocarpelares (Strasburger, 1994). Dentro del orden mencionado está la familia Proteaceae, a la cual pertenecen las especies *Embothrium coccineum* y *Gevuina avellana*.

*Gevuina avellana* es una planta endémica de los bosques costeros templados lluviosos, perteneciente a un género monoespecífico de la familia Proteaceae, se distribuye en Chile entre los 35° y los 45°S y desde el nivel del mar hasta los 700m de altitud. Su límite septentrional aproximado está constituido por los ríos Teno en la Cordillera de los Andes y Mataquito en la Cordillera de la Costa (VII región), llegando por el sur hasta las islas Guaitecas (XI región) (Donoso *et al.*, 2004).

El avellano, como se denomina a la especie *Gevuina avellana*, puede medir hasta 20 metros de altura, posee una copa globosa y muy ramificada cuando crece aislado (Rodríguez, 1983). En su hábitat natural las plantas pueden desarrollar una rápida velocidad de crecimiento y una gran estructura vegetativa con diámetros de tronco de 60 a 90 cm (Donoso *et al.*, 2004).

Esta especie, posee hojas perennes, flores hermafroditas asimétricas, cuatro tépalos libres color blanco-cremoso y rojizos en la base y cuatro estambres insertos en la concavidad de cada uno de los tépalos. El periodo de floración es entre Enero y Mayo. El avellano, posee como fruto una nuez de 1,5-2cm. de diámetro, color verde, rojo o negro violáceo según el grado de madurez. Su semilla es redonda, color café rojiza, que mide de 1-1,4cm. de diámetro (Rodríguez, 1983). Al ser la semilla del avellano pesada y carnosa, ocurre diseminación por gravedad, y tienden a acumularse en pequeñas hondonadas a lo largo de la pendiente desarrollándose grupos de árboles en esos puntos. También ocurre diseminación por pequeños mamíferos consumidores de semillas (Donoso, 1993).

La mayor presencia y variabilidad de esta especie se encuentra asociada a los bosques siempreverde de Chile (Donoso *et al.*, 2004). Se desarrolla en condiciones variadas de suelo, luz y competencia. Generalmente crece entremezclada con otras especies del bosque húmedo. No forma bosques puros, aunque a veces se le encuentra formando pequeños grupos aislados (Rodríguez, 1983). Es común encontrarla formando parte de los doseles intermedios o inferiores de distintos tipos de bosques, pudiendo establecerse como colonizadora a plena luz. En áreas taladas o alteradas, ésta especie crece rápidamente desde los tocones, pudiendo llegar a constituir una especie dominante. *Gevuina avellana* se puede definir como una especie con plasticidad genética en cuanto a las condiciones del medio ambiente en que crece, lo cual le permite asociarse a diferentes especies. Como prueba de esto, la especie prospera en sectores donde

predominan condiciones de menor pluviometría anual (700mm) y veranos secos con temperaturas estivales máximas de 31°C, hasta zonas con climas con fuerte influencia marítima, abundantes precipitaciones durante todo el año y temperaturas máximas medias de 19°C en verano.

Es una especie nativa ornamental y sus nueces tienen excelentes características frutícolas, nutricionales y farmacológicas, teniendo las plantas grandes posibilidades madereras, ornamentales, paisajistas y productos derivados de la actividad melífera (Donoso *et al.*, 2004).

*Embothrium coccineum* es una especie endémica, representada por árboles y arbustos, de los bosques costeros templados lluviosos o bosques subantárticos de Chile y Argentina (Donoso *et al.*, 2004; Chalcoff *et al.*, 2008). En Chile está presente entre los 35° y los 56°S (Donoso *et al.*, 2004), desde la VII a la XII región (Rodríguez, 1983), pero es especialmente abundante desde el sur de Valdivia hasta Aysén. Crece en biotipos de diversa distribución altitudinal, que van desde el nivel del mar, a las mayores altitudes de la vegetación en la Cordillera de los Andes (Donoso *et al.*, 2004).

*Embothrium coccineum*, denominada notro, puede medir hasta 10 metros de altura, posee una copa irregular, su tronco es recto y de hasta 50 cm de diámetro (Rodríguez, 1983), aunque en óptimas condiciones esta especie puede llegar a crecer más de 15m de altura y tener un metro de diámetro de fuste (Donoso *et al.*, 2004). Las hojas son perennes y de forma variable, además presenta un gran número de flores hermafroditas rojas y se encuentran en grupos de 20-50 por inflorescencia. Las flores tubulares son protándricas con cuatro estambres amarillos totalmente fundidos a los cuatro tépalos rojos, los cuales están libres en casi todo el largo de la corola (Rodríguez, 1983). Posee como fruto un folículo oblongo y liso, y numerosas semillas aladas de color café (Rodríguez, 1983), las que giran en el aire permitiendo una caída lenta a bastante distancia del árbol (Donoso, 1993). El periodo de floración es entre los meses de primavera y

principios de verano, y los frutos maduran en los meses de marzo a abril (Rodríguez, 1983). Pájaros y algunos insectos actúan como polinizadores (Smith-Ramirez y Armesto, 2003; Souto y Premoli, 2007).

Es una especie de rápido crecimiento, se desarrolla en suelos húmedos, arenosos y livianos (Rodríguez, 1983). El notro crece sin formar bosques puros ni tampoco grupos aislados (Donoso *et al.*, 2004; Mathiasen *et al.*, 2006; Donoso, 1993). Actúa agresivamente como colonizadora de áreas denudadas por eventos catastróficos, donde crece rápidamente a partir de semillas o tocones, formando renovales densos y permitiendo el ingreso de otras especies bajo su protección, luego su tasa de crecimiento disminuye cuando se ve sobrepasada por las demás especies.

El notro posee una alta capacidad de regeneración en los hábitats más fríos, adapta sus órganos y tejidos a las bajas temperaturas en invierno, lo cual está asociado a su carácter de especie siempreverde facultativa (tropófito), que permite perder sus hojas ante episodios de frío o sequía, pudiendo renovarlas una vez establecidas las condiciones favorables (Donoso *et al.*, 2004), lo que demuestra su gran plasticidad semidecidua, lo que además le permite extender sus rasgos de distribución hacia climas más polares o a las mayores elevaciones de la cordillera (Donoso, 1993). Esta característica se presenta alrededor de los cinco años (Donoso *et al.*, 2004). El notro tiene una mayor resistencia al frío en estado de plántula, lo cual es importante por su amplia distribución hasta los 56° de latitud sur, donde hay temperaturas muy bajas, lo que asegura la sobrevivencia en ese estado, edad en la que no se presenta la calidad de tropófito (Donoso, 1993). Hacia los límites de la vegetación arbórea, el notro crece en forma achaparrada y por lo general no pierde las hojas, en este caso la protección contra el frío es lograda por la baja altura que alcanza la planta, lo que permite que las yemas y hojas queden cubiertas por nieve en los



periodos más fríos, en estos casos, la plasticidad es por crecimiento en altura (Rodríguez, 1983).

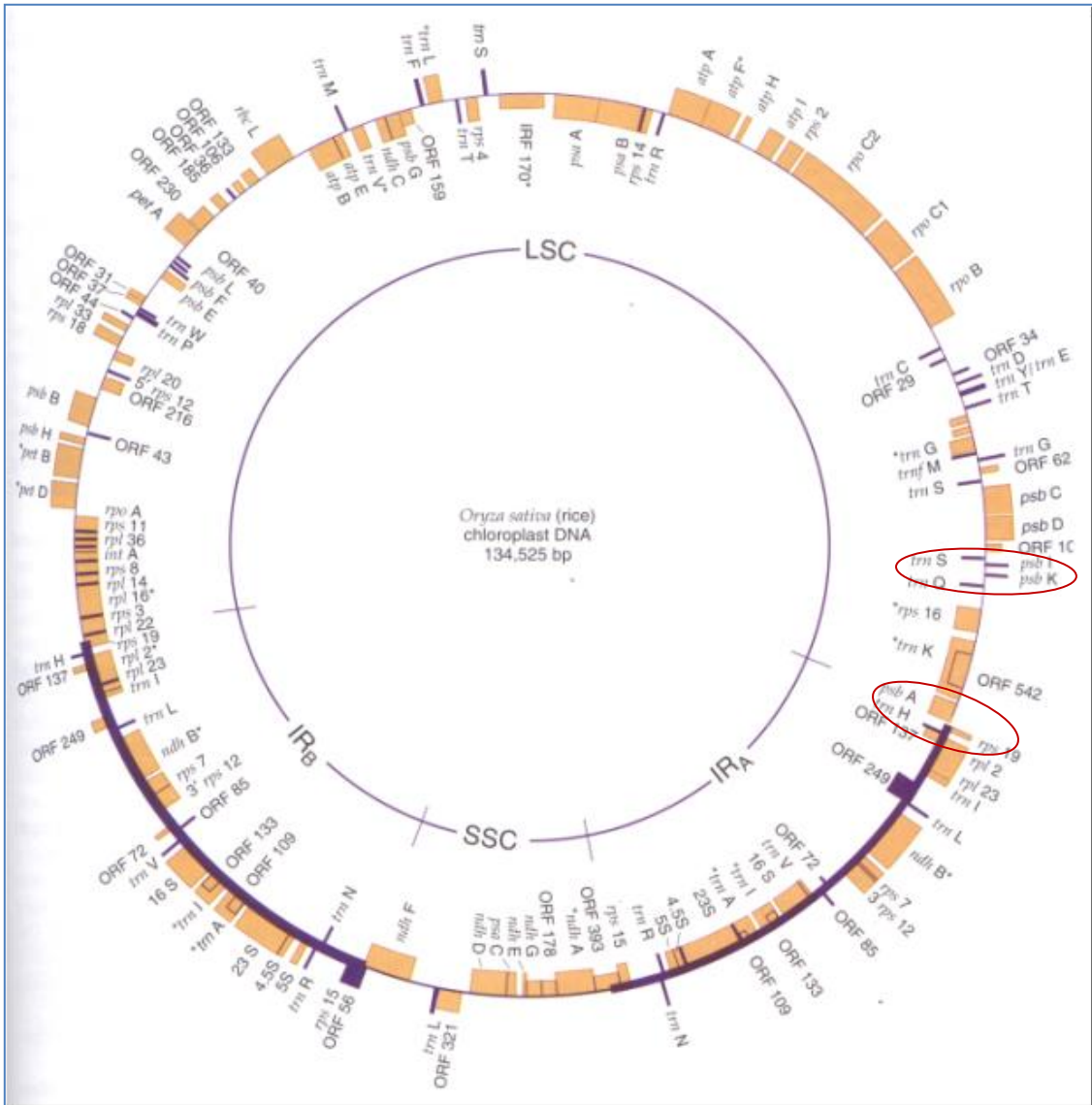
El notro tiene importancia como especie ornamental por sus flores de color rojo y su madera es utilizada en tornería para confeccionar artículos de adornos (Donoso, 1993).

## **2.2. GENOMA DEL CLOROPLASTO**

El genoma del cloroplasto (cpDNA) es circular y de doble hebra, varía en tamaño desde 120 a 220 Kb en plantas superiores. El cpDNA contiene múltiples copias (entre 20 y 40) dentro de la estructura organelar, conocidas como nucleoides, y está presente con frecuencia como complejos multiméricos, por lo que el número de copias de estos genomas por célula puede ser muy alto (Robert, 1991).

Solo con algunas excepciones, el cpDNA está dividido en dos regiones de copia única; la región de copia única larga (LSC) y la región de copia única corta (SSC), las que están separadas por una repetición invertida. Las regiones repetidas invertidas pueden tener un tamaño variable de 12 a 25Kb cada una (Hansen *et al.*, 2007). La región LSC es ligeramente menos conservada en su secuencia que el resto del genoma del cloroplasto (Robert, 1991), por lo cual es potencialmente más útil para estudios taxonómicos (Grivet *et al.*, 2001). Lo descrito anteriormente se muestra en la Figura 1.

Muchos genes del cpDNA se encuentran interrumpidos por intrones, los cuales son conservados en estructura secundaria, proveyendo una base para su clasificación. Estos son comunes en genes del cpDNA en algas, y han sido encontrados en algunos genes del tRNA en algunas cianobacterias, por lo cual se asume que tienen un origen antiguo (Robert, 1991).



**Figura 1. Organización del genoma del cloroplasto de *Oryza sativa*.** Esquema del genoma del cloroplasto del arroz, el cual se encuentra completamente secuenciado, donde se muestran sus distintas regiones y respectivas disposiciones. Además se destacan en círculos las regiones intergénicas trnH-psbA y psbK-trnS analizadas en este estudio.

En el curso de la evolución, muchas de las funciones de los genes que son esenciales para la fotosíntesis se piensan que han sido transferidas desde el genoma del cloroplasto al nuclear. El genoma del cloroplasto contiene genes específicos de las funciones que lleva a cabo el propio organelo, sin embargo, la mayoría de las funciones biológicas que ocurren en el interior del cloroplasto están especificadas por genes del genoma nuclear. En ningún caso se observa solapamiento con el genoma nuclear en lo que se refiere a contenido de genes.

El proceso de transferencia se desaceleró marcadamente antes del origen de las plantas terrestres, debido a que el genoma del cloroplasto de éstas es relativamente conservado tanto en el contenido como en la organización de los genes. Los genes del cloroplasto, evolucionan lentamente en comparación con los genes nucleares y no están sujetos a recombinación (Griffiths, 2000) debido a la herencia uniparental y la segregación vegetativa (Robert, 1991).

El cpDNA codifica todas las especies de RNAr y RNAt necesarias para la síntesis de proteínas, en total codifica unas 50 proteínas. Sus genes se transcriben y traducen con su propia maquinaria. La mayoría de los productos del cloroplasto forman parte de las membranas tilacoides o están relacionadas con reacciones redox. Existen 45 genes que codifican RNA, 27 que codifican proteínas relacionadas con la expresión génica, 18 que codifican proteínas de la membrana tilacoide y otros 10 con funciones relacionadas con la transferencia de electrones y siguen sin estar identificados los productos de algunas de los 30 marcos de lectura abiertos (Lewin, 2001).

En general los genomas de los cloroplastos de las angiospermas son altamente conservados en su organización y en el contenido y orden de los genes, encontrándose en la mayoría de las angiospermas 120- 130 genes en el mismo orden y orientación que la planta del tabaco (Hansen et al., 2007), cuyo genoma plastidial posee la organización del genoma de las angiospermas ancestrales. (Goremykin *et al.*, 2003).

Por el carácter conservativo de los genes del cloroplasto, la homología de secuencia, la estabilidad estructural y los patrones simples de cambio debido a mutaciones, es posible comparar genes a través del reino vegetal y son especialmente adecuados para la construcción de filogenias, especialmente en los niveles macroevolutivos (Robert, 1991).

En las plantas podemos observar herencia citoplasmática, este tipo de herencia se debe a la presencia de genomas de DNA en las mitocondrias y en los cloroplastos, que se heredan de forma independiente de los genes nucleares. El genoma organelar está formado por un segmento de DNA que queda secuestrado en una parte determinada de la célula, por lo que está sujeto a su propia forma de expresión y regulación, teniendo como consecuencia que evolucione según sus características propias. Además como el cloroplasto tiene un sistema de replicación distinto del nuclear, la tasa de error durante la replicación es diferente, por lo que la acumulación de mutaciones es intermedia, menor que la nuclear pero mayor que la mitocondrial (Lewin, 2001).

### **2.3. DIVERSIDAD GENETICA**

La variación genética es esencial para la evolución y está influenciada por la tasa de cambio evolutivo. La cantidad de variabilidad genética en las poblaciones es usualmente medida por la diversidad genética,  $H_d$ , definida como la probabilidad de que dos alelos elegidos al azar de todos los alelos en ese locus en la población sean diferentes (Stearns, 2000). La variación alélica constituye la base de la variación hereditaria (Griffiths, 2000).

Las cantidades relativas de variación, en cada población y entre poblaciones, varían de especie a especie, dependiendo de la historia y del ambiente. La variación genética en el seno de una población y entre distintas poblaciones es el resultado de la interacción de varias fuerzas

evolutivas (Tabla I). Las fuerzas que aumentan o mantienen la variación en una población impiden la diferenciación entre unas poblaciones y otras, mientras que la divergencia de las poblaciones es el resultado de fuerzas que hacen a cada población propensa a la homocigosis (Griffiths, 2000).

Se dice de un gen o un carácter fenotípico que es polimórfico, si hay más de una forma del gen o del carácter en la población (Griffiths, 2000). La coexistencia de múltiples alelos en un locus recibe el nombre de polimorfismo genético. Un alelo es catalogado como polimórfico si está presente en la población con una frecuencia mayor al 1% (Lewin, 2001).

Las principales causas del cambio en la frecuencia de los genes en las poblaciones naturales son: mutación, migración, selección natural, deriva génica y sistema de reproducción (Shorrocks, 1978; Stearns, 2000; Ward *et al.*, 2008).

### **2.3.1. Diversidad en el genoma del cloroplasto**

La variación en el genoma del cloroplasto ocurre principalmente por mutaciones. Una mutación es un cambio hereditario en la secuencia de DNA (Stearns, 2000). Una mutación puntual, es la que recae sobre un único par de bases, y puede deberse a distintos fenómenos como modificaciones químicas en el DNA (cambio de una base por otra) o a disfunciones durante el mecanismo de replicación del DNA (inserción de una base anómala).

Estas mutaciones se dividen en dos grupos según las bases sustituidas, puede ocurrir una transición, donde hay una sustitución entre pirimidinas o entre purinas, o puede ocurrir una transversión, donde hay sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa.

No todas las mutaciones en el DNA llevan a cambios reconocibles en el fenotipo, estas se denominan mutaciones silenciosas (Lewin, 2001).

**Tabla I. Interacción de las fuerzas evolutivas**

<b>Fuerza</b>	<b>Variación dentro de la población</b>	<b>Variación entre Poblaciones</b>
Endogamia o Deriva génica	-	+
Mutación	+	-
Migración	+	-

La Tabla I muestra la forma en la que algunas fuerzas de la evolución aumentan (+) o disminuyen (-) la variación en una población y entre poblaciones (adaptación de tabla 17.8, Griffiths, 2000).

Además ocurren inserciones de fragmentos de material adicional, denominados transposones, este fenómeno ocurre por errores producidos durante la replicación o la recombinación.

La variación intraespecífica en el genoma del cloroplasto ha sido reportada en muchas especies de plantas (Schaal *et al.*, 1998). Hay estudios que han utilizado marcadores moleculares del genoma del cloroplasto para examinar variación genética en robles, pertenecientes a la familia Fagaceae, y sugiere que los haplotipos del cpDNA son compartidos entre especies estrechamente relacionadas y que hay un polimorfismo intraespecífico considerable. Los haplotipos del cpDNA encontrados se correlacionaron con una región geográfica más que con especies en sí (Acosta y Premoli, 2009; Whittmore y Schaal, 1991).

La variación en el genoma del cloroplasto puede ser observada dentro de un área relativamente estrecha, y ofrece una oportunidad para el entendimiento de las diferencias filogenéticas entre poblaciones dentro de la escala geográfica (Honjo *et al.*, 2004). El estudio de la variación intraespecífica del genoma del cloroplasto, nos permite la reconstrucción de la filogenia a nivel poblaciones e inferir rutas de recolonización histórica (Fujii *et al.*, 1997).

#### **2.4. MARCADORES MOLECULARES**

Un marcador molecular se define como un segmento particular del DNA que es representativo de diferencias a nivel del genoma, y puede o no estar relacionado con la expresión fenotípica de un rasgo.

La técnica de los marcadores moleculares juegan un rol esencial hoy en día en el estudio de variabilidad y diversidad genética (Schulman, 2007).

Entre otras aplicaciones la detección y análisis de variaciones genéticas de los organismos, nos

ayudan a entender la base molecular de distintos fenómenos biológicos en plantas como su crecimiento, diferenciación, desarrollo y estado de defensa entre otros (Agarwal *et al.*, 2008).

El genoma de los organelos de las plantas, como es el DNA del cloroplasto (cpDNA) ha sido cada vez más aplicado al estudio de la estructura genética de las poblaciones y al de las relaciones filogenéticas en plantas. Debido a su modo uniparental de transmisión, los cloroplastos exhiben diferentes patrones de diferenciación genética comparada con los alelos nucleares.

El análisis del genoma del cloroplasto provee información de la dinámica de la población de las plantas, la cual es complementaria a la obtenida desde el genoma nuclear (Provan *et al.*, 1999).

Estos marcadores permiten descubrir discontinuidades genéticas y caracteres distintivos dentro o entre los taxones con ligeras diferenciaciones morfológicas, las cuales en algunos casos no son reveladas por marcadores del DNA nuclear, tales como cruces e intercambio genético, enmascarando la evidencia de los patrones demográficos del pasado (Wolfe *et al.*, 1987).

## **2.5. TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA**

Se pueden distinguir dos tipos de variación, la diversidad neutral y la variación adaptativa. La diversidad neutral son los rasgos no determinados por fuerzas selectivas y se estima principalmente por marcadores moleculares, estudiando tanto proteínas como DNA. La variación adaptativa está constituida por los caracteres de valor adaptativo, y para su estudio se hacen ensayos de procedencia/progenie, donde se analiza el grado de variabilidad y el porcentaje de variabilidad que corresponde a variación genética. Los marcadores moleculares dan una estimación de la diversidad genética neutral.

Los datos moleculares constituyen una aproximación adecuada para determinar los procesos que



configuran la estructura genética de una especie, ya que proporcionan información tanto sobre la distribución actual de la diversidad genética neutral y los procesos que actúan sobre ella (flujo genético, deriva, endogamia), como sobre la historia de la población, en particular sobre los patrones geográficos y la importancia del aislamiento histórico (Moritz, 1999, citado en Jiménez y Collada, 2000).

Existen distintos tipos de técnicas, que ofrecen distinto tipo de información según las características de la molécula o fragmento de molécula analizado. Lo más común es detectar diferencias de tamaño y a partir de las frecuencias con que aparece cada una de las distintas variantes (alelos) permiten comparar entre especies y estudios. También es posible establecer relaciones de paternidad y parentesco, relaciones filogenéticas, o analizar qué procesos están ocurriendo en las poblaciones (migración, deriva genética, cuellos de botella, etc.). Los estudios con marcadores resultan relativamente baratos y ofrecen resultados rápidamente.

Los principales marcadores son los basados en el estudio de proteínas, como los análisis isoenzimáticos y el polimorfismo posicional de péptidos, y los basados en el estudio del DNA, los cuales pueden ser utilizando sondas o con amplificación por PCR. Según el tipo de molécula utilizada, los marcadores pueden ser haploides o diploides y dominantes o codominantes.

Los marcadores proteicos son generalmente codominantes y permiten el análisis de varios loci a la vez a bajo costo. Las técnicas más comunes son el análisis isoenzimático, que ha sido utilizado exitosamente para caracterizar diversidad genética, y la electroforesis en dos dimensiones.

Los marcadores de DNA tienen como ventaja que no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base de la variación, permiten seleccionar regiones específicas dentro de la molécula de DNA, se puede analizar tanto información que se expresa como la que no y hay un gran número de técnicas para su estudio.

### 2.5.1. Técnicas de estudio

Técnica que proporciona marcadores codominantes que se pueden utilizar en la construcción de mapas de ligamiento, estudios de segregación, recombinación, paternidad entre otros. Como desventaja esta técnica es costosa y laboriosa, además se necesita gran cantidad de DNA e información previa sobre la secuencia (Jiménez y Collada, 2000).

#### Microsatélites

En este caso, el polimorfismo observado corresponde a diferencias de longitud provocadas por un número distinto de repeticiones. Pueden corresponder al genoma nuclear o al genoma del cloroplasto. Requiere de un conocimiento previo de la secuencia. Estos marcadores tienen un alto grado de polimorfismo. En el caso de los marcadores nucleares, sirven para hacer estudios individuales entre poblaciones, mapas genéticos y estudios filogenéticos. En marcadores del cloroplasto se realizan estudios de la historia de las poblaciones, flujo genético, hibridación e identificación de áreas que poseen una alta diversidad genética (Jiménez y Collada, 2000).

#### PCR-RFLP de DNA citoplasmático

En esta técnica se utiliza DNA de cloroplasto o mitocondria y se combina la amplificación mediante PCR y la digestión con enzimas de restricción. Se requiere un conocimiento previo de la secuencia, pero el DNA del cloroplasto es muy conservado en tamaño y estructura por lo que hay disponibilidad de partidores universales. Este marcador es útil para detectar inserciones, deleciones y mutaciones puntuales, con esta información se pueden realizar estudios de filogenia y genética de poblaciones ya que el DNA utilizado es haploide (Al-Janabi *et al.*, 1994 citado en Jiménez y Collada, 2000).

El sistema de marcadores moleculares basados en la PCR, permite una examinación directa de las diferencias en la secuencia del DNA, permitiendo una detección precisa y sensible de la variación

genética entre individuos (Ward *et al.*, 2008). Los análisis con enzimas de restricción y la secuenciación nos permiten estimar la variabilidad genética a nivel de nucleótidos (Lewin, 2001). La aproximación más directa para descubrir polimorfismos en el DNA es la secuenciación directa de los productos de PCR desde un número de individuos distintos. Los partidores para la PCR son cada uno diseñados en base a una secuencia conocida de DNA de genes disponibles en GenBank o desde secuencias EST (Rafalski, 2002).

Los marcadores dominantes deben ser tratados como caracteres fenotípicos, como presencia o ausencia. En este caso para el análisis se realizan matrices compuestas por 1s y 0s, donde en las filas se muestran los datos de un individuo en particular, y cada columna muestra la presencia o ausencia de una banda en particular. Estos datos suelen ser convertidos en matrices de similitud para el cálculo de las distancias genéticas. En este caso solo un número reducido de estadísticas son necesarios. Las frecuencias de los alelos también pueden ser indirectamente estimadas desde estos marcadores, y los resultados pueden ser utilizados para obtener los parámetros para un estudio de genética de poblaciones (Escudero *et al.*, 2003).

Los marcadores genéticos, nos proporcionan distinto tipo de información la cual sirve para diferentes aplicaciones las cuales se muestran en la Tabla II (adaptación de Tabla I, Jiménez y Collada, 2000).

**Tabla II. Características y aplicación de los marcadores genéticos**

Tipo de Marcador		Genética	Aplicación				
			Diversidad	Evolución	Dif. De poblaciones	Flujo polen	Flujo semilla
Nucleares							
Metabólico o	Fenoles	Cod, Ad	+	+	+		
	Terpenos	Cod, Ad	+	+	+		
Proteína	Isoenzimas	Cod, N/Ad	+		+		
DNA	RAPD	Dom, N	+	+	+		
	SSR	Cod, N	+				
	ITS	Cod, N	+	+			
	AFLP	Dom, N	+		+		
Citoplasmáticos							
mtDNA	RFLP	Mat		+	+		+
cpDNA	RFLP, SSR	Mat/Pat, N	+	+	+	+	+

Cod: codominante, Ad: adaptativo, N: neutral, Mat: materna, Pat: paterna

## 2.6. UTILIDAD PARA LA CONSERVACIÓN

La diversidad genética constituye un componente de la biodiversidad y como tal debe contemplarse su conservación y mantenimiento (Moritz y Faith, 1998 citado en Jiménez y Collada, 2000). Como objetivo de los programas de conservación está el mantenimiento del potencial adaptativo de la especie, protegiendo los procesos ecológicos y evolutivos.

Los marcadores moleculares tienen diversas aplicaciones en el campo de la conservación, como: medida de la diversidad genética y la diferenciación, estimación de las tasas de flujo genético o migración, caracterización del sistema de reproducción, análisis de paternidad y parentesco, determinación de la eficiencia de los huertos semilleros, identificación de clones y material forestal de reproducción, estudios de filogenia y taxonomía, mapas de ligamiento genético, selección asistida por marcadores, entre otros (Young, 2000 citado en Jiménez y Collada, 2000).

*Gevuina avellana* y *Embothrium coccineum*, ambas pertenecientes a la familia Proteaceae, fueron seleccionadas para este estudio por ser plantas endémicas de los bosques costeros templados lluviosos, por lo cual se espera que durante la LGM hayan sobrevivido en refugios glaciares, principalmente costeros, conservando la diversidad genética. Por esto mismo, con los antecedentes presentados y mediante el uso de marcadores moleculares del cpDNA se procederá al estudio de dos regiones intergénicas (*trnH-psbA* y *psbK-trnS*), conocidas por ser polimórficas, correspondientes al genoma del cloroplasto de dos especies nativas de Chile que comparten en gran mayoría el área de distribución. Al realizar este trabajo, se evaluará la diversidad genética intraespecífica asociada al cpDNA de las especies en estudio, lo que evidenciará la distribución genética de las mismas. Esto permitiría definir las regiones que presentan mayor diversidad en cada especie y como consecuencia contemplar esas áreas para programas de conservación.

## **2.7. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

*Embothrium coccineum* y *Gevuina avellana* presentan diversidad genética a nivel del genoma del cloroplasto, lo cual permite identificar haplotipos asociados a distintas regiones geográficas de Chile dando a conocer la biodiversidad de ambas especies.

## **2.8. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar los polimorfismos intraespecíficos en el genoma del cloroplasto que permitirían identificar haplotipos en *Gevuina avellana* y *Embothrium coccineum*.

## **2.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Analizar las secuencias de distintos fragmentos del cpDNA, y diseñar partidores específicos para la amplificación de regiones polimórficas en ambas especies.
- 2.- Identificar polimorfismos y relacionarlos en distintos haplotipos.
- 3.- Determinar frecuencias de haplotipos y relacionarlos a la distribución geográfica de ambas especies.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Reactivos químicos

Alcohol etílico (TCL-Equilab), alcohol isoamílico (Merck), cloroformo (Vetec), CTAB (Winkler), agarosa (Winkler e Invitrogen), EDTA (Invitrogen), Trisma base (US Biological) PVP (Sigma).

De Grupo Bios se obtuvieron los partidores psbKf-GA, trnSO<sub>f</sub>-Ga, psbKr-Ga, trnS<sub>0</sub>r, psbK-P1, trnH-f, psbA-r, trnH-f2, M13-psbK-P1, NotroR, M13-PET y M13-VIC.

De Applied Biosystems se obtuvieron los fluorocromos VIC y PET.

De BIOTECH se obtuvieron los partidores ccmp2-F, ccmp2-R

De Fermentas se obtuvo buffer PCR 10X, MgCl<sub>2</sub> 25mM, dNTPs 2mM, *Taq* DNA polimerasa 5U/uL, estándares de 50pb y 1kb, bromuro de etidio 10mg/mL.

##### 3.1.2. Equipos utilizados

Termociclador Multigene Labnet 90834, centrífuga Sprout, microcentrífuga Spectrafuge 24D Labnet, termoblock Accu Block digital dry bath Labnet D1100, balanza SHIMADZU Equilab ELB600S, vórtex VX100 Labnet, pipetas RAININ de 2, 10, 20, 100, 200 y 1000uL, cámara de electroforesis ADVANCE Mupid-EXU, cámara de electroforesis ENDURO Labnet, cámara de electroforesis SCIE-PLAS, fuente de poder ENDURO Labnet y E833 Consort, transiluminador UV Vilber Lourmat, agitador magnético Bio Axis 1767/7 y cámara fotográfica Samsung L400.

### **3.1.3. Softwares utilizados**

Gene Marker V1.95, análisis de genotipificación, [www.softgenetics.com/downloads.html](http://www.softgenetics.com/downloads.html)

Chromas Lite 2.01, manejo de cromatogramas, [www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)

Fast PCR 6.0, manejo y edición de secuencias, [www.primerdigital.com/fastpcr.html](http://www.primerdigital.com/fastpcr.html)

Clustal W2, alineamiento múltiple de secuencias, [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

Primer3, diseño de partidores, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>



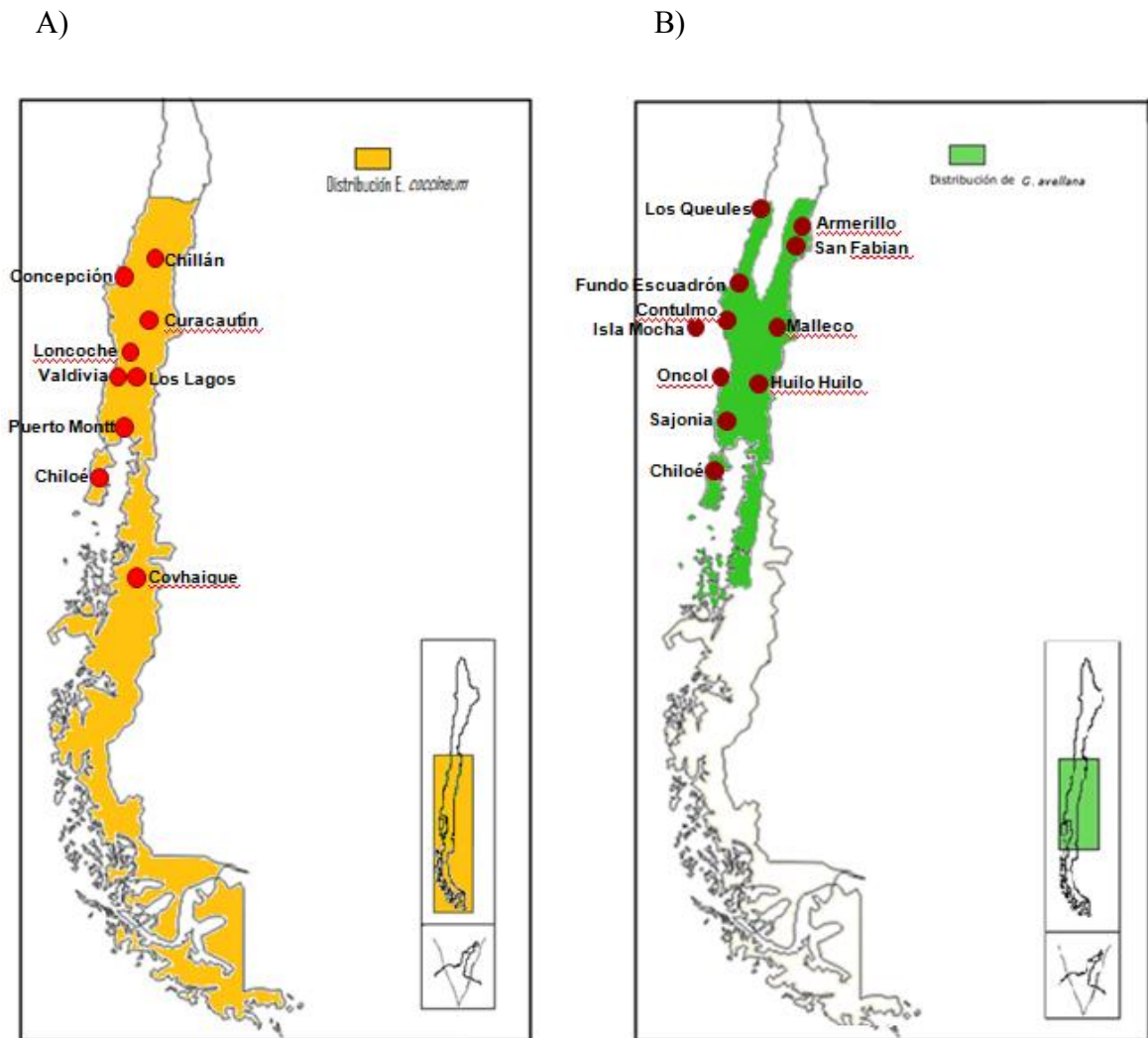
## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Muestras

Para el estudio de diversidad genética, se utilizaron muestras de hojas de nueve poblaciones de *Embothrium coccineum* y de once poblaciones para *Gevuina avellana* colectadas dentro de su área de distribución en Chile. La Figura 2 muestra la localización geográfica de las poblaciones junto al área de distribución de ambas especies. En total se analizaron 94 individuos, 38 notros y 56 avellanos.

Las muestras de notros se obtuvieron en el ámbito del proyecto Fondecyt de Iniciación 11080162 y las de avellano dentro del proyecto Fondecyt 1060192. Las muestras fueron recolectadas de árboles con una distancia mínima entre individuos de 30 metros y con un DAP mayor a 10 centímetros.

En ambas especies, para los análisis realizados con partidores específicos de cpDNA, se utilizaron entre tres y seis individuos por población. Es posible utilizar un bajo número de individuos por población, debido a que el genoma del cloroplasto es de herencia materna y no presenta recombinación, por lo que es altamente conservado en su evolución. El número de individuos por población y las características geográficas de las mismas se muestran en las Tablas III y IV.



**Figura 2.** Área de distribución y localizaciones geográficas en Chile de las poblaciones de A) *Embothrium coccineum* y B) *Gevuina avellana* estudiadas. (Distribución según Donoso, 2005 y Hoffman, 1982).

**Tabla III. Ubicación geográfica y número de individuos de las poblaciones de *Embothrium coccineum* estudiadas.**

<b>Población</b>	<b>N° Individuos</b>	<b>Región</b>	<b>Provincia</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
Chillán, (Chi)	4	VIII	Ñuble	36°42' S - 71°52' O	985
Concepción, (Co)	5	VIII	Concepción	36°52' S - 73°08' O	4
Curacautín, (Cu)	4	IX	Malleco	38°27' S - 71°44' O	728
Loncoche, (Lo)	4	IX	Cautín	39°16' S - 72°33' O	196
Valdivia, (Curi)	5	XIV	Valdivia	39°44' S - 73°22' O	192
Los Lagos, (Pich)	3	X	Palena	39°51' S - 72°48' O	530
Puerto Montt, (PM)	6	X	Llanquihue	41°31' S - 72°45' O	69
Tocoihue, (Ich)	3	X	Chiloé	42°15' S - 73°41' O	190
Coyhaique, (Coy)	4	XI	Coyhaique	45°52' S - 72°00' O	300

En la primera columna se indica el nombre de la población y su correspondiente abreviatura, además a cada individuo dentro de una población se le indica un número distinto para diferenciarlos entre sí (anexo 4A).

**Tabla IV. Ubicación geográfica y número de individuos de las poblaciones de *Gevuina avellana* estudiadas.**

<b>Población</b>	<b>N° individuos</b>	<b>Región</b>	<b>Provincia</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
Los Queules, (Lq)	6	VII	Cauquenes	35°59' S - 72°41' O	500
Armerillo, (Ar)	5	VII	Talca	35°42' S - 71°6' O	680
San Fabián, (Sf)	5	VIII	Ñuble	36°33' S - 71°32' O	500
Fundo Escuadrón (Fe)	5	VIII	Concepción	36°56' S - 73°6' O	150
Contulmo, (Ct)	5	VIII	Arauco	38°01' S - 73°10' O	380
Isla Mocha, (IM)	5	VIII	Arauco	38°21' S - 73°54' O	100
Malleco, (Ma)	5	IX	Malleco	38°02' S - 71°44' O	815
Oncol, (On)	5	XIV	Valdivia	39°41' S - 73°20' O	415
Huilo Huilo, (Hu)	5	XIV	Valdivia	39°51' S - 71°55' O	480
Sajonia, (Sa)	5	X	Llanquihue	40°50' S - 73°29' O	207
Dalcahue, (Ch)	5	X	Chiloé	42°17' S - 73°27' O	120

En la primera columna se indica el nombre de la población y su correspondiente abreviatura, además a cada individuo dentro de una población se le indica un número distinto para diferenciarlos entre sí (anexo 4B).

### 3.2.2. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó a partir de hojas de preferencia nuevas de notros o avellanos. En un tubo Eppendorf se colocaron algunas hojas y se procedió a pulverizar con nitrógeno líquido. Se agregaron 500uL de buffer de extracción CTAB previamente calentado a 60°C, y se agitó con vórtex. Luego las muestras fueron incubadas a 65°C por 30 minutos, mezclando por inversión cada 10 minutos. A continuación se agregó a cada muestra 500uL de cloroformo-octanol 24:1 frío (-20°C) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos, y se procedió a transferir la fase acuosa superior a otro tubo Eppendorf, aproximadamente 350uL. Se agregó el mismo volumen transferido de cloroformo-octanol 24:1 frío (-20°C) y se mezcló por inversión. Se repitió la centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos, y se transfirió la fase acuosa nuevamente a otro tubo. En el nuevo tubo se agregaron 150uL de acetato de amonio 7,5M y se mezcló por inversión, luego se añadieron 315uL de isopropanol frío (-20°C) y se mezcló por inversión. En este paso las muestras se dejaron precipitando a 4°C durante la noche. Las muestras se centrifugaron a 12000rpm durante 20 minutos y luego se eliminó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 500uL de etanol 70% frío (-20°C) y se centrifugó a 12000rpm durante 5 minutos. Luego se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado del precipitado con etanol y la centrifugación. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y el DNA se resuspendió en 100uL de agua estéril durante 30 minutos y luego se agregó 1uL de RNAsa y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se verificó el resultado de la extracción de DNA genómico mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. El DNA extraído fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Nanodrop, con el cual además se verificó la calidad de DNA. Posterior a la cuantificación, las muestras de DNA fueron diluídas todas a la misma concentración según la especie; 20ng/uL para notros y 5ng/uL para avellanos.

### **3.2.3. Diseño y selección de partidores**

Para el diseño y la selección de los partidores en ambas especies se realizó un alineamiento múltiple con el programa Clustal W2 utilizando dos secuencias de cpDNA de tres especies relacionadas (*Platanus occidentalis*, *Vitis vinífera* y *Drimys granadensis*) pertenecientes a la clase Magnoliopsida, al igual que las especies en estudio. El alineamiento fue realizado para dos fragmentos de cpDNA de los cuales se tenía antecedentes de presentar polimorfismo, la región intergénica trnH-psbA y la región intergénica psbK-trnS. Sobre la base del análisis de secuencias, se diseñaron distintos partidores en regiones conservadas utilizando el programa Primer3 o se utilizaron partidores previamente diseñados en el proyecto Fondecyt 1060192 para amplificar los fragmentos polimórficos observados. Las secuencias y la posición de los partidores se muestran en el anexo 1 y 2. En resultados se muestra el detalle de los partidores trnH-f, psbA-r y trnH-f2 que fueron utilizados en distintas combinaciones para obtener los fragmentos de interés dentro de la región intergénica trnH-psbA y el detalle de los partidores psbKf-GA trnSO<sub>f</sub>-Ga, psbKr-Ga, trnSO<sub>r</sub> y psbK-P1 los cuales fueron utilizados en distintas combinaciones para obtener los fragmentos de interés dentro de la región intergénica psbK-trnS.

### **3.2.4. Estandarización de las amplificaciones en notros y avellanos**

Para lograr la amplificación se realiza una PCR que es un método rápido y de alta sensibilidad que consiste en la síntesis de un segmento específico de DNA utilizando como partidores dos oligonucleótidos de secuencia complementaria a las regiones laterales del segmento que se desea generar. La reacción involucra: desnaturación por calentamiento del DNA, apareamiento de los partidores a las hebras de DNA y extensión de estos con una DNA polimerasa termoresistente. Ciclos sucesivos de amplificación doblan la cantidad del DNA sintetizado.

Para la estandarización de las amplificaciones enzimáticas se procedió a realizar una reacción de PCR tipo de 25uL consistente en PVP 2%, 2,5uL buffer PCR 10X, 2,5uL MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2,5uL dNTPs 2mM, 0,8uL c/partidor 10pmol/uL, 0,125uL *Taq* DNA polimerasa 0,5U/uL, 1,0uL templado 20ng/uL y dependiendo si ocurrió o no amplificación se realizaron modificaciones para cada par de partidores en las concentraciones de los reactivos como MgCl<sub>2</sub>, PVP, buffer de la enzima, dNTPs, *Taq* DNA polimerasa o en los respectivos partidores.

El perfil general de amplificación inicialmente fue: 94°C (1-3min); 35 ciclos a 94°C (30s) / Tm-5°C (30s) / 72°C (1min); 72°C (5min), siendo modificadas para cada partidor según corresponda. Todas las reacciones realizadas fueron evaluadas en geles de agarosa al 1,5%.

Para los partidores diseñados se intentaron varias combinaciones entre si para lograr la amplificación, siendo sólo algunas convenientes o exitosas las cuales se muestran más adelante.

### **3.2.5. Secuenciación**

Con los antecedentes anteriores se procedió a amplificar y enviar a secuenciar a Macrogen INC (Seúl, Corea) ambos fragmentos en distintos individuos pertenecientes a las dos especies en estudio, con el objetivo de buscar polimorfismos e identificar nuevos partidores a utilizar. Los individuos de los cuales se obtuvieron muestras para amplificar y posteriormente enviar a secuenciar se muestran en la Tabla V.

Con las secuencias obtenidas de ambos fragmentos en distintos individuos de notros y avellanos, se identificaron los polimorfismos de interés y también se diseñaron nuevos partidores para obtener fragmentos más adecuados para la identificación de los polimorfismos observados. Las secuencias completas se muestran en el anexo 3.

**Tabla V. Individuos de ambas especies en los cuales se realizó amplificación y secuenciación.**

<b>Fragmento</b>	<b>Partidores</b>	<b>Especie</b>	<b>Individuos</b>
Región intergénica trnH-psbA	trnH-f/psbA-r	Notros	Pm6 Co2 Chi2 Lo5 Coy3
		Avellanos	Ar23 Ch3 IM4 Lq16 Lq22 Ct4 Ct12 Fe3 Fe8 Hu23 Ma3 Ma8 Sa6 Sa26 Sf7
Región intergénica psbK-trnS	psbKf-GA/ trnS0r	Notros	Pm6 Co2 Chi2 Lo5 Coy3
		Avellanos	Fe8 IM4 LQ9 LQ16 Ma3 Ma8

Individuos de notros y avellanos de los cuales se obtuvo la secuencia de los fragmentos amplificados con los partidores que se indican.



### 3.2.6. Técnicas para la detección de polimorfismos en notro y avellano.

#### 3.2.6.1. Amplificación por PCR de fragmentos de cpDNA

Las distintas amplificaciones se realizan por PCR según lo descrito en el punto 3.2.4, y los protocolos de las concentraciones para los distintos pares de partidores que lograron amplificación y que se utilizan a lo largo de este trabajo se muestran en la Tabla VI.

Los perfiles de amplificación para los distintos partidores fueron los siguientes:

**trhH-f/psbA-r:** 95°C (3min); 30 ciclos 95°C (1min)/55°C (30s)/72°C (1min); 72°C (3min).

**trnS0r/psbKf-GA:** 94°C (3min); 35 ciclos 94°C (45s)/63°C (45s)/72°C (1min); 72°C (7min).

**ccmp2-F/ccmp2-R:** 94°C (4min); 35 ciclos 94°C (1min)/50°C (1min)/72°C (1min); 72°C (8min)

**PsbK-P-1/NotroR:** 94°C (5min); 30 ciclos 94°C (30s)/56°C (45s)/72°C (45s); 72°C (5min).

**M13-PET o M13-VIC/psbK-P1-M13/NotroR:** 94°C (5min); 30 ciclos 94°C (30s)/56°C (45s)/72°C (45s); seguido de 8 ciclos 94°C (30s)/53°C (45s)/72°C (45s); 72°C (10min).

**Tabla VI. Protocolos de la concentración de los reactivos para los distintos partidores utilizados.**

<b>Partidores</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Especie</b>	<b>Buffer PCR 10X (uL)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> 25mM (uL)</b>	<b>dNTPs 2mM (uL)</b>	<b>Partidores 10pmol/uL (uL)</b>	<b>Taq DNA polimerasa (uL)</b>	<b>Templado (ug/uL)</b>	<b>Volumen reacción (uL)</b>
trhH-f/ psbA-r	trnH-psbA	Notro y avellano	1	1,6	3,2	0,8	0,16	1	20
trnS0r/ psbKf-GA	psbK-trnS	Notro y avellano	1	1	1	0,1	0,05	0,5	10
ccmp2-F/ ccmp2-R	psbK-trnS	Avellano	2,5	1,5	1,5	1	0,5	1	20
M13-F/ psbK- P1.2 M13/NotroR	psbK-trnS	Notro	2	1,2	1,2	*PS=0,225 *PA= 0,9 *PF=0,9	0,3	0,3	20
psbK-P1/ NotroR	psbK-trnS	Notro	1	0,6	0,6	0,4	0,2	1	10

\*PS: partidior sentido, PA: partidior antisentido y PF: partidior fluorescente en la reacción.

### **3.2.6.2. Electroforesis en geles de agarosa**

En ésta técnica ocurre la migración de una sustancia por la acción de un campo eléctrico. La técnica es utilizada para resolver fragmentos de ADN lineales en base a su tamaño molecular, los fragmentos pequeños migrarán más rápido que los más grandes, y la distancia de migración en el gel varía en forma inversamente proporcional al logaritmo del tamaño molecular. Esta técnica permite visualizar ácidos nucleicos y así determinar su tamaño al compararlos con un estándar.

Para la confección del gel se mezcló la agarosa con el tampón TAE 1X en la concentración requerida, luego se calentó en el microondas hasta disolución, para luego agregar bromuro de etidio que permitió la visualización del DNA en el transiluminador. Luego se dejó enfriar la solución y se agregó a la bandeja con la peineta para la solidificación del gel.

Una vez confeccionado el gel se sacó la peineta y se introdujo a la cámara electroforética que contiene el tampón TAE 1X, luego se cargó el estándar y las muestras que deben estar mezcladas con buffer de carga en una relación de 3:1 y se corre el gel en la cámara para luego ser visualizado en el transiluminador.

Para la confección del gel al 2,5% se mezclan 2,5gr de agarosa, 100mL de tampón TAE 1X y 4uL de bromuro de etidio 10mg/mL, para luego correr el gel a 100V. Para el gel al 1,5% se mezclan 1,5gr de agarosa, 100mL de tampón TAE 1X y 4uL de bromuro de etidio 10mg/mL, para luego correr el gel a 50V.

### **3.2.6.3. Genotipificación**

Para poder detectar polimorfismos de menos de 7pb en los que no se pueda hacer un análisis de restricción se procedió a realizar este análisis donde se diseñan partidores internos en el fragmento para así flanquear la región del polimorfismo.

Una vez diseñados los partidores específicos para la región de interés, se procede a agregar un fragmento al extremo 5' del partidor sentido a utilizar, el fragmento denominado cola M13 (TGTAACGACGGCCAGT-) inserto en el partidor y junto al partidor universal M-13 marcado con fluorescencia y junto al partidor antisentido permiten realizar una técnica de marcaje fluorescente de un fragmento de PCR, y así detectar pequeñas diferencias de tamaño al ser procesados por un equipo secuenciador donde se utiliza un estándar para determinar el tamaño de los fragmentos al ser analizados con un software específico. Para la técnica de marcaje se utilizó la metodología descrita por Schuelke, 2000 donde las condiciones de la PCR y los ciclos del termociclador están diseñados para que ocurra una incorporación inicial del partidor sentido, al que se le ha agregado la cola M-13, hasta que se agota ya que está presente en menor cantidad que los 2 partidores restantes, y luego haya una incorporación del partidor M13 fluorescente como sentido para la adición de la fluorescencia. Así primero ocurre una acumulación de producto de PCR y luego una incorporación de fluorescencia al mismo fragmento para su posterior detección en el secuenciador.

#### **3.2.6.4 Análisis de restricción de un producto de PCR**

Para realizar la identificación de los polimorfismos de base única se hizo un análisis de restricción, donde una endonucleasa es capaz de generar un corte hidrolítico en un sitio de reconocimiento dentro de una secuencia de DNA. Primero se identifica la enzima que cortará el fragmento en el lugar del polimorfismo, una sustitución en este caso, lo cual se puede hacer utilizando el programa FastPCR 6.0 para luego realizar la digestión directamente desde un producto de PCR utilizando el protocolo recomendado por el fabricante para la enzima a utilizar. La digestión producirá un número de fragmentos específicos dependiendo de la cantidad de

cortes que realice la enzima en el segmento de DNA según las secuencias que la misma enzima reconozca, de esta manera se logra diferenciar entre las secuencias de los individuos que poseen la sustitución y las que no, ya que se generarán un número distinto de fragmentos dependiendo de la presencia o ausencia de la sustitución. La visualización de los fragmentos se realiza en un gel de agarosa al 1,5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DISEÑO Y SELECCIÓN DE PARTIDORES

En la primera fase de selección de partidores se obtuvieron ocho de ellos (trnH-f, psbA-r, trnH-f2 psbKf-GA, trnSO<sub>f</sub>-Ga, psbKr-Ga, trnSO<sub>r</sub> y psbK-P1 detallados en Tabla VII) complementarios a regiones conservadas de las dos secuencias polimórficas de las regiones intergénicas obtenidas de alineamientos múltiples de tres especies relacionadas, *Platanus occidentalis*, *Vitis vinífera* y *Drimys granadensis* (anexos 1 y 2), para luego realizar ampliificaciones en las especies en estudio.

Luego de realizar y verificar las extracciones de DNA genómico, se hicieron las distintas PCR. De los ocho partidores, cinco resultaron en ampliificaciones exitosas (trnH-f, psbA-r, psbKf-GA, trnSO<sub>r</sub> y psbK-P1) y cuatro fueron seleccionados (trnH-f/psbAr para la región intergénica trnH-psbA y trnSO<sub>r</sub>/psbK-P1 para la región intergénica psbK-trnS) para obtener dos fragmentos para enviar a secuenciar en ambas especies y así evaluar la existencia de polimorfismo y también evaluar la selección y diseño de nuevos partidores para hacer las ampliificaciones. Los partidores utilizados a lo largo de esta investigación se muestran en la Tabla VII.

### 4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE INTERÉS

Como se muestra en las Figuras 3, 4, 5 y 6 con las secuencias obtenidas se identificaron los polimorfismos de interés en ambas especies y se determinaron los partidores más adecuados, ya sea seleccionados de trabajos previos o diseñados durante esta investigación, para realizar las ampliificaciones y la posterior detección de los polimorfismos.

**Tabla VII. Partidores utilizados para la amplificación de fragmentos de cpDNA dentro de las regiones intergénicas trnH-psbA y psbK-trnS.**

Nombre	Secuencia	Región amplificada	Especie	Origen
trhH-f	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	Región intergénica trnH-psbA	Notro y avellano	Tate and Simpson, 2003
psbA-r	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Región intergénica trnH-psbA	Notro y avellano	Sang <i>et al.</i> , 1997
trnS0r	GGGAGAGATGGCTGAGTGGAC	Región intergénica psbK-trnS	Notro y avellano	Grivet <i>et al.</i> , 2001
psbKf- GA	CTGGGACGGAAGGATTCG	Región intergénica psbK-trnS	Notro y avellano	Proyecto Fondecyt 1060192
psbK-P1	GCCTTTGTTTGGCAAGCTGCTGTAAG	Región intergénica psbK-trnS	Notro	Heinze, 2007
M13- psbK- P1.2	TGTAACGACGGCCAGTTTTGGCA AGCTGCTGTAAG	Región intergénica psbK-trnS	Notro	Este trabajo

**Tabla VII. Partidores utilizados para la amplificación de fragmentos de cpDNA dentro de las regiones intergénicas trnH-psbA y psbK-trnS (continuación).**

NotroR	AATGTTTCAATCGAGGGTTC	Región intergénica psbK-trnS	Notro	Este trabajo
ccmp2-F	GATCCCGGACGTAATCCTG	Región intergénica psbK-trnS	Avellano	Weising and Gardner, 1999
ccmp2-R	ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	Región intergénica psbK-trnS	Avellano	Weising and Gardner, 1999
trnSof- Ga	TCTCTTCATCTTCGGATTCCT	Región intergénica psbK-trnS	Notro y avellano	Proyecto Fondecyt 1060192
psbKr- Ga	TGCCAGTCATACCTGTGCTC	Región intergénica psbK-trnS	Notro y avellano	Proyecto Fondecyt 1060192
trnH-f2	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	Región intergénica trnH-psbA	Notro y avellano	Hamilton, 1999



```

Pm6-III      TTTTTTTAGCATTTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA----- 112
Co2-I       TTTTTTTAGCATTTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA----- 112
Chi2-III    TTTTTTTAGCATTTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA----- 112
Coy3-III    TTTTTTTAGCATTTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA----- 112
Lo5-II      TTTTTTTAGCATTTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAACATTAAAA 120
*****

Pm6-III      AAAAAATGGAAAAAATCTTATGTGAATAAAACATTACTAACTATAAACTAAATGAAGG 172
Co2-I       AAAAAATGGAAAAAATCTTATGTGAATAAAACATTACTAACTATAAACTAAATGAAGG 172
Chi2-III    AAAAAATGGAAAAAATCTTATGTGAATAAAACATTACTAACTATAAACTAAATGAAGG 172
Coy3-III    AAAAAATGGAAAAAATCTTATGTGAATAAAACATTACTAACTATAAACTAAATGAAGG 172
Lo5-II      AAAAAATGGAAAAAATCTTATGTGAATAAAACATTACTAACTATAAACTAAATGAAGG 180
*****

```

**Figura 3. Fragmento del alineamiento múltiple de las secuencias de la región intergénica trnH-psbA de distintos notros amplificados utilizando los partidores trnH-f/psbA-r.** En la secuencia se destaca en amarillo el polimorfismo de interés, la inserción CATTAAAA de 8pb necesaria para la discriminación entre individuos. El nombre de cada secuencia se indica con el nombre del individuo seguido del haplotipo al cual corresponde. Los asteriscos son posicionados bajo el alineamiento de cada base cuando los residuos de todas las secuencias son iguales. Los colores rojo y verde de las secuencias son para una mejor visualización de la misma.

```

                                psbKp1 TTTGGCAAGCTGCTGTAAG
Chi2-I      TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 540
Coy3-III   TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 531
Co2-III    TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 540
Lo5-II     TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 540
Pm6-III    TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 540
*****

Chi2-I      TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAAA 600
Coy3-III   TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAAA 591
Co2-III    TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAAA 598
Lo5-II     TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAAA 598
Pm6-III    TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAAA 600
*****

                                NotroR GAACCCTCGATTGAAACATT
Chi2-I      TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCTCGATTGAAAC 660
Coy3-III   TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCTCGATTGAAAC 651
Co2-III    TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCTCGATTGAAAC 658
Lo5-II     TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCTCGATTGAAAC 658
Pm6-III    TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCTCGATTGAAAC 660
*****

```

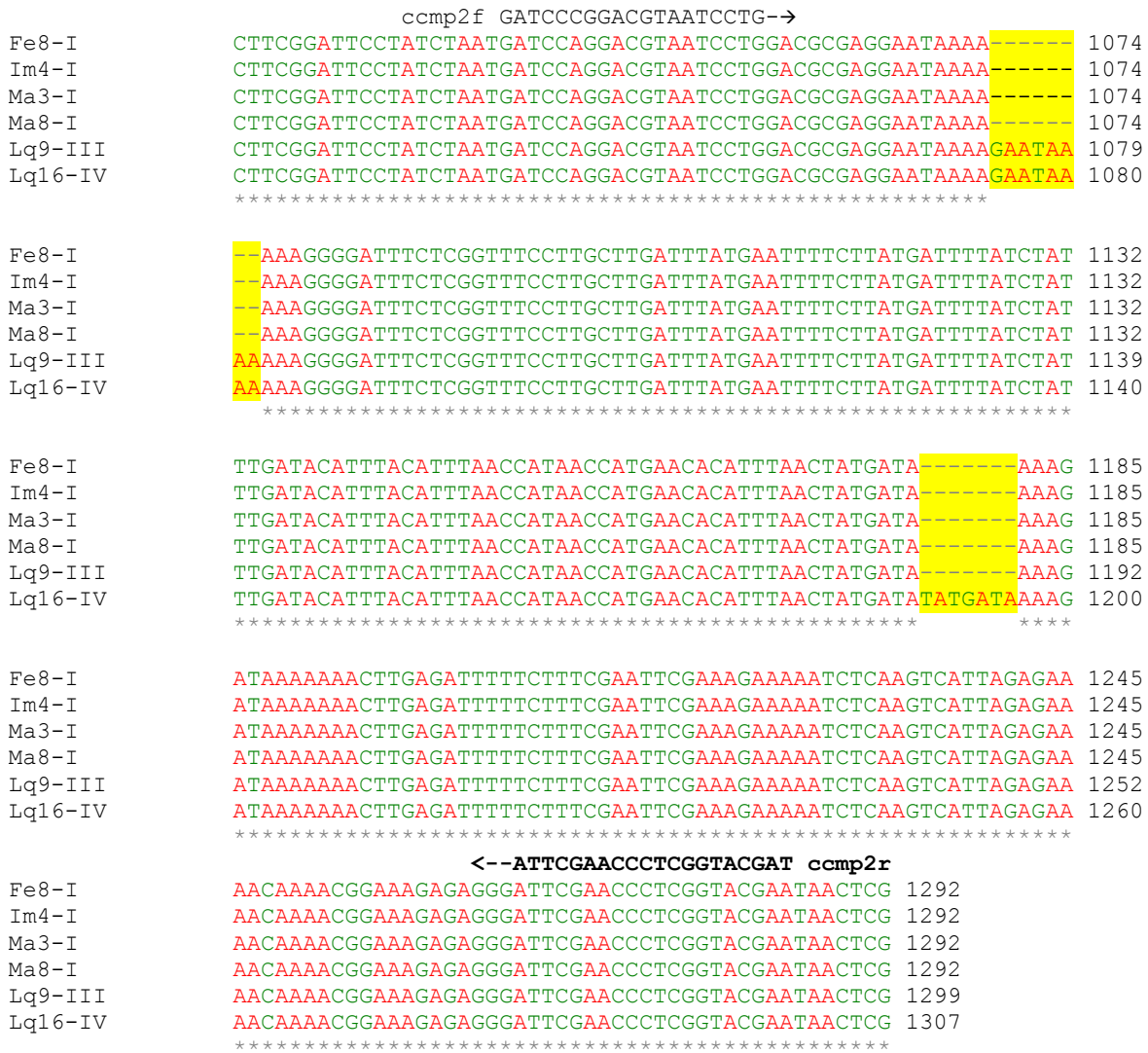
**Figura 4. Fragmento del alineamiento múltiple de las secuencias región intergénica psbK-trnS de distintos notros amplificados utilizando los partidores psbKf-GA/ trnS0r.** En la secuencia se destaca en amarillo el polimorfismo de interés AA de 2pb y los partidores psbK-P1/NotroR diseñados en base a la misma secuencia. El nombre de cada secuencia se indica con el nombre del individuo seguido del haplotipo al cual corresponde. Los asteriscos son posicionados bajo el alineamiento de cada base cuando los residuos de todas las secuencias son iguales. Los colores rojo y verde de las secuencias son para una mejor visualización de la misma.

```

SA26-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
SF7-II     ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
SA6-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
MA8-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
HU23-I     ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
FE8-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
FE3-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
CT12-I     ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
CT4-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
LQ22-III   ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
LQ16-IV    ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
IM4-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
CH3-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
AR23-I     ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
MA3-I      ACTGCCTTAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATTC AATAGATT 60
*****

```

**Figura 5. Fragmento del alineamiento múltiple de las secuencias de la región intergénica *trnH-psbA* de distintos avellanos amplificados utilizando los partidores *trnH-f/psbA-r*. En la secuencia se destaca en amarillo el polimorfismo de interés, la sustitución T/G necesaria para la discriminación entre individuos. El nombre de cada secuencia se indica con el nombre del individuo seguido del haplotipo al cual corresponde. Los asteriscos son posicionados bajo el alineamiento de cada base cuando los residuos de todas las secuencias son iguales. Los colores rojo y verde de las secuencias son para una mejor visualización de la misma.**



**Figura 6. Fragmento del alineamiento múltiple de las secuencias de la región intergénica psbK-trnS de distintos avellanos amplificadas utilizando los partidores psbKf-GA/ trnS0r.**

En la secuencia se destacan en amarillo los dos polimorfismos de interés; las inserciones GAATAAAA y TATGATA de 8 y 7pb respectivamente y los partidores ccmp2 más adecuados para la amplificación y discriminación entre individuos. El nombre de cada secuencia se indica con el nombre del individuo seguido del haplotipo al cual corresponde. Los asteriscos son posicionados bajo el alineamiento de cada base cuando los residuos de todas las secuencias son iguales. Los colores rojo y verde de las secuencias son para una mejor visualización de la misma.

### 4.3. TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS

Para la detección de los distintos polimorfismos encontrados, se utilizaron 3 técnicas diferentes:

- Amplificación de fragmentos de cpDNA y visualización en gel de agarosa al 2,5%
- Amplificación de fragmentos de cpDNA y posterior genotipificación.
- Amplificación de fragmentos de cpDNA y posterior análisis de restricción

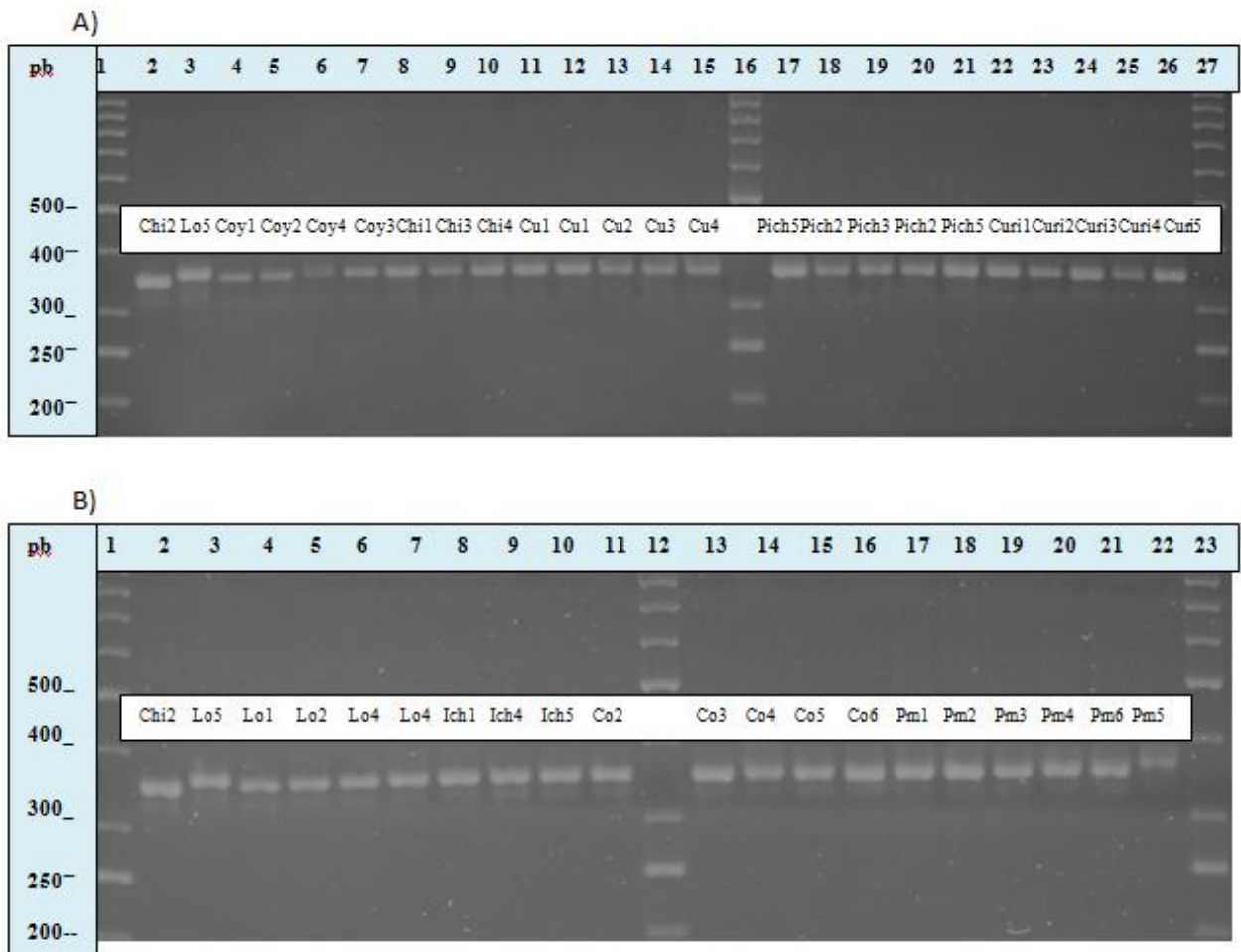
En la Tabla VIII se muestra el tipo de polimorfismo identificado para cada fragmento y la respectiva técnica utilizada para su identificación según cada especie.

#### 4.3.1. Amplificación de fragmentos de cpDNA de notros.

Para la detección del polimorfismo de 8pb correspondiente a la inserción CATTAAAA en algunos individuos de notro, primero se hizo la amplificación de cpDNA de las muestras con los partidores trhH-f/psbA-r y luego una electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, donde el gel fue corrido a 50V durante el tiempo necesario para obtener una buena separación de las bandas y así poder visualizar y detectar la diferencia de tamaño entre los individuos al compararlos con un estándar de 50pb. Como se muestra en la Figura 7 se observan dos tipos de bandas de tamaños distintos, estas corresponden por un lado a los tres individuos Lo5, Coy4 y Pm5 (carril 3 y 6 en A y 22 en B respectivamente) que tienen bandas de aproximadamente 370pb y por otro lado las bandas correspondientes a los otros 35 individuos que tienen un tamaño aproximado de 362pb (detalles en Tabla IX). Con los antecedentes anteriores de los individuos enviados a secuenciar, sabemos que los que tienen aproximadamente 370pb, tienen la inserción CATTAAAA, siendo 8pb más largo que los que tienen un tamaño aproximado de 362pb que no poseen la inserción.

**Tabla VIII. Técnicas utilizadas para la identificación de los polimorfismos en cada especie.**

<b>Especie</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Partidores</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Técnica utilizada</b>
Notros	Región intergénica trnH-psbA	trnH-f/psbA-r	Inserción CATTAAAA	PCR de cpDNA y electroforesis en gel de agarosa
Notros	Región intergénica psbK-trnS	psbKf-GA/ trnS0r M13-psbK-P1.2NotroR	Inserción AA	PCR anidada de cpDNA y genotipificación
Avellanos	Región intergénica trnH-psbA	trnH-f/psbA-r	Sustitución T/G	PCR de cpDNA y análisis de restricción
Avellanos	Región intergénica psbK-trnS	ccmp2-F/ccmp2-R	Inserciones GAATAAAA TATGATA	PCR de cpDNA y electroforesis en gel de agarosa



**Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% de los fragmentos de amplificación de Notros utilizando los partidores trhH-f/psbA-r. A) Carril 1, 16 y 27: Estándar de 50pb. Carril 2, 8-10: Población Chillán. Carril 3: Población Loncoche. Carril 4-7: Población Coyhaique. Carril 11-15: Población Curacautín. Carril 17-21: Población Los Lagos Carril 22-27: Población Valdivia. B) Carril 1, 12 y 23 Estándar de 50pb. Carril 2: Población Chillán. Carril 3-7: Población Loncoche. Carril 8-10: Población Tocoihue. Carril 11, 13-16: Población Concepción. Carril 17-22: Población Puerto Montt.**

**Tabla IX. Tipo de polimorfismo en notro asociado a cada individuo en los fragmentos amplificados con los partidores trnH-f/psbA-r.**

Especie	Fragmento	Polimorfismo	Individuo
Notro	Región intergénica	Inserción CATTAAAA presente	Lo5, Pm5, Coy4
	trnH-psbA	Inserción CATTAAAA ausente	Chi2 Coy1 Coy2 Coy3 Chi1 Chi3 Chi4 Cu1 Cu2 Cu3 Cu4 Pich2 Pich3 Pich5 Curi1 Curi2 Curi3 Curi4 Curi5 Lo1 Lo2 Lo4 Ich1 Ich4 Ich5 Co2 Co3 Co4 Co5 Co6 Pm1 Pm2 Pm3 Pm4 Pm6



#### 4.3.2. Genotipificación .

Para poder detectar el polimorfismo observado de 2pb de largo (AA) en los fragmentos de los individuos de notros amplificados con los partidores trnS0r/psbKf-GA se procedió a diseñar partidores internos en el fragmento para así flanquear la región del polimorfismo.

Utilizando una de las secuencias obtenidas con la secuenciación y mediante el programa Primer3, como se muestra en la Figura 8, se diseñaron dos partidores para la región que flanquean el polimorfismo; psbK-P1 y NotroR. Luego se procedió a realizar la técnica de marcaje fluorescente descrita en material y método en el punto 3.2.6.3.

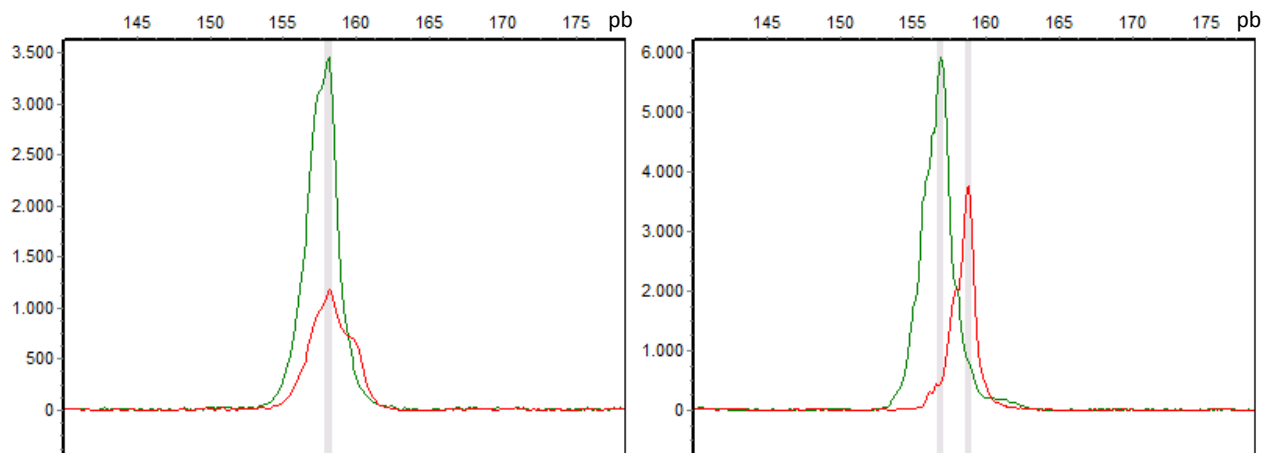
Los fragmentos obtenidos son verificados en un gel de agarosa al 1,5% para luego ser procesados en el secuenciador ABI Prism 310 del centro de inseminación artificial de la UACH utilizando como estándar el LIZ500 para determinar el tamaño de los fragmentos. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Gene Marker 1.85.

Para la genotipificación, se mezclan dos muestras de individuos a analizar, donde a cada uno se le ha incorporado un tipo de fluorescencia distinto (VIC o PET) para poder optimizar el proceso y analizar dos muestras a la vez. La mezcla de muestras se hace en relación 1:1 y el mix de reacción para el secuenciador contiene 1uL de muestra, 11uL de formamida y 0,25uL de LIZ500.

Como se muestra en la Figura 9, con el programa Gene Marker 1.85 se pueden observar los picos correspondientes a cada muestra, en el caso de la Figura 9, a la izquierda, se observan dos muestras que poseen el mismo tamaño, aproximadamente 158pb lo que corresponde a las muestras que no poseen la inserción AA y a la derecha se observan dos muestras que poseen tamaños diferentes de 157pb y 159pb aproximadamente correspondientes a una muestra sin y con la inserción AA respectivamente. Como se muestra en la Tabla X, en las muestras de notros analizadas, hay 16 individuos que poseen la inserción y 22 individuos que no la poseen.

```
TTTGGCAAGCTGCTGTAAG-PsbK-P1>  
TTTGGCAAGCTGCTGTAAGTTTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTCATGA  
TTTATTCGAAAAAAAAAAAAAAAATTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATT  
ATATTATGAACCCTCGATTGAAACATT  
<NotroR-GAACCCTCGATTGAAACATT
```

**Figura 8. Secuencia de un fragmento polimórfico de la región intergénica psbK-trnS de cpDNA de notro y los partidores diseñados para su amplificación.** Se destaca en amarillo el polimorfismo a identificar y los partidores se muestran en color azul.



**Figura 9. Ejemplo de muestras analizadas con el equipo ABI Prism 310.** En verde se observa la muestra a la cual se le incorporó la fluorescencia VIC y en rojo la muestra a la cual se le incorporó la fluorescencia PET, de esta manera se pueden analizar dos muestras a la vez. En la foto de la izquierda se presentan dos muestras con el mismo tamaño y en la derecha se observan dos muestras con tamaños distintos con una diferencia de 2pb.

**Tabla X. Tipo de polimorfismo asociado a cada individuo de notro en la detección mediante genotipificación.**

<b>Especie</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Individuo</b>
Notro	Región intergénica psbK-trnS	Inserción AA presente	Chi1 Chi2 Chi3 Chi4 Cu2 Cu3 Cu4 Lo1 Lo2 Coy1 Coy2 Coy3 Coy4 Ich1 Ich4 Ich5
		Inserción AA ausente	Cu1 Lo4 Lo5 Pich2 Pich3 Pich5 Curi1 Curi2 Curi3 Curi4 Curi5 Co2 Co3 Co4 Co5 Co6 Pm1 Pm2 Pm3 Pm4 Pm5 Pm6

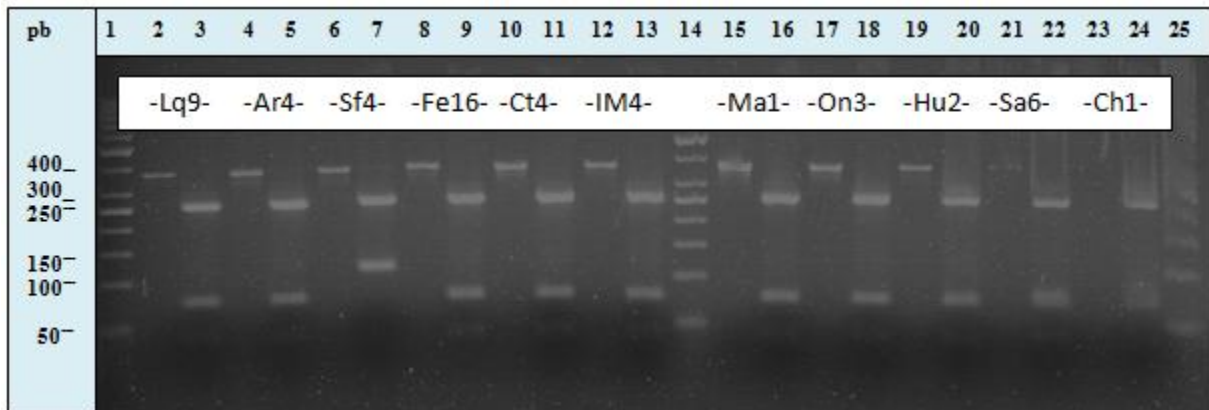
### 4.3.3. Análisis de restricción

Para la detección del polimorfismo de base única correspondiente a la sustitución T/G en algunos individuos de notros, se procedió primero a la amplificación del fragmento con los partidores trhH-f/psbA-r, luego a la verificación en un gel de agarosa al 1,5% para posteriormente realizar un análisis de restricción.

El programa FastPCR 6.0 identificó a la enzima *TasI* como adecuada para realizar el análisis de restricción. Esta enzima es capaz de reconocer la secuencia AATT y generar un corte en el extremo 5'. El fragmento mencionado en algunos individuos presenta la sustitución T/G quedando la secuencia anterior como AATG, la cual no es reconocida por la enzima. De esta manera, en el fragmento de 380pb amplificado por los partidores trnH-f/psbA-r, en los individuos que no presentan la sustitución, la enzima reconoce el fragmento AATT dos veces, por lo que realiza dos cortes en la secuencia generando tres fragmentos de 260, 80 y 40pb de largo. En los individuos que presentan la sustitución, la enzima reconoce el fragmento una vez, realizando un corte y así generando dos fragmentos de 260 y 120pb de largo.

El protocolo para la digestión consistió en hacer un mix con 10uL del producto de PCR de interés, 18uL de agua libre de nucleasas, 2uL de buffer y 2uL de la enzima para luego incubar por 4 horas a 65°C. La visualización de los productos de interés se hace en un gel de agarosa al 1,5%, cargando 32uL en cada pocillo en el caso de los productos digeridos y 6uL para los fragmentos sin digerir, para luego compara los tamaños con un estándar de 50pb.

En la Figura 10, correspondiente al gel del análisis de restricción, se muestra un individuo representativo de cada población, ya que en análisis anteriores (datos no mostrados) donde se analizaron todos los individuos de las distintas poblaciones, todos los individuos mostraron el mismo patrón de restricción entre si dentro de cada población.



**Figura 10. Análisis de restricción.** Análisis en gel de Agarosa al 1,5% de los fragmentos obtenidos luego de la digestión con la enzima de restricción *TasI* de fragmentos de DNA de avellanos amplificados con los partidores trhH-f/psbA-r. En un individuo representativo de cada población, primero se observa el fragmento sin digerir y en el siguiente carril el resultado de la digestión. **Carril 1-14 y 25:** Estándar 50pb. **Carril 2-3:** Los Queules 9. **Carril 4-5:** Armerillo 4. **Carril 6-7:** San Fabián 4. **Carril 8-9:** Fundo Escuadrón 16. **Carril 10-11:** Contulmo 14. **Carril 12-13:** Isla Mocha 4. **Carril 15-16:** Malleco 1. **Carril 17-18:** Oncol 3. **Carril 19-20:** Huilo Huilo 2. **Carril 21-22:** Sajonia 6. **Carril 23-24:** Dalcahue 1.

En el gel se observan los fragmentos sin digerir de 380pb de todos los individuos según se indica (carril 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 19, 21 y 23) y dos patrones de restricción, uno correspondiente al individuo Sf4 (carril 7) y otro correspondiente al resto de los individuos (carril 3, 5, 9, 11, 13, 16, 18, 20, 22 y 24), estas diferencias en el patrón de restricción, evidencian la presencia o ausencia de la sustitución T/G. En el caso del individuo de la población San Fabián (carril 7), el patrón de restricción muestra dos fragmentos de 260 y 120pb de largo evidenciando la presencia de la sustitución ya que la enzima es capaz de reconocer una vez el fragmento AATT en la secuencia y así realizar un corte. En el caso de los demás individuos, el patrón de restricción muestra tres fragmentos de 260, 80 y 40pb de largo evidenciando la ausencia de la sustitución ya que la enzima es capaz de reconocer dos veces el fragmento AATT en la secuencia y realizar dos cortes. Como se muestra en la Tabla XI, los 5 individuos de la población San Fabián presentan la sustitución T/G, mientras que el resto de los 51 individuos no.

**Tabla XI. Tipo de polimorfismo asociado a cada individuo en el análisis de restricción.**

Especie	Fragmento	Polimorfismo	Individuo
Avellano	Región intergénica trnH-psbA	Sustitución T/G presente	Sf4 Sf7 Sf17 Sf24 Sf30
		Sustitución T/G ausente	Fe3 Fe8 Fe13 Fe1 Fe19 Ct4 Ct12 Ct15 Ct17 Ct28 Im4 Im6 Im13 Im17 Im19 Ma1 Ma3 Ma8 Ma14 Ma27 On3 On8 On9 On16 On30 Hu2 Hu6 Hu23 Hu26 Hu29 Sa6 Sa9 Sa14 Sa26 Sa28 Ch1 Ch3 Ch6 Ch14 Ch28 Lq3 Lq8 Lq9 Lq16 Lq22 Lq30 Ar4 Ar13 Ar23 Ar26 Ar29

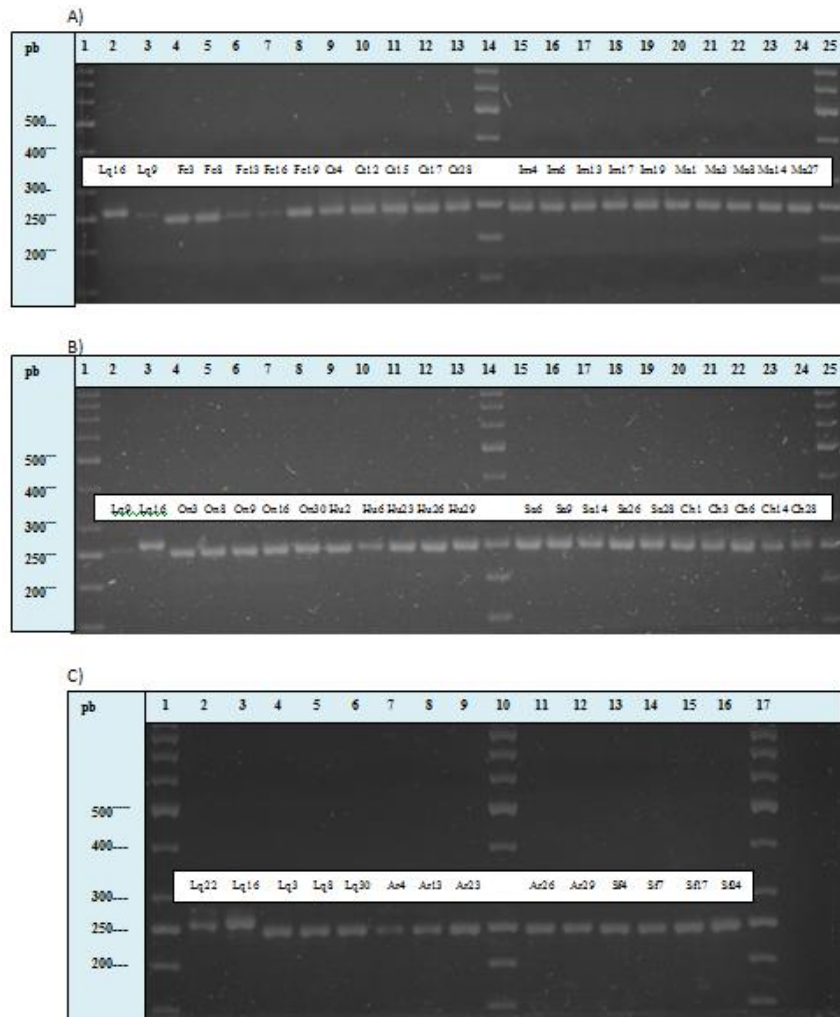


#### **4.3.4. Amplificación de fragmentos de cpDNA de avellanos.**

Para la detección del polimorfismo de 8 y 7pb correspondientes a las inserciones GAATAAAA y TATGATA respectivamente en algunos individuos de avellanos, se procedió primero a la amplificación de cpDNA de las muestras con los partidores ccmp2-F/ccmp2-R y luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, donde el gel fue corrido a 50V durante el tiempo necesario para obtener una buena separación de las bandas y así poder visualizar y detectar la diferencia de tamaño entre los individuos al compararlos con un estándar de 50pb.

Como se observa en la Figura 11 se ven tres tipos de bandas de tamaños distintos, las que corresponden por un lado a los dos individuos Lq9 (carril 3 en A y carril 2 en B) y Lq22 (carril 2 en C) que tiene un tamaño aproximado de 254pb, por otro lado se observa el individuo Lq16 (carril 2 en A y carril 3 en A y C) que tiene un tamaño aproximado de 261pb y también se ven los otros 53 individuos que tienen un tamaño aproximado de 246pb.

Con los antecedentes anteriores de los individuos enviados a secuenciar, sabemos que los que tienen un tamaño aproximado de 261pb poseen las inserciones GAATAAAA de 8pb y TATGATA de 7pb, siendo 15pb más largo que los individuos que tienen un tamaño aproximado de 246pb que no poseen ninguna de las dos inserciones, y 7pb más largo que los que tienen un tamaño aproximado de 254pb que posee la inserción GAATAAAA de 8pb. El detalle de los individuos de tanto los que poseen las inserciones como los que no, se muestran en la Tabla XII.



**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% de los fragmentos de amplificación de avellanos utilizando los partidores ccmp2-F/cmp2-R. A) Carril 1, 14 y 25: Estándar 50pb. Carril 2-3: Población Los Queules. Carril 4-8: Población Fundo Escudrón. Carril 9-13: Población Contulmo. Carril 15-19: Población Isla Mocha. Carril 20-24: Población Malleco. B) Carril 1,14 y25: Estándar 50pb. Carril 2-3: Población Los Queules. Carril 4-8: Población Oncol. Carril 9-13: Población Huilo Huilo. Carril 15-19: Población Sajonia. Carril 20-24: Población Dalcahue. C) Carril 1-10 y 17: Estándar 50pb. Carril 2-6: Población Los Queules. Carril 7-9 y 11-12: Población Armerillo. Carril 13-16: Población San Fabián**

**Tabla XII. Tipo de polimorfismo en avellanos asociado a cada individuo en los fragmentos amplificados con los partidores ccmp2-F/ccmp2-R.**

<b>Especie</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Individuo</b>
Avellano	Región intergénica psbK-trnS	<b>Inserción GAATAAAA presente</b>	Lq9 Lq16 Lq22
		<b>Inserción TATGATA presente</b>	Lq16
		<b>Ambas inserciones ausentes</b>	Fe3 Fe8 Fe13 Fe1 Fe19 Ct4 Ct12 Ct15 Ct17 Ct28 Im4 Im6 Im13 Im17 Im19 Ma1 Ma3 Ma8 Ma14 Ma27 On3 On8 On9 On16 On30 Hu2 Hu6 Hu23 Hu26 Hu29 Sa6 Sa9 Sa14 Sa26 Sa28 Ch1 Ch3 Ch6 Ch14 Ch28 Lq3 Lq8 Lq30 Ar4 Ar13 Ar23 Ar26 Ar29 Sf4 Sf7 Sf17 Sf24

#### **4.4. IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE NOTROS MEDIANTE LA RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS**

Para la determinación de los haplotipos, se procedió a hacer una relación entre los polimorfismos encontrados. En el caso de los notros, dos regiones polimórficas dentro de los fragmentos amplificados permitieron la identificación de 4 haplotipos. En la Tabla XIII se muestra la relación de todos los polimorfismos encontrados según la técnica utilizada para su detección asociados a un haplotipo determinado. Se muestra una lista de 1s y 0s para cada polimorfismo, lo cual significa presencia de la inserción para los 1s y ausencia de la inserción para los 0s según se indica en cada polimorfismo, lo que permite determinar los haplotipos indicados.

#### **4.5. IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE AVELLANOS MEDIANTE LA RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS**

Para la determinación de los haplotipos, se procedió a hacer una relación entre los polimorfismos encontrados. En el caso de los avellanos, tres regiones polimórficas dentro de los fragmentos amplificados permitieron la identificación de 4 haplotipos. En la Tabla XIV se muestra la relación de todos los polimorfismos encontrados según la técnica utilizada para su detección asociados a un haplotipo determinado. Se muestra una lista de 1s y 0s para cada polimorfismo, lo cual significa la presencia en el caso de los 1s y la ausencia en el caso de los 0s para la sustitución T/G y la presencia de la inserción para los 1s y ausencia de la inserción para los 0s en el caso de las inserciones GAATAAAA y TATGATA según se indica en cada polimorfismo, lo que permite determinar los haplotipos indicados.

**Tabla XIII. Identificación de los haplotipos en notros mediante la relación de los polimorfismos encontrados.**

<b>Inserción CATTAAAA</b> <b>Región intergénica</b> <b>trnH-psbA</b>	<b>Inserción AA</b> <b>Región intergénica</b> <b>psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>	<b>% Frecuencia</b>
0	0	I	50
1	0	II	5,2
0	1	III	42,1
1	1	IV	2,6

Se muestran los haplotipos I, II, III y IV según la combinación de los tipos de polimorfismos que se presentan. En el anexo 4A se muestra el detalle para cada individuo.

**Tabla XIV. Identificación de los haplotipos en avellanos mediante la relación de los polimorfismos encontrados.**

<b>Sustitución T/G Región intergénica trnH-psbA</b>	<b>Inserción GAATAAAA Región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Inserción TATGATA Región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>	<b>% Frecuencia</b>
0	0	0	I	85,7
1	0	0	II	8,9
0	1	0	III	3,6
0	1	1	IV	1,8

Se muestran los haplotipos I, II, III y IV según la combinación de los tipos de polimorfismos que se presentan. En el anexo 4B se muestra el detalle para cada individuo.

#### 4.6. RELACIÓN ENTRE LOS HAPLOTIPOS Y SU DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Para ver si existía relación entre los haplotipos y un lugar geográfico específico, una vez determinados los haplotipos de nosotros para cada individuo, como se muestra en la Figura 12, se confeccionó un mapa de distribución geográfica que al mismo tiempo muestra la distribución y frecuencia de los haplotipos para cada población en estudio. En la Tabla XV se muestran las frecuencias de los haplotipos para cada población.

Cuatro haplotipos fueron determinados, en base a la relación de los dos polimorfismos de interés, en los treinta y ocho individuos correspondientes a las nueve poblaciones analizadas.

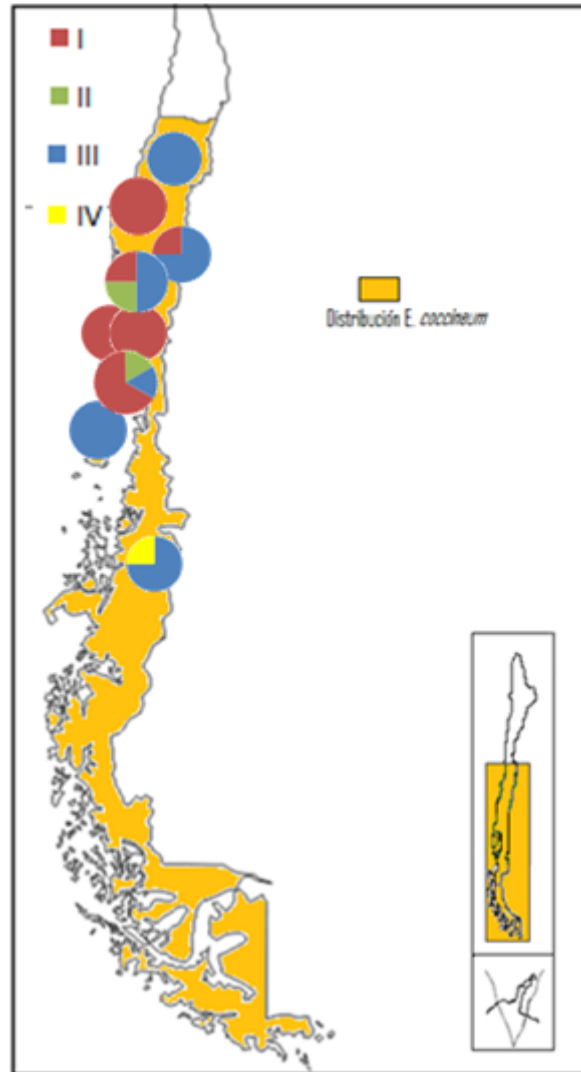
Los haplotipos I y III se presentan con mayor frecuencia y son los más dispersos, encontrándose presentes en seis poblaciones cada uno.

Tres de los haplotipos (I, II y III) fueron distribuidos en más de una población. Un haplotipo, el IV corresponde a una población específica, siendo exclusivo de la población Coyhaique y encontrándose en solo un individuo.

Un 55,5% de las poblaciones presentan solo un haplotipo, dos poblaciones correspondientes al haplotipo III y tres representantes del haplotipo I. De las nueve poblaciones muestreadas cinco (Chillán, Concepción, Valdivia, Los Lagos y Tocoihue) presentaron un solo haplotipo.

La población Loncoche y Puerto Montt presentan el mayor número de haplotipos, existiendo tres en cada una. De las nueve poblaciones muestreadas dos, Curacautín y Coyhaique, albergaron dos haplotipos y dos, Loncoche y Puerto Montt, tres haplotipos. De las nueve poblaciones muestreadas cinco (Chillán, Concepción, Valdivia, Los Lagos y Tocoihue) presentaron un solo haplotipo.

#### 4.6.1. Mapa de distribución de poblaciones y haplotipos de *Embothrium coccineum*



**Figura 12. Haplotipos y localización de las poblaciones de nosotros analizadas.** Los cuatro haplotipos se muestran en diferentes colores según se indica y sus frecuencias en cada población están representadas por los gráficos. (Detalles en Tabla XV).



**Tabla XV. Frecuencia de los haplotipos presentes en las distintas poblaciones de notros.**

Población	N° de individuos analizados	N° de haplotipos	Frecuencia de los haplotipos			
			I	II	III	IV
Chillán, (Chi)	4	1			1	
Concepción, (Co)	5	1	1			
Curacautín, (Cu)	4	2	0,25		0,75	
Loncoche, (Lo)	4	3	0,25	0,25	0,5	
Valdivia, (Curi)	5	1	1			
Los Lagos, (Pich)	3	1	1			
Puerto Montt, (PM)	6	3	0,66	0,16	0,16	
Tocoihue, (Ich)	3	1			1	
Coyhaique, (Coy)	4	2			0,75	0,25

El haplotipo I se encontró en diecinueve individuos en seis poblaciones distintas, lo que corresponde a un 50% de los individuos presentes en un 66,6% de las poblaciones.

El haplotipo II se encontró en dos individuos en dos poblaciones distintas, lo que corresponde a un 5,2% de los individuos presentes en un 22,2% de las poblaciones.

El haplotipo III se encontró en dieciséis individuos en seis poblaciones distintas, lo que corresponde a un 42.1% de los individuos presentes en un 66,6% de las poblaciones.

El haplotipo IV se encontró en un individuo en una población, lo que corresponde a un 2,6% de los individuos presentes en un 11,1% de las poblaciones.

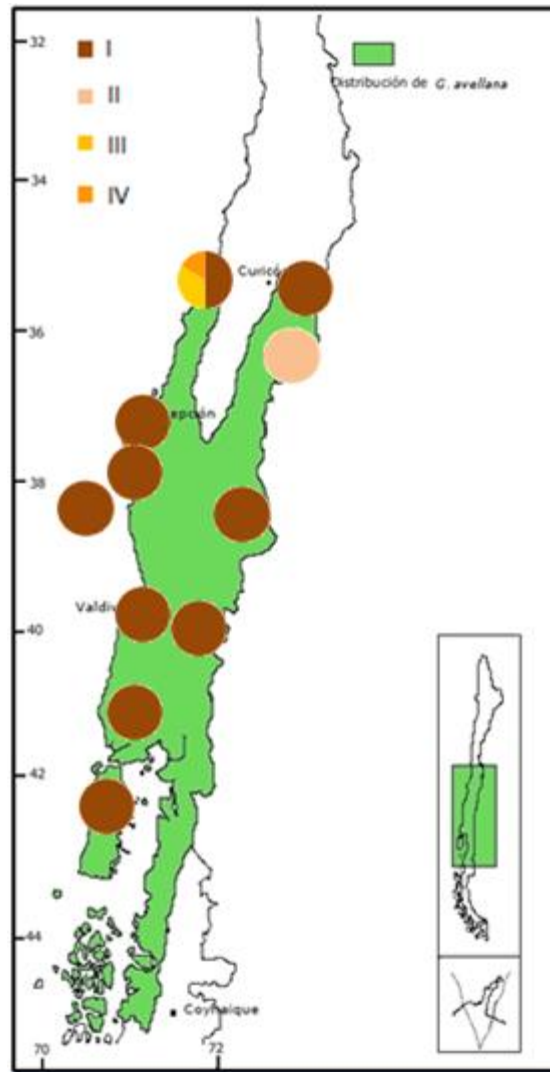
En avellanos, para ver si existía relación entre los haplotipos y un lugar geográfico específico, una vez determinados los haplotipos para cada individuo se confeccionó un mapa de distribución geográfica (Figura 13) que al mismo tiempo muestra la distribución y frecuencia de los haplotipos para cada población en estudio. En la Tabla XVI se muestran las frecuencias de los haplotipos presentes en cada población.

Cuatro haplotipos fueron determinados, en base a la relación de los tres polimorfismos de interés, en los 56 individuos correspondientes a las 11 poblaciones analizadas

El haplotipo I se presenta con mayor frecuencia y dispersión, fue el único distribuido en más de una población, se exhibió en 10 poblaciones.

La población Los Queules es la única que presenta más de un haplotipo, teniendo el I, III y IV entre sus individuos. El haplotipo III fue encontrado en tan solo dos individuos y el IV en un individuo.

#### 4.6.2. Mapa de distribución de poblaciones y haplotipos de *Gevuina avellana*



**Figura 13. Haplotipos y localización de las poblaciones de avellanos analizadas.** Los cuatro haplotipos se muestran en diferentes colores según se indica y sus frecuencias en cada población están representadas por los gráficos. (Detalles en Tabla XVI).

**Tabla XVI. Frecuencia de los haplotipos presentes en las distintas poblaciones de avellanos.**

Población	N° de individuos analizados	Número de haplotipos	fi de los haplotipos			
			I	II	III	IV
Los Queules, (Lq)	6	3	0,5		0,33	0,16
Armerillo, (Ar)	5	1	1			
San Fabián, (Sf)	5	1		1		
Fundo Escuadrón, (Fe)	5	1	1			
Contulmo, (Ct)	5	1	1			
Isla Mocha, (IM)	5	1	1			
Malleco, (Ma)	5	1	1			
Oncol, (On)	5	1	1			
Huilo Huilo, (Hu)	5	1	1			
Sajonia, (Sa)	5	1	1			
Dalcahue, (Ch)	5	1	1			

Los haplotipos II III y IV corresponden a una población específica. Estando los haplotipos III y IV presentes en la población Los Queules y el II presente en San Fabián, cada uno de manera exclusiva en su población.

De las 11 poblaciones muestreadas una, Los Queules, exhibió 3 haplotipos. Un 90,9% de las poblaciones presentan solo un haplotipo, nueve poblaciones para el haplotipo I y una para el haplotipo II.

El haplotipo I se encontró en 48 individuos en 10 poblaciones distintas, lo que corresponde a un 85,7% de los individuos presentes en un 90,9% de las poblaciones.

El haplotipo II se encontró en 5 individuos en 1 población, lo que corresponde a un 8,9% de los individuos presentes en un 9,09% de las poblaciones.

El haplotipo III se encontró en 2 individuos en 1 población, lo que corresponde a un 3,6% de los individuos presentes en un 9,09% de las poblaciones.

El haplotipo IV se encontró en 1 individuos en 1 población, lo que corresponde a un 1,8% de los individuos presentes en un 9,09% de las poblaciones.

## 5. DISCUSION

La estructura conservada (Palmer, 1986) y el alineamiento múltiple de tres especies de distinto orden pertenecientes a la clase Magnoliópsida, permitió el consenso de la selección de ocho partidores para la amplificación de diversas regiones polimórficas.

De los ocho partidores que se probaron en las especies en estudio, cinco (trhH-f/psbA-r y psbKf-GA o psbK-P1/trnS0r) resultaron en producto de amplificación, lo que nos indica que un 62,5 % de los partidores resultaron exitosos, además todos los fragmentos presentaron regiones polimórficas.

En trabajos anteriores (Kress, 2007; Fazecas, 2008; Erickson et al., 2008; Heinze, 2007) se había reportado una alta tasa de transferencia en distintas especies pertenecientes a diversas familias para los partidores que resultaron en una amplificación exitosa en las especies en estudio en los primeros ensayos de amplificación.

De los cinco partidores exitosos, se seleccionaron cuatro (psbA-r/trhH-f, y trnS0r/psbKf-GA) para amplificar regiones del genoma de individuos de ambas especies y enviar a secuenciar. Como psbK-P1/trnS0r amplificaba un fragmento más pequeño dentro del amplificado con los partidores trnS0r/psbKf-GA, y por lo mismo reportaría menos información, no se seleccionó en la primera etapa.

En nosotros, en la secuencia obtenida con el partidador psbA-r (anexo 3A y Figura 2), se encontró una región polimórfica la cual sirvió para la discriminación entre individuos mediante la amplificación del fragmento con los partidores psbA-r/trhH-f y un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.

En nosotros, en la secuencia del fragmento obtenido con los partidores trnS0r/psbKf-GA, se

encontró una región polimórfica (anexo 3B y Figura 3) la que fue suficiente para la discriminación entre individuos. Para analizar la región polimórfica se diseñaron dos partidores, psbK-P1 y NotroR, como los más adecuados para determinar los polimorfismos de interés luego de un análisis por genotipificación.

En avellanos, en la secuencia obtenida con el partidor psbA-r (anexo 3C y Figura 4), se encontró una región polimórfica la que sirvió para la discriminación entre individuos mediante la amplificación del fragmento polimórfico con los partidores psbA-r/trhH-f y un posterior análisis de restricción con la enzima *TasI*.

En avellanos, en la secuencia del fragmento obtenido con los partidores trnS0r/psbKf-GA, se encontraron cuatro regiones polimórficas (anexo 3D) de las cuales fueron seleccionadas dos (Figura 5) por ser suficientes para la discriminación entre individuos y además por que los tipos de polimorfismos eran más fáciles y económicos de identificar, ya que se trataban de inserciones de 7 y 8 pb que se podían identificar en un gel de agarosa, en comparación a las sustituciones de una base que se deben detectar mediante métodos más complejos como secuenciación o análisis de restricción. Para analizar las dos regiones polimórficas seleccionadas se eligieron dos partidores, ccmp2f y ccmp2r, como los más adecuados para determinar los polimorfismos de interés luego de un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.

Para la detección de cada polimorfismo de interés se determinó una técnica como la más adecuada según las características del mismo.

La presencia o ausencia de la inserción CATTA AAA en algunos individuos de notros, al igual que la presencia o ausencia de las inserciones GAATA AAA y TATGATA en algunos individuos de avellanos, se logró detectar mediante la amplificación por PCR de los fragmentos polimórficos con los partidores adecuados y una posterior electroforesis en gel de agarosa al 2,5% corrida a

50volt, el alto porcentaje de agarosa en el gel permite una mejor separación de los fragmentos más pequeños de DNA y una mejor resolución del tamaño de la molécula de DNA, y el bajo voltaje de corrida es necesario para que ocurra una adecuada separación de las bandas entre individuos, de manera que se logre un gran distanciamiento de las bandas para comparar individuos que tienen diferencias de 7, 8 o 15pb.

La presencia o ausencia de la inserción AA en algunos individuos de notro se logró identificar mediante una PCR anidada con los partidores psbK-P1-M13/NotroR desde un fragmento previamente amplificado con los partidores psbKf-GA/trnS0r para luego realizar una genotipificación, ésta técnica se determinó como la más adecuada ya que no se puede lograr una diferenciación de 2 pb en un gel de agarosa y tampoco era factible utilizar una enzima de restricción por las características del fragmento a reconocer, ya que en el caso de todos los individuos el fragmento es igual con respecto al tipo de bases, siendo diferente en el largo. Por lo mismo se optó por la genotipificación que es una técnica eficiente y que cumple con los requerimientos para resolver el polimorfismo, además en este trabajo permitió la determinación de dos muestras a la vez por la incorporación de dos fluoróforos distintos, uno para cada secuencia de individuos distintos, las que se procesan juntas en una misma muestra para genotipificación.

La presencia o ausencia de la sustitución T/G en algunos individuos de avellano, se pudo detectar mediante la amplificación del fragmento polimórfico con los partidores trnH-f/psbA-r y un posterior análisis de restricción con la enzima *TasI*. Esta técnica es la más adecuada para la detección del polimorfismo, ya que al tratarse de una transversión ocurre un cambio en la secuencia del segmento reconocido por la enzima y esto puede detectarse con la enzima adecuada en un gran número de muestras de manera rápida. Si bien se necesita bastante producto de PCR



para su detección, esto no necesariamente representa un problema ya que la cantidad inicial de DNA es la misma.

En todos los casos de este trabajo, la secuenciación hubiera sido la técnica más íntegra, pero se eligieron las técnicas que fueran suficientes para evidenciar los polimorfismos.

La caracterización y relación de los polimorfismos permitió la identificación de cuatro haplotipos en cada especie. En el caso de los notros, dos regiones polimórficas dentro de los fragmentos amplificados permitieron la identificación de cuatro haplotipos y en el caso de los avellanos, tres regiones polimórficas dentro de los fragmentos amplificados permitieron la identificación de 4 haplotipos.

En notros, de las nueve poblaciones estudiadas, tres presentan el haplotipo I sin mostrar variación genética intrapoblacional, correspondientes a un 33,3% del total de las poblaciones. Además, dos poblaciones presentan el haplotipo III sin mostrar variación genética intrapoblacional, lo que corresponde a un 22,2% de las poblaciones. Esto nos indica que un 55,5% de las poblaciones presenta solo un haplotipo, lo cual ha sido observado en estudios similares del cpDNA en otras especies como se muestra en Kelleher *et al.*, 2004, Gong *et al.*, 2011 y Zhou *et al.*, 2010.

Los haplotipos I y III se encuentran en seis poblaciones cada uno, siendo los más dispersos y presentándose como dominantes.

El haplotipo IV se presenta en un solo individuo y es exclusivo de la población Coyhaique, la población más austral estudiada, también se encontraron haplotipos exclusivos en los estudios del genoma del cloroplasto de otras especies en Artyukova *et al.*, 2011 y Zhou *et al.*, 2010.

Las poblaciones Loncoche y Puerto Montt, fueron caracterizadas con un alto nivel de polimorfismo en el cpDNA, siendo Loncoche dominante con respecto al haplotipo III con una frecuencia del 50% y siendo Puerto Montt dominante con respecto al haplotipo I con una

frecuencia del 66,6%.

Las poblaciones Curacautín y Coyhaique también fueron caracterizadas como polimórficas, aunque en un menor grado, siendo ambas dominante con respecto al haplotipo III con una frecuencia del 75%. Este patrón de alto nivel de polimorfismo y dominancia de uno o dos haplotipos fue observado en estudios similares en Artyukova *et al.*, 2011 y Kato *et al.*, 2011.

En avellanos, de las once poblaciones estudiadas, nueve presentan el haplotipo I sin mostrar variación genética intrapoblacional, estas correspondientes a un 81,8% del total de las poblaciones. Además, una población presenta el haplotipo II sin mostrar variación genética intrapoblacional, lo cual corresponde al 9,09% de las poblaciones. Un 90,9% de las poblaciones presenta solo un haplotipo coincidente con lo observado en Kelleher *et al.*, 2004, Gong *et al.*, 2011 y Zhou *et al.*, 2010.

El haplotipo I es dominante y de más amplia distribución, estando presente en diez poblaciones a lo largo de toda el área de distribución de la especie como se observó en el estudio del cpDNA de otra especie en Kelleher *et al.*, 2004.

El haplotipo II es exclusivo de la población San Fabián, presentándose en todos sus individuos.

Los haplotipos III y IV son exclusivos de la población Los Queules, la cual fue caracterizada con un alto nivel de polimorfismo intrapoblacional en el cpDNA, siendo el haplotipo I el dominante en la población con una frecuencia del 50%, seguido de los haplotipos III y IV con frecuencias del 33 y 16% respectivamente, similar a lo observado en algunas de las poblaciones del estudio de Artyukova *et al.*, 2011.

La distribución actual de las especies tuvo un gran impacto debido al avance y retroceso de los hielos a través de los múltiples ciclos glaciares, principalmente durante la LGM alrededor de 23.000 a 18.000 años atrás (Webb y Bartlein, 1992; Hewitt, 2003). En los Andes se formó

una capa de hielo alargada que se extendió más de 1800 kilómetros entre las latitudes 38°S y 56°S (Holling y Schilling, 1981; Miller, 1976; Sudgent *et al.*, 2002) la cual se extendió sobre gran parte de la actual superficie de tierra de Chile hacia el sur alrededor de los 43°S y sobre a mayoría de la depresión intermedia, proporcionando una pequeña extensión para la supervivencia de los bosques (Villagrán *et al.*, 1995). La costa permaneció en gran medida libre de hielo desde la latitud 42° hacia el norte (Veit y Garleff, 1995; Muellner *et al.*, 2005), datos mostrados en el anexo 5.

Registros paleontológicos, palinológicos y datos biogeográficos sugieren que la mayoría de la biota, principalmente especies templadas, persistieron a través de la LGM en refugios de menor latitud, donde las condiciones climáticas eran menos extremas (Bennet *et al.*, 1991). Siguiendo el retroceso de los glaciares desde su máxima extensión, las poblaciones se han expandido desde sus refugios glaciares (Villagrán, 1991). El aislamiento dentro de refugios reduce la distribución geográfica y las poblaciones, resultando en una marca genética característica de alta diversidad genética dentro y alta disimilitud entre poblaciones de refugios (Hewitt, 1996 y 2004; Comes y Kadereit, 1998).

De acuerdo a la revisión de diversos autores, (Hewitt, 1996, 2000 y 2004; Provan y Bennett, 2008; Maggs *et al.*, 2008) se encontró que existe un bajo nivel de estructura genética en poblaciones de regiones históricamente glaciadas versus una relativamente alta estructura genética en regiones no glaciadas en un amplio rango de taxas marinas y terrestres, lo cual es una marca de recolonización postglaciar. Las áreas colonizadas se esperan que alberguen solo un subconjunto de su pool de genes de origen y diversidad genética (Hewitt, 1996 y 2000; Soltis *et al.*, 1997; Taberlet *et al.*, 1998). Esto coincide con lo encontrado en dos de las poblaciones de nosotros estudiadas, Loncoche y Coyhaique (situada en el límite de la LGM), las cuales presentan

una mayor diversidad genética que el resto de las poblaciones y se encuentran en zonas que no fueron afectadas por la LGM, por lo que se plantea que la especie sobrevivió en esos lugares que habrían actuado como posibles refugios durante la LGM y que sirvieron como poblaciones de origen para colonizaciones postglaciares. La recolonización se propone que habría ocurrido a partir de la zona de Loncoche en dirección a la Cordillera de los Andes.

La pérdida de variación de las poblaciones de Chillán y Curacautín se puede atribuir a una severa reducción en el tamaño de las poblaciones durante el último periodo glacial (Fowler y Morris, 1977) a pesar de su probable supervivencia en ambas zonas debido a la tolerancia al frío de la especie.

En dirección hacia la Costa desde la población Loncoche, la Cordillera de Nahuelbuta habría actuado como una barrera natural impidiendo la migración de la especie hacia la zona costera, además la posibilidad de flujo génico a través de la dispersión de las semillas por el viento es poco probable hacia esa zona, ya que la dirección del viento en esa región es de oeste a este (Marchelli y Gallo, 2006). Por lo mismo no se encontraron todos los haplotipos de Loncoche en las poblaciones de Concepción y Curiñanco.

La población de Coyhaique, que durante la LGM se encontraba en el límite de ésta, también se plantea como un posible refugio ya que en ella se encuentra un individuo con un haplotipo exclusivo de la región, posiblemente el mismo haplotipo podría encontrarse en zonas aledañas en las laderas del este de los andes en Argentina debido a la migración como se plantea que ocurrió con *Hypochaeris palustris* en Muellner *et al.*, 2005.

Con respecto a Puerto Montt, a pesar de encontrarse en un área afectada por la LGM, posee un mayor grado de diversidad que la mayoría del resto de las poblaciones, esto se asocia a que probablemente ésta área fue colonizada por más de un refugio, tal como se ha observado en otras

ocasiones como se plantea en (Muellner *et al.*, 2005). Probablemente la colonización en esa área ocurrió tanto desde poblaciones de la costa como del norte, ya que se observan similitudes genéticas provenientes de ambos sectores.

A nivel global, se observa un predominio del haplotipo III en la región de los Andes y del haplotipo I en la región de la costa.

Muchas de las glaciaciones que ocurrieron causaron la extinción-migración de la flora hacia el norte y hacia elevaciones más bajas (Vuilleumier, 1971; Simpson, 1975, 1979 y 1983; Villagrán *et al.*, 1995 y 1998; McCulloch *et al.*, 2000). Evidencia desde análisis de polen sugieren que durante la última era glacial, los bosques templados de América del Sur fueron reducidos a pequeños refugios en varias localidades costeras en Chile central-sur (Markgraf *et al.*, 1995). Los bosques continuos se restringieron a la costa, a valles no glaciados y tierras bajas en latitudes entre los 30°S y 38°S donde las bajas temperaturas eran moderadas por las influencias oceánicas (Villagrán, 2001).

En las poblaciones de avellanos estudiadas, se observa que la mayor diversidad se encuentra en la zona norte de su área de distribución entre los 35°S y 36°S. La mayor diversidad se encontró en la población los Queules en los 35° 50'S. Estos datos coinciden con lo reportado en otro trabajo donde se estudiaron microsatélites del genoma nuclear en la misma especie (Díaz, 2010) en el cual se reporta una disminución de la diversidad genética en las poblaciones de norte a sur. Evidencia del mismo patrón de una mayor diversidad en la zona norte, ha sido reportado en especies como *Nothofagus obliqua* en Argentina. (Donoso *et al.*, 2004) y en análisis de ISSR en Copihue en Chile (Hoffens, 2009).

Respecto a las poblaciones de Armerillo y San Fabián, por estar ubicadas en valles, son poblaciones propensas a tener menor diversidad genética tal como los resultados de este estudio.

Además San Fabián presenta características únicas con respecto al resto de las poblaciones, y basándonos en que la mutación de transversión presente en el genoma de sus individuos es única con respecto al resto de los individuos, tanto de avellanos como de notros y asumiendo que en algún momento estas especies derivaron de un ancestro en común, se plantea al haplotipo II como el más reciente en aparecer.

## 5.1 CONCLUSIONES

Existe diversidad genética a nivel del genoma del cloroplasto en ambas especies estudiadas, lo que permitió la identificación de haplotipos y su asociación a regiones geográficas.

En notros, se plantea que al menos la especie sobrevivió en posibles refugios durante la LGM en las poblaciones de Loncoche y Coyhaique, esto debido a la alta diversidad y a la presencia de haplotipos exclusivos respectivamente.

Existe un predominio del haplotipo I en las regiones cercanas a la costa y del haplotipo III en zonas cercanas a los Andes.

En avellanos, la mayor diversidad se encuentra en la zona norte de su área de distribución entre los 35°S y 36°S, siendo la población Los Queules la que presenta mayor diversidad intrapoblacional por lo cual se plantea como posible refugio.

En avellanos por sus características genéticas se plantea al haplotipo II, presente en la población de San Fabián, como el más reciente en aparecer.

La diversidad genética es fundamental para la mantención de la biodiversidad, por lo que debe ser prioritaria su conservación. En los avellanos, existe una distribución fragmentada, la mayor diversidad se encontró en sectores reducidos, en contraste con los notros que presentan una

distribución continua con lo que hay mayor flujo génico y se observó una alta diversidad en sectores más amplios, con estos antecedentes se puede concluir que la conservación es prioritaria para la especie *Gevuina avellana*.

El análisis del genoma del cloroplasto provee información de la dinámica de la población, la cual es complementaria a la obtenida desde el genoma nuclear y mitocondrial, por lo que la información proporcionada en este trabajo contribuiría como material adicional fundamental en otras investigaciones para lograr un trabajo más íntegro e informativo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, M.C. and Premoli, A.C. (2009). Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 54, 235–242.

Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.*, 27, 617–631.

Al-Janabi, S. M., McClelland, M., Petersen, C. and Sobral, B. W. S. (1994). Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: Saccharinae. *Theor. Appl. Genet.*, 88, 933–944.

Arismendi, N., Andrade, N., Riegel, R. and Carrillo, R. (2010). Presence of a phytoplasma associated with witches' broom disease in *Ugni molinae turcz.* and *Gaultheria phillyreifolia* (pers.) sleumer determined by DAPI, PCR, and DNA sequencing. *ChileanJAR.*, 70, 26–33.

Artyukova, E.V., Kozyrenko, M.M., Kholina, A.B. and Zhuravlev, Y.N. (2011). High chloroplast haplotype diversity in the endemic legume *Oxytropis chankaensis* may result from independent polyploidization events. *Genética*, 139, 221–232.

Bennett, K.D., Tzedakis, P.C. and Willis, K.J. (1991). Quaternary refugia of north European trees. *J. Biogeogr.*, 18, 103–115.



Bremer, B., Bremer, K., Heidari, N., Erixon, P., Olmstead, R.G., Anderberg, A.A., Källersjö, M. and Barkhordariana, E. (2002). Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 24, 274–301.

Chalcoff, V.R., Ecurra, C. and Aizen, M.A. (2008). Uncoupled Geographical Variation between Leaves and Flowers in a South-Andean Proteaceae. *Ann. Bot.*, 102, 79–91.

Comes, H. P. and Kadereit, J.W. (1998). The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant Sci.*, 3, 432–438.

Diaz, L. (2010). Determinación de la diversidad y estructura genética en poblaciones de avellano *Gevuina avellana* mol. mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites de secuencias expresadas (EST–SSR). Tesis de magister, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, 97pp.

Donoso, C. (1993). Bosques templados de Chile y Argentina Variación estructura dinámica. Universitaria, Santiago. 483p.

Donoso, C., Premoli, A., Gallo, L.A. and Ipinza, R. (2004). Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Universitaria, Santiago. 420p.

Donoso, C., Gallo, L., Donoso, P. and Azpilicueta, M. (2004). Variación en *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. En: Donoso, C., Premoli, A., Gallo, L.A. and Ipinza, R. Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. 79–114 Universitaria, Santiago.

Donoso, C. (2005). Árboles nativos de Chile. Guía de Reconocimiento. 4° Ed. Marisa Cuneo, Valdivia. 136p.

Erickson, D.L., Spouge, J., Resch, A., Weigt, L.A. and Kress, W.J. (2008). DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success. *Taxon*, 57, 1304–1316.

Escudero, A., Iriondo, J.M. and Torres, M.E. (2003). Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biol. Conserv.*, 113, 351–365.

Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M. and Barrett, S.C.H. (2008). Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PLoS One*, 3(7):e2802.

Fowler, D.P. and Morris, R.W. (1977). Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. *Can. J. Forest Res.*, 7, 343–347.

Ford, C.S., Ayres, K.L. Toomey, N., Haider, N., Van Alphen Stahl, J., Kelly, L.J., Wikström, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R.J., Hoot, S.B., Cowan, R.S., Chase, M.W. and Wilkinson, M.J. (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Bot. J. Linn. Soc.*, 159, 1–11.

Fujii, N., Ueda, K., Watano, Y., and Shimizu, T. (1997). Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Pedicularis chamissonis* Steven (Scrophulariaceae) and geographic structuring of the Japanese “alpine” plants. *J. Plant Res.*, 110, 195–207.

Gong, X., Luan, S., Hung, K., Hwang, C., Lin, C., Chiang, Y. and Chiang, T. (2011). Population structure of *Nouelia insignis* (Asteraceae), an endangered species in southwestern China, based on chloroplast DNA sequences: recent demographic shrinking. *J. Plan. Res.*, 124, 221–230.

Goremykin, V., Hirsch-Ernst, K.I., Wolf, S. and Hellwig, F.H. (2003). The chloroplast genome of the “basal” angiosperm *Calycanthus fertilis* – structural and phylogenetic analyses. *Plant Syst. Evol.*, 242, 119–135.

Griffiths, A. (2000). *Genética Moderna*. McGraw – Hill–Interamericana, España. 676p.

Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G.G., Petit, R.J. (2001). Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Mol. Ecol. Notes*, 1, 345–349.

Hamilton, M.B. (1999). Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.*, 8, 521-523.

Hansen, D.R., Dastidar, S.G., Cai, Z., Penafior, C., Kuehl, J.V., Boore, J.L. and Jansen, R.K. (2007). Phylogenetic and evolutionary implications of complete chloroplast genome sequences of four early-diverging angiosperms: *Buxus* (Buxaceae), *Chloranthus* (Chloranthaceae), *Dioscorea* (Dioscoreaceae), and *Illicium* (Schisandraceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 45:547–563.

Heinze, B. (2007). A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods*, 3:4.

Hewitt, G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.*, 58, 247–276.

Hewitt, G.M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913.

Hewitt, G.M. (2003). Ice ages: their impact on species distributions and evolution. En: Rothschild, L., Lister, A. *Evolution on Planet Earth*: 339–361, Academic Press, London.

Hewitt, G.M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans.*, 358, 183–196.

Hoffman, A. (1982). Flora Silvestre de Chile, Zona Araucana. 4ª Ed. Fundación Claudio Gay, Santiago. 258p.

Hollin, J.T. and Schilling, D.H. (1981). Late Wisconsin-Weichselian mountain glaciers and small ice caps. En: Denton, G.H. and Hughes, T.J. The Last Great Ice Sheets: 179–220. Wiley, New York.

Hoffens, K. (2009). Diversidad genética en poblaciones de copihue (*Lapageria rosea* Ruiz et Pav.) Determinada a través de marcadores moleculares. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 107 pp.

Hollingsworth, M.L., Clark, A.A., Forrest, L.L., Richardson, J., Pennington, R.T., Long, D.G., Cowan, R., Chase, M.W., Gaudeul, M. and Hollingsworth, P.M. (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol. Ecol. Resour.*, 9, 439–457.

Honjo, M., Ueno, S., Tsumura, Y., Washitani, I. and Ohsawa, R. (2004). Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. *Biol. Conserv.*, 120, 211–220.

Izco Sevillano, J. (1997). Botánica. Mc.Graw-Hill, Madrid. 781p.

Jiménez, P. and Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Invest. Agr. Sist. Recur. For.*, 9, 237–248.

Kato, S., Iwata, H., Tsumura and Mukai, Y. (2011). Genetic structure of island populations of *Prunus lannesiana* var. *speciosa* revealed by chloroplast DNA, AFLP and nuclear SSR loci analyses. *J. Plan. Res.*, 124, 11–23.

Kelleher, C.T., Hodkinson, T.R., Kelly, D.L. and Douglas, G.C. (2004). Characterisation of chloroplast DNA haplotypes to reveal the provenance and genetic structure of oaks in Ireland. *Forest. Ecol. Manag.*, 189, 123–131.

Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS*, 102, 8369-74.

Kress, W.J. and Erickson, D.L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnHpsbA* Spacer Region. *PLoS One*, 2(6):e508.

Lewin, B. (2001). *Genes VII*. Marban, Madrid. 990p.

Maggs, C.A., Castilho, R., Foltz, D., Henzler, C., Jolly, M.T., Kelly, J., Olsen, J., Perez, K.E., Stam, W., Vainola, R., Viard, F. and Wares, J. (2008). Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology*, 89, 108–122.

Marchelli, P. and Gallo, L. (2006). Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conserv. Genet.*, 7, 591–603.

Markgraf, V., McGlone, M., and Hope, G. (1995). Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems—a southern perspective. *Trends. Ecol. Evol.*, 10, 143–147.

McCulloch, R.D., Bentley, M.J., Purves, R.S., Hulton, N.R.J., Sudgen, D.E. and Clapperton, C.M. (2000). Climatic inferences from glacial and palaeoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *J. Quaternary Sci.*, 15, 409–417.

Miller, A. (1976). The climate of Chile. En: Schwerdtfeger, W. *Climates of Central and South America*: 113–145. Elsevier, Amsterdam.

Moreno, S., Gorgoncena, Y. and Ortiz, J.M. (1997). The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hortic.-Amsterdam*, 62, 237–243.

Moritz, C. and Faith, D.P. (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol. Ecol.*, 7, 419–429.

Moritz, C. (1999). Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas.*, 130, 217–228.

Muellner, A.N., Tremetsberger, K., Stuessy, T. and Baeza, C.M. (2005). Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern andes: insights from *Hypochoeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Mol. Ecol.*, 14, 203–212.

Palmer, J.D., Stein, D.B. (1986). Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. *Curr. Genet.*, 10, 823–833.

Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., van Dam, B., Deans, J.D., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M.H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B. and Kremer, A. (2002). Chloroplast DNA variation in European white oaks Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest. Ecol. Manag.*, 156, 5–26.

Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., and Vendramin, G.G. (2005) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.*, 14, 689–701.

Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N.J., Goldstein, D.B. and Powell, W.A. (1999). Low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153, 943–947.

Provan, J. and Bennett, K.D. (2008). Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends. Ecol. Evol.*, 23, 564–571.



- Rafalski, J.A. (2002). Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based Approaches. *Plant Sci.*, 162, 329–333.
- Robert K. (1991). *Evolution at the Molecular Level*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. 350p.
- Rodríguez, R. (1983). *Flora arborea de Chile*. Universidad de Concepción, Concepción. 408p.
- Rovere, A.E., Smith-Ramírez, C., Armesto, J.J. and Premoli, A.C. (2006) Breeding system of *Embothrium coccineum* (Proteaceae) in two populations on different slopes of the Andes. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 79, 225–232.
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T., Smith, W.A.m(1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol. Ecol.*, 7, 465–474.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.*, 18, 233–234.
- Schulman, A.H. (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158, 313–321
- Shorrocks, B. (1978). *The Genesis of Diversity*. Hodder and stoughton. Londres. 150p.
- Simpson, B.B. (1975). Pleistocene changes in the flora of the high tropical Andes. *Palaeobiology*, 1, 273–294.

Simpson, B.B. (1979). Quaternary Biogeography of the High Montane Regions of South America. En: Duellman, W.E. The South American Herpetofauna: its Origin, Evolution, and Dispersal: 157–187. University of Kansas, Lawrence, Kansas.

Simpson, B.B. (1983). An historical phytogeography of the high Andean flora. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 56, 109–122.

Smith-Ramirez, C. and Armesto, J.J. (2003). Foraging behaviour of bird pollinators on *Embothrium coccineum* (Proteaceae) trees in forest fragments and pastures in southern Chile. *Austral Ecol.*, 28, 53–60.

Soltis, D.E., Gitzendanner, M.A., Streng, D.D. and Soltis, P.A. (1997). Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Syst. Evol.*, 206, 353–373.

Souto, C.P. and Premoli, A.C. (2007). Genetic variation in the widespread *Embothrium coccineum* (Proteaceae) endemic to Patagonia: effects of phylogeny and historical events. *Aust. J. Bot.*, 55, 809–817.

Stearns, S. (2000). Evolution an Introduction. Oxford University, Oxford. 381 p.

Strasburger, E. (1994) Tratado de Botánica. 8ªEd. Omega, Barcelona. 1068.

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G. and Cosson, J.F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.*, 7, 453–464.

Sugden, D.E., Hulton, N.R.J. and Purves, R.S. (2002). Modelling the inception of the Patagonian icesheet. *Quatern. Int.*, 95-96, 55–64.

Veit, H. and Garleff, K. (1995). Evolución del paisaje cuaternario y los suelos en Chile central-sur. En: Armesto, J.J., Villagrán, C. and Arroyo, M.K. *Ecología de Los Bosques Nativos de Chile*: 29-50. Universitaria, Santiago.

Villagran, C. (1991). Historia de los bosques templados del sur de Chile durante el Tardiglacial y Postglacial. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 64, 447–460.

Villagrán, C., Moreno, P. and Villa, R. (1995). Antecedentes Palinológicos acerca de la Historia Cuaternaria de los Bosques Chilenos. En: Armesto, J.J., Villagrán, C. and Arroyo, M.K. *Ecología de Los Bosques Nativos de Chile*: 51–70. Universitaria, Santiago.

Villagrán, C., Le-Quesne, C., Aravena, J.C., Jiménez, H. and Hinojosa, F. (1998). El rol de los cambios de clima del Cuaternario en la distribución actual de la vegetación de Chile central-sur. *Bamberger Geographische Schriften*, 15, 227–242.

Villagrán, C., (2001). Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de La Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 74, 793–803.

Vuilleumier, B.S. (1971). Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science*, 173, 771–780.

Ward, S.M., Gaskin, J.F. and Wilson, L.M. (2008). Ecological Genetics of Plant Invasion: What Do We Know. *IPSM.*, 1, 98–109.

Webb, T. and Bartlein, P.J. (1992). Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic response. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.*, 23, 141–173.

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

Whittemore, A.T. and Schaal., B.A. (1991). Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2540–2544.

Wolfe K.H., Li, W.H. and Sharp, P. M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 9054–9058.

Young, A. (2000). Forest conservation genetics: principles and practice. *CSIRO-CABI*, Australia. 39–59.

Zhou, T., Li, S., Qian, Z., Su, H., Huang, Z., Guo, Z. Dai, P., Liu, Z., and Zhao, G. (2010). Strong phylogeographic pattern of cpDNA variation reveals multiple glacial refugia for *Saruma henryi* Oliv. (Aristolochiaceae), an endangered herb endemic to China. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 57, 176–188.

## 7. ANEXOS

## ANEXO 1

**Alineamiento múltiple de la región intergénica trnH-psbA de las especies *Platanus occidentalis*, *Vitis vinifera* y *Drimys granadensis*.**

```

                                trnH-f2 ACTGCCTTGATCCACT
                                trnH-f   CGCGCATGGTGGATTCAATCC-->
Drimysgranadensis GCGAACGACGGGAATTGAACCCGCGCATGGTGGATTCAATCCACTGCCTTGATCCACT 60
Vitis              GCGAACGACGGGAATTGAACCCGCGCATGGTGGATTCAATCCACTGCCTTGATCCACT 60
Platanusoccidentalis GCGAACGACGGGAATTGAACCCGCGCATGGTGGATTCAATCCACTGCCTTGATCCACT 60
*****
TGGC-->
Drimysgranadensis TGGCTACATCCGCCCTCCTCTCTCTCTAAAGCTAAAGGAGT----CAATCTCCTTTAAA 116
Vitis             TGGCTACATCCGCCCTCTACTAT---TCACATTACAAGAAA----TAACAAATTGAAA 113
Platanusoccidentalis TGGCTACATCCGCCCTACTTTTTCAAAAAATAATGGAATTTCTACCATTCATCAT 120
*****          * * * * *
Drimysgranadensis GGATAAAATTT-----CTACCATACA-----ATTAATTATTATTGTATTGAGTG 160
Vitis             AGATTAAATTT-----CCACCAT-----TCATCATGTT----- 141
Platanusoccidentalis TATTTAAATTTAGTTTTCTTGCTTTCATTCTGAAATACAGGTCTTAAACATAAAATGCC 180
* * * * *          *   **          * * *
Drimysgranadensis TTTCTTATTGAGTCTTTC-----TTACTTTCTTTCATACTGAGATACAT-----GGACA 209
Vitis             -TTTTTATTA-----TC-----TTACTTT---AAGATTAAGGTAT-T-----AAACA 178
Platanusoccidentalis AATCCTGTAACGTACACAAAAATGACTTAAAAAAGTCAAAAGATTTTCGAGGAAGATA 240
* * * * *          *   * * * * *   * * * * *
Drimysgranadensis TACAATACCAATAAAGTCATTTTTATTTTTAGGAACGTACATTAATTTTCAGATTG---- 264
Vitis             -----
Platanusoccidentalis TATTAATATATTACAATATATTACATATTACATAATATATATATATTACATAATATAT 300
Drimysgranadensis ATACAGAACAAAAGTAT---GATATT-----CGATCATGAACTAACCAACAAT- 309
Vitis             --ACAAAACCAAAGTAT---GATACT-----CAGTCATAAACCAACCTATGAG- 221
Platanusoccidentalis ATATATATTTAATATATTAAATATTTCTAAATATTTCAATTTATAAATACATTACAGAT 360
* * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
Drimysgranadensis -AATATTTTCTTAAGTTGAAGTAAATCAACTTTATTTTCAT---AGTCAAT----- 355
Vitis             -AATACTTTT---ATT---ACTATTTTAGTTTTAGTTGA-----AATAAAG----- 261
Platanusoccidentalis TAGTACGAACCTAAAATGAAATACTCAATCATAAACCAACCCGTAGTAATGTTTTACTT 420
* * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
Drimysgranadensis -AAAAAAAAAAAA---GGAGTAATCAGCTGTGAATAAAACACTACTCAATGGACCATGGA 412
Vitis             -AATAAAAAAAAACTTAGAAAAAGTAAAAGACTACTAAGATAAATAAAAGACTACTAATA 320
Platanusoccidentalis AAGTTGAAAGTAAAGAAAGGAAAATGGAATAACTTATGTGAGTAAACCATTAATAATA 480
* * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
Drimysgranadensis AC-----AGAGCAATACCAAACTCTTGATATATCAAGAAATGGGATTGCTCCTT-- 464
Vitis             AA-----GGAGCAATACCATCCCTTGATAAAAAGGAAATGGTTATTGCTCCTTTA 374
Platanusoccidentalis AAAATAAAGGAGCAATACCAACTCTCTTGATAGAACAAAGAAATCGGGATTGCTCCGTGA 540
* * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
Drimysgranadensis ----CAACGCCTCGTATACTAACACCGAAGTATTAATTTGTAGATGGAGCTTCGA 520
Vitis             CATTCAAAAACCTCGTAAACACTAAGACGGAATCTTATCCATTTATAGATGGAGCTTCAA 434
Platanusoccidentalis ACTTCAACGACTCGTATACACTAAGACCGAAGTCTTATCCATTTGTAGATGGGGCTTCAA 600
***          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *

```

```

                                PSBar <--GAGCATTACGTTTCATGCATAAC
Drimysgranadensis CAGCAGCTAGGTCTAGAGGGAAATTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAACTTCCATACCAA 580
Vitis CAGCAGCTAGATCTAGAGGGAAATTATGAGCATTACGTTTCATGCATAACTTCCATACCAA 494
Platanusoccidentalis CAGCAGCTAGATCTAGAGGGAAATTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAACTTCCATACCAA 660
*****
Drimysgranadensis GGTTAGCACGGTTGATGATATCAGCCCAAGTGTAAATACACGACCTTGACTATCAACTA 640
Vitis GGTTAGCACGGTTGATAATATCAGCCCAAGTATTAATTACACGACCTTGCTATCAACTA 554
Platanusoccidentalis GGTTAGCACGGTTGATGATATCAGCCCAAGTGTAAATACACGACCTTGACTGTCAACTA 720
*****
Drimysgranadensis CAGATTGGTTGAAATTGAAACCATTTAGGTTGAAAGCCATGGTGCTAATACCTAAAGCAG 700
Vitis CAGATTGGTTGAAATTGAAACCATTTAGGTTGAAAGCCATAGTGCTGATACCTAAAGCAG 614
Platanusoccidentalis CAGATTGGTTGAAATTGAAACCATTTAGGTTGAAAGCCATGGTGCTGATACCTAAAGCAG 780
*****
Drimysgranadensis TGAACCAGATACCTACTACAGGCCAAGCAGCTAGGAAGAAATGTAAAGAACGAGAATTGT 760
Vitis TGAACCAGATACCTACTACAGGCCAAGCAGCTAGGAAGAAATGTAAAGAACGAGAATTAT 674
Platanusoccidentalis TGAACCAGATACCTACTACAGGCCAAGCAGCTAGGAAGAAATGTAAAGAACGAGAATTGT 840
*****

```

La secuencia correspondiente a un fragmento polimórfico de aproximadamente 650 a 850pc. En la secuencia se muestran los partidores a utilizar.





Platanusoccidentalis ATTTATTCAATAAAAAA----ATTCTAACA-----ATCGATAAG-TCAGATAA-GTCT 681  
Vitis ATTTCTTCGA-GAAAAAA-----ATTCTAACA-----ATTGATAAGATTAGAAAA-ATCT 684  
Drimysgranadensis ATTGATTGATAAAATCAATTCATTTCAACAATTCATAAAGATTGATAAGATCAGATAATGTCT 689  
\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis TACATTATGAACCCCTCGATGCAAAACATTGAAATTC-----TTGGATAGCCACAATA 733  
Vitis TAGATTATGAACCCCTCAATTAACAATTCGAAAGTCAA--AGTATCGGATAGTCGCAATAA 742  
Drimysgranadensis TACATTATGAACCCCTCGATTCAAAGATTGAAATTCCTTTGATTTTTGATAGCCGCGATGA 749  
\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis A-----TCTGGATCACCCTCATTTCGCCATTCTGACCCTCTACTTCCAGTGAAACAAGAAC 787  
Vitis A-----TCTGTATCACCTCAT--CTAACCCCT--TTCCTTTTCCAGTGAAAGGCACT 791  
Drimysgranadensis AGATGAATCTGGATCACCTAATTTCCGCATTTGCCCCTCCAGTCCAGGGGTCAAAGAC 809  
\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis CCTA-TTAGGGTCCCCACAATTAGATAAGATATTGTGGATATGA-AAGAGAGTTTTGAT 845  
Vitis ATTAATTAGGGTCCCCACAAT-ATCTAA----TTGTGGGTATGA-AAGAAAATTTTGGC 845  
Drimysgranadensis CCTATATATGGTACCCCAATAAT-ACCTAA----TTG-GGGTATGACAAGATAAATTTGGT 863  
\*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis AAAGAAAGAAATCTTA-----TTCCAAATGAAATTTCTGCGAATGCCCTTTC-TTCTAGA 898  
Vitis AATGAAAGACTCTTAA-----TTACAAATGATTTTTTGAAAAAGCTTTTCCATTTCTAGA 900  
Drimysgranadensis AACAAAGGAATTCGAATCTTATTCACAAAGGAAATCCTGCAAAATCCTTTCT-TTCTAAA 922  
\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis AACTTTCTAGAAAGTACTTTATTTCTTGGTGTCAAAATAGGAT---ATTAGAAATATGTG 954  
Vitis AACTACTT-----CTCATGTCTTGGTGTCAAAATAGGAGTCAAAATAGGATATGTG 951  
Drimysgranadensis AACCACTTTTT---CATTTTTTTTCTTGGTGTCAA-----GGATATGTG 963  
\*\*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis GTATAAAAAGTGATAAATCTATTCCTTTTCCC-----AAAAATGA 996  
Vitis GTATAAAAATGGAAATCTATTCCTTTTCCC-----AAAAATGA 993  
Drimysgranadensis GTACAAAAATAGAGAAATCTATTCCTTTTCCCATTTCCTTTGCAAAAAACAAAAAAAATGA 1023  
\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis TTTTGGAGATTGT--AATGCTTACTCTCAAACTTTCGTTTACACAGTAGTGATATTCTT 1054  
Vitis TCTTGGAGATTGTGTAAGCTTACTCTCAAACTTTCGTTTACACAGTAGTGATATTCTT 1053  
Drimysgranadensis TCTTGGAGATTGTGCAATGCTTACTCTCAAACTTTCGTTTACACAGTAGTGATATTCTT 1083  
\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

trnSof-Ga TCTCTTACCTTCGGATTCCT-->

Platanusoccidentalis TGTTTCTCTCTTTCATCTTCGGATTCCATCTAATGATCCAGGACGTAATCTCGGACGCGA 1114  
Vitis TGTTTCTCTCTTTCATCTTCGGATTCCATCTAATGATCCGGGACGTAATCTCGGCGTGA 1113  
Drimysgranadensis TGTTTCTCTCTTTCATCTTCGGATTCCATCTAATGATCCAGGACGTAATCTCGGACGCGA 1143  
\*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis GGATAAAAAAATAAGGGATTTGTCGTTTTCTTGTCTTATTTCTGAATTTTCTTATG 1174  
Vitis AGAATGAAGAAATAAAAAATAAA--GGCATTTCCTTACTTGATTTTCAAATTTTCTTCGG 1171  
Drimysgranadensis GGATAAAAAATCAGAGGTTTTTCAATTTTCCTTGTCTTATTTCTGCATTTTCTTATG 1203  
\*\*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis ATTTTCTCTATTCGACACATTTAACTATGAAAAATCAAACATTAACAAGGACTCGA 1234  
Vitis ATTTTATCTATTCACACCTTTAACTATGAAAAA-----GAAAAAGGTTTCGA 1220  
Drimysgranadensis CTTTCTCTATTCAGACATTTAACTAAAAA-----GGGCTTGA 1246  
\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis GATTTTCTTTTGAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATCAGAGAAACCGGAAGAGAGG 1294  
Vitis GAAATT----CGAAGATAAATAAAA-TATCAATTCATCAATGGAACGGAAAGAGAGG 1274  
Drimysgranadensis TATTTTT---TGAATTCGAAAGATAAATCTCAAGTCATCCGAGGAAACGGAGAAAGAGG 1302  
\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Platanusoccidentalis GATTCGAACCCCTCGGTACGAATAACTCGTACAACGGATTAGCAATCCGCCGCTTATGTC 1354  
Vitis GATTCGAACCCCTCGGTACGAATAACTCGTACAACGGATTAGCAATCCGCCGCTTATGTC 1334  
Drimysgranadensis GATTCGAACCCCTCGGTACGAACAGCTCGTACAACGGATTAGCAATCCGTCGCTTATGTC 1362  
\*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

TRNSOR <--GTCCACTCAGCCATCTCTCCC

Platanusoccidentalis ACTCAGCCATCTCTCCA-ATTTAAAAAGGAGAAATGACTAGATTACGCATGACGTAGTAA 1413  
Vitis ACTCAGCCATCTCTCCATACATAAAGTAAAGATTGAAAAGTCTTTCTTA----- 1386  
Drimysgranadensis ACTCAGCCATCTCTCCA-ATTCAAAAAGATAATTCATATGTGACGCTGA---AGTAA 1418  
\*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

```
Platanusoccidentalis   AGATTGAGAAAAGTCTTCCTTA 1436  
Vitis                  -----  
Drimysgranadensis     AGATTGATCAAAGTCTTCCTTA 1441
```

La secuencia corresponde a un fragmento polimórfico de aproximadamente 1400pb. A lo largo de la secuencia se muestran los distintos partidores a utilizar.

ANEXO 3

**A) Alineamiento múltiple de las secuencias de distintos notros correspondiente a una parte de la región intergénica trnH-psbA amplificada con los partidores trnH-f/psbA-r.**

Pm6-III	ACTGCCTTAA	TCCACTTGGCTACATCCGCCCTCACTCTTTTTAAAAGATTCAATAGATTC	60
Co2-I	ACTGCCTTAA	TCCACTTGGCTACATCCGCCCTCACTCTTTTTAAAAGATTCAATAGATTC	60
Chi2-III	ACTGCCTTAA	TCCACTTGGCTACATCCGCCCTCACTCTTTTTAAAAGATTCAATAGATTC	60
Coy3-III	ACTGCCTTAA	TCCACTTGGCTACATCCGCCCTCACTCTTTTTAAAAGATTCAATAGATTC	60
Lo5-II	ACTGCCTTAA	TCCACTTGGCTACATCCGCCCTCACTCTTTTTAAAAGATTCAATAGATTC	60
*****			
Pm6-III	TTTTTTTAGCATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA	-----	112
Co2-I	TTTTTTTAGCATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA	-----	112
Chi2-III	TTTTTTTAGCATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA	-----	112
Coy3-III	TTTTTTTAGCATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA	-----	112
Lo5-II	TTTTTTTAGCATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATTAAAA	CATTAAAA	120
*****			
Pm6-III	AAAAAATGGAAAAAATCCTTATGTGAATAAAACATTACTAAACTATAAACTAAATGAAGG		172
Co2-I	AAAAAATGGAAAAAATCCTTATGTGAATAAAACATTACTAAACTATAAACTAAATGAAGG		172
Chi2-III	AAAAAATGGAAAAAATCCTTATGTGAATAAAACATTACTAAACTATAAACTAAATGAAGG		172
Coy3-III	AAAAAATGGAAAAAATCCTTATGTGAATAAAACATTACTAAACTATAAACTAAATGAAGG		172
Lo5-II	AAAAAATGGAAAAAATCCTTATGTGAATAAAACATTACTAAACTATAAACTAAATGAAGG		180
*****			
Pm6-III	AGCAATACCAATCCTCTTGATAAAACAAGAAATGCGGTATTGCTCCTTCAACAACTCGTA		232
Co2-I	AGCAATACCAATCCTCTTGATAAAACAAGAAATGCGGTATTGCTCCTTCAACAACTCGTA		232
Chi2-III	AGCAATACCAATCCTCTTGATAAAACAAGAAATGCGGTATTGCTCCTTCAACAACTCGTA		232
Coy3-III	AGCAATACCAATCCTCTTGATAAAACAAGAAATGCGGTATTGCTCCTTCAACAACTCGTA		232
Lo5-II	AGCAATACCAATCCTCTTGATAAAACAAGAAATGCGGTATTGCTCCTTCAACAACTCGTA		240
*****			
Pm6-III	TACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGCTCAAC		276
Co2-I	TACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGCTCAAC		276
Chi2-III	TACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGCTCAAC		276
Coy3-III	TACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGCTCAAC		276
Lo5-II	TACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGCTCAAC		284
*****			

En la secuencia se destaca el polimorfismo de interés, la inserción CATTAAAA de 8pb necesaria para la discriminación entre individuos.

**B) Alineamiento múltiple de las secuencias de distintos notros correspondiente a una parte de la región intergénica psbK-trnS amplificada con los partidores psbKf-GA/ trnS0r.**

```

Chi2-I          ACCCGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCAATTCGATTTCTATTCGACACTAATAACA 60
Coy3-III       -----CTTACCGCTTGGCCACGCCCAATTCGATTTCTATTCGACACTAATAACA 51
Co2-III        ACCCGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCAATTCGATTTCTATTCGACACTAATAACA 60
Lo5-II         ACCCGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCAATTCGATTTCTATTCGACACTAATAACA 60
Pm6-III        ACCCGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCAATTCGATTTCTATTCGACACTAATAACA 60
                *****

Chi2-I          TTAATATCGATGTTGGTTGTTTCGTCAATTCAGTCCAAATATGTATGGAATAGATTAGAT 120
Coy3-III       TTAATATCGATGTTGGTTGTTTCGTCAATTCAGTCCAAATATGTATGGAATAGATTAGAT 111
Co2-III        TTAATATCGATGTTGGTTGTTTCGTCAATTCAGTCCAAATATGTATGGAATAGATTAGAT 120
Lo5-II         TTAATATCGATGTTGGTTGTTTCGTCAATTCAGTCCAAATATGTATGGAATAGATTAGAT 120
Pm6-III        TTAATATCGATGTTGGTTGTTTCGTCAATTCAGTCCAAATATGTATGGAATAGATTAGAT 120
                *****

Chi2-I          TGTGCTAGGATTTGATACCGTAGATGTAGAATTAACCTTAATTTATTGATCATTACAT 180
Coy3-III       TGTGCTAGGATTTGATACCGTAGATGTAGAATTAACCTTAATTTATTGATCATTACAT 171
Co2-III        TGTGCTAGGATTTGATACCGTAGATGTAGAATTAACCTTAATTTATTGATCATTACAT 180
Lo5-II         TGTGCTAGGATTTGATACCGTAGATGTAGAATTAACCTTAATTTATTGATCATTACAT 180
Pm6-III        TGTGCTAGGATTTGATACCGTAGATGTAGAATTAACCTTAATTTATTGATCATTACAT 180
                *****

Chi2-I          ATAATTCAAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTTGAGAATTGA 240
Coy3-III       ATAATTCAAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTTGAGAATTGA 231
Co2-III        ATAATTCAAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTTGAGAATTGA 240
Lo5-II         ATAATTCAAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTTGAGAATTGA 240
Pm6-III        ATAATTCAAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTTGAGAATTGA 240
                *****

Chi2-I          AGGATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAAGAAAAAGAAGGATTTAAAAATTTATCTTATTGTT 300
Coy3-III       AGGATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAAGAAAAAGAAGGATTTAAAAATTTATCTTATTGTT 291
Co2-III        AGGATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAAGAAAAAGAAGGATTTAAAAATTTATCTTATTGTT 300
Lo5-II         AGGATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAAGAAAAAGAAGGATTTAAAAATTTATCTTATTGTT 300
Pm6-III        AGGATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAAGAAAAAGAAGGATTTAAAAATTTATCTTATTGTT 300
                *****

Chi2-I          TCATTTTTCCCTTATCTTATATTAATAAATCAATCAAAATACAATTTTCCAAGAACGA 360
Coy3-III       TCATTTTTCCCTTATCTTATATTAATAAATCAATCAAAATACAATTTTCCAAGAACGA 351
Co2-III        TCATTTTTCCCTTATCTTATATTAATAAATCAATCAAAATACAATTTTCCAAGAACGA 360
Lo5-II         TCATTTTTCCCTTATCTTATATTAATAAATCAATCAAAATACAATTTTCCAAGAACGA 360
Pm6-III        TCATTTTTCCCTTATCTTATATTAATAAATCAATCAAAATACAATTTTCCAAGAACGA 360
                *****

Chi2-I          AATGCTTGTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCAATCTACCCCTTCACTCGAG 420
Coy3-III       AATGCTTGTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCAATCTACCCCTTCACTCGAG 411
Co2-III        AATGCTTGTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCAATCTACCCCTTCACTCGAG 420
Lo5-II         AATGCTTGTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCAATCTACCCCTTCACTCGAG 420
Pm6-III        AATGCTTGTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCAATCTACCCCTTCACTCGAG 420
                *****

Chi2-I          TAGTTTTTCTTTGCCAAATTGCCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCGTAGATGT 480
Coy3-III       TAGTTTTTCTTTGCCAAATTGCCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCGTAGATGT 471
Co2-III        TAGTTTTTCTTTGCCAAATTGCCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCGTAGATGT 480
Lo5-II         TAGTTTTTCTTTGCCAAATTGCCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCGTAGATGT 480
Pm6-III        TAGTTTTTCTTTGCCAAATTGCCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCGTAGATGT 480
                *****

```

psbkP1 TTTGGCAAGCTGCTGTAAG-->

Chi2-I TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 540  
Coy3-III TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 531  
Co2-III TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 540  
Lo5-II TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 540  
Pm6-III TATGCCAGTCATACCTGTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTGCTGTAAG 540  
\*\*\*\*\*

Chi2-I TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAA 600  
Coy3-III TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAA 591  
Co2-III TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAA 598  
Lo5-II TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAA 598  
Pm6-III TTTTCGATGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTTCATGATTTATTCGAAAAAAAAAAAAA 600  
\*\*\*\*\*

<--NotroR GAACCCCTCGATTGAAACATT

Chi2-I TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCCTCGATTGAAAC 660  
Coy3-III TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCCTCGATTGAAAC 651  
Co2-III TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCCTCGATTGAAAC 658  
Lo5-II TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCCTCGATTGAAAC 658  
Pm6-III TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCCCTCGATTGAAAC 660  
\*\*\*\*\*

Chi2-I ATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCCATTCTGACCTT 720  
Coy3-III ATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCCATTCTGACCTT 711  
Co2-III ATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCCATTCTGACCTT 718  
Lo5-II ATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCCATTCTGACCTT 718  
Pm6-III ATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCCATTCTGACCTT 720  
\*\*\*\*\*

Chi2-I CTACTTCCAGTAAACAAGGACCTACAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCACAATAT 780  
Coy3-III CTACTTCCAGTAAACAAGGACCTACAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCACAATAT 771  
Co2-III CTACTTCCAGTAAACAAGGACCTACAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCACAATAT 778  
Lo5-II CTACTTCCAGTAAACAAGGACCTACAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCACAATAT 778  
Pm6-III CTACTTCCAGTAAACAAGGACCTACAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCACAATAT 780  
\*\*\*\*\*

Chi2-I CTTTATCTAATTGTGGGTATGTATGAAAGAGAATTTTGGTAACGAAAGAATCTTATTACA 840  
Coy3-III CTTTATCTAATTGTGGGTATGTATGAAAGAGAATTTTGGTAACGAAAGAATCTTATTACA 831  
Co2-III CTTTATCTAATTGTGGGTATGTATGAAAGAGAATTTTGGTAACGAAAGAATCTTATTACA 838  
Lo5-II CTTTATCTAATTGTGGGTATGTATGAAAGAGAATTTTGGTAACGAAAGAATCTTATTACA 838  
Pm6-III CTTTATCTAATTGTGGGTATGTATGAAAGAGAATTTTGGTAACGAAAGAATCTTATTACA 840  
\*\*\*\*\*

Chi2-I ACTGAATTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAAACTACTTGATTTCTTGTTTCAAAT 900  
Coy3-III ACTGAATTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAAACTACTTGATTTCTTGTTTCAAAT 891  
Co2-III ACTGAATTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAAACTACTTGATTTCTTGTTTCAAAT 898  
Lo5-II ACTGAATTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAAACTACTTGATTTCTTGTTTCAAAT 898  
Pm6-III ACTGAATTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAAACTACTTGATTTCTTGTTTCAAAT 900  
\*\*\*\*\*

Chi2-I AGGATATGTGGTATAAAAAATAGATAAATCTATTCCCCCTTTCCCCCAAAAAGATCTTGGA 960  
Coy3-III AGGATATGTGGTATAAAAAATAGATAAATCTATTCCCCCTTTCCCCCAAAAAGATCTTGGA 951  
Co2-III AGGATATGTGGTATAAAAAATAGATAAATCTATTCCCCCTTTCCCCCAAAAAGATCTTGGA 958  
Lo5-II AGGATATGTGGTATAAAAAATAGATAAATCTATTCCCCCTTTCCCCCAAAAAGATCTTGGA 958  
Pm6-III AGGATATGTGGTATAAAAAATAGATAAATCTATTCCCCCTTTCCCCCAAAAAGATCTTGGA 960  
\*\*\*\*\*

```

Chi2-I          GATTGTAATGCTTACTCTCAAACCTCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTTGTTCGCT 1020
Coy3-III       GATTGTAATGCTTACTCTCAAACCTCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTTGTTCGCT 1011
Co2-III       GATTGTAATGCTTACTCTCAAACCTCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTTGTTCGCT 1018
Lo5-II        GATTGTAATGCTTACTCTCAAACCTCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTTGTTCGCT 1018
Pm6-III       GATTGTAATGCTTACTCTCAAACCTCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTTGTTCGCT 1020
*****

Chi2-I          CTTCATCTTCGGATTCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1080
Coy3-III       CTTCATCTTCGGATTCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1071
Co2-III       CTTCATCTTCGGATTCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1078
Lo5-II        CTTCATCTTCGGATTCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1078
Pm6-III       CTTCATCTTCGGATTCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1080
*****

Chi2-I          GAATAAAAAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTA 1140
Coy3-III       GAATAAAAAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTA 1131
Co2-III       GAATAAAAAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTA 1138
Lo5-II        GAATAAAAAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTA 1138
Pm6-III       GAATAAAAAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTA 1140
*****

Chi2-I          TCTATTCGACACATTTCCATTTAACCATTAACCATGAACACATTTAATTATGATAAAAAGA 1200
Coy3-III       TCTATTCGACACATTTCCATTTAACCATTAACCATGAACACATTTAATTATGATAAAAAGA 1191
Co2-III       TCTATTCGACACATTTCCATTTAACCATTAACCATGAACACATTTAATTATGATAAAAAGA 1198
Lo5-II        TCTATTCGACACATTTCCATTTAACCATTAACCATGAACACATTTAATTATGATAAAAAGA 1198
Pm6-III       TCTATTCGACACATTTCCATTTAACCATTAACCATGAACACATTTAATTATGATAAAAAGA 1200
*****

Chi2-I          ACGCGAGATTTTCTTTTCGAAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAAGAAAACGGAAA 1260
Coy3-III       ACGCGAGATTTTCTTTTCGAAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAAGAAAACGGAAA 1251
Co2-III       ACGCGAGATTTTCTTTTCGAAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAAGAAAACGGAAA 1258
Lo5-II        ACGCGAGATTTTCTTTTCGAAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAAGAAAACGGAAA 1258
Pm6-III       ACGCGAGATTTTCTTTTCGAAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAAGAAAACGGAAA 1260
*****

Chi2-I          GAGAGGGATTCGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1294
Coy3-III       GAGAGGGATTCGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1285
Co2-III       GAGAGGGATTCGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1292
Lo5-II        GAGAGGGATTCGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1292
Pm6-III       GAGAGGGATTCGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1294
*****

```

En la secuencia se destaca el polimorfismo de interés AA de 2pb y los partidores psbK-P1/NotroR diseñados en base a la misma secuencia.

**C) Alineamiento múltiple de las secuencias de distintos avellanos correspondiente a una parte de la región intergénica trnH-psbA amplificada con los partidores trnH-f/psbA-r.**

```

SA26-I      ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
SF7-II     ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATGCAATAGATT 60
SA6-I      ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
MA8-I      ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
HU23-I    ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
FE8-I     ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
FE3-I     ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
CT12-I    ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
CT4-I     ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
LQ22-III  ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
LQ16-IV   ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
IM4-I     ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
CH3-I     ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
AR23-I    ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
MA3-I     ACTGCCTTAAATCCACTTGGCCACATCCGCCCCCTACTCTTTCTAAAAAATCAATAGATT 60
*****

SA26-I      CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
SF7-II     CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
SA6-I      CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
MA8-I      CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
HU23-I    CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
FE8-I     CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
FE3-I     CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
CT12-I    CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
CT4-I     CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
LQ22-III  CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
LQ16-IV   CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
IM4-I     CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
CH3-I     CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
AR23-I    CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
MA3-I     CTATATTTGAAATTCATCATTATTTAATTTAGTTTTTCTTACCTTCATAAACATAAAAA 120
*****

SA26-I      AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
SF7-II     AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
SA6-I      AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
MA8-I      AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
HU23-I    AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
FE8-I     AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
FE3-I     AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
CT12-I    AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
CT4-I     AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
LQ22-III  AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
LQ16-IV   AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
IM4-I     AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
CH3-I     AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
AR23-I    AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
MA3-I     AAAATGGCAAAAATACTTATCTTATGTGAGTAAAACATTACTAAACTAGAAAGTAAATGA 180
*****

```

```

SA26-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
SF7-II     AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
SA6-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
MA8-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
HU23-I     AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
FE8-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
FE3-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
CT12-I     AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
CT4-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
LQ22-III   AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
LQ16-IV    AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
IM4-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
CH3-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
AR23-I     AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTATCAAGAGGGTTGGTATTGCTCCTTCAACAAC 240
MA3-I      AGGAGCAATACCGCATTTCTTGTTTTNTCAAGNNGGTTGGTANTGCTCCTTCAACAAC 240
*****

```

```

SA26-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
SF7-II     GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
SA6-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
MA8-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
HU23-I     GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
FE8-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
FE3-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
CT12-I     GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
CT4-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
LQ22-III   GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
LQ16-IV    GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
IM4-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
CH3-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
AR23-I     GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
MA3-I      GTATACACTAAGATCTAAGTCTTATCCATTTATGGATGGAGACTCAAC 288
*****

```

En la secuencia se destaca el polimorfismo de interés, la sustitución T/G necesaria para la discriminación entre individuos.



**D) Alineamiento múltiple de las secuencias de distintos avellanos correspondiente a una parte de la región intergénica psbK-trnS amplificada con los partidores psbKf-GA/ trnS0r.**

Fe8-I	CGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCCATTTTCGATTTCTATTCGACACTAATAAACATTA	60
Im4-I	CGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCCATTTTCGATTTCTATTCGACACTAATAAACATTA	60
Ma3-I	CGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCCATTTTCGATTTCTATTCGACACTAATAAACATTA	60
Ma8-I	CGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCCATTTTCGATTTCTATTCGACACTAATAAACATTA	60
Lq9-III	CGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCCATTTTCGATTTCTATTCGACACTAATAAACATTA	60
Lq16-IV	CGATGCCTTACCGCTTGGCCACGCCCCATTTTCGATTTCTATTCGACACTAATAAACATTA	60
	*****	
Fe8-I	ATATCGATGTTGGTTGTTTCGTC AATTCCAGTCCAAATATCTATGGAATAGATTATATTGT	120
Im4-I	ATATCGATGTTGGTTGTTTCGTC AATTCCAGTCCAAATATCTATGGAATAGATTATATTGT	120
Ma3-I	ATATCGATGTTGGTTGTTTCGTC AATTCCAGTCCAAATATCTATGGAATAGATTATATTGT	120
Ma8-I	ATATCGATGTTGGTTGTTTCGTC AATTCCAGTCCAAATATCTATGGAATAGATTATATTGT	120
Lq9-III	ATATCGATGTTGGTTGTTTCGTC AATTCCAGTCCAAATATCTATGGAATAGATTAGATTGT	120
Lq16-IV	ATATCGATGTTGGTTGTTTCGTC AATTCCAGTCCAAATATCTATGGAATAGATTAGATTGT	120
	*****	
Fe8-I	TGCTAGGATTTGATACACGTAGATGTAGAAATGAAACTGAATTTATTGATCATTACATATA	180
Im4-I	TGCTAGGATTTGATACACGTAGATGTAGAAATGAAACTGAATTTATTGATCATTACATATA	180
Ma3-I	TGCTAGGATTTGATACACGTAGATGTAGAAATGAAACTGAATTTATTGATCATTACATATA	180
Ma8-I	TGCTAGGATTTGATACACGTAGATGTAGAAATGAAACTGAATTTATTGATCATTACATATA	180
Lq9-III	TGCTAGGATTTGATACACGTAGATGTAGAAATGAAACTGAATTTATTGATCATTACATATA	180
Lq16-IV	TGCTAGGATTTGATACACGTAGATGTAGAAATGAAACTGAATTTATTGATCATTACATATA	180
	*****	
Fe8-I	ATTCAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTGAGAATTGAAGG	240
Im4-I	ATTCAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTGAGAATTGAAGG	240
Ma3-I	ATTCAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTGAGAATTGAAGG	240
Ma8-I	ATTCAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTGAGAATTGAAGG	240
Lq9-III	ATTCAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTGAGAATTGAAGG	240
Lq16-IV	ATTCAATTAAGATATTATAGGAAAGTATCATTCCTTCTATTCTCATTGAGAATTGAAGG	240
	*****	
Fe8-I	ATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAATAAAAAGAAGGATTTTTTAGTTTTATCTTATTTGTTTC	300
Im4-I	ATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAATAAAAAGAAGGATTTTTTAGTTTTATCTTATTTGTTTC	300
Ma3-I	ATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAATAAAAAGAAGGATTTTTTAGTTTTATCTTATTTGTTTC	300
Ma8-I	ATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAATAAAAAGAAGGATTTTTTAGTTTTATCTTATTTGTTTC	300
Lq9-III	ATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAATAAAAAGAAGGATTTTTTAGTTTTATCTTATTTGTTTC	300
Lq16-IV	ATTTTTGATTGGGCGAGTTTAAATAAAAAGAAGGATTTTTTAGTTTTATCTTATTTGTTTC	300
	*****	
Fe8-I	ATTTTTCCCTTATCTTATATTA CTTATATTAATAA ACTCAATCAAATGCAATTATTTCCA	360
Im4-I	ATTTTTCCCTTATCTTATATTA CTTATATTAATAA ACTCAATCAAATGCAATTATTTCCA	360
Ma3-I	ATTTTTCCCTTATCTTATATTA CTTATATTAATAA ACTCAATCAAATGCAATTATTTCCA	360
Ma8-I	ATTTTTCCCTTATCTTATATTA CTTATATTAATAA ACTCAATCAAATGCAATTATTTCCA	360
Lq9-III	ATTTTTCCCTTATCTTATATTA CTTATATTAATAA ACTCAATCAAATGCAATTATTTCCA	360
Lq16-IV	ATTTTTCCCTTATCTTATATTA CTTATATTAATAA ACTCAATCAAATGCAATTATTTCCA	360
	*****	
Fe8-I	AGAACGAAATGCTTGTTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCACTTACCCTTC	420
Im4-I	AGAACGAAATGCTTGTTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCACTTACCCTTC	420
Ma3-I	AGAACGAAATGCTTGTTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCACTTACCCTTC	420
Ma8-I	AGAACGAAATGCTTGTTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCACTTACCCTTC	420
Lq9-III	AGAACGAAATGCTTGTTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCACTTACCCTTC	420
Lq16-IV	AGAACGAAATGCTTGTTATGCTTAATATCTTTGCTTTGATCTGTTTTCACTTACCCTTC	420
	*****	

Fe8-I ACTCGAGTAGTTTTCTTTGCCAAATTGCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCG 480  
 Im4-I ACTCGAGTAGTTTTCTTTGCCAAATTGCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCG 480  
 Ma3-I ACTCGAGTAGTTTTCTTTGCCAAATTGCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCG 480  
 Ma8-I ACTCGAGTAGTTTTCTTTGCCAAATTGCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCG 480  
 Lq9-III ACTCGAGTAGTTTTCTTTGCCAAATTGCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCG 480  
 Lq16-IV ACTCGAGTAGTTTTCTTTGCCAAATTGCCGAGGCTTACGCTTTTTTCAATCCAATCG 480

\*\*\*\*\*

Fe8-I TAGATGTTATGCCAGTCATACCTCTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTG 540  
 Im4-I TAGATGTTATGCCAGTCATACCTCTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTG 540  
 Ma3-I TAGATGTTATGCCAGTCATACCTCTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTG 540  
 Ma8-I TAGATGTTATGCCAGTCATACCTCTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTG 540  
 Lq9-III TAGATGTTATGCCAGTCATACCTCTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTG 540  
 Lq16-IV TAGATGTTATGCCAGTCATACCTCTGTTTTTTTTTCTCTTAGCCTTTGTTGGCAAGCTG 540

\*\*\*\*\*

Fe8-I CTGTAAGTTTTTCGGTGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTATGATTTATTCGATAAAA 600  
 Im4-I CTGTAAGTTTTTCGGTGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTATGATTTATTCGATAAAA 600  
 Ma3-I CTGTAAGTTTTTCGGTGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTATGATTTATTCGATAAAA 600  
 Ma8-I CTGTAAGTTTTTCGGTGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTATGATTTATTCGATAAAA 600  
 Lq9-III CTGTAAGTTTTTCGGTGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTATGATTTATTCGATAAAA 600  
 Lq16-IV CTGTAAGTTTTTCGGTGAGATCTCTTTAGTCCTACAAGCATTATGATTTATTCGATAAAA 600

\*\*\*\*\*

Fe8-I AAAAAAAAAATTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCC 660  
 Im4-I AAAAAAAAAATTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCC 660  
 Ma3-I AAAAAAAAAATTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCC 660  
 Ma8-I AAAAAAAAAATTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCC 660  
 Lq9-III AAAAAAAAA-TTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCC 659  
 Lq16-IV AAAAAAAAAATTATAACAATTGATAAGATTAGATAAGTCTTACATTATATTATGAACCC 660

\*\*\*\*\*

Fe8-I TCGATTGAAACATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCC 720  
 Im4-I TCGATTGAAACATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCC 720  
 Ma3-I TCGATTGAAACATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCC 720  
 Ma8-I TCGATTGAAACATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCC 720  
 Lq9-III TCGATTGAAACATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCC 719  
 Lq16-IV TCGATTGAAACATTGAAACTGTTGGATAGCAGCAATAAGTCTGGATCACCTCATTTCCCC 720

\*\*\*\*\*

Fe8-I ATCCTGACCTTCTACTTCCAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCCACAATATCTTTAT 780  
 Im4-I ATCCTGACCTTCTACTTCCAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCCACAATATCTTTAT 780  
 Ma3-I ATCCTGACCTTCTACTTCCAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCCACAATATCTTTAT 780  
 Ma8-I ATCCTGACCTTCTACTTCCAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCCACAATATCTTTAT 780  
 Lq9-III ATCCTGACCTTCTACTTCCAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCCACAATATCTTTAT 779  
 Lq16-IV ATCCTGACCTTCTACTTCCAGTAAACAAGGACCTATTAGGGTCCCCCACAATATCTTTAT 780

\*\*\*\*\*

Fe8-I CTAATTGTGGGTATGTATGAAAGATAATTTAGGTAGCGAAAGAATCTTATTACAACCTGAA 840  
 Im4-I CTAATTGTGGGTATGTATGAAAGATAATTTAGGTAGCGAAAGAATCTTATTACAACCTGAA 840  
 Ma3-I CTAATTGTGGGTATGTATGAAAGATAATTTAGGTAGCGAAAGAATCTTATTACAACCTGAA 840  
 Ma8-I CTAATTGTGGGTATGTATGAAAGATAATTTAGGTAGCGAAAGAATCTTATTACAACCTGAA 840  
 Lq9-III CTAATTGTGGGTATGTATGAAAGATAATTTAGGTAGCGAAAGAATCTTATTACAACCTGAA 839  
 Lq16-IV CTAATTGTGGGTATGTATGAAAGATAATTTAGGTAGCGAAAGAATCTTATTACAACCTGAA 840

\*\*\*\*\*

Fe8-I TTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAACTACTGGATTTCTGGGTTCAAAATAGGATA 900  
 Im4-I TTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAACTACTGGATTTCTGGGTTCAAAATAGGATA 900  
 Ma3-I TTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAACTACTGGATTTCTGGGTTCAAAATAGGATA 900  
 Ma8-I TTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAACTACTGGATTTCTGGGTTCAAAATAGGATA 900  
 Lq9-III TTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAACTACTGGATTTCTGGGTTCAAAATAGGATA 899  
 Lq16-IV TTTCTGCGAATTCCTTTCTTTTCTAGAACTACTGGATTTCTGGGTTCAAAATAGGATA 900  
 \*\*\*\*\*

Fe8-I TGTGGTATAAAAAAGATAAATCTATTTCCCTTTCCCTCAAAAAATATCTTGGAGATTGT 960  
 Im4-I TGTGGTATAAAAAAGATAAATCTATTTCCCTTTCCCTCAAAAAATATCTTGGAGATTGT 960  
 Ma3-I TGTGGTATAAAAAAGATAAATCTATTTCCCTTTCCCTCAAAAAATATCTTGGAGATTGT 960  
 Ma8-I TGTGGTATAAAAAAGATAAATCTATTTCCCTTTCCCTCAAAAAATATCTTGGAGATTGT 960  
 Lq9-III TGTGGTATAAAAAAGATAAATCTATTTCCCTTTCCCTCAAAAAATATCTTGGAGATTGT 959  
 Lq16-IV TGTGGTATAAAAAAGATAAATCTATTTCCCTTTCCCTCAAAAAATATCTTGGAGATTGT 960  
 \*\*\*\*\*

Fe8-I AATGCTTACTCTCAAACCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTGTTTCGCTCTTCAT 1020  
 Im4-I AATGCTTACTCTCAAACCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTGTTTCGCTCTTCAT 1020  
 Ma3-I AATGCTTACTCTCAAACCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTGTTTCGCTCTTCAT 1020  
 Ma8-I AATGCTTACTCTCAAACCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTGTTTCGCTCTTCAT 1020  
 Lq9-III AATGCTTACTCTCAAACCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTGTTTCGCTCTTCAT 1019  
 Lq16-IV AATGCTTACTCTCAAACCTTCGTTTACACAGTAGTGATATTTTTGTTTCGCTCTTCAT 1020  
 \*\*\*\*\*

Ccmp2f-GATCCCGACGTAATCCTG-->

Fe8-I CTTCGGATTCCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1074  
 Im4-I CTTCGGATTCCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1074  
 Ma3-I CTTCGGATTCCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1074  
 Ma8-I CTTCGGATTCCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1074  
 Lq9-III CTTCGGATTCCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1079  
 Lq16-IV CTTCGGATTCCCTATCTAATGATCCAGGACGTAATCCTGGACGCGAGGAATAAAA 1080  
 \*\*\*\*\*

Fe8-I --AAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTATCTAT 1132  
 Im4-I --AAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTATCTAT 1132  
 Ma3-I --AAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTATCTAT 1132  
 Ma8-I --AAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTATCTAT 1132  
 Lq9-III AAAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTATCTAT 1139  
 Lq16-IV AAAAGGGGATTTCTCGGTTTCCTTGCTTGATTTATGAATTTTCTTATGATTTTATCTAT 1140  
 \*\*\*\*\*

Fe8-I TTGATACATTTACATTTAACCATAACCATGAACACATTTAACTATGATA 1185  
 Im4-I TTGATACATTTACATTTAACCATAACCATGAACACATTTAACTATGATA 1185  
 Ma3-I TTGATACATTTACATTTAACCATAACCATGAACACATTTAACTATGATA 1185  
 Ma8-I TTGATACATTTACATTTAACCATAACCATGAACACATTTAACTATGATA 1185  
 Lq9-III TTGATACATTTACATTTAACCATAACCATGAACACATTTAACTATGATA 1192  
 Lq16-IV TTGATACATTTACATTTAACCATAACCATGAACACATTTAACTATGATA 1200  
 \*\*\*\*\*

Fe8-I ATAAAAAACTTGAGATTTTCTTTTCGAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAGAGAA 1245  
 Im4-I ATAAAAAACTTGAGATTTTCTTTTCGAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAGAGAA 1245  
 Ma3-I ATAAAAAACTTGAGATTTTCTTTTCGAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAGAGAA 1245  
 Ma8-I ATAAAAAACTTGAGATTTTCTTTTCGAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAGAGAA 1245  
 Lq9-III ATAAAAAACTTGAGATTTTCTTTTCGAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAGAGAA 1252  
 Lq16-IV ATAAAAAACTTGAGATTTTCTTTTCGAATTCGAAAGAAAAATCTCAAGTCATTAGAGAA 1260  
 \*\*\*\*\*

```

                                <--ATTCTGAACCCTCGGTACGAT ccmp2r
Fe8-I      AACAAAACGGAAAGAGAGGGATTCTGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1292
Im4-I      AACAAAACGGAAAGAGAGGGATTCTGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1292
Ma3-I      AACAAAACGGAAAGAGAGGGATTCTGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1292
Ma8-I      AACAAAACGGAAAGAGAGGGATTCTGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1292
Lq9-III   AACAAAACGGAAAGAGAGGGATTCTGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1299
Lq16-IV    AACAAAACGGAAAGAGAGGGATTCTGAACCCTCGGTACGAATAACTCG 1307
*****

```

En la secuencia se destacan los dos polimorfismos de interés; las inserciones GAATAAAA y TATGATA de 8 y 7pb respectivamente y los partidores ccmp2 más adecuados para la amplificación y discriminación entre individuos.

## ANEXO 4

## A) Resumen de resultados de la detección de polimorfismos en notros.

<b>Individuos</b>	<b>Inserción CATTAAAA en la región intergénica trnH-psbA</b>	<b>Inserción AA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>
Chi1	0	1	III
Chi2	0	1	III
Chi3	0	1	III
Chi4	0	1	III
Cu1	0	0	I
Cu2	0	1	III
Cu3	0	1	III
Cu4	0	1	III
Lo1	0	1	III
Lo2	0	1	III
Lo4	0	0	I
Lo5	1	0	II
Coy1	0	1	III
Coy2	0	1	III
Coy3	0	1	III
Coy4	1	1	IV
Ich1	0	1	III
Ich4	0	1	III

**A) Resumen de resultados de la detección de polimorfismos en notros (continuación).**

<b>Individuos</b>	<b>Inserción CATTAAAA en la región intergénica trnH-psbA</b>	<b>Inserción AA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>
Ich5	0	1	III
Pich2	0	0	I
Pich3	0	0	I
Pich5	0	0	I
Curi1	0	0	I
Curi2	0	0	I
Curi3	0	0	I
Curi4	0	0	I
Curi5	0	0	I
Co2	0	0	I
Co3	0	0	I
Co4	0	0	I
Co5	0	0	I
Co6	0	0	I
PM1	0	0	I
PM2	0	0	I
PM3	0	0	I
PM4	0	0	I
PM5	1	0	II

**A) Resumen de resultados de la detección de polimorfismos en notros (continuación).**

<b>Individuos</b>	<b>Inserción CATTAAAA en la región intergénica trnH-psbA</b>	<b>Inserción AA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>
PM6	0	1	III

**B) Resumen de resultados de la detección de polimorfismo en avellanos.**

<b>Individuos</b>	<b>Sustitución T/G en la región intergénica trnH-psbA</b>	<b>Inserción GAATAAAA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Inserción TATGATA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>
Lq3	0	0	0	I
Lq8	0	0	0	I
Lq9	0	1	0	III
Lq16	0	1	1	IV
Lq22	0	1	0	III
Lq30	0	0	0	I
Ar4	0	0	0	I
Ar13	0	0	0	I
Ar23	0	0	0	I
Ar26	0	0	0	I
Ar29	0	0	0	I
Sf4	1	0	0	II
Sf7	1	0	0	II
Sf17	1	0	0	II
Sf24	1	0	0	II
Sf30	1	0	0	II
Fe3	0	0	0	I



**B) Resumen de resultados de la detección de polimorfismo en avellanos (continuación).**

<b>Individuos</b>	<b>Sustitución T/G en la región intergénica trnH-psbA</b>	<b>Inserción GAATAAAA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Inserción TATGATA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>
Fe8	0	0	0	I
Fe13	0	0	0	I
Fe16	0	0	0	I
Fe19	0	0	0	I
Ct4	0	0	0	I
Ct12	0	0	0	I
Ct15	0	0	0	I
Ct17	0	0	0	I
Ct28	0	0	0	I
Im4	0	0	0	I
Im6	0	0	0	I
Im13	0	0	0	I
Im17	0	0	0	I
Im19	0	0	0	I
Ma1	0	0	0	I
Ma3	0	0	0	I
Ma8	0	0	0	I

**B) Resumen de resultados de la detección de polimorfismo en avellanos (continuación).**

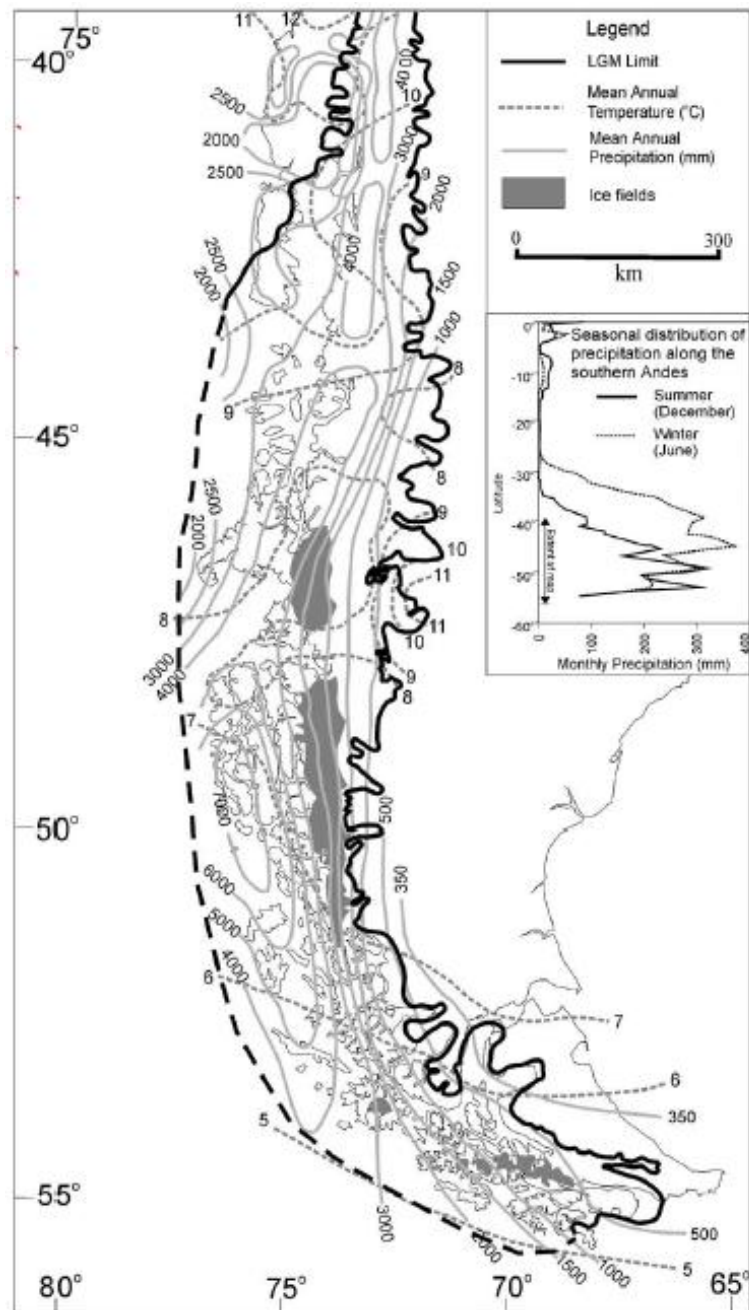
<b>Individuos</b>	<b>Sustitución T/G en la región intergénica trnH-psbA</b>	<b>Inserción GAATAAAA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Inserción TATGATA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>
Ma14	0	0	0	I
Ma27	0	0	0	I
On3	0	0	0	I
On8	0	0	0	I
On9	0	0	0	I
On16	0	0	0	I
On30	0	0	0	I
Hu2	0	0	0	I
Hu6	0	0	0	I
Hu23	0	0	0	I
Hu26	0	0	0	I
Hu29	0	0	0	I
Sa6	0	0	0	I
Sa9	0	0	0	I
Sa14	0	0	0	I
Sa26	0	0	0	I
Sa28	0	0	0	I

**B) Resumen de resultados de la detección de polimorfismo en avellanos (continuación).**

<b>Individuos</b>	<b>Sustitución T/G en la región intergénica trnH-psbA</b>	<b>Inserción GAATAAAA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Inserción TATGATA en la región intergénica psbK-trnS</b>	<b>Haplotipo</b>
Ch1	0	0	0	I
Ch3	0	0	0	I
Ch6	0	0	0	I
Ch14	0	0	0	I
Ch18	0	0	0	I

## ANEXO 5

## Límite de los hielos durante la LGM en la zona austral de América del Sur.



Los límites establecidos son según Holling y Schilling, 1981 y McCulloch *et al.*, 2000. En la foto se muestra el límite con la línea negra continua y discontinua.