



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Biología

**Generación de un código de barras de ADN para el taxón endémico
Alstroemeria ligtu L. subsp. *ligtu* (Alstroemeriaceae).**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Biólogo.

Por: CLAUDIA ISABEL ORELLANA KING

Profesor guía: OSCAR FERNANDO TORO NUÑEZ

abril., 2024

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la correspondiente cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron a la realización de esta tesis.

En primer lugar, agradezco profundamente al Dr. Oscar Toro Núñez y a Pedro Carrasco, por su disposición, orientación, apoyo y paciencia durante este proceso. Sus conocimientos, experiencia y compromiso, así como la confianza que depositaron en mi trabajo, fueron fundamentales para el desarrollo y culminación de este proyecto.

Por otra parte, quiero agradecer a mi pareja, Moisés, y mis amigos Benjamín, Catalina e Illari por su paciencia, cariño y constante apoyo a lo largo de todo este proceso. Me ayudaron a mantenerme motivada y enfocada, y me recordaron siempre creer en mis capacidades.

A todos ustedes, gracias.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN	12
<i>El género Alstroemeria en Chile.</i>	12
<i>Desafío en el trabajo taxonómico en Alstroemerias chilenas.</i>	14
<i>Códigos de barras de ADN.</i>	16
<i>El desafío de Alstroemeria ligtu subsp. ligtu.</i>	19
<i>Contexto.</i>	20
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS	23
<i>Objetivo general.</i>	23
<i>Objetivos específicos.</i>	23
METODOLOGÍA	24
<i>Material biológico.</i>	24
<i>Diseño de marcadores moleculares flanqueantes.</i>	27
<i>Extracción y amplificación de ADN.</i>	28
a. Testeando partidores nucleares.	29
b. Amplificación del partidor nuclear.	30
c. Amplificación con partidores cloroplastidiales.	30
<i>Secuenciación y análisis bioinformáticos.</i>	31
RESULTADOS.....	33
<i>Resultados de laboratorio.</i>	33
a. Calidad del ADN genómico total extraído.....	34
b. Amplificaciones preliminares marcador nuclear.	34
c. Amplificaciones marcador nuclear específicas (4249g319_166F - 1419g319_599R). 37	

d. Amplificación marcador cloroplastidial (rpl32-trnL).	39
<i>Resultados de secuenciación</i>	41
a. Marcador nuclear (4249g319_166F - 1419g319_599R).	41
b. Marcador cloroplastidial.	43
<i>Relaciones filogenéticas</i>	44
a. Red de haplotipos.....	44
b. Árbol filogenético.	46
DISCUSIÓN	48
<i>Evaluación de efectividad y aplicabilidad de los códigos de barras de ADN</i>	48
a. Códigos de barra nucleares.	48
b. Códigos de barra cloroplastidiales.	51
<i>Recuperación de grupos taxonómicamente coherentes usando marcadores moleculares cloroplastidiales</i>	52
<i>Diferenciación y límites genéticos de A. ligtu subsp. ligtu usando barcodes moleculares</i>	53
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de ubicación de las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri*, *A. ligtu* subsp. *ligtu*, *A. ligtu* subsp. *simsii* y *A. presliana* subsp. *australis* usadas en este estudio.....25
- Figura 2.** Calidad de la extracción de ADN para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10).....34
- Figura 3.** PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) representadas por H y L respectivamente. Utilizando los partidores nucleares (P) 1, 2, 3 y 4 (tabla 2) en un rango de temperaturas de *annealing*, que van de los 55 a 59°C.....35
- Figura 4.** PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) representadas por H y L respectivamente, con los partidores nucleares (P) 1, 2, 3 y 4 (tabla 2) a una temperatura de *annealing* de 60°C.....35
- Figura 5.** PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) representadas por H y L respectivamente. Utilizando los partidores nucleares (P) 5, 6, 7 y 8 (tabla 2) a diferentes temperaturas de *annealing*, que van de los 55 a 59°C.....36
- Figura 6.** PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) representadas por H y L respectivamente. Utilizando los partidores nucleares (P) 5, 6, 7 y 8 (tabla 2) a 60°C. Y los partidores nucleares (P) 9 y 10 a diferentes temperaturas de *annealing* que van desde los 55 a los 60°C.....36
- Figura 7 (izquierda) y Figura 8 (derecha).** A la izquierda, PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10) con el partidador nuclear 4249g319_166F - 1419g319_599R a 57°C. A la derecha, repetición de la PCR realizada en la imagen 8 pero eliminando las muestras *A. hookeri* subsp. *hookeri* 1 y 3.....37

Figura 9. PCR realizada con cambios en las concentraciones de reactivos, para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10) con el partidor nuclear 4249g319_166F - 1419g319_599R a una temperatura de *annealing* de 57°C. La fila superior representa una mayor concentración de ADN, mientras que la fila inferior una más diluida.....38

Figura 10. PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10) con el partidor cloroplastidial *rpl32-trnL* a una temperatura de *annealing* de 50°C.....39

Figura 11. PCR realizada con cambios en las concentraciones de ADN para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10) con el partidor cloroplastidial *rpl32-trnL* y una temperatura de *annealing* de 50°C. La fila superior representa una mayor concentración de ADN (sin dilución: concentración a), mientras que la fila inferior una más diluida (1:20: concentración b).....40

Figura 12. Imagen que muestra la búsqueda realizada a través de la herramienta BLAST 2.2.25 (Altschul et al. 1990) en Genbank, con la optimización megablast (secuencias muy similares).....41

Figura 13. Imagen que muestra la búsqueda realizada a través de la herramienta BLAST 2.2.25 (Altschul et al. 1990) en Genbank, con la optimización discontinuous megablast (secuencias más disimilares).....42

Figura 14. Imagen que muestra la búsqueda realizada a través de la herramienta BLAST 2.2.25 (Altschul et al. 1990) en Genbank, con la optimización blastn (secuencias algo similares).....42

Figura 15. Red de haplotipos para las secuencias obtenidas para *rpl32-trnL* con el set de datos completo (tesis + FONDECYT de Iniciación 11220556), empleando criterios de parsimonia con TCS basados en una red de extensión mínima.....45

Imagen 16: Árbol filogenético generado a partir de secuencia con *rpl32-trnL* (log-likelihood = -1084.983) por el set de datos completo (tesis + FONDECYT de iniciación 11220556).....47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Material biológico recolectado y usado en la presente tesis.....	26
Tabla 2. Marcadores moleculares generados por esta tesis.....	28
Tabla 3. Reactivos utilizados para la mezcla de reacción para PCR, en microlitros.....	29
Tabla 4. Cambios en la concentración de reactivos para la mezcla de reacción para PCR con partidores nucleares, en microlitros.....	30
Tabla 5. Cambios en la concentración de reactivos para la mezcla de reacción para PCR con el partidador <i>rpl32-trnL</i> , en microlitros.....	31
Tabla 6. Material biológico utilizado en los análisis de laboratorio.....	33
Tabla 7: Datos sobre las secuencias obtenidas con el partidador <i>rpl32-trnL</i> . Para el número de sitios variables no se consideran los eventos de inserción y delección presentes en el alineamiento.....	43
Tabla 8: Estadísticas de los nucleótidos de las secuencias obtenidas con el partidador <i>rpl32-trnL</i> ...	43
Tabla 9: Estadísticas de los haplotipos de las secuencias obtenidas con el partidador <i>rpl32-trnL</i>	44
Tabla 10. Individuos presentes en los haplotipos 2, 4, 7 y 8 los cuales representan al Complejo A. <i>hookeri</i> , en la Red de haplotipos.....	69
Tabla 11. Individuos presentes en los haplotipos 1, 3, y 5 los cuales representan al Complejo A. <i>presliana</i> , en la Red de haplotipos.....	71

Tabla 12. Individuos presentes en los haplotipos 6, 9 y 10 los cuales representan al Complejo *A. ligtu*, en la Red de haplotipos.....72

Tabla 13. Individuos presentes en los haplotipos 11 y 14 los cuales representan a *A. aurea* en la Red de haplotipos.....73

Tabla 14. Individuos presentes en las secuencias utilizadas en los análisis de red de haplotipos y árbol de filogenia con el partidor *rpl32-trnL*, obtenidas previamente por el Proyecto FONDECYT de Iniciación N° 1122055.....74

RESUMEN

El género *Alstroemeria*, con 90 especies originarias de Sudamérica (principalmente Brasil y Chile), pertenece a la familia Alstroemeriaceae. En Chile, se destacan 60 taxones, distribuidos desde el nivel del mar hasta los 4500 m.s.n.m. sobre una variedad de ambientes. Sus flores son apreciadas por su variabilidad morfológica, colores y duradera floración, siendo modificadas genéticamente para la generación de híbridos ornamentales y comerciales. Si bien su taxonomía se ha basado precisamente en estas características florales y vegetativas, también se ha explorado en el uso de otras fuentes de evidencia, tales como la variación colorimétrica, citogenética y molecular. En particular, a pesar de la diversidad de estudios moleculares existentes para el género, no existen estudios que apunten al diseño de barcodes moleculares que puedan apoyar la labor taxonómica para *Alstroemeria*.

Este trabajo examinó la viabilidad de identificar taxones específicos en *Alstroemeria* mediante barcodes moleculares, abordando la evaluación de regiones nucleares de baja copia y espaciadores cloroplastidiales hipervariables para la recuperación de grupos taxonómicamente coherentes, usando como ejemplo la subespecie *A. ligtu* subsp. *ligtu*. En general, se identificaron cuatro grupos genéticos, aunque se detectaron limitaciones de resolución en la discriminación inter e infraespecífica, las que podrían ser rectificadas al emplear fuentes de información complementarias tales como la morfología y la distribución geográfica. El marcador cloroplastidial *rpl32-trnL* se presenta como efectivo para la identificación y diferenciación de la subespecie en estudio, pero se resalta la necesidad de combinar su uso con otras fuentes de evidencia complementarias. Particularmente, se reporta un nuevo marcador nuclear de baja copia (1419g319_599), el que podría ayudar en la labor de identificación y discriminación de las subespecies en estudio. En general, los resultados ofrecen información sobre la aplicación de barcodes moleculares en *Alstroemeria*, destacando la importancia de considerar múltiples marcadores, datos y técnicas para la delimitación e identificación precisa de sus taxones.

Palabras claves: *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu*, barcodes moleculares, taxonomía, delimitación de entidades.

ABSTRACT

The genus *Alstroemeria*, with 90 species originating from South America (mainly Brazil and Chile), belongs to the family Alstroemeriaceae. In Chile, 60 taxa are distinguished, distributed from sea level to 4500 meters above sea level and across multiple environments. Its flowers are appreciated for their morphological variability, colors, and long-lasting blooming, being recurrently modified for the generation of ornamental and commercial hybrids. While its taxonomy has been based on these floral and vegetative characteristics, further exploration has been also conducted into the use of other sources of evidence, such as colorimetric, cytogenetic, and molecular variation. Specifically, despite the diversity of existing molecular studies for the genus, no other attempts have aimed at designing molecular barcodes to support the current taxonomic proposal of *Alstroemeria*.

This study examined the feasibility of identifying specific taxa in *Alstroemeria* using molecular barcodes, addressing the evaluation of low-copy nuclear regions and hypervariable chloroplast spacers for the recovery of taxonomically coherent groups, using the subspecies *A. ligtu* subsp. *ligtu* as a study subject. In general, four genetic groups were identified, which could be rectified by employing complementary sources of information such as morphology and geographic distribution. Despite their limitations in resolution and discrimination at inter- and intra-specific levels. The chloroplast marker *rpl32-trnL* proved to be effective for the identification and differentiation of the subspecies under study; yet the need to combine its use with other complementary sources of evidence is emphasized. Furthermore, a new low-copy nuclear marker (1419g319_599) is reported for this study, which could aid with the discrimination efforts. Overall, the results provide information on the application of molecular barcodes in *Alstroemeria*, highlighting the importance of considering multiple markers, data, and techniques for the precise delimitation and identification of its taxa.

Keywords: *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu*, molecular barcodes, taxonomy, taxonomic delimitation.

INTRODUCCIÓN

El género Alstroemeria en Chile.

Alstroemeria L. es un género perteneciente a la familia Alstroemeriaceae, subfamilia Alstroemerioideae (Finot et al., 2018a; Hofreiter & Rodríguez, 2006), constituido por 90 especies endémicas de Sudamérica (Finot et al., 2018a). Este grupo posee dos principales centros de distribución en Brasil y Chile (Aker & Healy, 1990; Bayer, 1987; Finot et al., 2018a; Hofreiter & Rodríguez, 2006; Meerow et al., 1999; Muñoz & Moreira, 2003).

En Chile, *Alstroemeria* representa uno de los géneros de monocotiledóneas más diversos, comprendiendo 60 taxones aceptados, 40 especies y 20 taxones infraespecíficos actualmente aceptados (Rojas & Baeza, 2021; Villalobos et al., 2024). Estas especies se distribuyen a lo largo de todo el país, desde el nivel de mar hasta la Cordillera de los Andes (4500m.s.n.m) (Aagesen & Sanso, 2003; Baeza et al., 2006; Finot et al., 2018a; Muñoz & Moreira, 2003) abarcando desde los 20°S (Región de Tarapacá) hasta los 53°S (Región de Magallanes) (Finot et al., 2018a). Su centro de distribución se encuentra en Chile central (Bayer, 1987), entre los 28°S (Región de Coquimbo) y 37°S (Región del Biobío) (Finot et al., 2018a) donde aproximadamente el 82% de las especies son endémicas de la zona mediterránea de dicha región (Muñoz & Moreira, 2003). Es posible encontrarlas en una gran diversidad de ambientes como playas, pastizales, bosques, estepas y laderas cordilleranas (Finot et al., 2018a).

De acuerdo con la Guía de Campo Alstroemerias Chilenas, estas plantas son principalmente herbáceas perennes, con la excepción de una especie anual: *Alstroemeria graminea* (Finot et al., 2018a). Se distinguen por tener un rizoma largo, raíces blancas que pueden convertirse en raíces de almacenamiento de agua y almidón con la madurez, y tallos que crecen erectos o decumbentes. Sus hojas, típicamente resupinadas, pueden tener una variedad de formas y presentar papilas en los bordes o en toda la lámina. La inflorescencia, que suele ser terminal y umbeliforme, y produce de 1 a 5 flores que pueden ser de color blanco, amarillo, rojo, naranja, rosado o violeta, (Bayer, 1987; Finot et al., 2015, 2016, 2018a; Muñoz & Moreira, 2003) lo que es un rasgo taxonómico importante dentro del género (Sanso, 1996). Sus flores generalmente son zigomorfas, con seis

tépalos libres dispuestos en dos ciclos. Tanto los tépalos externos como internos pueden tener diversas formas. Los externos generalmente de tamaño y forma similares mientras que los internos son más angostos y a veces asimétricos. Los internos superiores poseen patrones únicos de maculas (guías de néctar) de color más oscuro, que son específicos de cada especie. El androceo está compuesto por seis estambres y el gineceo por un ovario ínfero trilocular con placentación axilar. El estilo, de la misma longitud que los filamentos, se divide en tres ramas estigmáticas papilosas que se curvan cuando están receptivas.

El uso ornamental de las especies *Alstroemeria* es bien valorado dado su enorme potencial económico (Baeza et al., 2010; Buitendijk et al., 1997; Finot et al., 2018a). En la actualidad, se ha convertido en un cultivo de gran relevancia en el mercado global de flores de corte (Baeza et al., 2015; Buitendijk & Ramanna, 1996; Buitendijk et al., 1997). Existen importantes cultivos de este género en Holanda, Inglaterra, Estados Unidos y Japón (Muñoz & Moreira, 2003; Sanso & Xifreda, 2001; Hajizadeh et al., 2024). Dentro de los factores que le dan su gran valor comercial son la gran durabilidad de sus flores una vez cortadas y lo llamativo del perianto, exhibiendo una gran diversidad floral especialmente en lo que respecta a su color y ornamentación (Finot et al., 2015, 2018a; Muñoz & Moreira, 2003; Sanso & Xifreda, 2001). A pesar de poseer estos atributos, debido a la necesidad de introducir características agronómicamente deseables, actualmente se están modificando genéticamente introduciendo genes en forma asexual y generando híbridos entre especies de Chile y Brasil (Kim et al., 2006; Lin et al., 2000a, 2000b). Por otra parte, en Chile, se solía extraer el alto contenido de almidón presente en las raíces almacenadoras de *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu* con fines medicinales y alimenticios. Este almidón, conocido popularmente como “chuño”, es similar al que se encuentra en las papas, pudiéndose utilizar como alimento, siendo de común uso en la zona de Concepción (Finot et al., 2018a, Sanso & Xifreda, 2001).

Desafío en el trabajo taxonómico en *Alstroemerias* chilenas.

En *Alstroemeria*, el enfoque taxonómico tradicional se ha basado principalmente en la interpretación de los caracteres florales y atributos vegetativos, lo que ha llevado a la descripción de numerosos taxones y complejos de especies (Muñoz & Moreira, 2003). No obstante, estas plantas poseen caracteres morfológicos muy variables representados por una amplia variedad de patrones morfológicos y de coloración (Bayer, 1987; Finot et al., 2018a; Muñoz & Moreira, 2003). Tales variaciones del fenotipo se generan dado a que las especies están experimentando procesos recientes de divergencia microevolutiva (Muñoz & Moreira, 2003; Negritto et al., 2015; Ruiz et al., 2010), lo que sugiere que los procesos de especiación continúan muy activos en el género (Muñoz & Moreira, 2003; Ruiz et al., 2010). Debido a esto, también es común que se generen incongruencias entre caracteres fenotípicos y genotípicos, provocando una posible sub o sobreestimación de la diversidad taxonómica total del grupo, lo cual resulta en un problema continuo para la delimitación de sus taxones (Finot et al., 2018a). Por lo que, si bien estas características externas pueden ayudar a discriminar a nivel interespecífico, en algunos grupos de especies estas características varían a tal nivel que no proporcionan una base sólida para una discriminación precisa y confiable a nivel inter e infraespecífico (Baeza et al., 2010, 2015, 2016a, 2016b).

Al día de hoy, se han llevado a cabo diversos tipos de estudios para contribuir a la delimitación de taxones en *Alstroemeria*. En estudios colorimétricos, se ha empleado el sistema CIELab (Commission Internationale de L'Éclairage) para analizar el color de manera objetiva, proporcionando datos numéricos que son cuantitativos y reproducibles (e.g. Finot et al., 2018a, b.). Este sistema ha sido utilizado en diversos estudios (Finot et al., 2015a, 2015b, 2016, Villalobos et al., 2023). Por otro lado, estudios citogenéticos han sido útiles para delimitar especies y comprender procesos cromosómicos que determinan la divergencia entre ellas (Baeza et al., 2007). Como cada taxón presenta un cariotipo único, y variaciones en la estructura o índices de asimetría, son útiles en el reconocimiento de distintos taxones a nivel infraespecífico (Cajas et al., 2009; Baeza et al., 2007, 2010). Dentro de este ámbito se han estudiado complejos y definido nuevas especies (e.g. Buitendijk et al., 1996, 1998; Cajas et al., 2009; Baeza et al., 2010, 2016b, 2020; Baeza & Ruiz, 2011; Negritto et al., 2015; Zhou et al., 2003).

Tal nivel desarrollo aún no es alcanzado en estudios genéticos, el cual sigue en un continuo proceso de testeo de marcadores moleculares. Se han utilizado marcadores moleculares dominantes para caracterizar la diversidad genética (Anastassopoulos & Keil, 1996; Han et al., 1999), identificar variedades cultivadas (De Jeu et al., 1995; Dubouzet et al., 1997), y realizar análisis de genética poblacional (Ruiz et al., 2010; Souto & Premoli, 2003). Además, se han empleado secuencias genéticas de origen nuclear y cloroplastidial para construir hipótesis filogenéticas y establecer patrones biogeográficos (Aegesen & Sanso, 2003; Chacón et al., 2012). En relación con la divergencia genética infraespecífica, se han realizado estudios específicos utilizando marcadores ISSR (inter-secuencias simples repetidas) y aloenzimáticos, los cuales revelaron altos niveles de estructuración genética poblacional entre las subespecies *A. hookeri* subsp. *hookeri* y *A. hookeri* subsp. *sansebastianana* del Complejo *A. hookeri* (Finot et al., 2018b; Ruiz et al., 2010). Por otro lado, para el complejo *A. presliana*, se han detectado altos niveles de diversidad dentro de las poblaciones y niveles moderados de estructuración genética poblacional utilizando marcadores AFLP (Polimorfismo en el largo de los fragmentos amplificados) (Finot et al., 2018b).

Un consenso alcanzado entre los diversos estudios genéticos realizados en el género es la dificultad de evidenciar inequívocamente patrones de delimitación entre entidades con este tipo de aproximaciones (Finot et al., 2018b). Esto tiene impactos en la construcción de la propuesta taxonómica de *Alstroemeria*, puesto que al no esclarecer estos patrones deja en incógnita cuáles son los mecanismos responsables en el origen de sus especies y cómo debería conformarse su correcta delimitación (Finot et al., 2018b). Se ha sugerido que factores como el aislamiento geográfico y la selección ejercen un impacto significativo en el flujo génico entre poblaciones, lo que resulta en una mayor diferenciación fenotípica y genotípica de especies y poblaciones, especialmente en presencia de poblaciones aisladas dentro del rango de distribución de una especie (Finot et al., 2018b; Ruiz et al., 2010). Como la diversidad genética poblacional está relacionada con la potencial adaptación local y resiliencia, es importante evaluar la distribución de la diversidad genética para la conservación (Finot et al., 2018a). En este sentido, el continuar con el estudio con datos moleculares sigue siendo una tarea pendiente en *Alstroemeria*, en particular para reflejar patrones de divergencia más acordes a la dinámica de flujo génico local y si estos tienen un impacto en el reconocimiento de sus especies (Ruiz et al., 2010).

Códigos de barras de ADN.

Dentro de las herramientas moleculares que podrían ayudar a dilucidar los problemas de delimitación en *Alstroemeria*, destacan los códigos de barras de ADN, también conocidos como barcodes genéticos. Estos son secuencias cortas de ADN que se utilizan como herramienta de reconocimiento molecular para identificar y distinguir especies (Asahina et al., 2010; Coissac et al., 2016; De Boer et al., 2017; Devos et al., 2005; Feng et al., 2015; Herbert et al., 2003, 2005). Estas secuencias se seleccionan de regiones del genoma que presentan variabilidad entre diferentes especies, pero son altamente conservadas dentro de una misma especie (CBOL Plant Working Group, 2009; Hollingsworth et al., 2011). Al analizar las diferencias en las secuencias de nucleótidos, se pueden construir perfiles de código de barras únicos para diferentes especies (Hebert et al., 2003). Estos perfiles se utilizan para crear una base de datos de referencia que permite la identificación rápida y precisa de especies desconocidas (Kress et al., 2005).

El uso de códigos de barras de ADN es un procedimiento estandarizado que tiene la capacidad de identificar especies de manera rápida y precisa, considerando una amplia gama de factores como la etapa de desarrollo, la diversidad morfológica interna, los factores ambientales y el nivel profesional del usuario (Asahina et al., 2010; CBOL Plant Working Group, 2009; Coissac et al., 2016; Feng et al., 2015; Kim et al., 2014; Tehen et al., 2014). Por lo mismo, esta proporciona una herramienta de análisis molecular eficiente para el monitoreo de la biodiversidad, la realización de estudios de filogenia y evolución de especies vegetales (Hebert et al., 2003; Hollingsworth et al., 2011). Los códigos de barras de ADN se han utilizado ampliamente en biosistemática, biodiversidad, evolución de comunidades ecológicas, clasificar especies de herbario, discriminar taxones en familias con taxonomía compleja, protección de especies, identificación de muestras arqueológicas, detección y estudio de especies difíciles de distinguir morfológicamente, entre otros (Cameron., 1999; Chase et al., 2015; Feng et al., 2015; Hebert et al., 2003; Kesanakurti et al., 2011; Sass et al., 2007; Tehen et al., 2014; Xu et al., 2015)

El código de barras de ADN ideal debe tener tres características: 1) Universales o conservados: sus regiones flanqueantes pueden ser revisadas en un amplio rango taxonómico, de preferencia representativos de diferentes linajes evolutivos. 2) Ortólogos: sus variantes alélicas pueden ser trazadas desde un ancestro común, a diferencia de aquellas que provienen de copias en familias de genes generados por poliploidía (parálogos) o heredados por transferencia horizontal (e.g.,

hibridación). 3) Baja copia o única: el registro de la variación alélica es más estable, ya que aumenta las probabilidades de presentar un origen ortólogo (Sang, 2002). En particular, los genes nucleares de baja copia (LCNG, por sus siglas en inglés) proporcionan un marcador adecuado para la reconstrucción filogenética bajo escenarios de aloploidización e hibridación (Doyle et al., 2000; Sang & Zhang, 1999; Small et al., 1998). Además, teóricamente, dado el gran número de genes presente en el genoma nuclear, este puede servir como una fuente “ilimitada” de marcadores genéticos que pueden ofrecer numerosas estimaciones independientes de la filogenia e identidad de un linaje en particular (Sang, 2002).

Los códigos de barras moleculares se basan en la amplificación y secuenciación de la región seleccionada como secuencia de interés en el ADN. La elección de la región adecuada es fundamental para asegurar una buena resolución en la identificación de especies (Hollingsworth et al., 2011), esta debe ser lo suficientemente informativa como para permitir la discriminación precisa entre especies relacionadas y ser de fácil amplificación mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); una técnica comúnmente utilizada para obtener secuencias de barcodes genéticos (Hebert et al., 2003; Hollingsworth et al., 2011). Subsecuentemente, se comparan las secuencias obtenidas de diferentes individuos dentro y entre especies cercanamente relacionadas, a través de diversos métodos filogenéticos y estadísticos, para evaluar su eficacia, precisión y confiabilidad (Hollingsworth et al., 2011). Estas técnicas incluyen el alineamiento de secuencias, la construcción de árboles filogenéticos y el cálculo de distancias genéticas (Kress et al., 2005).

Para que los códigos de barra de ADN sean válidos, se requiere un nivel de precisión apropiado el cual varía dependiendo del contexto, los objetivos de investigación, el grupo de estudio y la región de ADN utilizada. Sin embargo, en general, se espera que el rango de valores muestre una alta concordancia entre secuencias de individuos de la misma especie y una clara diferenciación entre especies cercanamente relacionadas (Hollingsworth et al., 2011; Kress et al., 2005). Cuanto mayor sea la variabilidad observada entre secuencias de diferentes especies, mejor será la capacidad de discriminación del código de barras genético. Por otro lado, se espera que la secuencia de ADN se conserve dentro de una misma especie ya que los individuos de una misma especie deben tener secuencias similares o idénticas. La conservación de secuencias dentro de una especie permite utilizar el código de barras genético para identificar y clasificar individuos de una misma especie.

En las últimas décadas, a pesar de los significativos esfuerzos en la búsqueda de códigos de barras genéticos en plantas, no existe un consenso sobre un código de barras unificado o general para estas (Farrington et al., 2009; Lahaye et al., 2008; Li et al., 2021). Los espaciadores del cistrón nuclear ribosomal (nrITS) han sido ampliamente utilizados a nivel de especie con este propósito. Sin embargo, existen 3 preocupaciones asociadas a él: 1) Evolución concertada incompleta; es decir, pueden generar y almacenar copias parálogas divergentes. 2) Contaminación fúngica particularmente con especies endófitas. 3) Dificultad para amplificar y secuenciar en a través de diversos grupos taxonómicos (Álvarez & Wendel, 2003; Bailey et al., 2003). Simultáneamente, Kress et al., (2005) sugiere al espaciador intergénico *trnH-psbA* como la mejor opción de plastidio. Este es el código de barras de plastidios más utilizado puesto que es fácil de amplificar y posee una gran variabilidad interespecífica (Hollingsworth et al., 2011; Kress et al., 2005). Con este marcador pueden ocurrir microinversiones, lo que se debe tener presente al momento de establecer homología posicional en este tipo de datos (Witlock et al., 2010). Sin embargo, este marcador tiende a tener una terminación prematura de las lecturas de secuenciación por repeticiones de mononucleótidos, llevando a complicaciones durante el proceso de secuenciación de lecturas unidireccionales (CBOL Plant Working Group, 2009; Devey et al., 2011; Ebihara et al., 2010). A pesar de esto, se ha utilizado con éxito en estudios relacionados al uso de códigos de barras de ADN para construir filogenias, y en identificación de especies (González et al., 2009; Kress et al., 2010).

En cuanto a espaciadores cloroplastidiales, Shaw et al., (2007) realizaron una comparación integral evaluando los niveles de variabilidad entre todas las regiones no codificantes de copia única del genoma del cloroplasto. Identificaron regiones con niveles de variación mucho más elevados que las regiones comúnmente utilizadas, destacando los espaciadores *rpl32-trnL*, *trnQ-rps16*, *trnV-ndhC*, *ndhF-rpl32*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *rps16-trnK*, *atpI-atpH* y *petL-psbE*. Por otra parte, a pesar de establecer estar de acuerdo con Kress et al., (2005) al sugerir *trnH-psbA* como buen código de barras taxonómico, se debate sus limitaciones dado que esta región es particularmente corta en angiospermas y, por lo tanto, es posible que no genere suficientes PICs (Caracteres informativos parsimoniosos) para distinguir entre especies estrechamente relacionadas. Este estudio ha sido utilizado en diversos contextos de investigación como la caracterización del genoma completo de cloroplasto para algunas especies, el análisis demográfico de especies en

respuesta a cambios climáticos, y la identificación de especies mediante códigos de barras de ADN (Choudhary et al, 2023; Park et al, 2024, Huang et al 2024; Yu et al. 2024).

Al día de hoy, a pesar de los diversos estudios moleculares conducidos con *Alstroemeria* (Finot et al., 2018b), no se han conducido estudios específicos sobre códigos de barras genéticos entre taxones dentro del género *Alstroemeria*.

El desafío de Alstroemeria ligtu subsp. ligtu.

A. ligtu subsp. *ligtu* es una especie endémica de Chile. Es posible encontrarla desde Puertecillo, Provincia de Cardenal Caro (34°03'S) en la costa de la Región de O'Higgins hasta Angol, Provincia de Malleco (38°10'S) en la Región de la Araucanía, desde el nivel del mar hasta los 1.300m.s.n.m (Finot et al., 2018a). En los sectores costeros crece en pastizales y matorral esclerófilo, y en la cordillera de la costa, en claro de bosque nativo (Finot et al., 2018a).

A. ligtu subsp. *ligtu* es descrita con flores predominantemente rosadas, pero en ocasiones muestran tonalidades más rojizas, o en raras ocasiones, amarillas; con un mucrón corto, grueso y de tono más claro. Los tépalos externos son espatulados u obovados, mientras que los tépalos internos superiores son oblanceolados, estrechos y alargados, siendo 1 cm más largos que los externos. Estos se distinguen por presentar líneas longitudinales purpureas, largas y continuas, así como dos líneas centrales paralelas de color blanco a ligeramente amarillo, que son distintivas de la especie. El tépalo interno inferior es similar a los superiores, pero carece de ornamentación. Además, poseen 6 estambre con anteras de color café-amarillento o gris-liliáceo. (Finot et al. 2018a).

Esta especie pertenece a un complejo de especies para el cual se reconocen 3 subespecies: *Alstroemeria. ligtu* subsp. *ligtu*, *Alstroemeria. ligtu* subsp. *simsii* y *Alstroemeria. ligtu* subsp. *splendens* (Bayer, 1987; Finot et al., 2018a). Para este complejo se han realizado diversas investigaciones, las que incluyen el análisis comparativo del cariotipo tanto de poblaciones de *A. ligtu* subsp. *ligtu* como del Complejo *A. ligtu*, la caracterización de híbridos de *Alstroemeria*, y el contenido de ADN nuclear (Baeza et al., 2006, 2016; Buitendijk et al., 1996, 1998; Zhou et al., 2003). Baeza et al., (2016) estudiaron el cariotipo de estas plantas, demostrando que el índice de asimetría intracromosomal MCA se organiza en dos grupos de poblaciones dentro de la subsp.

splendens, las que también difieren en fórmula cariotípica, morfología, hábitat, tipo de suelo y distribución. Como resultado, se sugiere la existencia de una cuarta subespecie que corresponde a poblaciones ubicadas en la parte baja de la Cordillera de los Andes en la Región del Maule, ya que las poblaciones de mayores altitudes son aquellas que corresponden a las ya descritas como subsp. *splendens* (Muñoz & Moreira, 2003).

Actualmente, dado los estudios cariológicos realizados, el Complejo de *A. ligtu* ha pasado por diferentes reconfiguraciones de su taxonomía. Sin embargo, a pesar de contener evidencia fenotípica que soporta la diferenciación de sus especies, no existe algún estudio molecular acabado en el grupo que permita distinguir entre las tres entidades infraespecíficas antes mencionadas. Dentro de las subespecies destaca *A. ligtu* subsp. *ligtu*, la cual, en términos de distribución no posee límites geográficos bien definidos, pero se la ha descrito en rangos costeros y del interior hasta 1.300 m.s.n.m. Esta distribución se puede superponer con la distribución de *A. ligtu* subsp. *simsii*, *A. hookeri* subsp. *hookeri*, *A. presliana* subsp. *australis* y *A. aurea*. Con estas especies, además posee afinidades morfológicas. Dentro del contexto del desarrollo de un código de barras de ADN, puede ser conveniente analizar *A. ligtu* subsp. *ligtu* debido a las siguientes características: 1) Posee una alta representatividad dentro del Complejo *A. ligtu*. 2) Posee una alta afinidad con otras especies de su rango de distribución, lo que puede llegar a permitir que el código de barras sea aplicable a un conjunto diverso de organismos. 3) No posee límites geográficos definidos.

Contexto.

La completa comprensión de la biología y la sistemática de las poblaciones nativas de *Alstroemeria* es de gran importancia debido a su alto valor ornamental. En especies del género se han documentado altos niveles de estructuración genética, como es el caso de los complejos *A. hookeri* y *A. presliana* (Fuentes et al., 2015; Ruiz et al., 2010). Por lo que la realización de estudios a nivel molecular de estas plantas podría contribuir en futuros planes de manejo y cultivo contribuyendo al desarrollo de los recursos económicos de manera consciente (Baeza et al., 2015, 2018; Finot et al., 2018a). A pesar de la existencia de varios caracteres que facilitan la diferenciación de las entidades taxonómicas dentro del género *Alstroemeria* a nivel fenotípico, se carece de herramientas que permitan realizar esta distinción desde una perspectiva molecular. La carencia

de información molecular representa un desafío significativo para la taxonomía y la comprensión precisa de las relaciones filogenéticas dentro del género. En este contexto, este estudio busca superar esa limitación al emplear técnicas moleculares para examinar las relaciones y diferencias genéticas dentro de *A. ligtu* subsp. *ligtu* y así contribuir a una mejor delimitación taxonómica de esta especie.

Esta investigación tiene como objetivo generar un código de barras de ADN, basado tanto en regiones cloroplastidiales como nucleares, que permita diferenciar individuos de *A. ligtu* subsp. *ligtu* de otras especies de *Alstroemeria* que comparten su distribución geográfica. Se espera que este código de barras genético proporcione un método de identificación preciso y rápido. La elección de esta especie se debe a su representatividad dentro del complejo y su relación con otras especies afines, lo que puede llegar a permitir que el código de barras sea aplicable y facilite una confiable identificación y clasificación taxonómica. Además, como todas las especies del género, posee un alto interés científico, en términos de identificación, biodiversidad, conservación y comercio, por lo que la obtención de un código de barras de ADN es de un alto interés para esta especie y, potencialmente, para otras *Alstroemerias* nativas (Finot et al., 2018a).

Es importante notar que para este proyecto se descartó el uso de secuencias del cistron nuclear ribosomal y sus regiones (i.e., ETS, ITS1 e ITS2), como potencial barcode, debido a que pruebas preliminares reportaron un alto nivel de saturación de sustitución nucleotídica, sugiriendo la existencia de alelos parálogos las entre las especies nativas de *Alstroemeria* (Toro Núñez et al. comm. pers.).

HIPÓTESIS

La generación de un código de barras de ADN permitirá la identificación de individuos pertenecientes a *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu* y su discriminación con individuos de otras especies del género *Alstroemeria* que comparten distribución geográfica.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Diferenciar *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu* de otras especies de *Alstroemeria* con las que comparte distribución mediante un barcode genético.

Objetivos específicos.

1. Identificar y seleccionar regiones específicas del ADN que sean altamente variables y exclusivas de *A ligtu* subsp. *ligtu* para el desarrollo de barcodes genéticos.
2. Elaborar marcadores moleculares flanqueantes que permitan delimitar las secuencias objetivo para la formación de barcodes genéticos.
3. Utilizar técnicas de secuenciación y análisis bioinformáticos para asegurar la precisión y capacidad de discriminación del barcode genético generado.

METODOLOGÍA

Material biológico.

A menudo se recurre al uso de sílica gel para evitar la degradación del ADN. Si bien este método es efectivo para deshidratar y detener la acción de las DNAsas (Chase & Hills, 1991), no permite recuperar niveles de integridad de ADN genómico total como para detectar barcodes nucleares de copia simple (Sang, 2002). Por este motivo, se optó por utilizar hojas frescas obtenidas de individuos recolectados en terreno o desde invernadero, aprovechando su resistencia para mantenerse vivas por varios días una vez cortadas (Baeza et al., 2008; Carrasco et al., comm. pers).

Se recolectaron muestras pertenecientes a las especies *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu*, *Alstroemeria ligtu* subsp. *simsii*, *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri*, *Alstroemeria presliana* subsp. *australis* y *Alstroemeria aurea*. Se consideró el estado de las muestras recolectadas, aceptando sólo aquellas que tuvieran características idóneas, en particular eligiendo especímenes libres de enfermedades e irregularidades morfológicas. Para las especies *A. ligtu* subsp. *ligtu*, *A. ligtu* subsp. *simsii* y *A. hookeri* subsp. *hookeri*, los individuos se recolectaron desde el invernadero experimental del departamento de Botánica de la Universidad de Concepción, donde se conservan ejemplares de estas especies. Estos ejemplares son representativos de diversas poblaciones entre la región de O'Higgins y Biobío (**Tabla 1 y Figura 1**).

Para las especies *A. presliana* subsp. *australis* y *A. aurea* la recolección se realizó directamente desde localidades de la Región de la Araucanía visitadas en 2023. Como guía de localización, se utilizó la Guía de Campo Alstroemerias Chilenas de Finot et al., (2018a) como referencia geográfica para el muestreo. Una vez recolectadas, las muestras fueron almacenadas en un refrigerador portable donde se mantuvieron frescas hasta el momento de ser extraído el ADN. Además, como estas muestras no se encontraban en registros herborizados, se incorporaron especímenes voucher representativos de cada población en el herbario de la Universidad de Concepción (CONC). A los individuos recolectados en campo y utilizados en el muestreo de barcodes se les registró una foto de sus flores para evitar confusiones en su fenotipo floral por las deformaciones que suelen suceder con el material herborizado (Besnard et al., 2018). Todas las

colectas contaron con un sólo individuo, a excepción de las poblaciones de *A. presliana* subsp. *australis* (PCM 41, 42, 44, 45 Y 47) las de *A. aurea* (PCM 43 y 46), y una población de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219), de las cuales se utilizaron 2 individuos por población.

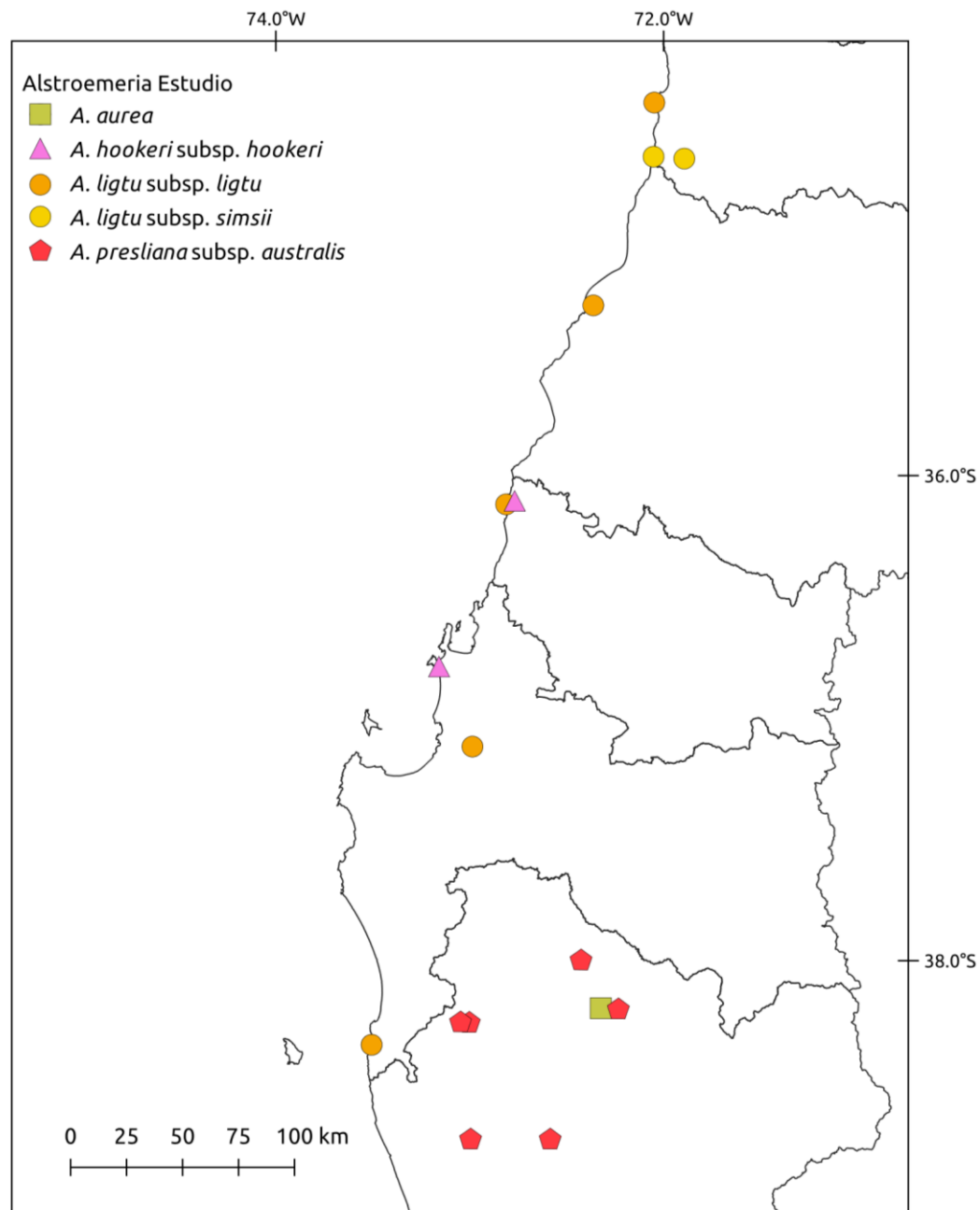


Figura 1. Mapa de ubicación de las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri*, *A. ligtu* subsp. *ligtu*, *A. ligtu* subsp. *simsii* y *A. presliana* subsp. *australis* usadas en este estudio.

Tabla 1. Material biológico recolectado y usado en la presente tesis.

Especie	Código Colecta	Localidad	Coordenadas
<i>A. hookeri</i> subsp. <i>hookeri</i>	OTN 151	Región del Biobío. Estación biológica UdeC, Península de Hualpén.	36°47'52.0"S; 73°09'30.0"W
	OTN 219	Región del Ñuble, Cobquecura sector Iglesia de Piedra.	36°05'43.1"S; 72°48'41.6"W
<i>A. ligtu</i> subsp. <i>simsii</i>	OTN 211	Reg. de O'Higgins, Saliendo de Bucalemu, Ruta I-72, hacia Nilahue Bajo.	34°39'23.5"S; 72°03'07.6"W
	OTN 223	Reg. de O'Higgins, Prov. Cardenal Caro, hacia San Pedro de Alcántara.	34°39'52.8"S; 71°53'36.6"W
<i>A. ligtu</i> subsp. <i>ligtu</i>	OTN 178	Reg. de O'Higgins, Pichilemu, Sendero a Playa la Pancora.	34°25'35.0"S; 72°02'53.6"W
	OTN 217	Región del Maule, Ruta K-24, entre esteros Cañete y Guenon.	35°17'07.8"S; 72°21'46.4"W
	OTN 220	Región del Ñuble, Cobquecura sector Iglesia de Piedra.	36°05'44.0"S; 72°48'39.4"W
	OTN 222	Región del Biobío, Concepción. Camino a Santa Juana (Ruta 156).	37°07'24.71"S; 72°59'10.58"W
	PCM 32	Región del Biobío, Tirúa, sendero "Cabeza de perro".	38°20'28.0"S; 73°30'23.0"W
<i>A. aurea</i>	PCM 43-2	Reg. Araucanía, Inspector Fernández. Ruta R-71, hacia P.N. Tolhuaca.	38°11'46.0"S; 72°17'45.0"W
	PCM 46-3	Región de la Araucanía, Comuna de Lumaco, ruta R-90-P.	38°14'51.0"S; 73°02'52.0"W
<i>A. presliana</i> subsp. <i>australis</i>	PCM 41-4	Región de la Araucanía, Collipulli. Ruta 5 sur, Km 578.5.	37°59'54.0"S; 72°25'36.0"W
	PCM 42-10	Reg. Araucanía, Inspector Fernández. Ruta R-71, hacia al P.N. Tolhuaca.	38°11'46.0"S; 72°17'45.0"W
	PCM 44-2	Región de la Araucanía, Temuco. Cerro Nielol.	38°43'18.0"S; 72°35'07.0"W
	PCM 45-4	Región de la Araucanía, Nueva Imperial. Ruta S-216.	38°43'15.0"S; 72°59'40.0"W
	PCM 47-9	Reg. Araucanía, Lumaco, ruta R-90-P, entre Los Laureles y La Aurora.	38°14'30.0"S; 73°01'50.0"W

Identificación y selección de regiones específicas del ADN como código de barras.

En cuanto a marcadores cloroplastidiales, basados en resultados obtenidos de tests preliminares, se utilizó la región *rpl32-trnL* por presentar el mayor porcentaje de variación entre especies dentro del plastoma de *Alstroemeria* (Carrasco et al. comm pers.).

En el caso de marcadores nucleares, se utilizó un set de prueba de 10 marcadores nucleares, universales, ortólogos y de copia única para *Alstroemeria*. Estos se generaron a partir de una secuenciación de transcriptoma y un análisis de SNP array de un híbrido comercial; proveídas por la Universidad de Wageningen (Países Bajos) y generadas bajo el proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11220556. Para esto, se inició con un set de 500 secuencias nucleares ortólogas putativas, las que se secuenciaron previamente con la técnica TargetSeq (Daicel ArborBioSci, Michigan, USA) en 8 muestras de *Alstroemeria*: *A. hookeri* subsp. *hookeri*, *A. hookeri* subsp. *sansebastiana*, *Alstroemeria angustifolia*, *A. ligtu* subsp. *ligtu*, *A. ligtu* subsp. *simsii*, *A. ligtu* subsp. *splendens*. De los *contigs* recuperados, se filtraron todas aquellas con potencial estructura de parálogos o de cobertura incompleta, usando pipeline Hybpiper (Johnson et al. 2016). Posteriormente, el set de búsqueda se redujo a 250 regiones, las que fueron revisadas por niveles de cobertura y profundidad (i.e, profundidades individuales superiores a 10X y coberturas de 100% a lo largo de las secuencias), filtrando a un set final de 80 regiones nucleares para testear el diseño de partidores.

Diseño de marcadores moleculares flanqueantes.

Para generar los partidores se utilizaron las 80 regiones nucleares obtenidas para las 8 muestras de *Alstroemeria* mencionadas en la sección 2, las cuales fueron alineadas y analizadas en Aliview v.1.28 (Larsson, A. 2014). Para su selección, se siguieron los siguientes criterios: a) La presencia de SNPs entre las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* y *A. ligtu* subsp. *ligtu*. b) Sitios de flanqueo conservados entre las 8 muestras testeadas. c) La presencia exclusiva de SNPs como variantes alélicas. Como resultado, del set inicial de 80 regiones nucleares, se identificaron 10 potenciales marcadores para el presente proyecto (**Tabla 2**). El diseño de partidores se realizó usando la herramienta Primer3 v.2.3.7 (Koressaar et al, 2018), implementada en la plataforma Geneious prime v.2023.2 (Biomatters

Inc., Boston, USA), donde se configuraron parámetros de diseño con productos amplificados con temperaturas de melting de 60°C referenciales y un producto de PCR no superior a 800 pares de bases. Los fragmentos fueron testeados in silico sobre las regiones transcriptómicas antes de ordenar la construcción de los partidores, lo que se realizó con la empresa Fermelo Biotec (Región Metropolitana).

Tabla 2. *Marcadores moleculares generados por esta tesis.*

	Forward	Reverse
A	104g11_89F	104g11_637R
B	3951g293_415F	3951g293_970R
C	4249g319_166F	4249g319_599R
D	4652g339_234F	4652g339_287R
E	5160g362_202F	5160g362_252R
F	7620g422_951F	7620g422_144R
G	11140cg31_137F	11140cg31_701R
H	17081cg108_210F	17081cg108_272R
I	17437cg113_532F	17437cg113_101R
J	31986cg425_617F	31986cg425_112R

Extracción y amplificación de ADN.

Para cada una de las muestras obtenidas de las diferentes especies de *Alstroemeria*, el ADN genómico se aisló del tejido de sus hojas siguiendo el Protocolo de Extracción para ADN genómico derivado del kit DNAeasy miniprep de QIAGEN (Venlo, Países Bajos). Para visualizar la calidad de la extracción de ADN se realizó una electroforesis donde se sembró una mezcla de 1µl de ADN con 1µl de fluoróforo para cada extracción y se corrió a 100V por 15min, para luego ser observada con el sistema de fotodocumentación BioRad Gel DocTM EZ Imager (Hércules, California, Estados Unidos).

Para la obtención de amplificadores de las regiones barcodes propuestas, se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) basado en el kit MasterMix Sapphire (TAKARA) y siguiendo las temperaturas de desnaturalización sugeridas en el diseño de partidores. Estas amplificaciones por PCR se realizaron en mezclas de reacción de 25µl que contenían 24µl de mezcla de reacción y 1µl de ADN. Se utilizó el ADN diluido en una relación 1:20, con 5µl de ADN y 95 µl de agua nanopura. Las cantidades de reactivos utilizados para la realización de la mezcla de reacción fue igual para todos los experimentos (**Tabla 3**), el único cambio implementado fue la utilización de BSA (Albúmina Sérica Bovina, por sus siglas en inglés) en pruebas con partidores cloroplastidiales y DMSO (Dimetilsulfóxido) en pruebas con partidores nucleares. Todas las amplificaciones fueron visualizadas mediante una electroforesis que corrió a 80V por 20min y verificadas con el sistema de fotodocumentación.

Tabla 3. Reactivos utilizados para la mezcla de reacción para PCR, en microlitros.

	µl
Zafiro	150
Agua nanopura	126
BSA/DMSO	6
Partidor forward	3
Partidor reverse	3

a. Testeando partidores nucleares.

Para probar el funcionamiento de los 10 partidores nucleares generados, se realizaron reacciones PCR con cada uno de ellos utilizando dos muestras, correspondientes a *A. hookeri* subsp. *hookeri* y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (muestras 2 y 9, respectivamente; **Tabla 6**). Las muestras se amplificaron con un gradiente de optimización de temperaturas, el que fue desde los 55°C a los 60°C. Los parámetros del termociclador utilizados fueron un primer periodo de 5 min. a 94°C, seguido por 27 ciclos de 30s a 94°C, 30s a temperatura variable (gradiente de 55 a 60°C) y 1 min. a 72°C, y un periodo de extensión final de 10 min. a 72°C para terminar la reacción de PCR.

b. Amplificación del partidador nuclear.

Luego del testeo de partidores, se realizó una reacción PCR focalizada con el partidador nuclear que rindió los mejores resultados de amplificación (i.e., amplificación de una banda en todas las muestras testeadas). Para esto se utilizaron todas las muestras de *A. ligtu* subsp. *ligtu*, *A. ligtu* subsp. *simsii* y *A. hookeri* subsp. *hookeri*. Posteriormente, se efectuó una segunda reacción PCR con cambios de concentraciones para evaluar la posibilidad de obtener mejores resultados (Tabla 4). Los parámetros del termociclador utilizados fueron un primer periodo de 5 min. a 94°C, seguido por 27 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 57°C y 1 min. a 72°C, y un periodo de extensión final de 10 min. a 72°C para terminar la PCR.

Tabla 4. Cambios en la concentración de reactivos para la mezcla de reacción para PCR con partidores nucleares, en microlitros.

	µl	
	a	b
Zafiro	150	150
Agua nanopura	132	133.5
BSA	6	6
Partidor forward	3	2.25
Partidor reverse	3	2.25

c. Amplificación con partidores cloroplastidiales.

Se realizaron reacciones PCR con el partidador cloroplastidial *rpl32-trnL* para las muestras 1 a 24 (**Tabla 6**). Esta prueba se realizó una segunda vez con cambios de concentraciones los cuales se pueden visualizar en la tabla 5, los tubos Eppendorf a amplificar para las muestras con concentraciones a poseían 1µl de ADN (sin diluir) y 24µl de mezcla de reacción mientras que los tubos con concentraciones b poseían 0.5µl de ADN (1:20) y 24.5µl de mezcla de reacción. Los parámetros del termociclador utilizados fueron un primer periodo de 5 min a 94°C, seguido por 27 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 50°C y 1 min. a 72°C, y un periodo de extensión final de 10 min. a 72°C para terminar la reacción de PCR.

Tabla 5. Cambios en la concentración de reactivos para la mezcla de reacción para PCR con el partidor *rpl32-trnL*, en microlitros.

	μl	
	a	b
Zafiro	150	150
Agua nanopura	126	132
BSA	6	6
Partidor forward	3	3
Partidor reverse	3	3

Secuenciación y análisis bioinformáticos.

Los productos de PCR obtenidos se enviaron a Macrogen Chile (Santiago de Chile) para ser secuenciados bajo el método de secuenciación de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas Forward y Reverse a través del programa Geneious prime v.2023.2, las que fueron comparadas para obtener un consenso. Las secuencias de consenso obtenidas con partidores cloroplastidiales se alinearon contra muestras generadas anteriormente por el proyecto FONDECYT de Iniciación N°1122056 (**Tabla 14**). El set de datos final (i.e., las generadas para esta tesis y las generadas anteriormente) fueron alineadas con MAFFT v.7.490 (Katoh & Standley, 2016), ocupando el algoritmo de optimización automática y parámetros por defecto.

Las secuencias obtenidas con el partidor nuclear fueron introducidas en la herramienta BLAST v.2.2.25 (Altschul et al., 1990) de Genbank. Con esta, se realizó una búsqueda por defecto para determinar procedencia a través de una búsqueda con todos los organismos y secuencias disponibles en la base de datos de Genbank (hongos, bacterias, animales, etc.). Estas búsquedas se hicieron a través de 3 optimizaciones: *megablast* (secuencias muy similares), *discontiguous megablast* (secuencias más disimilares), y *blastn* (secuencias algo similares).

Con respecto al partidor cloroplastidial *rpl32-trnL*, se caracterizó sus secuencias ingresando los datos obtenidos a DNAsp versión 5 (Rozas et al., 2017). A través de este programa se obtuvieron métricas de diversidad tales como: largo de secuencia, número y diversidad de haplotipos (h y H) y diversidad de nucleótidos (π). Por otra parte, se buscó distinguir grupos taxonómicos presentes, por lo que se infirió una Red de Haplotipos para todos los individuos muestreados. La construcción de la red se llevó a cabo mediante el software PopART versión 1.7 (Leigh et al., 2018), empleando criterios de parsimonia basados en una red de extensión mínima con el algoritmo TCS (Clement et al., 1999). Por otro lado, el mismo set de datos fue analizado para la inferencia de un árbol filogenético usando el criterio de optimización de máxima verosimilitud con IQTREE versión 1.6.12 (Nguyen et al., 2019), usando *A. aurea* como grupo externo (Chacón et al., 2012). El modelo de sustitución nucleotídica fue inferido automáticamente a través del programa Model Finder (Moorthy et al., 2017), usando el criterio de información Bayesiana (BIC) incluido por defecto en IQTREE. Adicionalmente, se realizó un cálculo de soporte de ramas en el árbol más probable inferido a través de un bootstrap no paramétrico de 100 réplicas, en el cual se interpretó un soporte significativo para clados con índices sobre el 70% (Hillis & Bull., 1993). El árbol filogenético resultante fue visualizado en FigTree v.1.4.4 8 (Rambaut., 2018).

Finalmente, para los efectos de esta tesis, se considerará la calidad del barcode analizado en términos de su capacidad de recuperar grupos genéticos o filogenéticos coherentes con la propuesta taxonómica morfológica de los especímenes analizados. Es decir, se espera la existencia de haplogrupos congruentes o clados definidos por monofilia que sean taxonómicamente congruentes.

RESULTADOS

Resultados de laboratorio.

Para una mejor comprensión de las imágenes, se elaboró una tabla (**Tabla 6**) con las muestras y especies utilizadas, las cuales fueron numeradas del 1 al 24.

Tabla 6. Material biológico utilizado en los análisis de laboratorio.

	Código colecta	Especie
1	OTN 151	<i>A. hookeri subsp. hookeri</i>
2	OTN 219	
3	OTN 219A	
4	OTN 211	<i>A. ligtu subsp. simsii</i>
5	OTN 223	
6	OTN 178	<i>A. ligtu subsp. ligtu</i>
7	OTN 217	
8	OTN 220	
9	OTN 222	
10	PCM 32	
11	PCM 41-1	<i>A. presliana subsp. australis</i>
12	PCM 41-4	
13	PCM 42-7	
14	PCM 42-10	
15	PCM 43-2	<i>A. aurea</i>
16	PCM 43-8	
17	PCM 44-2	<i>A. presliana subsp. australis</i>
18	PCM 44-4	
19	PCM 45-4	
20	PCM 45-7	
21	PCM 46-3	<i>A. aurea</i>
22	PCM 46-4	
23	PCM 47-7	<i>A. presliana subsp. australis</i>
24	PCM 47-9	

a. Calidad del ADN genómico total extraído.

La electroforesis de extracción de ADN de los individuos de *A. hookeri* subsp. *hookeri*, *A. ligtu* subsp. *simsii* y *A. ligtu* subsp. *ligtu*, reveló bandas únicas y bien definidas (**Figura 2**). Esto sugiere una alta calidad en la extracción de ADN, con una integridad y concentración adecuadas. Estos datos respaldan la efectividad del método de extracción utilizado, y confirma la idoneidad de la muestra para los análisis a realizar.

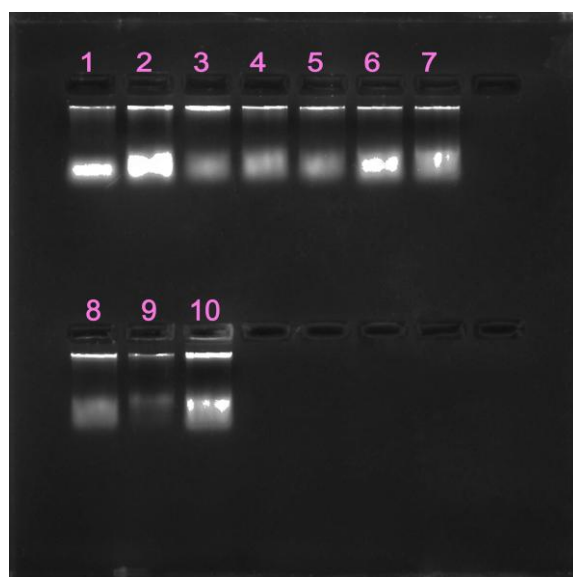


Figura 2. Calidad de la extracción de ADN para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10).

b. Amplificaciones preliminares marcador nuclear.

A partir de los resultados obtenidos con los partidores nucleares con las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) (**Figuras 3, 4, 5 y 6**) a diferentes temperaturas de *annealing*, se desprende que: 1) Estos sólo funcionan para una de las especies. 2) Presentan múltiples bandas o una migración arrastrada. 3) No generaron ninguna banda discernible. Esto, con la excepción del partidor 3, el cual corresponde a 4249g319_166F - 1419g319_599R, a los 57°C. Por esto, se decidió continuar con este partidor para los análisis siguientes.

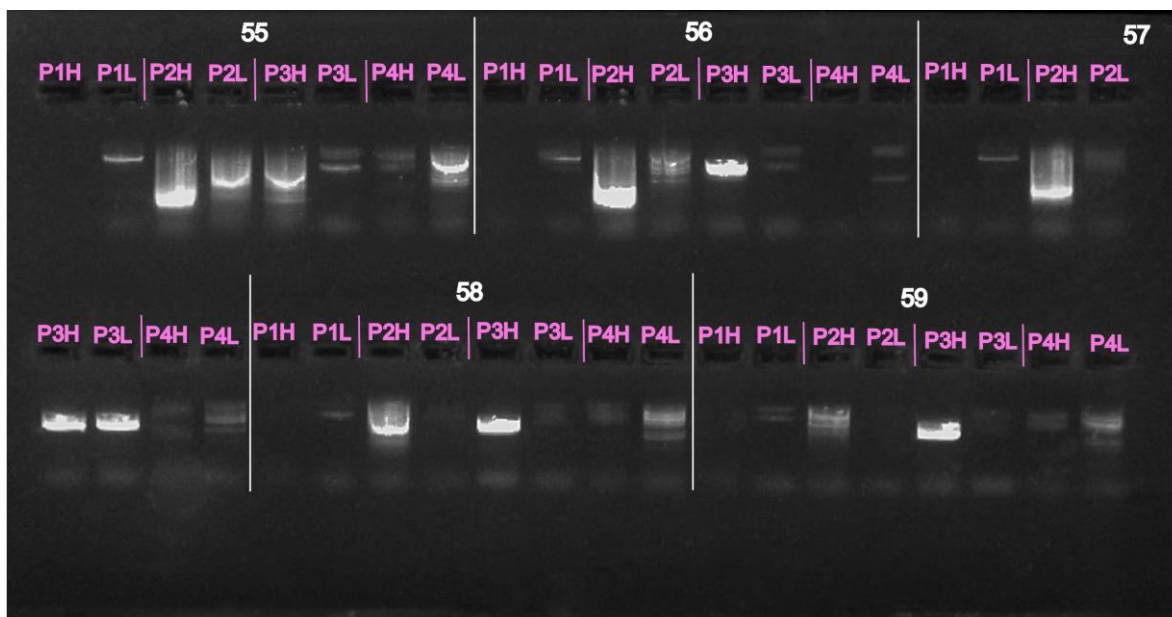


Figura 3. PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) representadas por H y L respectivamente. Utilizando los partidores nucleares (P) 1, 2, 3 y 4 (tabla 2) en un rango de temperaturas de *annealing*, que van de los 55 a 59°C.

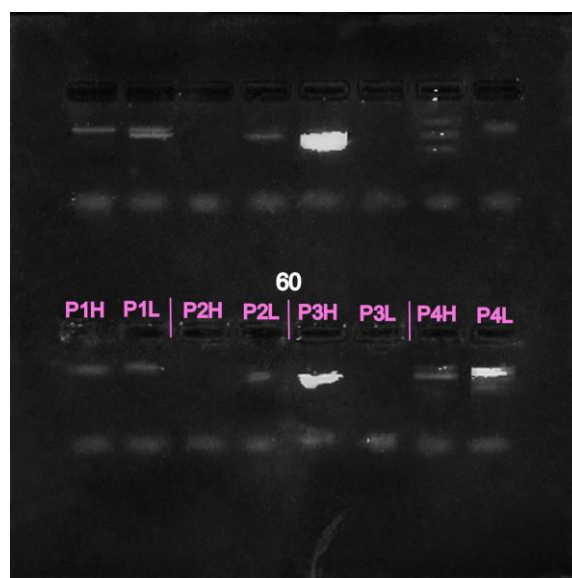


Figura 4. PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) representadas por H y L respectivamente, con los partidores nucleares (P) 1, 2, 3 y 4 (tabla 2) a una temperatura de *annealing* de 60°C.

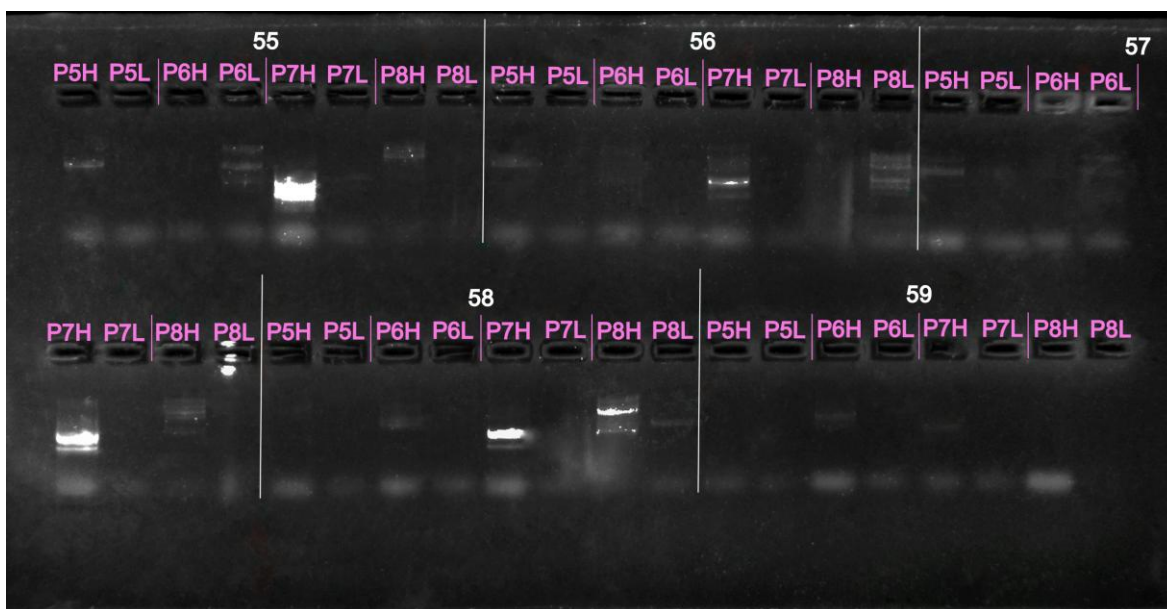


Figura 5. PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) representadas por H y L respectivamente. Utilizando los partidores nucleares (P) 5, 6, 7 y 8 (tabla 2) a diferentes temperaturas de *annealing*, que van de los 55 a 59°C.

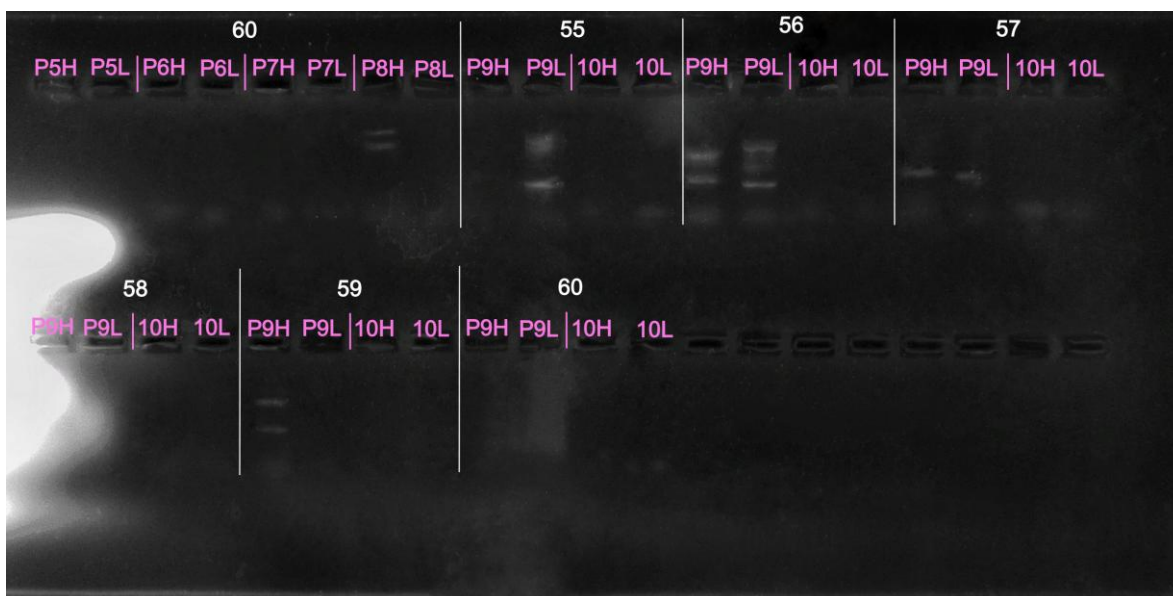


Figura 6. PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (OTN 219) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (OTN 220) representadas por H y L respectivamente. Utilizando los partidores nucleares (P) 5, 6, 7 y 8 (tabla 2) a 60°C. Y los partidores nucleares (P) 9 y 10 a diferentes temperaturas de *annealing* que van desde los 55 a los 60°C.

**c. Amplificaciones marcador nuclear específicas
(4249g319_166F - 1419g319_599R).**

Para el partidor nuclear, con una temperatura de *annealing* de 57°C, se obtuvieron resultados positivos de una sola banda para las muestras 1, 2 y 3, las cuales corresponden a individuos de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (**Figura 7 y 8**). En un segundo intento, se buscó lograr obtener mejores resultados para las muestras 4 a 10, manteniendo la muestra 2 presente para actuar como referencia. Se obtuvieron múltiples bandas para todos los individuos, incluyendo el número 2 el cual si registro un funcionamiento exitoso en pruebas anteriores. La única variación entre ambos intentos fue una mayor cantidad de material cargado en el gel.

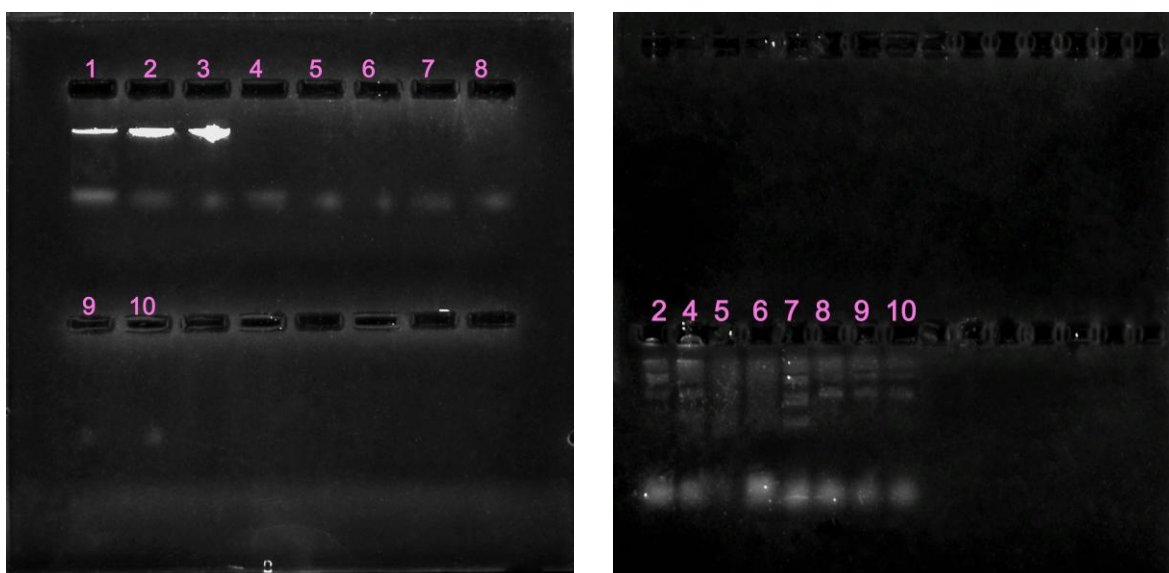


Figura 7 (izquierda) y Figura 8 (derecha). A la izquierda, PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10) con el partidor nuclear 4249g319_166F - 1419g319_599R a 57°C. A la derecha, repetición de la PCR realizada en la imagen 8 pero eliminando las muestras *A. hookeri* subsp. *hookeri* 1 y 3.

Para corroborar la consistencia de los resultados observados se decidió realizar una prueba con cambios en las concentraciones de reactivos para la mezcla de reacción de la PCR (**Tabla 4**). Como resultado se observó, tanto para la concentración a como la concentración b, que se presentaron tres bandas con un buen resultado, las cuales corresponden a las muestras 1, 2 (*A. hookeri* subsp. *hookeri*) y 8 (*A. ligtu* subsp. *ligtu*) (**Figura 9**). Para las demás muestras se observó que, en la “concentración a” estas presentaron múltiples bandas, mientras que en la “concentración b”, si bien son bandas únicas, estas fueron detectadas con una señal débil (**Figura 9**). Como resultado, se decidió secuenciar las muestras 2 y 8 de la “concentración b” para corroborar la identidad del fragmento nuclear amplificado.

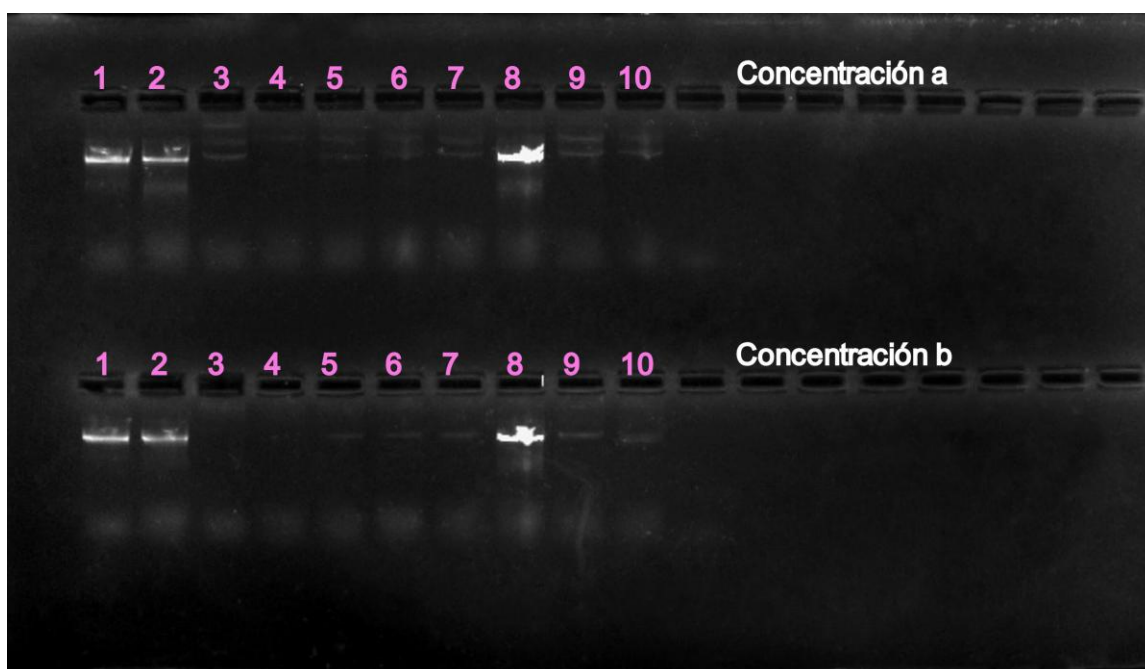


Figura 9. PCR realizada con cambios en las concentraciones de reactivos, para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10) con el partidor nuclear 4249g319_166F - 1419g319_599R a una temperatura de *annealing* de 57°C. La fila superior representa una mayor concentración de ADN, mientras que la fila inferior una más diluida.

d. Amplificación marcador cloroplastidial (*rpl32-trnL*).

Al amplificar las muestras con el partidor cloroplastidial, la mayor parte de las muestras no resultaron con una amplificación positivas (**Figura 10**). El partidor *rpl32-trnL* ha sido testeado en múltiples ocasiones dentro del género *Alstroemeria*, habiendo obtenido resultados óptimos previamente (Baeza et al. 2023; Carrasco et al., comm. pers.). Debido a estos antecedentes, se realizó una segunda prueba de amplificación donde se probaron diferentes concentraciones de reactivos (**Tabla 5**).

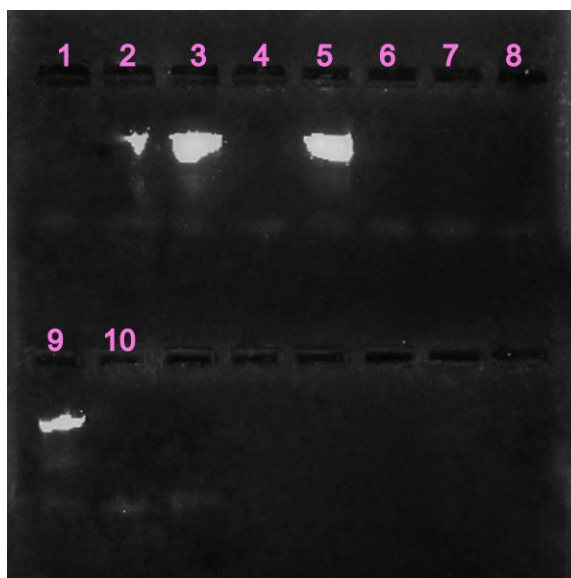


Figura 10. PCR realizada para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simisii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10) con el partidor cloroplastidial *rpl32-trnL* a una temperatura de *annealing* de 50°C.

Los cambios para la prueba propuesta rindieron resultados positivos (i.e., amplificación positiva y la detección de una sola banda de tamaño conocido) en todas las muestras testeadas (**Figura 11**), lo que corrobora que durante el primer intento de amplificación hubo un problema de ejecución. Se optó por utilizar las muestras de la “concentración b”, puesto que las bandas presentaron una mayor definición.

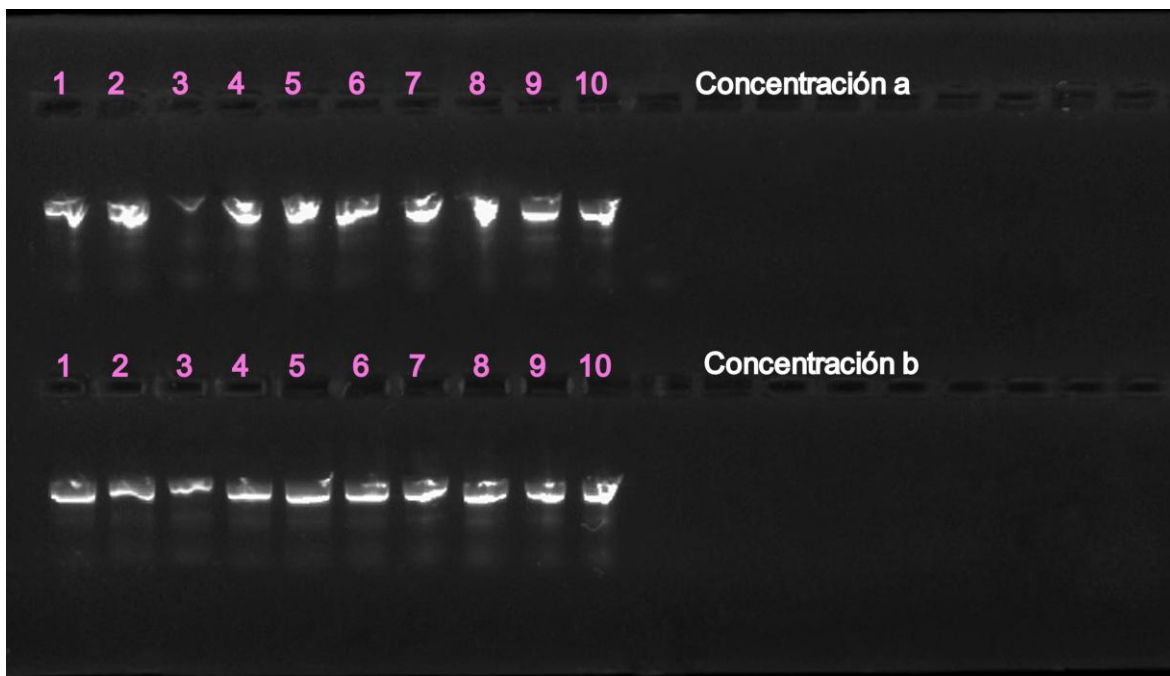


Figura 11. PCR realizada con cambios en las concentraciones de ADN para las muestras de *A. hookeri* subsp. *hookeri* (1, 2 y 3), *A. ligtu* subsp. *simsii* (4 y 5) y *A. ligtu* subsp. *ligtu* (6, 7, 8, 9 y 10) con el partidor cloroplastidial *rpl32-trnL* y una temperatura de annealing de 50°C. La fila superior representa una mayor concentración de ADN (sin dilución: concentración a), mientras que la fila inferior una más diluida (1:20: concentración b).

Resultados de secuenciación

a. Marcador nuclear (4249g319_166F - 1419g319_599R).

Dentro de las búsquedas realizadas con las optimizaciones *megablast* y *discontiguous megablast* (**Figuras 12 y 13**) no se encontraron coincidencias con ningún organismo de la base de datos. Por otro lado, la búsqueda realizada con *blastn* (**Figura 14**), aquella menos rigurosa en términos de similitud, arrojó una baja similitud con *Fallopia convolvulus* (Polygonaceae), la que se dio en un intervalo de sólo 220 de las 794 pares de bases disponibles en el barcode (~20% del total).

The screenshot displays the BLAST 2.2.25 interface. At the top, the NIH National Library of Medicine logo is visible. The search title is "BLAST® » blastn suite » results for RID-0BKSPBHH013". Below the title, there are links for "Edit Search", "Save Search", and "Search Summary". The search parameters are listed on the left: Job Title (Nucleotide Sequence), RID (0BKSPBHH013), Program (Citation), Database (nt), Query ID (Ic|Query_7364105), Description (None), Molecule type (dna), Query Length (789), and Other reports. The "Filter Results" section on the right allows filtering by Percent Identity, E value, and Query Coverage. A yellow banner at the bottom indicates "No significant similarity found. For reasons why, click here".

Job Title	Nucleotide Sequence
RID	0BKSPBHH013 Search expires on 03-30 04:12 am Download All
Program	Citation
Database	nt See details
Query ID	Ic Query_7364105
Description	None
Molecule type	dna
Query Length	789
Other reports	?

Filter Results

Percent Identity	E value	Query Coverage
to	to	to
		Filter Reset

⚠ No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

Figura 12. Búsqueda realizada a través de la herramienta BLAST 2.2.25 (Altschul et al., 1990) en Genbank, con la optimización megablast (secuencias muy similares).

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-0BKT4MJG013

Home Recent Results Saved Strategies Help

[Edit Search](#) Save Search Search Summary

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title **Nucleotide Sequence**

RID [0BKT4MJG013](#) Search expires on 03-30 04:12 am [Download All](#)

Program [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID IcllQuery_7376111

Description None

Molecule type dna

Query Length 789

Other reports

Filter Results

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

Figura 13. Búsqueda realizada a través de la herramienta BLAST 2.2.25 (Altschul et al., 1990) en Genbank, con la optimización *discontiguous megablast* (secuencias más disimilares).

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-0BKTWU6F013

Home Recent Results Saved Strategies Help

[Edit Search](#) Save Search Search Summary

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title **Nucleotide Sequence**

RID [0BKTWU6F013](#) Search expires on 03-30 04:12 am [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID IcllQuery_7395773

Description None

Molecule type dna

Query Length 789

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism ☐ exclude only top 20 will appear

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary **Alignments** Taxonomy

Alignment view Pairwise ☐ CDS feature [Restore defaults](#) [Download](#)

1 sequences selected

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Fallopia convolvulus genome assembly, chromosome: 11

Sequence ID: [OZ024728.1](#) Length: 59587980 Number of Matches: 1

Range 1: 5413992 to 5414041 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
55.4 bits(60)	0.026	42/50(84%)	0/50(0%)	Plus/Plus

Query 171 CCATTTGTGCACATTTACAGTTGAGTTATAATCTTAAGGAAAAATG 220

Sbjct 5413992 CCATTTGTGCACATTTCTGTTGTGATCTAATCTAATAAGGAATAATG 5414041

Figura 14. Búsqueda realizada a través de la herramienta BLAST 2.2.25 (Altschul et al., 1990) en Genbank, con la optimización *blastn* (secuencias algo similares).

b. Marcador cloroplastidial.

La secuenciación reveló que, de la muestra de 100 secuencias cloroplastidiales, se obtuvo una matriz alineada total de 698 sitios. De estos, al excluir sitios de inserción y deleción, se obtuvo un total de 643 sitios. Además, se detectaron 21 sitios segregantes entre las muestras, lo que indicaría una variabilidad genética considerable dentro y entre las poblaciones analizadas (**Tabla 7**).

Tabla 7: Datos sobre las secuencias obtenidas con el partidor *rpl32-trnL*. Para el número de sitios variables no se consideran los eventos de inserción y deleción presentes en el alineamiento.

Número de secuencias	100
Número de sitios	698
Número total de sitios (excluyendo gaps y datos faltantes)	643
Número de sitios segregantes (polimorfismo)	21

El análisis reveló una diversidad de nucleótidos por sitio (π) notablemente alta, con un valor de 0.0085, indicando una considerable variabilidad genética en la muestra estudiada (**Tabla 8**). Además, los bajos valores de la varianza muestral (0.0000001) y de la desviación estándar (0.00034) de este indicador sugiere consistencia una dispersión mínima de los valores de diversidad observada. Por otro lado, el número promedio de diferencias de nucleótidos (k) de 5.461 indica una proporción considerable de variación genética entre las secuencias analizadas. En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de una población genéticamente diversa, pero con una estructura genética estable y consistente en el marcador cloroplastidial empleado.

Tabla 8: Estadísticas de los nucleótidos de las secuencias obtenidas con el partidor *rpl32-trnL*.

Diversidad de nucleótidos (por sitio)	$\pi = 0.00849365$
Varianza muestral de π	0.0000001
Desviación estándar de π	0.00034
Número promedio de diferencias de nucleótidos	$k: 5.46141$

Los resultados muestran que se identificaron un total de 14 haplotipos distintos en las secuencias analizadas. La diversidad de haplotipos (H_d) alcanzó un valor de 0.0848, sugiriendo una alta variabilidad genética dentro de la muestra analizada (**Tabla 9**). Comparativamente, se observó una baja varianza (0.00023) y desviación estándar (0.015), sugiriendo una estabilidad en la distribución de la diversidad genética entre los haplotipos identificados.

Tabla 9: Estadísticas de los haplotipos de las secuencias obtenidas con el partidador *rpl32-trnL*.

Numero de haplotipos	h:14
Diversidad de haplotipos (gen)	H_d : 0.8487
Varianza de la diversidad de haplotipos	0.00023
Desviación estándar de la diversidad de haplotipos	0.015

Relaciones filogenéticas.

a. Red de haplotipos.

La red de haplotipos reveló la formación de 4 haplogrupos distintos: *A. aurea*, Complejo *A. hookeri*, Complejo *A. ligtu* y Complejo *A. presliana* (**Figura 15**). Además, demuestra que los haplotipos identificados están estrechamente relacionados en función de su identidad taxonómica preliminar. Se destaca que *A. aurea* se encuentra separado de los demás grupos, lo cual era de esperarse ya que es el grupo externo. Por otra parte, el Complejo *A. ligtu* presenta una mayor proximidad con el Complejo *A. presliana* que con el Complejo *A. hookeri*, basado en una diferencia de sólo uno o dos cambios mutacionales (i.e., pasos; **Figura 15**). La relación con el Complejo *A. presliana* se establece en un sólo paso, mientras que con el Complejo *A. hookeri* se establece en 6 pasos de distancia.

Dentro del Complejo *A. hookeri* se identificó un nodo que incluye exclusivamente subespecies de dicho complejo, con la excepción de *A. marticorenae*. Los demás nodos contienen individuos de subespecies del Complejo *A. ligtu*, entre los cuales se encuentran 2 individuos de la subsp. *simsii* y 11 individuos de la subsp. *ligtu*, los cuales son muestras obtenidas de zonas costeras (Tabla 10, 11, 12 y 13). Interesantemente, estas muestras corresponden a individuos que muestran características híbridas entre la subsp. *simsii* con la subsp. *ligtu*.

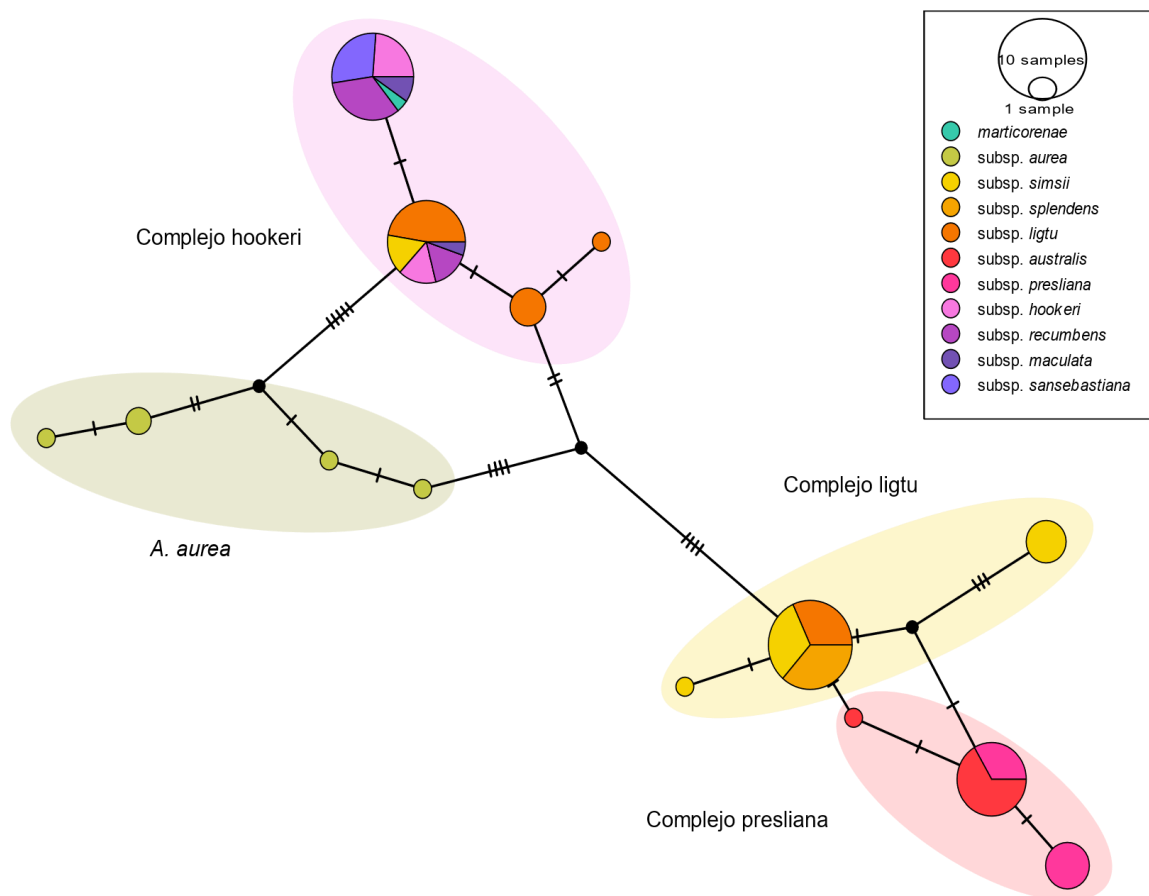


Figura 15. Red de haplotipos para las secuencias obtenidas para *rpl32-trnL* con el set de datos completo (tesis + FONDECYT de Iniciación11220556), empleando criterios de parsimonia con TCS basados en una red de extensión mínima.

b. Árbol filogenético.

El árbol inferido (log-likelihood = -1084.983) mostró, en general, una topología definida en términos de la propuesta taxonómica del grupo de estudio, con 4 grupos claramente diferenciados (**Figura 16**). El primer grupo correspondió a todas las muestras de *A. aurea*, las que fueron recuperadas con un valor de soporte de ramas de 95%. El segundo se compuso por las subespecies pertenecientes al Complejo *A. presliana* con un soporte de ramas de 65%. El tercer grupo incluyó a las subespecies del Complejo *A. ligtu*, con un soporte de ramas de 95%. Finalmente, en el cuarto grupo se recuperó una agrupación de las subespecies del Complejo *A. hookeri* - *A. martcorenae*, y subespecies del Complejo *A. ligtu*, los cuales correspondieron a los mismos especímenes detectados en la red de haplotipos: 2 de la subsp. *simsii*, y 11 correspondientes a la subsp. *ligtu*, las cuales todas corresponden a individuos muestreados en el rango costero de la distribución. Este grupo presentó un valor de soporte de ramas de 72%. A excepción del nodo del Complejo *A. presliana*, todos los nodos fueron recuperados con valores de soporte sobre 70%, por lo que son considerados como bien soportados dado el set de datos empleados para este análisis (*rpl32-trnL*).

DISCUSIÓN

Los hallazgos de esta investigación señalan la viabilidad de identificar taxones específicos mediante la aplicación de barcodes moleculares. No obstante, los resultados derivados de los patrones de amplificación, detección de SNPs y agrupación genética reflejan una diversidad de patrones que requieren ser adecuadamente contextualizados. Por ende, la discusión se estructura en torno a tres principales enfoques: 1) Evaluación de la efectividad y aplicabilidad de barcodes nucleares y cloroplastidiales. 2) Recuperación de grupos taxonómicamente coherentes utilizando marcadores moleculares cloroplastidiales. 3) Análisis de la diferenciación y límites genéticos en la subespecie *A. ligtu* subsp. *ligtu*.

Evaluación de efectividad y aplicabilidad de los códigos de barras de ADN.

a. Códigos de barra nucleares.

Se han llevado a cabo estudios utilizando marcadores moleculares con el propósito de abordar la genética de poblaciones y filogenética, tales como: la evaluación de la diversidad genética de especies silvestres y variedades cultivadas de *Alstroemeria* a través de marcadores RAPD (Aros et al., 2006), y la investigación sobre la distribución del ADN ribosomal y la filogenia en *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) (Chacón et al., 2012). En cuanto a estudios con marcadores moleculares, existe un estudio que buscó evaluar la universalidad de los marcadores de código de barra cloroplastidiales *matK* y *rbcL* de diferentes especies de *Alstroemeria* presentes en el norte de Chile (Contreras et al., 2020). A pesar de esto, existe un limitado uso de marcadores moleculares con fines taxonómicos, lo que podría estar relacionado con el complejo y enorme genoma que posee este grupo de plantas en consecuencia a la gran variedad de ADN repetido y ADN ribosomal presente (Ribeiro et al., 2021).

De esta manera, los resultados utilizando el marcador 4249g319_166F - 4249g319_599R son innovadores, ya que demuestra la capacidad de generar marcadores para regiones nucleares de copia única específicos en *Alstroemeria*. A pesar de la existencia de algunos intentos

previos donde se caracteriza la expresión de genes asociados a la producción de color (chalcona sintasa y antocianina sintasa; Donoso et al., 2021), estos no han empleado explícitamente para la identificación mediante códigos de barras de ADN. En cambio, este trabajo se centró en el uso de marcadores previamente definidos, mediante RNA. Seq y SNP array, los cuales resultaron ser potencialmente útiles para los propósitos mencionados.

Aunque este resultado es alentador, es importante mencionar que existen algunas consideraciones técnicas que puntualizar, los que indican que el logro de caracterización de regiones nucleares aún está lejos de terminar. En particular, las técnicas de amplificación empleadas necesitan de una mayor optimización para garantizar resultados consistentes, dada la presencia de amplificaciones débiles en diversas muestras escrutadas (**Figura 9**). Es posible que mayores calibraciones, particularmente en términos de estandarización de concentración de ADN, sean necesarias para optimizar los resultados observados. Tales limitaciones ya han sido documentadas previamente para la amplificación óptima de productos de PCR en Angiospermas (Hillis et al., 1996), de las cuales sólo por falta de tiempo no pudieron ser abordadas en la presente tesis.

Por otro lado, cabe mencionar la falta de similitud entre la región amplificada y el diseño original de este marcador. Se obtuvo una secuencia más corta que la originalmente diseñada, en 26 pares de bases, por lo que es muy probable que el segmento de ADN amplificado sea diferente a lo buscado originalmente. Además, al compararlas entre muestras, estas no resultaron ser similares. Este resultado podría explicarse por la existencia de diversos errores técnicos, tales como: 1) Error de tipeo de rótulos. 2) Contaminación cruzada de partidores durante la preparación de la reacción de PCR. 3) Degradación del partidador debido a condiciones de almacenamiento inadecuadas o exposición a contaminantes ambientales que puedan afectar su eficacia y especificidad. 4) Homología de la región objetivo con otras regiones del genoma, que lleva a la unión del marcador en múltiples lugares (algo común en regiones altamente conservadas), etc. En particular, la constatación de la falta de identidad de este marcador con secuencias de otros organismos, mediante la búsqueda en Genbank (**Figuras 12, 13 y 14**), permite estimar que efectivamente el marcador amplificado pertenece a regiones de las muestras de *Alstroemeria* analizadas.

Cabe resaltar que, si bien las secuencias obtenidas para el marcador nuclear no son las esperadas al diseñar el partidador, al alinear las dos secuencias obtenidas, se observa una congruencia exitosa en términos de similitud. Esto demuestra que existen diferencias entre *A. hookeri* subsp. *hookeri* y *A. ligtu* subsp. *ligtu*, ya que ambas secuencias presentan SNPs congruentes entre taxones. Al revisar la lectura también se observó la ausencia de sitios heterocigotos, es decir, es probable la ausencia de variación multilocus en esta región específica del ADN (i.e., secuencias paralogas), lo que es indicativo de que es una región de copia única puesto que es altamente conservada a lo largo de la evolución.

De esta manera podemos establecer que, si bien la amplificación del partidador nuclear no fue exitosa para todas las *Alstroemerias* testeadas, aquellas que sí amplificaron son secuencias que: 1) Presentan variación que permitiría diferenciar así ambas especies (*A. hookeri* subsp. *hookeri* y *A. ligtu* subsp. *ligtu*). 2) Son de copia única. 3) Promete pertenecer a alguna región del ADN nuclear de *Alstroemeria*. Sin embargo, antes de declarar este marcador como un barcode nuclear efectivo, esta consideración requiere realizar un mayor trabajo sobre este marcador para determinarlo completamente funcional para su uso a escalas moleculares.

Otro punto importante a recalcar, más allá del objetivo de barcoding taxonómico, es que la identificación de marcadores de copia única nucleares en *Alstroemeria* podría ayudar con las limitaciones asociadas a los patrones de variación detectadas en ITS. Particularmente, trabajo preliminar sugiere el evitar el uso de los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal nuclear (nrITS) y sus regiones, debido a la alta presencia de copias parálogas en especies nativas de *Alstroemeria* (Toro Núñez et al., comm. pers.). Estas copias se pueden presentar debido a un proceso de evolución concertada incompleta o de hibridación, el que acumula variantes alélicas dentro de esta región e impide determinar una correcta homología posicional en sus alineamientos (Álvarez & Wendel, 2003; Bailey et al., 2003). Al observar resultados obtenidos en trabajos previos (e.g., Chacón et al. 2012), es común detectar zonas con altas tasas de mutación, probablemente generando instancias de homoplasia debido a la saturación en las tasas de substitución percibidas (Lemey et al. 2009). Como resultado, este marcador podría generar asignaciones incorrectas, siendo no recomendable su uso para realizar comparaciones genéticas o inferir relaciones filogenéticas en taxones de *Alstroemeria*.

b. Códigos de barra cloroplastidiales.

En el caso del barcode cloroplastidial, *rpl32-trnL*, se detecta un proceso mucho más fácil de amplificación y caracterización. Esto se debe a que este marcador, junto a varios otros, se encuentran altamente caracterizados, existen como una copia haploide no recombinante, y han sido ampliamente utilizado dentro del conjunto de barcodes taxonómicos alternativos para Angiospermas (e.g., Arca et al., 2012; Peterson et al., 2014; Jiao et al., 2019). El uso del marcador empleado en este trabajo es el reflejo de un proceso de testeo, el que comprendió el análisis de regiones propuesta por Shaw et al., (2007) como una mejor opción en el uso de regiones cloroplastidiales para análisis más detallados: *rpl32-trnL* , *trnQ-5' rps16* , *3' trnV-ndhC* , *ndhF-rpl32* , *psbD-trnT* , *psbJ-petA* , *3' rps16-5' trnK* , *atpI-atpH* y *petL-psbE* (Carrasco et al., comm. pers.). Según los hallazgos descritos, los resultados preliminares de Carrasco et al., (comm. pers.) y los de Shaw et al., (2007) coinciden con los obtenidos en esta tesis, ya que se obtuvieron buenos niveles de variación genética con el marcador *rpl32-trnL*, sugiriendo que el genoma del cloroplasto puede ser adecuado como un barcode taxonómico.

Basado en la información genética obtenida con este marcador, se observa una notable variabilidad genética entre las secuencias analizadas. Esto se evidencia por la diversidad de nucleótidos por sitios, el alto número de sitios segregantes y variables, y la presencia de múltiples haplotipos distintos (**Tabla 7, 8 y 9**). Además, la baja varianza y desviación estándar en los valores de diversidad genética sugieren consistencia en los datos obtenidos y una dispersión mínima de los valores de diversidad. Tales resultados, al menos desde un punto de vista técnico, sugieren que *rpl32-trnL* debería ser la primera opción como barcode genético efectivo para la identificación y diferenciación de especies.

Recuperación de grupos taxonómicamente coherentes usando marcadores moleculares cloroplastidiales.

Al momento de analizar los grupos genéticos obtenidos, tanto la red de haplotipos como el árbol filogenético inferido, demostraron de forma consistente la presencia de cuatro grupos genéticos (**Figura 15 y 16**). Estas agrupaciones genéticas identificadas en este estudio se alinean de manera consistente con las clasificaciones taxonómicas previas para estas especies. Pero, al analizar estos grupos de forma puntual, es posible evidenciar una falta de resolución en la discriminación de entidades inter e infraespecíficas, o la recuperación de grupos parafiléticos.

En el caso del Complejo *A. hookeri*, además de detectar todos los taxones asociados a este como grupo monofilético, se identificó a *A. marticorenae* (**Figura 15 y 16**), lo que resulta interesante, dado que este taxón fue recientemente redefinido como una especie diferente (Negritto et al., 2015). Adicionalmente, dentro de este grupo, también se recuperaron 11 individuos de *A. ligtu* subsp. *ligtu* y 2 individuos híbridos putativos con *A. ligtu* subsp. *simsii*, los cuales corresponden a muestras recolectadas en zonas costeras (**Figura 1 y Tabla 1**). La sugerencia de una agrupación parafilética para el Complejo *A. ligtu* representa un hallazgo novedoso. Esta agrupación podría ser beneficiosa para la distinción de *A. ligtu* subsp. *ligtu* de las otras subespecies de Complejo *A. ligtu*, sin embargo, no sería suficiente para diferenciarla de los taxones del Complejo *A. hookeri*.

Los otros complejos identificados (*A. presliana* y *A. aurea*) se mostraron como monofiléticos y claramente diferenciados del resto (**Figura 15 y 16**). El Complejo *A. presliana* aparece cercanamente relacionada con el Complejo *A. ligtu*, mientras que el Complejo *A. aurea* se encuentra distanciado del resto de los taxones muestreados. Este resultado concuerda con resultados previos que establecen a estos taxones en posiciones similares dentro de *Alstroemeria* (Chacón et al., 2012). El alto soporte para todos los clados recuperados, a excepción de Complejo *A. presliana*, apoya el uso de *rpl32-trnL* como barcode respectivo al recuperar estos grupos sin ninguna incertidumbre estadística asociada.

Diferenciación y límites genéticos de A. ligtu subsp. ligtu usando barcodes moleculares.

El resultado más evidente de este trabajo es que, si bien *A. ligtu* subsp. *ligtu* pertenece al Complejo *A. ligtu*, esta se encuentra completamente separada del resto de los taxones muestreados para este complejo, mientras que se mantiene cercana al Complejo *A. hookeri*. Esto denota elementos que pueden ir más allá de la observación taxonómica (**Figura 15 y 16**). Esta subespecie se encuentra con un haplotipo altamente afín de otro complejo de especie, lo que se traduce en una identificación de este grupo como parafilético. La implicancia de esto radica en el cuestionamiento de la identidad de *A. ligtu* subsp. *ligtu* como parte del Complejo *A. ligtu*.

Un análisis más detallado de los resultados podría indicar la posibilidad de que esté ocurriendo un fenómeno de introgresión desde el Complejo *A. hookeri* sobre *A. ligtu*, resultando en la presencia de una copia cloroplastidial “foránea” de su grupo base. Tal fenómeno, denominado “captura cloroplastidial”, puede ser generado por fenómenos asociados a introgresión direccional (Riesberg et al., 1994), selección natural (Bock et al., 2014) o transferencia horizontal de material genético (Stagemann et al., 2012). Este resultado podría confirmarse si existiese una mayor evidencia de marcadores nucleares que respalden una discrepancia en la señal filogenética cito-nuclear de *A. ligtu* subsp. *ligtu*. La expectativa es que, si la introgresión es consistente, dado que no se han encontrado ejemplares de *A. ligtu* subsp. *ligtu* con haplotipos cloroplastidiales del Complejo *A. ligtu*, entonces deberían identificarse individuos con un genoma nuclear que se asemeje al de su grupo taxonómico correspondiente (Riesberg & Soltis, 1991). En espera de una conclusión definitiva, esto puede evidenciarse en las notorias diferencias identificadas en las secuencias nucleares amplificadas entre las muestras OTN 219 y OTN 222, las que mostraron un importante número de SNPs consistentes y diferenciados entre ellas. En este sentido, los resultados estarían efectivamente respaldando la idea de que el marcador *rpl32-trnL* debería ser respaldado con una contraparte nuclear (4249g319_166F - 1419g319_599R), lo que podría ayudar a contextualizar las hipótesis de delimitación inferidas.

Otro resultado a destacar es que al delimitar *A. ligtu* subsp. *ligtu*, se establecen límites claros sobre su potencial distribución, la cual se sugiere que está restringida exclusivamente a las zonas costeras entre la Región de O'Higgins y el Biobío. Esto permite distinguir este taxón con ejemplares de *A. ligtu* subsp. *simsii*, los que aparecen distribuidos exclusivamente en el rango interior de los valles centrales de Chile Central (**Tablas 10, 11, 12 y 13**). Debido a esto, es conveniente recomendar el uso del marcador *rpl32-trnL* acompañado de información geográfica y morfológica para fines diagnósticos. Es posible diferenciar *A. hookeri* subsp. *hookeri* y *A. ligtu* subsp. *ligtu* por sus evidentes similitudes morfológicas, mientras que la distribución geográfica y diferencias de haplotipo permitirían su diferenciación con *A. ligtu* subsp. *simsii*. Igualmente, a pesar de sus similitudes morfológicas y cercanía geográfica de distribución sur con *A. presliana* subsp. *australis* (Finot et al., 2018a), los haplotipos cloroplastidiales son eficientes en separar ambas especies sin problemas (**Figura 15 y 16**).

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación ofrecen valiosas perspectivas sobre la viabilidad y el potencial de los barcodes moleculares en el estudio de la diversidad biológica, particularmente en el contexto de la identificación taxonómica y la comprensión de las relaciones filogenéticas. Si bien, el partidor nuclear obtenido en este trabajo es prometedor como un posible barcode molecular, se observa la necesidad de abordar las complejidades inherentes a la amplificación y caracterización de estos. Se presentan consideraciones técnicas que requieren abordarse, como la optimización de la amplificación de PCR para garantizar resultados consistentes y la resolución de potenciales problemas relacionados con la falta de similitud entre las regiones amplificadas y los diseños originales de los marcadores.

Además, la identificación de un marcador de copia única en *Alstroemeria* podría ofrecer una alternativa prometedora para superar las limitaciones asociadas con los patrones de variación detectados en regiones nucleares altamente conservadas, como el nrITS. En este sentido, la continuación de la investigación para mejorar la eficacia y la aplicabilidad de los barcodes nucleares en la identificación taxonómica de *Alstroemeria* es crucial para avanzar en nuestro entendimiento de la diversidad genética, su relevancia para la conservación y la gestión de estos importantes recursos vegetales.

Se destaca la eficacia del barcode cloroplastidial *rpl32-trnL*, para discernir entre especies y recuperar grupos genéticamente coherentes dentro del género. Esto sugiere que este marcador proporciona una cantidad de información genética significativa, la cual puede ser utilizada para comprender las relaciones evolutivas y la diversidad dentro de *Alstroemeria*. Por otro lado, la robustez de las relaciones filogenéticas inferidas, como se evidencia en los valores de soporte de ramas, indica una alta confianza en la precisión de los resultados obtenidos. Por lo tanto, este marcador representa una herramienta valiosa y válida como un buen barcode molecular para futuros estudios taxonómicos, filogenéticos y de conservación en el género.

Finalmente, se enfatiza la importancia de considerar factores adicionales, como la geografía y la morfología. La integración de múltiples fuentes de información puede mejorar significativamente la capacidad de distinguir entre especies estrechamente relacionadas y comprender mejor sus patrones de distribución y evolución. En este sentido, la presente investigación no solo proporciona una contribución al campo de la taxonomía molecular, sino que también destaca la necesidad de un enfoque integrado y multidisciplinario para abordar de manera efectiva la complejidad de la diversidad biológica. Continuar avanzando en este camino, explorando nuevas técnicas y refinando metodologías existentes, es fundamental para ampliar nuestro conocimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Aagesen, L., & Sanso, M. (2003). The phylogeny of the Alstroemeriaceae, based on morphology, rps16 intron, and rbcL sequence data. *Systematic Botany*, 28 (1), 47–69.

Aker, S., & Healy, W. (1990). The phytogeography of the genus *Alstroemeria*. *Herbertia*, 46, 76-87.

Álvarez, I., & Wendel, J. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29 (3), 417–434.

Anastassopoulos, E., & Keil, M. (1996). Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 90(1-2), 235–244.

Arca, M., Hinsinger, D. D., Cruaud, C., Tillier, A., Bousquet, J., & Frascaria-Lacoste, N. (2012). Deciduous trees and the application of universal DNA barcodes: a case study on the circumpolar *Fraxinus*. *PLoS One*, 7(3).

Aros Orellana, D., Meneses Alvarado, C., & Infante Espiñeira, R. (2006). Genetic diversity of wild species and cultivated varieties of *Alstroemeria* estimated through morphological descriptors and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 108(1), 86-90.

Asahina, H., Shinozaki, J., & Masuda, K. (2010). Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences. *Journal of Natural Medicines*, 64 (1), 133–138.

Baeza, C., Schrader, O., Ruiz, E., & Negritto, M. (2006). Análisis comparativo del cariotipo en poblaciones de *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu* y *A. ligtu* subsp. *simsii* (Alstroemeriaceae) de Chile. *Darwiniana*, 44, 313–318.

Baeza, C. M., Schrader, O., & Budahn, H. (2007a). Characterization of geographically isolated accessions in five *Alstroemeria* L. species (Chile) using FISH of tandemly repeated DNA sequences and RAPD analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 269, 1-14.

Baeza, C. M., Schrader, O., Ruiz, E., & Negritto, M. (2008). *Alstroemeria presliana* Herb. (Alstroemeriaceae) in Chile from a cytogenetic perspective. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 68(4), 328-333.

Baeza, C. M., Ruiz, E., & Negritto, M. (2010). Comparative karyotypic analysis in the *Alstroemeria hookeri* Lodd. (Alstroemeriaceae) complex sensu Bayer (1987). *Genetics and Molecular Biology*, 33 (1), 119-124.

Baeza, C. M., Finot, V. L., & Ruiz, E. (2015). Comparative karyotype analysis of populations in the *Alstroemeria presliana* Herbert (Alstroemeriaceae) complex in Chile. *Genetics and Molecular Biology*, 38 (2), 199-204.

Baeza, C. M., Finot, V. L., Ruiz, E., Carrasco, P., Novoa, P., & Rosas, M. (2016a). Análisis citotaxonómico del complejo *Alstroemeria diluta* E. Bayer (Alstroemeriaceae) de Chile. *Gayana Botánica*, 73, 221-227.

Baeza, C. M., Finot, V. L., Ruiz, E., Carrasco, P., Novoa, P., Stuessy, T., & González, A. (2016b). Comparative karyotypic analysis and cytotaxonomy in the *Alstroemeria ligata* L. (Alstroemeriaceae) complex of Chile. *Brazilian Journal of Botany*, 39 (1), 305-313.

Baeza, C. M., Finot, V. L., Ruiz, E., Carrasco, P., Novoa, P., Rosas, M., & Toro-Núñez, O. (2018). Cytotaxonomic study of the Chilean endemic complex *Alstroemeria magnifica* Herb. (Alstroemeriaceae). *Genetic and Molecular Biology*, 41 (2), 434-441.

Baeza Perry, C.M., Rojas, G., Toro-Núñez, Ó., & Ruiz-Ponce, E. (2023). The fundamental karyotype and plastid DNA of *Alstroemeria piperata* (Liliales, Alstroemeriaceae), a species endemic to the Valparaíso Region, Chile. *Phytotaxa*, 629(2), 139-146.

Bailey, C., Carr, T., Harris, S., & Hughes, C. (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29 (3), 435–455.

Bayer, E. (1987). Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, 24, 1–362.

Besnard, G., Gaudeul, M., Lavergne, S., Muller, S., Rouhan, G., Sukhorukov, A. P., Vanderpoorten, A., & Jabbour, F. (2018). Herbarium-based science in the twenty-first century. *Botany Letters*, 165, 323–327.

Bock, D. G., Andrew, R. L., & Rieseberg, L. H. (2014). On the adaptive value of cytoplasmic genomes in plants. *Molecular Ecology*, 23(20), 4899–4911.

Buitendijk, J., & Ramanna, M. (1996). Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany*, 78 (4), 449–457.

Buitendijk, J., Boon, E., & Ramanna, M. (1997). Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany*, 79 (4), 343–353.

Cajas, D., Baeza, C., Ruiz, E., & Negritto, M. (2009). Análisis citogenético en poblaciones de *Alstroemeria hookeri* Lodd. ssp. *hookeri* (Alstroemeriaceae) en la región del Bío-Bío, Chile. *Gayana Botanica*, 66(2), 117–126.

Cameron, K. M., Chase, M. W., & Whitten, W. M. (1999). A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany*, 86 (2), 208–224.

CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 106 (31), 12794–12797.

Chacón, J., Camaro de Assis, M., Meerow, A. W., & Renner, S. S. (2012). From East Gondwana to Central America: historical biogeography of the Alstroemeriaceae. *Journal of Biogeography*, 39 (10), 1806-1018.

Chase, M. W., & Hills, H. H. (1991). Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, 40 (2), 215–220.

Chase, M., Cameron, K., Freudenstein, J., Pridgeon, A., Salazar, G., van den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177.

Choudhary, A., Shekhawat, D., Pathania, J., Sita, K., Sharma, S., Chawla, A., & Jaiswal, V. (2024). Exploring DNA barcode for accurate identification of threatened Aconitum L. species from Western Himalaya. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 75.

Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (1999). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology Notes*, 9.

Coissac, E., Hollingsworth, P. M., & Lavergne, S. (2016). From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 25 (24), 423–1428.

Contreras, R., van den Brink, L., Sepúlveda, B., Aguayo, F., & Porcile, V. (2020). Relaciones filogenéticas de especies de plantas que crecen en el desierto florido de la Región de Atacama. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 19 (3), 300 - 313.

De Boer, H. J., Ghorbani, A., Manzanilla, V., Raclariu, A. C., Kreziou, A., Ounjai, S., Osathanunkul, M., & Gravendeel, B. (2017). DNA metabarcoding of orchid derived products reveals widespread illegal orchid trade. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284.

Devey, D., Chase, M. W., & Clarkson, J. (2009). A stuttering start to plant DNA barcoding: microsatellites present a previously overlooked problem in noncoding plastid regions. *Taxon*, 58(1), 7–15.

Devos, N., Oh, S. H., Raspe, O., Jacquemart, A. L., & Manos, P. S. (2005). Nuclear ribosomal DNA sequence variation and evolution of spotted marsh Orchids (*Dactylorhiza maculata* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(3), 568–580.

Dubouzet, J. G., Murata, N., & Shinoda, K. (1998). Relationships among some cultivated species and varieties of *Alstroemeria* L. based on RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*, 73(1), 37–44.

Donoso, A., Rivas, C., Zamorano, A., Peña, Á., Handford, M., & Aros, D. (2021). Understanding *Alstroemeria pallida* Flower Colour: Links between Phenotype, Anthocyanins and Gene Expression. *Plants*, 10(1), 55.

Ebihara, A., Nitta, J., & Ito, M. (2010). Molecular species identification with rich floristic sampling: DNA barcoding the pteridophyte flora of Japan. *PLoS ONE*, 5(12), e15136.

Farrington, L., MacGillivray, P., Faast, R., & Austin, A. (2009). Investigating DNA barcoding options for the identification of *Caladenia* (Orchidaceae) species. *Australian Journal of Botany*, 57(4), 276–286.

Feng, S., Jiang, Y., Wang, S., Jiang, M., Chen, Z., Ying, Q., & Wang, H. (2015). Molecular identification of *Dendrobium* species (Orchidaceae) based on the DNA barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21975–21988.

Finot, V. L., Baeza, C. M., Melín, P., Novoa, P., Campos, J., Ruiz, E., Fuentes, G., Albornoz, P., & Carrasco, P. (2015a). ¿Es *Alstroemeria pulchra* Sims var. *maxima* Phil. (*Alstroemeriaceae*) un miembro del Complejo *A. magnifica* Herbert?: Estudio colorimétrico de los tépalos externos e internos de la flor. *Gayana Botánica*, 72, 101–113.

Finot, V. L., Baeza, C. M., Ruiz, E., Fuentes, G., Carrasco, P., & Melín, P. (2015b). Análisis colorimétrico y morfométrico de los tépalos florales en *Alstroemeria presliana* Herbert. XXVI Reunión Sociedad Botánica de Chile, Valparaíso, 24-26 octubre 2015.

Finot, V. L., Baeza, C. M., Ruiz, E., Carrasco, P., & Melín, P. S. (2016). Análisis colorimétrico de la flor de *Alstroemeria presliana* (Alstroemeriaceae). *J. Bot. Res. Inst. Texas*, 10, 89-108.

Finot, V., Baeza, C., Muñoz-Schick, M., Ruiz, E., Espejo, J., Alarcón, D., Carrasco, P., Novoa, P., & Eyzaguirre, M. T. (2018a). *Guía de Campo Alstroemerias Chilenas*. Ed. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile, 292p.

Finot, V. L., Baeza, C. M., Ruiz, E., Toro, O., & Carrasco, P. (2018b). Towards an integrative taxonomy of the genus *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) in Chile: A comprehensive review. In Dr. Sen, & Dr. Grillo (Eds.), *Biodiversity* (Chapter 12, pp. 229-265).

González, M., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S., Pétronelli, P., Riera, B., Roger, A. A., Thébaud, C., & Chave, J. (2009). Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS ONE*, 4(8), e7483.

Hajizadeh, H. S., Bayrami Aghdam, S., Fakhrghazi, H., Karakus, S., & Kaya, O. (2024). Physico-chemical responses of *Alstroemeria* spp. cv. Rebecca to the presence of salicylic acid and sucrose in vase solution during postharvest life. *BMC Plant Biology*, 24(1), 121.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & de Waard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, W. J. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl_1), S96–S99.

Hebert, P. D., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852–859.

Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, 42(2), 182–192.

Hillis, D. M., Moritz, C., & Mable, B. K. (1996). *Molecular Systematics, Second Edition* (2nd ed.). January 18, 1996.

Hofreiter, A., & Rodríguez, E. F. (2006). Alstroemeriaceae en Perú y áreas vecinas. *Revista Peruana de Biología*, 13, 5-69.

Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLOS One*, 6(4).

Huang, G., Li, L., Wang, X., Yang, L., Wang, Y., Wu, D., & Wu, J. (2024). The complete plastid genome of *Rhamnus leptacantha* Schneid. (Rhamnaceae). *Mitochondrial DNA B Resour*, 9(1), 33-36.

Jiao, L., Lu, Y., He, T., Li, J., & Yin, Y. (2019). A strategy for developing high-resolution DNA barcodes for species discrimination of wood specimens using the complete chloroplast genome of three *Pterocarpus* species. *Planta*, 250(1), 95–104.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780.

Kesanakurthi, R. P., Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Percy, D. M., Newmaster, S. G., Graham, S. W., Barrett, S., Hajibabaei, M., & Husband, B. C. (2011). Spatial patterns of plant diversity below ground as revealed by DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 20, 1289–1302.

Kim, J. B., Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E., & Visser, R. G. F. (2006). Efficient somatic embryogenesis in *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 86, 233–238.

Kim, H. M., Oh, S. H., Bhandari, G. S., Kim, C. S., & Park, C. W. (2014). DNA barcoding of Orchidaceae in Korea. *Molecular Ecology Resources*, 14, 499–507.

Koressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M. (2018). Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11), 1937–1938.

Kress, W. J. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8369–8374.

Kress, W. J., Erickson, D. L., Swenson, N. G., Thompson, J., Uriarte, M., et al. (2010). Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican Forest dynamics plot. *PLoS ONE*, 5, e15409.

Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., & Pupulin, F. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 2923–2928.

Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278.

Leigh, J. W., & Bryant, D. (2018). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1110–1116.

Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A.-M. (Eds.). (2009). *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* (pp. v–xviii). Cambridge: Cambridge University Press.

Li, H., Xiao, W., Tong, T., Li, Y., Zhang, M., Lin, X., Zou, X., Wu, Q., & Guo, X. (2021). The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants. *Scientific Reports*, 11, 1424.

Lin, H. S., Van der Toorn, C., Raemakers, C. J. J. M., Visser, R. G. F., de Jeu, M. J., & Jacobsen, E. (2000). Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria*. *Plant Cell Reports*, 19, 529-534.

Lin, H. S., Van der Toorn, C., Raemakers, C. J. J. M., Visser, R. G. F., de Jeu, M. J., & Jacobsen, E. (2000). Genetic transformation of *Alstroemeria* using particle bombardment. *Molecular Breeding*, 6, 369-377.

Meerow, A. W., Tombolato, A. F. C., & Meyer, F. (1999). Two new species of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) from Brazil. *Brittonia*, 51, 439-444.

Moorthy, K., et al. (2017). Barriers of Mobile Commerce Adoption Intention: Perceptions of Generation X in Malaysia. *Journal of Theoretical and Applied Electronic Commerce Research*, 12(2), 37-53.

Muñoz, M., & Moreira, A. (2003). *Alstroemerias de Chile: Diversidad, distribución y conservación. Taller La Era, Santiago, Chile*. 140 pp.

Negritto, M. A., Baeza, C. M., Ruiz, E., & Novoa, P. (2015). *Alstroemeria marticorenae* (Alstroemeriaceae), a new species from Central Chile. *Systematic Botany*, 40, 69-74.

Nguyen, L.T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 268-274.

Park, H., Park, J. H., & Kang, Y. J. (2024). Characterization of the complete chloroplast genome of *Wolffia arrhiza* and comparative genomic analysis with relative *Wolffia* species. *Scientific Reports*, 14(5873).

Peterson, P. M., Romaschenko, K., & Soreng, R. J. (2014). A laboratory guide for generating DNA barcodes in grasses: a case study of *Leptochloa* s.l. (Poaceae: Chloridoideae). *Webbia*, 69(1), 1-12.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Software for Systematics and Evolution*. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904.

Ribeiro, T., Nascimento, J., Santos, A., Félix, L.P., & Guerra, M. (2021). Origin and evolution of highly polymorphic rDNA sites in *Alstroemeria longistaminea* (Alstroemeriaceae) and related species. *Genome*, 64, 833-845.

Rieseberg, L. H., & Soltis, D. E. (1991). Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*, 5(1).

Rieseberg, L. H., Van Fossen, C., Arias, D., & Carter, R. L. (1994). Cytoplasmic Male Sterility in Sunflower: Origin, Inheritance, and Frequency in Natural Populations. *Journal of Heredity*, 85(3), 233–238.

Rojas, G., & Baeza, C. M., (2021) *Alstroemeria estepárica* (Alstroemeriaceae) una nueva especie para la zona del Cono Sur de Sudamérica. *Gayana Botánica* 78, 77-85.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 3299-3302.

Ruiz, E., Balboa, K., Negritto, M. A., Baeza, C.M., & Briceño, V. (2010). Variabilidad genética y morfológica y estructuración poblacional en *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri* (Alstroemeriaceae), endémica de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83, 605-616.

Sang, T. (2002). Utility of Low-Copy Nuclear Gene Sequences in Plant Phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3), 121-147.

Sanso, A. M. (1996). El género *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) en Argentina. *Darwiniana*, 34, 349-382.

Sanso, A. M., & Xifreda, C. (2001). Generic delimitation between *Alstroemeria* and *Bomarea* (Alstroemeriaceae). *Annals of Botany*, 88, 1057-1069.

Sass, C., Little, D. P., Stevenson, D. W., & Specht, C. D. (2007). DNA barcoding in the Cycadales: Testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. *PLOS ONE*, 2, e1154.

Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94, 275–288.

Souto, C. P., & Premoli, A. C. (2003). Genetic divergence among natural populations of *Alstroemeria aurea* D. Don: A dominant clonal herb of the understory in subalpine Nothofagus forests. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44, 329-336.

Stegemann, S., Keuthe, M., Greiner, S., & Bock, R. (2012). Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7).

Techen, N., Parveen, I., Pan, Z., & Khan, I. A. (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*, 25, 103–110.

Villalobos, N. I., Finot, V. L., Toro-Núñez, O., Baeza, C., Ruiz, E., Carrasco, P., Campos, J., & Melín, P. (2023). Morpho-colorimetric characterization of the perigonium of the *Alstroemeria pulchra* complex (Alstroemeriaceae, Alstroemerieae) as an aid to delimit its infraspecific taxa. *Phytotaxa*, 622(3), 173-190.

Villalobos, N. I., Baeza, C. M., Finot, V. L., Toro-Núñez, Ó., Ruiz-Ponce, E., Takayama, K., Noda, H., Collado, G.A., & Mora-Poblete, F. (2024). “*Alstroemeria maxima* (Alstroemeriaceae, Alstroemerieae), a hidden giant” revealed through integrative taxonomy. *Brazilian Journal of Botany*, 47(3), 649-669.

Whitlock, B., Hale, A., & Groff, P. (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode. *PLOS ONE*, 5, e11533.

Xu, S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., Jin, X., & Huang, L. (2015). Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia. *PLOS ONE*, 10, e0115168.

Yu, Q., Hu, J., Hu, X., Zhou, Y., Wang, F., Jiang, S., & Wang, Y. (2024). Demographic patterns of two related desert shrubs with overlapping distributions in response to past climate changes. *Frontiers in Plant Science*, 15, Article 5873.

Zhou, S., de Jeu, M. J., Visser, R. G. F., & Kuipers, A. G. J. (2003). Characterisation of distant *Alstroemeria* hybrids: application of highly repetitive DNA sequences from *A. ligtu* ssp. *ligtu*. *Annals of Applied Biology*, 142(2), 277-283.

ANEXO

Tabla 10. Individuos presentes en los haplotipos 2, 4, 7 y 8 los cuales representan al Complejo *A. hookeri*, en la Red de haplotipos.

Complejo <i>A. hookeri</i>		
Haplotipo	Especie	Código
Hap_2	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>ligtu</i>	OTN 222
		OTN 223
		OTN 213_A_extraction
		OTN 151
		PCM 32_A_extraction
		PCM 32
		OTN 178_extraction
		OTN 178
	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>simsii</i>	OTN 211
		OTN 214
		OTN 211_A_extraction
		OTN 214_A_extraction
	<i>A. hookeri</i> subsp. <i>hookeri</i>	4211_C
		NGS
		OTN 151_extraction
	<i>A. hookeri</i> subsp. <i>recumbens</i>	OTN 175_extraction
		4275_1
		OTN 175
	<i>A. hookeri</i> subsp. <i>maculata</i>	OTN 158_extraction
Hap_4	<i>A. hookeri</i> subsp. <i>hookeri</i>	OTN219A
		4181_B
		4222_C
		4224_A
		OTN 219_B_extraction
	<i>A. hookeri</i> subsp. <i>maculata</i>	4277_1
		4278_1
	<i>A. hookeri</i> subsp. <i>recumbens</i>	4271_9
		4273_3
		4284_3

		OTN 166
		OTN 169
		OTN 166_extraction
		OTN 169_extraction
	<i>A. hookeri</i> subsp. <i>sansebastiana</i>	4175_16
		4215_A
		4217_B
		4218_A
		4227_D
		OTN AhsY_extraction
	<i>A. marticorenae</i>	OTN 170_extraction
Hap_7	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>ligtu</i>	2727_16
		4394_15
		4178_14
		2727_6
Hap_8	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>ligtu</i>	4184_10

Tabla 11. Individuos presentes en los haplotipos 1, 3, y 5 los cuales representan al Complejo *A. presliana*, en la Red de haplotipos.

Complejo <i>A. presliana</i>		
Haplotipo	Especie	Código
Hap_1	<i>A. presliana</i> subsp. <i>australis</i>	TPCM 42
Hap_3	<i>A. presliana</i> subsp. <i>australis</i>	TPCM 44_2
		TPCM 41_4
		TPCM 45_4
		PCM 30_extraction
		1001_11
		4250_15
		4369_3
		4370_6
		4371_232
		4371_9
		PCM 30
	<i>A. presliana</i> subsp. <i>presliana</i>	4363_1
		4363_15
		PCM 35
		PCM 35_A_extraction
Hap_5	<i>A. presliana</i> subsp. <i>presliana</i>	4192_13
		4362_16
		4365_46
		4372_72
		ArgJE_7
		PCM 24_B_extraction

Tabla 12. Individuos presentes en los haplotipos 6, 9 y 10 los cuales representan al Complejo *A. ligtu*, en la Red de haplotipos.

Nodo: <i>A. complejo ligtu</i>		
Haplotipo	Especie	Código
Hap_6	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>ligtu</i>	4396_9
		4399_236
		4399_241
		4400_10
		4400_4
		4402_18
	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>splendens</i>	4404_16
		4404_2
		4404_4
		4405_12
		4405_21
		4405_4
		OTN 202_B_extraction
		OTN 207_A_extraction
	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>simsii</i>	OTN 195
		OTN 195_A_extraction
		4395_12
		OTN 196_A_extraction
		OTN 199_B_extraction
		OTN 208_B_extraction
	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>splendens</i>	naranja_OTN201N_B_extraction
		rosa_OTN201R_A_extraction
Hap_9	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>simsii</i>	4388_20
		4388_5
		4388_3
		OTN 173
		OTN 173_extraction
Hap_10	<i>A. ligtu</i> subsp. <i>simsii</i>	OTN 208

Tabla 13. Individuos presentes en los haplotipos 11 y 14 los cuales representan a *A. aurea* en la Red de haplotipos.

<i>A. aurea</i>		
Haplotipo	Especie	Código
Hap_11	<i>A. aurea</i>	PCM 29
		PCM 29_B_extraction
Hap_14	<i>A. aurea</i>	Aaurea
		Genbank_extraction
		PCM 22_A_extraction

Tabla 14. Individuos presentes en las secuencias utilizadas en los análisis de red de haplotipos y árbol de filogenia con el partidor *rpl32-trnL*, obtenidas previamente por el Proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11220556.

Especie	Código colecta	Localidad	Coordenadas
<i>A. ligtu</i> subsp. <i>ligtu</i>	PCM 32_A_extraction	Región del Biobío, Tirúa, sendero "Cabeza de perro".	38°20'28"S; 73°30'23"W
	OTN 178_extraction	Región de O'Higgins, Pichilemu, Sendero a Playa la Pancora, en el borde superior de acantilados.	34°25'35"S; 72°02'53.6"W
	OTN 213_A_extraction	Región del Maule, Camino a Curepto, Ruta K-278, cerca de entrada a faena de Forestal Arauco. A borde de camino	35°04'15.9"S; 72°06'06.9"W
	2722_6	Provincia de Arauco, Punta Lavapié, cerro a orilla del mar	37°09'05.2"S; 73°35'11.1"W
	2722_16	Provincia de Arauco, Punta Lavapié, cerro a orilla del mar	37°09'05.2"S; 73°35'11.1"W
	4178_14	Concepción: camino a Ramuntcho.	36°47'00"S; 73°10'00"W
	4184_10	Concepción: camino de Concepción a Santa Juana.	36°59'51"S; 72°58'20"W
	4394_15	Ñuble: Playa de Mela.	36°21'27.63"S; 72°51'0.04"W
	4396_9	Talca: Molina, Camino a Radal 7 Tazas, Puente Pancho.	35°22'28"S; 71°06'41"W
	4399_236	Talca: Molina, Camino a Radal 7 Tazas, Pte Bajo La Tuna	35°11'02"S; 71°13'16.7"W
	4399_241	Talca: Molina, Camino a Radal 7 Tazas, Pte Bajo La Tuna	35°11'02"S; 71°13'16.7"W
	4400_4	Talca: Ruta 5 Sur a Colbún Km 6,5.	35°34'59"S; 71°37'41.1"W
	4400_10	Talca: Ruta 5 Sur a Colbún Km 6,5.	35°34'59"S; 71°37'41.1"W
	4402_18	Talca, camino a Constitución Km 44.	35°33'00"S; 72°07'00"W

A. <i>Ligtu</i> subsp. <i>simsii</i>	4395_12	Región del Maule, Provincia de Talca. 300 m al Norte de Pte. Río Claro, desde el Sur. Km 216.	35°10'53"S; 71°23'19"W
	4388_20	Región de Valparaíso; Provincia de Valparaíso, 1 Km al poniente de la rotonda La Pólvora.	33°06'6.09"S; 71°32'51.7"W
	4388_5	Región de Valparaíso; Provincia de Valparaíso, 1 km al poniente de la rotonda La Pólvora.	33°06'6.09"S 71°32'51.7"W
	4388_3	Región de Valparaíso; Provincia de Valparaíso, 1 km al poniente de la rotonda La Pólvora.	33°06'6.09"S 71°32'51.7"W
	OTN 173_extraction	Región de Valparaíso, Jardín Botánico Nacional (Viña del Mar), a lo largo de sendero principal.	33°02'51.25"S 71°30'07"W
	OTN 173	Región de Valparaíso, Jardín Botánico Nacional (Viña del Mar), a lo largo de sendero principal.	33°02'51.25"S 71°30'07"W
	OTN 195_A_extraction	Región de Ñuble, Camino a Portezuelo, antes de puente "El Ala" desde Chillan Viejo, en huella peatonal lateral.	36°34'45.4"S 72°12'25.0"W
	OTN 195	Región de Ñuble, Camino a Portezuelo, antes de puente "El Ala" desde Chillan Viejo, en huella peatonal lateral.	36°34'45.4"S 72°12'25.0"W
	OTN 196_A_extraction	Región del Maule, Camino a Lago Colbún, a borde de camino bajo <i>Escallonia</i> y <i>Cryptocarya alba</i> .	35°42'32.8"S; 71°19'49.0"W
	OTN 199_B_extraction	Región del Maule, Ruta 5-Sur, después del puente Río Claro, en terreno aldeaño mirando hacia puente de línea férrea. Bajo <i>Eucalyptus globulus</i> .	35°10'51.3"S; 71°23'17.4"W
	OTN 208_B_extraction	Región de O'Higgins, Ruta a Pichilemu, después de Rinconada de Alcones. Ruta 90, pasado cruce I-80 G.	34°19'32.3"S; 71°45'15.2"W
	OTN 208	Región de O'Higgins, Ruta a Pichilemu, después de Rinconada de Alcones. Ruta 90, pasado cruce I-80 G.	34°19'32.3"S 71°45'15.2"W
	OTN 211_A_extraction	Región de O'Higgins, Saliendo de Bucalemú, Ruta I-72 hacia Nilahue Bajo. A borde de camino.	34°39'23.5"S 72°03'07.6"W
	OTN 214_A_extraction	Región del Maule, Ruta J-60, a 1.8 km desde puente y 2 km desde Lipimavida (al Sur), en explanada intervenida.	34°51'55.7"S 72°08'48.4"W
	OTN 214	Región del Maule, Ruta J-60, a 1.8 km desde puente y 2 km desde Lipimavida (al Sur), en muy intervenida.	34°51'55.7"S 72°08'48.4"W

<i>A. ligtu</i> subsp. <i>splendens</i>	4404_16	Curicó: Camino a Paso Vergara.	35°01'45"S 70°42'39"W
	4404_2	Curicó: Camino a Paso Vergara.	35°01'45"S 70°42'39"W
	4404_4	Curicó: Camino a Paso Vergara.	35°01'45"S 70°42'39"W
	4405_12	Curicó: Camino a Paso Vergara, Mina Rio Teno.	35°03'18"S 70°28'48"W
	4405_21	Curicó: Camino a Paso Vergara, Mina Rio Teno.	35°03'18"S 70°28'48"W
	4405_4	Curicó: Camino a Paso Vergara, Mina Rio Teno.	35°03'18"S 70°28'48"W
	OTN 202_B_extraction	Región del Maule, Camino a Radal - 7 Tazas, después de Puente Pancho, frente a pequeño caserío.	35°22'33.2"S; 71°06'36.8"W
	OTN 207_A_extraction	Región del Maule, Camino a Paso Vergara, a lo largo de laderas lado O, entre <i>Baccharis</i> , <i>Calceolaria</i> y <i>Acaena</i> .	35°06'35.1"S; 70°29'19.8"W
	OTN201N_B_extraction	Región del Maule, Camino a Radal - 7 Tazas, frente a la entrada de Fundo Rio Claro. Después de pte La Valdesina	33°13'47.9"S; 71°11'25.2"W
	OTN201R_A_extraction	Región del Maule, Camino a Radal - 7 Tazas, frente a la entrada de Fundo Rio Claro. Después de pte La Valdesina	33°13'47.9"S; 71°11'25.2"W
<i>A. hookeri</i> subsp. <i>maculata</i>	OTN 158_extraction	Región de Coquimbo, Km 235.5 Ruta 5 Norte, a ambos lados de la carretera, al Sur de Huentelauquen.	31°49'27.4"S; 71°30'24.4"W
	4277_1	Choapa: Los Vilos, Playa Matagorda, final bajo ducto minera Los Pelambres	31°53'24.3"S 71°29'39.4"W
	4278_1	Choapa: Playa Agua Amarilla, Mal Paso	31°51'38.6"S 71°30'33.4"W

<i>A. hookeri</i> subsp. <i>hookeri</i>	4211_C	Concepción: Camino de San Pedro a Coronel, Entrada Lateral A Bomba De Bencina YPF.	36°56'00"S; 73°09'00"W
	OTN 151_extraction	Región del Biobío. Estación biológica UdeC, Península de Hualpén.	36°47'52.0"S; 73°09'30.0"W
	4181_B	Concepción: Lenga.	36°46'00"S73°09'00"W
	4222_C	Concepción: Talcahuano, Isla Rocuant.	36°43'38"S73°05'51"W
	4224_A	Ñuble. Playa Colmuyao, Cobquecura.	36°15'48"S72°48'26"W
	OTN 219_B_extraction	Región del Ñuble, Cobquecura sector Iglesia de Piedra.	6°05'44.0"S; 72°48'39.4"W
<i>A. hookeri</i> subsp. <i>sansebastiana</i>	4175_16	Región del Biobío, Prov. Concepción, Puente El Roble	36°45'29.50"S72°24'55.64"W
	4215_A	Biobío: Yumbel, Salida Sur.	37°08'19"S72°32'38"W
	4217_B	Biobío: Cam Cabrero-Bulnes, A 2 Km De Cabrero, Orilla De Ruta 5.	37°01'00"S72°21'55"W
	4218_A	Ñuble: Camino A Quillón, Sector Los Alemanes (Quillón).	36°46'00"S72°24'00"W
	4227_D	Ñuble: Trehuaco, Salida Sur.	36°26'00"S72°40'00"W
	OTN AhsY_extraction	Región del Biobío, Prov. Concepción, Puente El Roble	36°45'29.50"S72°24'55.64"W

<i>A. hookeri</i> subsp. <i>recumbens</i>	OTN 175_extraction	Región de Valparaíso, Algarrobo, en Playa el Canelo, a lo largo de risco.	33°22'00.5"S 71°41'30.4"W
	OTN 175	Región de Valparaíso, Algarrobo, en Playa el Canelo, a lo largo de risco.	33°22'00.5"S 71°41'30.4"W
	4275_1	Región del Biobío, Prov. Concepción, Puente El Roble	36°45'29.50"S 72°24'55.64"W
	4271_9	Choapa: Playa Agua Amarilla, Mal Paso.	32°56'33"S 71°32'56"W
	4273_3	Valparaíso: Quintero, Sector Maitencillo.	32°39'00"S 71°25'00"W
	4284_3	Valparaíso, Playa Quintay	33°11'0.59"S; 71°41'15.68"W
	OTN 166	Región de Valparaíso, Dunas de Concón, al inicio de vegetación en ladera Oeste	32°56'27.9"S 71°32'52.1"W
	OTN 166_extraction	Región de Valparaíso, Dunas de Concón, al inicio de vegetación en ladera Oeste	32°56'27.9"S 71°32'52.1"W
	OTN 169_extraction	Región de Valparaíso, Playa Grande de Quintay, entrando por ladera Sur, alrededor de roca con casa en la punta	33°11'01.0"S 71°41'16.4"W
	OTN 169	Región de Valparaíso, Playa Grande de Quintay, entrando por ladera Sur, alrededor de roca con casa en la punta	33°11'01.0"S 71°41'16.4"W
<i>A. marticorenae</i>	OTN 170_extraction	Región de Valparaíso, Jardín Botánico Nacional (Viña del Mar), a lo largo de sendero "Los Túneles"	33°02'49.5"S; 71°30'10.4"W

<i>A. aurea</i>	PCM 29	Región de la Araucanía, Camino Angol - PN Nahuelbuta (ruta R-150-P).	37°49'01.5"S; 72°55'26.4"W
	PCM 29_B_extraction	Región de la Araucanía, Camino Angol - PN Nahuelbuta (ruta R-150-P).	37°49'01.5"S; 72°55'26.4"W
	PCM 22_A_extraction	Región del Biobío, ruta Q481. Antuco, sector Rucue alto.	37°22'49.8"S; 71°41'52.3"W
<i>A. presliana</i> subsp. <i>australis</i>	PCM 30_extraction	Región de la Araucanía, PN Nahuelbuta, sector "Piedra del Águila".	37°49'32"S73°02'02"W27
	PCM 30	Región de la Araucanía, PN Nahuelbuta, sector "Piedra del Águila".	37°49'32"S73°02'02"W
	1001_11	Camino de Trongol alto a Curanilahue, PN Nahuelbuta.	37°38'60.00"S73°5'60.00"W
	4250_15	Región de la Araucanía, Provincia de Malleco, Parque Nacional Nahuelbuta.	37°49'00.0"S73°7'60.0"W
	4369_3	Malleco: Camino a PN Nahuelbuta, a 50 M de Entrada al Parque, Bosque de Roble.	37°49'00.0"S ; 72°54'00.0"W
	4370_6	Malleco: Camino a PN Nahuelbuta, a 50 M de Entrada al Parque, Bosque de Roble.	37°49'0.00"S ; 72°57'00.0"W
	4371_232	Malleco: Camino desde Puente El Manzano a Angol.	37°47'00"S 72°50'00"W
	4371_9	Malleco: Camino desde Puente El Manzano a Angol.	37°47'00"S 72°50'00"W

<i>A. presliana</i> subsp. <i>presliana</i>	4363_1	Región del Maule, Camino desde Parque Inglés a Pozón Andino.	35°28'55.25"S70°58'33.86"W
	4363_15	Región del Maule, Camino desde Parque Inglés a Pozón Andino.	35°28'55.25"S70°58'33.86"W
	PCM 35	Región del Maule, sector Parque Inglés, Radal - Siete Tazas. sotobosque de Nothofagus.	35°28'24.1"S70°59'41.9"W
	PCM 35_A_extraction	Región del Maule, sector Parque Inglés, Radal - Siete Tazas. sotobosque de Nothofagus.	35°28'24.1"S70°59'41.9"W
	4192_13	Ñuble: Termas de Chillan, 500 m más Arriba del Hotel Termas De Chillán A 50 M De La Virgen.	36°54'00.0"S71°24'00.0"W
	4362_16	Biobío: Yungay, Hacienda Rucamanqui, Sendero Cerro Manque.	37°11'00.0"S71°43'00.0"W
	4365_46	Biobío: Pinto, Fundo los Pretiles, Sector Las Piedras.	36°53'00.0"S 71°36'00.0"W
	4372_72	Ñuble: Pinto, Frente a Entrada A Cueva Los Pincheira.	36°53'46.0"S71°33'04.0"W
	ArgJE_7	Argentina, Neuquén: Camino Alumine-Villa Pehuenia	39°09'20"S; 70°56'22"W
	PCM 24_B_extraction	Región del Biobío, ruta Q45. Camino Antuco - PN Laguna Laja, al norte de villa Peluca.	37°20'24.0"S; 71°36'03"W

