

# Variabilidad genética mediante AFLP en tres relictos de *Gomortega keule* (Molina) Baillon, especie endémica chilena en peligro de extinción

## Genetic diversity revealed by AFLP in three relicts of *Gomortega keule* (Molina) Baillon, endemic and endangered Chilean species

CATHERINE DELAVEAU<sup>1\*</sup>, GLENDA FUENTES-ARCE<sup>2</sup>, EDUARDO RUIZ<sup>2</sup>, RODRIGO HASBÚN<sup>1</sup>, MATILDE URIBE<sup>1</sup>, SOFÍA VALENZUELA<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

<sup>3</sup>Genómica Forestal S.A., Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

\*catherine.delaveau@gmail.com

### RESUMEN

*Gomortega keule*, especie arbórea endémica de Chile y única representante de la familia Gomortegaceae, se encuentra catalogada en peligro de extinción y despierta gran interés científico por su restringida área de distribución. El objetivo de este trabajo fue estimar la variabilidad genética de 24 individuos de *G. keule* ubicados en tres relictos de la provincia de Concepción, mediante marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) para futuros estudios de conservación. Se probaron 16 combinaciones de partidores y se eligieron las tres combinaciones más informativas para detectar diferencias entre individuos. Estas combinaciones generaron un total de 156 fragmentos, siendo un 62 % de ellos polimórficos. El sitio con mayor porcentaje de polimorfismos correspondió a Cerro Neuque, con un 84,6 %, seguido por Coroney y Hualqui con 59,6 y 42,3 %, respectivamente. El análisis de varianza molecular detectó un 73 % de variación dentro de las poblaciones y un 27 % de variación entre ellas. El estudio muestra que la técnica de AFLP puede ser utilizada en *G. keule* de forma rápida y confiable para identificar poblaciones remanentes y apoyar su conservación tanto *ex situ* como *in situ*.

**PALABRAS CLAVE:** Gomortegaceae, Laurales, marcadores moleculares, loci polimórfico.

### ABSTRACT

*Gomortega keule* is an endemic woody species to Chile and the only member of the Gomortegaceae family. It is currently an endangered species and is of great scientific interest due to its small area of distribution. The aim of this research was to estimate genetic diversity of 24 individuals of *G. keule* selected from three isolated relict populations from the province of Concepción using AFLP (Amplified fragment length polymorphism) for future conservation issue. Sixteen combinations of primers for AFLP were tested and three combinations of them were selected as the most informative, revealing differences between individuals. These primer combinations generated 156 fragments, of which 62 % were polymorphic. The relict population with the highest percentage of polymorphisms was located in Cerro Neuque with 84.6 %, followed by Coroney and Hualqui with 59.6 and 42.3 %, respectively. The analysis of molecular variance detected 73 % variation within populations and 27 % variation among populations. This study supported that AFLP can be used in *G. keule* as a fast and reliable test to identified remaining populations of the species. Thus, this technique can be used to support *ex situ* or *in situ* conservation of *G. keule*.

**KEYWORDS:** Gomortegaceae, Laurales, molecular markers, polymorphic loci.

## INTRODUCCIÓN

*Gomortega keule* (Molina) Baillon es una especie arbórea en estado crítico de conservación (González 1998) que habita en áreas pequeñas y fragmentadas de la Cordillera de la Costa entre Cauquenes 35° 46' S y Arauco 37° 41' S (Hechenleitner *et al.* 2005). *Gomortega* pertenece a la familia Gomortegaceae, la cual es endémica y monotípica (Rodríguez *et al.* 2005). Se reportan sólo 22 poblaciones insertas en plantaciones exóticas, lo que las mantiene en constante amenaza (San Martín & Sánchez 1999, Rodríguez & Quezada 2001). Además de los problemas de distribución, la regeneración de la especie se ve afectada por factores como depredación de semillas por roedores, colecta de frutos por los lugareños y apertura del bosque, así como también por la baja capacidad germinativa de la semilla y el lento crecimiento durante los primeros años (Donoso & Escobar 1985, Le Quesne & Stark 2006).

Los antecedentes disponibles concluyen que la especie se estaría propagando, principalmente, por vía asexual, al observarse escasa o nula regeneración sexual en terreno (Villegas *et al.* 2003).

La utilización de marcadores moleculares es una herramienta útil en numerosos estudios de diversidad genética, aportando información para desarrollar planes de conservación en especies amenazadas. Algunas de las técnicas empleadas son: polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) (Torres *et al.* 2003), intermicrosatélites (ISSR) (Huang *et al.* 2009), microsatélites (Azpilicueta *et al.* 2004) y AFLP (Wen-Kun *et al.* 2008). En específico, esta última técnica ha demostrado ser exitosa por su reproducibilidad, además de detectar un gran número de fragmentos polimórficos sin requerir conocimiento previo de la secuencia de ADN de la especie en estudio (Mueller & Wolfenbarger 1999, Meudt & Clarke 2007).

En *G. keule*, la diversidad genética fue estimada en 33 individuos de poblaciones del rango norte de su distribución mediante ISSR (Herrera *et al.* 2005). Posteriormente García-González *et al.* (2008) ampliaron el estudio a su rango sur utilizando la misma técnica en 11 poblaciones. En tanto Lander *et al.* (2007) aislaron y caracterizaron ocho microsatélites sin realizar estudios de variabilidad genética.

Considerando el estado de conservación de *G. keule* y la falta de información de su presencia en algunos sectores de su rango de distribución, el objetivo de este estudio fue estimar la variabilidad genética de *G. keule* mediante marcadores AFLP en tres relictos de la provincia de Concepción con el fin de contribuir a futuras propuestas de conservación *ex situ* de la especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

En tres relictos de *G. keule* ubicados en la provincia de

Concepción se colectaron hojas en pleno crecimiento. Se muestrearon 8 individuos en cada relicto, los cuales se encontraban a más de 3 m de distancia, fueron identificados con GPS (Global Positioning System) y denominados: 1) Cerro Neuque (36° 34' S; 72° 54' O), 2) Coroney (36° 40' S; 72° 51' O) y 3) Hualqui (36° 53' S; 72° 55' O) (Fig. 1). El material fue almacenado a -80 °C hasta su análisis.

### EXTRACCIÓN ADN

Se aisló ADN utilizando el protocolo de extracción de ADN para plantas DNeasy Plant Mini (QIAGEN). Se utilizaron 100 mg de tejido vegetal, el que fue homogeneizado con un equipo de lisis mecánica, adicionándole microesferas de cerámica a una velocidad de 6 m s<sup>-1</sup> durante 15 s.

El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260). Usando este método también se obtuvo una estimación de la pureza del ADN por medio de las relaciones de absorbancia (A260/A280) y (A260/A230).

Para evaluar la integridad del ADN extraído se mezclaron alícuotas de 5 µL con 1 µL de tampón de carga (6X DNA loading dye, Fermentas) y se analizó mediante electroforesis a 60 V durante 30 min en gel de agarosa al 1 % (p/v). La visualización del ADN en los geles se realizó usando un transiluminador y digitalización mediante fotografía digital.

### AFLP

La técnica de AFLP se desarrolló según el protocolo publicado por Hasbún *et al.* (2012). Éste está basado en el método descrito por Vos *et al.* (1995), pero utilizando fluoróforos adheridos a los partidores de la amplificación selectiva, con el fin de ser separados por electroforesis capilar y reconocidos con un secuenciador automático.

La técnica consta de tres pasos: 1) digestión- ligación: se realizó la digestión a 10 ng µL<sup>-1</sup> de ADN de *G. keule* con las enzimas *EcoRI* y *MseI*, posteriormente se ligó el producto de la digestión con adaptadores de doble cadena, específicos para cada enzima, 2) amplificación preselectiva: con el producto del paso anterior se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando partidores del tipo *EcoRI* +AC y *MseI* +C, 3) amplificación selectiva: se probaron 16 combinaciones de partidores selectivos del tipo *EcoRI*+3 / *MseI*+3 o +4 marcados con fluoróforos.

Para realizar el análisis genético de todos los individuos se procedió primero a elegir las combinaciones más informativas. Esta selección se realizó según los siguientes criterios; capacidad de amplificación, cantidad de fragmentos polimórficos (entre 50 y 500 pb) y nitidez de banda. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1 % (p/v) con 2 µL de bromuro de etidio, posteriormente se realizó la electroforesis capilar con el secuenciador automático ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer.

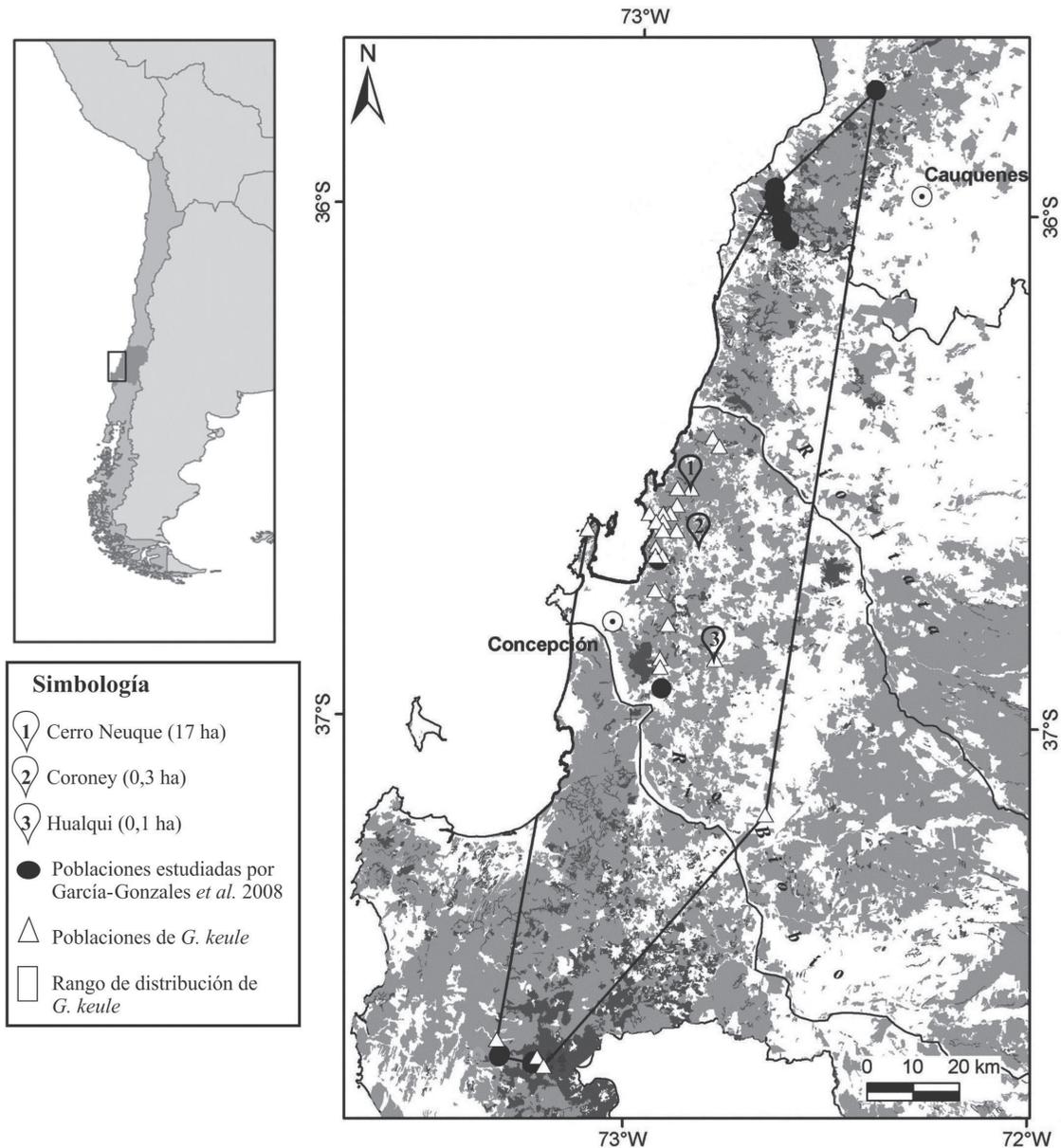


FIGURA 1. Localización de los relictos de *G. keule* estudiados y rango de distribución de la especie. Mapa modificado de García-Gonzales et al. 2008.

FIGURE 1. Locating relict populations of *G. keule* studied and distribution range of the species. Modified map from García-Gonzales et al. 2008.

Los datos fueron analizados utilizando el software GeneMapper v4.0 con el cual se confeccionó una matriz binaria (0/1) representando la ausencia o presencia del fragmento.

#### ANÁLISIS DE DATOS

A partir de la matriz binaria y utilizando el programa GenAlEx versión 6.1 (Peakall y Smouse 2006), se calcularon los siguientes índices de variabilidad genética: porcentaje de loci polimórficos (% P), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) e índice de Shannon (S). La estructuración genética se estimó

a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) y se realizó una prueba de Mantel para correlacionar valores de distancia genética y distancia geográfica.

#### RESULTADOS

De las 16 combinaciones de partidores AFLP evaluadas en *G. keule*, se seleccionaron tres combinaciones que permitieron visualizar bandas nítidas con más de 12 fragmentos

polimórficos cada una (Tabla I). Con ellas se obtuvo un total de 156 fragmentos de ADN y de los cuales el 62 % fue polimórfico. Las combinaciones restantes no fueron consideradas por no amplificar fragmentos en la especie o generar un patrón de fragmentos poco reproducible y con escasos polimorfismos.

La combinación *EcoRI*+*ACA* / *MseI*+*CAT* presentó el mayor porcentaje de polimorfismo arrojando 39 fragmentos polimórficos que corresponden al 68,42 % del total de fragmentos detectados para esta combinación.

A su vez, con *EcoRI*+*ACA* / *MseI*+*CCG* y *EcoRI*+*ACC* / *MseI*+*CAT* se detectaron un 58,8 y 41,6 % de polimorfismo, respectivamente.

Para el análisis genético, con el total de fragmentos obtenidos con las tres combinaciones de partidores, los índices de diversidad genética detectados por AFLP en los relictos de *G. keule* indican que el mayor porcentaje de loci polimórficos se observó en individuos de Cerro Neuque, con un 84,6 % de polimorfismo seguido por Coroney, con 59,6 %, y Hualqui, con 42,3 % de polimorfismo (Tabla II).

TABLA I. Porcentaje de polimorfismo detectado en 24 individuos de *G. keule* con tres combinaciones selectivas de marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados).

TABLE I. Polymorphic percentage in 24 *G. keule* individuals detected with three selective AFLP (Amplified fragment length polymorphism) primer sequences.

COMBINACIÓN SELECTIVA*	Nº FRAGMENTOS		% DE POLIMORFISMO
	TOTAL	POLIMÓRFICOS	
<i>EcoRI</i> + <i>ACA</i> / <i>MseI</i> + <i>CAT</i>	57	39	68,42
<i>EcoRI</i> + <i>ACC</i> / <i>MseI</i> + <i>CAT</i>	48	28	41,66
<i>EcoRI</i> + <i>ACA</i> / <i>MseI</i> + <i>CCG</i>	51	30	58,82
Total	156	97	-
Promedio	52	-	-

\*A, C, G, T representan los nucleótidos adenina, citosina, guanina, timina / A, C, G, T simbolize nucleotides adenine, guanine, cytosine, thymine.

TABLA II. Índices de diversidad genética detectados en tres relictos de *G. keule* utilizando marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados).

TABLE II. Genetic diversity index detected with AFLP (Amplified fragment length polymorphism) marker in three *G. keule* relict.

RELICTO	FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS	P (%)	S	He
Coroney	31	59,62	0,30 (0,03)	0,20 (0,02)
Hualqui	22	42,31	0,19 (0,03)	0,12 (0,02)
Cerro Neuque	44	84,62	0,46 (0,03)	0,31 (0,02)
Promedio		62,18	0,32 (0,02)	0,21 (0,01)

P: porcentaje de polimorfismo; S: índice de Shannon; He: heterocigosidad esperada. Valores entre paréntesis indican error estándar / P: polymorphic percentage; S: Shannon index; He: expected heterozygosity. Values in parentheses represent standard error.

El mayor porcentaje de la variación detectado por el análisis de varianza molecular se registró dentro de las poblaciones con un 73 %, mientras que entre los tres relictos de *G. keule* se registró el 27 % restante. El grado de estructuración genética entre las poblaciones de *G. keule* medido por el coeficiente de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) fue 0,267, indicando que las poblaciones se encuentran altamente diferenciadas. Además, al realizar la prueba de Mantel no se obtuvo una correlación entre valores de distancia genética y distancia geográfica ( $R^2 = 0,691$ ;  $p = 0,160$ ).

Cabe indicar que sólo en Coroney se observó regeneración sexual; sin embargo, en visitas posteriores se pudo constatar la nula supervivencia de las plántulas.

## DISCUSIÓN

Al comparar los resultados obtenidos en *G. keule* con otras Lauraceae y en categoría de amenaza, mediante marcadores dominantes, tales como RAPD en *Neolitsea sericeae* ( $P=50,5$  %, Wang *et al.* 2005) y AFLP en *Litsea szemaois* ( $P=80,79$  % y ISSR,  $P=87,01$  %, Ci *et al.* 2008) se puede ordenar a *G. keule* en un rango intermedio. Por otro lado, si se consideran los valores de diversidad genética reportados por Hamrick & Godt (1989) para especies leñosas longevas ( $P=49,3$  %,  $He=0,148$ ), *G. keule* presenta mayores niveles de diversidad ( $P=62,18$  %,  $He=0,212$ ). No obstante, estos valores de diversidad genética se asemejan a los obtenidos para especies endémicas ( $He=0,2$ ) por medio de RAPD (Nybom 2004).

Lander *et al.* (2009, 2010) determinaron que la polinización de la especie es entomófila y el polen de *G. keule* se mueve hasta 6 km desde pequeños parches o árboles aislados hasta sitios de mayor tamaño y viceversa, siendo los primeros fundamentales en la conectividad del flujo génico. Esto se ve reflejado en los valores obtenidos en la prueba de Mantel ( $R^2=0,691$ ;  $p=0,160$ ), los cuales concuerdan a los reportados por García-Gonzales *et al.* (2008) ( $r=-0,000$ ;  $p=0,72$ ) que señalan que las poblaciones no presentan aislamiento por distancia.

Adicionalmente, al comparar el índice de Shannon promedio para *G. keule* ( $S=0,322$ ) con una especie endémica longeva, tal como *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch ( $S=0,65$ , Bekessy *et al.* 2002), se observa que la variabilidad genética de *G. keule* es menor. Esto puede deberse a la dispersión entomófila del polen de *G. keule*, ya que especies cuyo polen es dispersado anemófilamente, como es el caso de *A. araucana*, presentan mayor diversidad genética (Hamrick & Godt 1996).

Estudios realizados por Herrera *et al.* (2005) en 33 individuos de *G. keule* y utilizando ISSR reportaron valores de variación entre y dentro de la población (30 y

70 % respectivamente). García-Gonzales *et al.* (2008) por su parte, a través del mismo marcador molecular y en 223 individuos de *G. keule* obtuvieron valores idénticos a los de este estudio (27 y 73 %), los cuales son los esperados para especies perennes leñosas y de polinización cruzada (Hamrick *et al.* 1992).

El nivel de diferenciación genética ( $F_{st}=0,267$ ) determinado para *G. keule* en este estudio es similar al informado por García-Gonzales *et al.* (2008) ( $F_{st}=0,275$ ) siendo ambos valores mayores al descrito para especies longevas, perennes y de polinización cruzada ( $F_{st}=0,094$ ) (Hamrick & Godt 1996). La limitada dispersión de la semilla puede ser la responsable de este resultado, ya que las semillas suelen encontrarse intactas bajo el dosel y a pocos metros del árbol. Según Villegas *et al.* (2003) y García-Gonzales *et al.* (2008), al encontrarse los relictos de *G. keule* rodeados por plantaciones exóticas se favorece la pérdida de agentes dispersores (del polen y la semilla).

Los tres relictos estudiados, al igual que otras poblaciones de *G. keule*, se encuentran aislados e insertos en plantaciones de pino, reproduciéndose sólo vegetativamente. Durante el período de colecta de material se observó reiterada intervención antrópica como el control de malezas con el fin de evitar incendios forestales, esto genera daño al eliminar plántulas y evitar la regeneración natural de la especie. A pesar de las condiciones en las cuales se encuentra *G. keule* en los sitios de estudio se obtuvo una mayor variabilidad genética en los relictos de mayor superficie (Fig.1). Según Hamrick & Godt (1996) los factores que más influyen sobre la variabilidad genética entre las poblaciones son el número de individuos y la superficie. Esto se corrobora en este trabajo dado que se utilizó la misma técnica e igual número de individuos para todos los relictos y sólo la superficie fue distinta.

En este estudio se reafirma que los AFLP son una poderosa herramienta para estudios de genética de poblaciones, ya que con sólo 3 combinaciones selectivas de AFLP se estimó la variabilidad de *G. keule* en los relictos analizados. Resultados similares se lograron en otras especies amenazadas utilizando tres o cuatro combinaciones de AFLP (Palacios *et al.* 1999, Ni *et al.* 2006, Ci *et al.* 2008). A su vez empleando ISSR en *G. keule* se obtiene una estructuración genética similar a la obtenida en este estudio (Herrera *et al.* 2005, García-González *et al.* 2008).

Adicionalmente, la variabilidad genética presentada en los relictos contribuye a ampliar los antecedentes en la especie, ya que reportes anteriores y de zonas cercanas al área de estudio presentan menores niveles de variabilidad. Por ejemplo, Penco ( $P=67,95$  %,  $S=0,3708$ , García-Gonzales *et al.* 2008) en comparación con Cerro Neuque ( $P=84,62$  %,  $S=0,46$ ).

Por lo tanto, es posible estimar la variabilidad genética en las poblaciones naturales remanentes de *G. keule* y detectar a

futuro variantes genéticas únicas y/o centros de variabilidad genética con el fin de contribuir en estudios enfocados a la conservación *ex situ* de esta especie amenazada.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto DIUC N° 209.142.028-1.0 de la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción por el financiamiento y a Genómica Forestal S.A. por la cooperación en este estudio. Catherine Delaveau agradece a Conicyt por su beca doctoral.

### BIBLIOGRAFÍA

- AZPILICUETA, M., H. CARON, C. BODÉNES & L. GALLO. 2004. SSR markers for analysing South American *Nothofagus* species. *Silvae Genetica* 53(5-6): 240-243.
- BEKESSY, S., T. ALLNUTT, A. PREMOLI, A. LARA, R. ENNOS, M. BURGMAN, M. CORTÉS & A. NEWTON. 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity* 88: 243-249.
- CI, X., J. CHEN, Q. LI & J. LI. 2008. AFLP and ISSR analysis reveals high genetic variation and inter-population differentiation in fragmented populations of the endangered *Litsea szemaiois* (Lauraceae) from Southwest China. *Plant Systematic and Evolution* 273: 237-246.
- DONOSO, C. & B. ESCOBAR. 1985. Germinación de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon. *Bosque* 6(2): 120-122.
- EXCOFFIER, L., P. SMOUSE & J. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- GARCÍA-GONZALES, R., B. CARRASCO, P. PEÑAILLO, L. LETELIER, R. HERRERA, B. LAVANDERO, M. MOYA & P. CALIGARI. 2008. Genetic variability and structure of *Gomortega keule* (Molina) Baillon (Gomortegaceae) relict populations: geographical and genetic fragmentation and its implications for conservation. *Botany* 86: 1299-1310.
- GONZÁLEZ, M. 1998. *Gomortega keule*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. URL: <http://www.iucnredlist.org/details/31357/0> Viewed: march 03, 2013.
- HAMRICK, J. & M. GODT. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir (eds.), *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. pp. 43-63. Sinauer, Sunderland, MA.
- HAMRICK, L. & M. GODT. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- HAMRICK, J., M. GODT & S. SHERMAN-BROYLES. 1992. Factors influencing genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.
- HASBÚN, R., C. ITURRA, P. MORAGA, P. WACHTENDORFF, P. QUIROGA & S. VALENZUELA. 2012. An efficient and reproducible for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection. *Tree Genetics & Genome* 8(4): 925-931.
- HECHENLEITNER, P., M. GARDNER, P. THOMAS, C. ECHEVERRÍA, B. ESCOBAR, P. BROWNLESS & C. MARTÍNEZ. 2005. Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Primera Edición. pp. 74-75. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo.
- HERRERA, R., M. ARIAS, M. MOYA-LEÓN, P. PEÑAILLO & M. WILKINSON. 2005. Genetics variation in a Chilean endangered endemic: *Gomortega keule* (Molina) Baillon. *Biodiversity and Conservation* 14: 2871-2881.
- HUANG, Y., C. ZHANG & D. LI. 2009. Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation. *Journal of Systematics and Evolution* 47(2): 103-109.
- LANDER, T., D. BOSHIER & S. HARRIS. 2007. Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the endangered, endemic Chilean tree *Gomortega keule* (Gomortegaceae). *Molecular Ecology Notes* 7: 1332-1334.
- LANDER, T., D. BOSHIER & S. HARRIS. 2009. Flower and fruit production and insect pollination of the endangered Chilean tree, *Gomortega keule* in native forest, exotic pine plantation and agricultural environments. *Revista Chilena de Historia Natural* 82(3): 403-412.
- LANDER, T., D. BOSHIER & S. HARRIS. 2010. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. *Biological Conservation* 143(11): 2583-2590.
- LE QUESNE, C. & D. STARK. 2006. Latifoliadas chilenas: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon. En: C. Donoso (ed.), *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Autoecología. pp. 277-284. Valdivia, Chile. Marisa Cuneo Ediciones.
- MEUDT, H. & A. CLARKE. 2007. Almost forgotten or latest practice AFLP applications, analyses and advances. *Plant Science* 12(3): 106-117.
- MUELLER, U. & L. WOLFENBARGER. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 389-394.
- NI, X., Y. HUANG, L. WU, R. ZHOU, S. DENG, D. WU, B. WANG, G. SU, T. TANG & S. SHI. 2006. Genetic diversity of the endangered Chinese endemic herb *Primulina tabacum* (Gesneriaceae) revealed by amplified length polymorphism (AFLP). *Genetica* 127: 177-183.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- PALACIOS, C., S. KRESOVICH & F. GONZÁLEZ-CANDELAS. 1999. A Population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 8: 645-657.
- PEAKALL, R. & P. SMOUSE. 2006. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- RODRÍGUEZ, R., & M. QUEZADA. 2001. Gomortegaceae. En: C. Marticorena & R. Rodríguez (eds.), *Flora de Chile*, Vol. 2(1). Winteraceae-Ranunculaceae. Ediciones Universidad

- de Concepción, Chile. 16-18.
- RODRÍGUEZ, R., E. RUIZ & J. ELISSETCHE. 2005. Árboles en Chile. Ed. Universidad de Concepción, Chile. 183 pp.
- SAN MARTÍN, J. & A. SÁNCHEZ. 1999. Las comunidades relictas de *Gomortega keule* (Gomortegaceae, Magnoliopsida) en Chile Central. Anales Jardín Botánico Madrid 57(2): 317-326.
- TORRES, E., J. IRIONDO & C. PÉREZ. 2003. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. American Journal of Botany 90(1): 85-92.
- VILLEGAS, P., C. LE QUESNE & CH. LUSK. 2003. Estructura y dinámica de una población de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon en un rodal antiguo de bosque valdiviano, Cordillera de Nahuelbuta, Chile. Gayana Botánica 60(2): 107-113.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER & M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23(21): 4407-4414.
- WANG, Z.S., S.Q. AN, H. LIU, X. LENG, J.W. ZHENG & Y.H. LIU. 2005. Genetic structure of the endangered plant *Neolitsea sericea* (Lauraceae) from the Zhoushan Archipelago using RAPD markers. Annals of Botany 95: 305-313.
- WEN-KUN, H., G. JIAN-YING, W. FANG-HAO, G. BI-DA & X. BING-YAN. 2008. AFLP analyses on genetic diversity and structure of *Eupatorium adenophorum* populations in China. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology 5 (1): 33-41.

Recibido: 08.03.13  
Aceptado: 30.05.13