



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas -Programa de Magíster en Ciencias
mención Botánica

**Evidencia de la especiación anagenética sobre la
diversidad genética de la especie insular *Dysopsis
hirsuta* (Müll. Arg.) Skotts. (Euphorbiaceae),
Archipiélago de Juan Fernández, Chile, en comparación
con su ancestro continental *D. glechomoides* (A. Rich.)
Müll. Arg.**

Tesis para optar al grado de Magíster

HELLEN TERESA MONTOYA ESTRADA

CONCEPCIÓN-CHILE

2020

Profesor Guía: Patricio López Sepúlveda
Dpto. de Botánica, Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Página oficial de Firmas:
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

Profesor Guía

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Ha sido aprobada por la Siguiete Comisión evaluadora



Nombre y Grado (s) Académico (s)

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Directora de Programa

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Dedicatoria

Le dedico esta tesis a la persona más importante de mi existencia, a mi querida madre Ruth Ellen, gracias por siempre apoyarme en mis éxitos y fracasos, por nunca rendirte conmigo, a ser mejor persona, por enseñarme que, a pesar de todo, siempre es posible. Sin ti no tendría las oportunidades de ser quién soy y explorar esta experiencia en mi vida.

Gracias por haber nacido.

Te amo infinito.



Agradecimientos

A mi profesor guía Dr. Patricio López Sepúlveda por su infinita paciencia y apoyo a lo largo de estos años. Estaré siempre agradecida de sus enseñanzas y todo el conocimiento entregado, sin dudas la palabra tutor, del latín “*tutor*”, quién observa, dirige y protege es la definición más acertada para usted. Gracias por permitirme ser su alumna, ser parte en el Proyecto Fondecyt N°1160794 y por financiar esta investigación, así como cada una de las oportunidades académicas.



A Dra. Glenda Fuentes, mi madre académica, amiga, apoyo, consejera y mi contención, sin ti nada de esto hubiese sido posible. Gracias a ti pude confiar en mí. 언니~ 태어나 줘서 고마워요, 힘이 되어줘서 고마워. 말로는 너에 대한 내 사랑과 존경을 표현할 수 없어. 사랑해 친구!

A la Corporación Nacional Forestal (CONAF) y en especial a Iván Leiva, Felipe Sáez, Ramón Schiller, Alfonso Andaur, Bernardo López, Guillermo Araya, Maximiliano Recabarren y Danilo Arredondo, del Parque Nacional Archipiélago de Juan Fernández, por las facilidades de acceso y apoyo en terreno.

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	Vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	ix
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Principales modos de especiación en islas oceánicas: Cladogénesis y Anagénesis.....	2
1.2 Antecedentes previos de anagénesis en el Archipiélago de Juan Fernández.....	5
1.3 Sitio de estudio: Archipiélago de Juan Fernández.....	7
1.4 Diversidad genética mediada por procesos evolutivos.....	11
1.5 Marcadores moleculares (AFLP y SNP).....	12
1.6 Especie de estudio	13
1.7 Marco de estudio	14
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
3 METODOLOGÍA	19
3.1 Especies.....	19
3.2 Área de estudio y poblaciones empleadas.....	21

3.3 Extracción de ADN	23
3.4 AFLPs.....	24
3.5 Tipificación de SNP's.....	26
3.6 Detección de loci <i>outlier</i> en AFLP y SNP.....	27
3.7 Obtención de matrices neutrales y <i>outlier</i>	28
3.8 Diversidad genética	28
3.9 Divergencia genética	29
3.10 Tamaño efectivo poblacional (N_e).....	30
3.11 Determinación de Unidades de Conservación (UC) en Isla Robinson Crusoe.....	30
4 RESULTADOS.....	32
4.1 AFLPs.....	32
4.2 SNP.....	33
4.3. Diversidad genética.....	34
4.3.1 Estadísticos de diversidad genética AFLP Neutral y <i>outlier</i>	34
4.3.2 Estadísticos de diversidad genética SNP Neutral y <i>outlier</i>	35
4.4. Divergencia Genética	36
4.4.1 Estimación de la estructura genética (Neutral para <i>D. hirsuta</i> y <i>D.</i> <i>glechomoides</i> para marcadores AFLP y SNP.....	36
4.4.2 Estimación de la estructura genética basada en individuos con marcadores AFLP y SNP para las matrices Neutral y <i>outlier</i>	45
4.5 Tamaño efectivo poblacional (N_e).....	61

4.6. Unidades de Conservación Genética en isla Robinson Crusoe.....	62
5 DISCUSION.....	65
5.1 Diversidad y estructura genética.....	67
5.2 Procesos Micro-evolutivos que modelan la diversidad genética en <i>D. hirsuta</i> en la isla Robinson Crusoe.....	70
5.3 Implicancias para la conservación	75
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Poblaciones de las especies <i>Dysopsis hirsuta</i> y <i>D. glechomoides</i> empleadas en marcadores SNP y AFLP con su respectiva ubicación geográfica.....	23
Tabla 2: Detalles del número de loci obtenidos para los marcadores AFLP, en las distintas matrices utilizadas: matriz completa que incluye las dos especies y matrices neutrales y <i>outlier</i> para cada una de las especies.....	33
Tabla 3: Detalles del número de loci obtenidos para los marcadores SNP, en matrices utilizadas para cada una de las especies de <i>Dysopsis</i> analizadas.	34
Tabla 4. Estimación de la diversidad genética basadas en análisis de las matrices neutrales y <i>outlier</i> del marcador AFLP para 9 poblaciones de <i>Dysopsis</i> <i>hirsuta</i> y 9 poblaciones de <i>D. glechomoides</i>	38

Tabla 5. Estimación de la diversidad genética basadas en análisis de las matrices neutrales y <i>outlier</i> del marcador SNP para 9 poblaciones de <i>Dysopsis hirsuta</i> y 5 poblaciones de <i>D. glechomoides</i>	39
Tabla 6. Resumen de los análisis de varianza molecular (AMOVA) para la especie <i>D. hirsuta</i> con marcador AFLP para matrices neutrales y <i>outlier</i>	49
Tabla 7. Resumen de los análisis de varianza molecular (AMOVA) para la especie <i>D. hirsuta</i> con marcador SNP para matrices neutrales y <i>outlier</i>	49
Tabla 8. Porcentajes de asignación de grupos genéticos obtenidos en STRUCTURE para marcadores AFLP en ambas matrices neutral y <i>outlier</i> para la especie <i>D. hirsuta</i>	51
Tabla 9. Porcentajes de asignación de grupos genéticos obtenidos en STRUCTURE para marcadores SNP en ambas matrices neutral y <i>outlier</i> para la especie <i>D. hirsuta</i>	51
Tabla 10: Valores de distancia genética (FST) entre pares de poblaciones para la matriz de AFLP neutral para <i>D. hirsuta</i>	54
Tabla 11: Valores de distancia genética (FST) entre pares de poblaciones para la matriz de AFLP <i>outlier</i> para <i>D. hirsuta</i>	54
Tabla 12: Valores de distancia genética (FST) entre pares de poblaciones para la matriz de SNP neutral para <i>D. hirsuta</i>	55
Tabla 13: Valores de distancia genética (FST) entre pares de poblaciones para la matriz de SNP <i>outlier</i> para <i>D. hirsuta</i>	55

Tabla 14. Valores de diversidad genética para marcadores AFLP y SNP en matrices neutrales y <i>outlier</i> para la especie <i>D. hirsuta</i>	64
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de las poblaciones muestreadas de <i>Dysopsis hirsuta</i> en isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández y distribución de la especie continental <i>D. glechomoides</i>	22
Figura 2. Estimación de las relaciones genéticas entre poblaciones de <i>Dysopsis hirsuta</i> y <i>D. glechomoides</i> en base a análisis de agrupamiento de redes de vecino más cercano con marcador AFLP y SNP	40
Figura 3. Gráfico de barras de los porcentajes de asignación de los individuos para la matriz completa (Neutral) para <i>Dysopsis hirsuta</i> y <i>D. glechomoides</i>	41
Figura 4. Porcentajes de asignación obtenidos en el análisis de estructura genética para marcadores AFLP en <i>Dysopsis hirsuta</i> y <i>D. glechomoides</i>	42
Figura 5. Gráfico de barras de los porcentajes de asignación de los individuos para la matriz completa (Neutral) para <i>D. hirsuta</i> y <i>D. glechomoides</i>	43
Figura 6. Porcentajes de asignación obtenidos en el análisis de estructura genética para marcadores SNP en <i>D. hirsuta</i> y <i>D. glechomoides</i>	44

Figura 7. Gráficos PCoA para las matrices neutral y <i>outlier</i> de la especie <i>Dysopsis hirsuta</i>	47
Figura 8. Gráficos de la distribución de la varianza molecular para la especie <i>Dysopsis hirsuta</i> con marcador AFLP.....	48
Figura 9. Gráficos de la distribución de la varianza molecular para la especie <i>Dysopsis hirsuta</i> con marcador SNP	48
Figura 10. Barplots de asignación de grupos genéticos para las matrices neutrales y <i>outlier</i> en marcadores AFLP y SNP en la especie <i>Dysopsis hirsuta</i> ...	52
Figura 11. Gráficos de la distancia genética entre pares de poblaciones para los marcadores AFLP y SNP en matrices neutrales y <i>outlier</i> para la especie <i>Dysopsis hirsuta</i>	56
Figura 12. Modelo de regresión obtenido a partir del Test de Mantel para la especie <i>Dysopsis hirsuta</i> en las matrices neutrales y <i>outlier</i> para cada marcador AFLP y SNP.....	57
Figura 13. Árbol de redes basado en la estimación del vecino más cercano de las poblaciones de <i>Dysopsis hirsuta</i> obtenidas mediante la matriz neutral de AFLP.....	59
Figura 14. Árbol de redes basado en la estimación del vecino más cercano con las de las poblaciones de <i>Dysopsis hirsuta</i> obtenidas mediante la matriz <i>outlier</i> de AFLP.....	59

Figura 15. Árbol de redes basados en la estimación del vecino más cercano de las poblaciones de *Dysopsis hirsuta* obtenidas mediante la matriz neutral de SNP..... 60

Figura 16. Árbol de redes basado en la estimación del vecino más cercano de las poblaciones de *Dysopsis hirsuta* obtenidos mediante la matriz *outlier* de SNP..... 61

Figura 17. Tamaño efectivo poblacional con su respectivo intervalo de confianza en la Isla Robinson Crusoe en la especie *Dysopsis hirsuta*..... 62



RESUMEN

Las islas oceánicas a pesar de su pequeño tamaño, han sido reconocidas como grandes reservorios naturales de la biodiversidad ya que albergan numerosas especies únicas. Estas islas ofrecen oportunidades para realizar estudios de tipo evolutivos que ayudan a comprender como las especies y poblaciones divergen en espacios acotados, aislados y relativamente jóvenes en edad geológica. La generación y diversificación de especies en islas oceánicas se atribuye principalmente a los modos de especiación destacando cladogénesis y anagénesis, ambos han modelado la variabilidad genética en especies de plantas en islas oceánicas mediante procesos micro-evolutivos de tipo neutrales y selección. En particular la anagénesis genera solo una especie cuya variación genética se acumula a través del tiempo, siendo igual, ligeramente menor o mayor a la especie parental. Diversos estudios se han llevado a cabo para comprobar como la anagénesis incide sobre la variabilidad genética de las especies de islas oceánicas. Hasta el momento la mayor parte de los estudios relacionados con esta especiación han sido realizados en especies arbóreas, por ello en este estudio se evaluó este proceso en una especie herbácea, utilizando como modelo *Dysopsis hirsuta* (Müll. Arg.) Skotts. (Euphorbiaceae), especie endémica de la isla Robinson Crusoe, derivada anageneticamente de la especie endémica de Chile continental *Dysopsis glechomoides* (A. Rich.) Müll. Arg. Además, se tiene conocimiento que la especie insular se encuentra en peligro crítico por la drástica reducción de hábitat, sin embargo, no existen antecedentes

de tipo genético que ayuden a dilucidar el estado de conservación genético de las poblaciones hoy existentes.

Este estudio evaluó procesos micro-evolutivos que acompañan a la especiación anagénica. Para ello se analizó la diversidad y estructuración genética neutral y *outlier* con el propósito de dilucidar qué procesos son los que estarían modelando la variabilidad genética de esta especie, examinando la variación genética basada en seis marcadores AFLP en 382 individuos pertenecientes a 14 poblaciones y marcadores SNP basados en 367 individuos distribuidos en 11 poblaciones, incluyendo ambas especies. Los resultados de diversidad genética al analizar la especie insular versus la continental para AFLP y SNP evaluadas de manera neutral y *outlier* en promedio muestran que *D. hirsuta* presenta niveles iguales o ligeramente menores a aquellos de *D. glechomoides*, lo que corrobora su origen anagenético. Los resultados de divergencia genética muestran la existencia de dos *pools* génicos dentro de la isla Robinson Crusoe y dos en el continente, esto podría sugerir dos efectos fundadores desde el continente a la isla. Los resultados de diversidad genética al evaluar sólo la especie insular mediante marcadores neutrales y *outlier* dan cuenta que los procesos de tipo neutrales y *outlier* estarían actuando sobre las poblaciones de la isla, por lo que no se descarta selección en alguna de ellas. Al evaluar los resultados de divergencia genética se evidencia una estructuración genética con varios *pool* génicos dentro de la isla, con los mayores valores de varianza dentro de las poblaciones y sin existir aislamiento por distancia. Este patrón encontrado es

discordante a los evaluados en otras especies que abrían derivado por este proceso de especiación, en la cuales no existe un patrón geográfico, además de un solo pool génico encontrado en la isla. Todos estos resultados de diversidad y estructura genética demuestran que la variación estaría siendo modelada principalmente por la deriva génica y flujo génico histórico por sobre la selección, corroborando que los procesos de tipo neutrales son lo que modelan la diversidad genética en esta especie insular. Con los resultados de diversidad de y divergencia se propone caracterizar unidades de conservación genética basadas en ESU. En donde de las nueve poblaciones insulares evaluadas, se propone considerar de manera prioritaria las poblaciones Mirador Selkirk, Plazoleta Yunque, Salsipuedes, La Campana y Puerto Inglés, en el desarrollo de estrategias de conservación para la especie, considerando herramientas que incluyan la conservación de semillas de estos sitios (*in situ*) y el estableciendo de planes de manejo para aumentar los niveles de variación genética de las poblaciones.

SUMMARY

Oceanic islands, despite being small, have been recognized as great natural reservoirs of biodiversity since they are home to many unique species. These islands offer opportunities to carry out evolutionary studies, which allow us to understand how species and populations diverge in limited spaces, isolated and relatively young in geological age. The generation and diversification of species on oceanic islands is attributed mainly to the speciation modes of cladogenetic and anagenetic, both have modeled genetic variability in plant species on oceanic islands through micro-evolutionary processes of a neutral type and selection. In the case of anagenesis generates only one species whose genetic variation accumulates over time, being equal, slightly lower or higher than the parent species. Various studies have been carried out to verify how anagenesis affects the genetic variability of oceanic island species. Until now, most of the studies related to this speciation have been carried out in tree species, therefore in this study this process was evaluated in herbaceous species, using *Dysopsis hirsuta* (Müll. Arg.) Skottsbo as a model. (Euphorbiaceae), endemic species of Robinson Crusoe Island, derived anagenetically from the endemic species of continental Chile *Dysopsis glechomoides* (A. Rich.) Müll. Arg. In addition, it is known that the insular species is critically endangered due to the drastic reduction of habitat, however, there is no genetic background that helps to elucidate the genetic conservation status of the populations that exist today. This study evaluated micro-evolutionary processes that accompany anagenetic speciation. For this, the

diversity and neutral and outlier genetic structuring were analyzed in order to elucidate which processes are the ones that would be modeling the genetic variability of this species, examining the genetic variation based on six AFLP markers in 382 individuals belonging to 14 populations and SNP markers. based on 367 individuals distributed in 11 populations, including both species. The results of genetic diversity when analyzing the insular versus the continental species in AFLP and SNP with a neutral and outlier approach, it is observed that *D. hirsuta* presents levels equal to or slightly lower than those of *D. glechomoides*, which corroborates its anagenetic origin. The genetic divergence results show the existence of two genetic pool within Robinson Crusoe island and two on the mainland, this could suggest two founding effects from the mainland to the island. The results of genetic diversity when evaluating only the insular species using neutral and outlier markers show that the processes of the neutral and outlier type would be acting on the populations of the island, so selection on these is not ruled out. When evaluating the results of genetic divergence, a genetic structure with several gene pools within the island is evidenced, where the highest variance values would be found within populations and without isolation by distance. This pattern is discordant to those evaluated in other species that were derived by anagenesis, in which there is no geographic pattern, in addition to a single genetic pool found in the island. All these genetic diversity and divergence results suggest that variation is being modeled mainly by processes of historical gene flow and gene drift over selection, corroborating that neutral-type processes are what

model genetic diversity in *D. hirsuta*. With the diversity and divergence results it is proposed to characterize ESU-based genetic conservation units. Where of the nine island populations evaluated, it is proposed to consider as a priority the populations Mirador Selkirk, Plazoleta Yunque, Salsipuedes, La Campana and Puerto Inglés, in the development of conservation strategies for the species, considering tools that include seed conservation of these sites (in situ) and the establishment of management plans to increase the levels of genetic variation of the populations.



1 INTRODUCCIÓN

Las islas oceánicas son consideradas grandes fuentes de biodiversidad biológica y son reconocidas como laboratorios naturales para el estudio de la evolución debido a su área limitada, aislamiento geográfico, restricción de hábitat, cuantiosos microhábitats con una biota relativamente simple y altos niveles de endemismo (Drake *et al.*, 2002). Aunque los sistemas insulares cubren solo alrededor del 2% de la superficie terrestre, su contribución a la biodiversidad mundial es primordial (Hahn *et al.*, 2005). Este conjunto de características únicas, que resultan de un aislamiento evolutivo prolongado, hace a las islas particularmente sensibles a los cambios de tipo evolutivos, ecológicos y antropogénicos (Frankham, 2005), convirtiendo a las islas oceánicas en repositorios de información genética (Ministerio del medio ambiente, 2014).

Los prolongados periodos de tiempo que algunas de estas islas han permanecido alejadas de las áreas fuente (en su mayoría áreas continentales), ofrece oportunidades para determinar el o los orígenes de las especies inmigrantes y la historia evolutiva posterior al establecimiento en estos ecosistemas (Emerson, 2002). Una manera de comprender esta historia evolutiva es por medio de marcadores moleculares, los cuales entregan oportunidades para el estudio de los procesos evolutivos a través de la genética de poblaciones, revelando la divergencia y especiación (Bretting y Widrlechner, 1995; Luikart *et al.*, 2003)

1.1 Principales modos de especiación en islas oceánicas: Cladogénesis y Anagénesis

Es bien conocido que la generación de nuevas especies en islas oceánicas se debe entre otros a los modos de especiación, destacando los procesos de cladogénesis y anagénesis (Stuessy *et al.*, 2014), que influyen de manera significativa sobre la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones de especies endémicas que habitan las islas (Stuessy, 2018). Esto se debe a que tanto cladogénesis como anagénesis se desarrollan a partir de procesos micro-evolutivos, como mutación, flujo génico, deriva génica y selección natural (Frankham,1997).

La cladogénesis es el modo de especiación más común en islas oceánicas, la cual involucra radiación adaptativa (Schlüter, 2000), generalmente esquematizada como una división de eventos, según los cuales una especie ancestral puede dar origen a dos o más especies descendientes (Stanley, 1975; Emerson y Patiño, 2018). En este caso, al llegar el propágulo de una especie (inmigrante continental o insular) a una isla, por efecto fundador genera una población que rápidamente diverge y se fragmenta produciendo numerosos linajes que se adaptan a diferentes hábitats ecológicos (Stuessy *et al.*, 1990, 2012). Como resultado, las especies originadas presentan una morfología diferente y una variabilidad genética menor respecto de la especie parental (Frankham,1997; Baldwin *et al.*, 1998; Givnish *et al.*, 2009), debido a la

subdivisión del conjunto de genes (o pool génico) de los inmigrantes y la rápida selección de tipo direccional que se genera de manera aislada (Takayama *et al.*, 2018). Varios complejos de especies se han desarrollado en islas oceánicas a través de la radiación adaptativa, como lo ilustran los géneros *Clermontia* Gaudich., *Cyanea* Gaudich. y *Trematolobelia* Zahlbr. ex Rock, del complejo Lobelioides (Campanulaceae, Givnish *et al.*, 2009) y *Argyroxiphium* DC., *Wilkesia* A.Gray y *Dubautia* Gaudich. en el complejo de Silverwords (Asteraceae, Keeley y Funk 2011) en Hawaii; además de los géneros *Aeonium* Webb. y Berthel. (Crassulaceae, Liu, 1989; Jorgensen y Olesen, 2001) y *Echium* L. (Boraginaceae, Böhle *et al.*, 1996) en las Islas Canarias; *Scalesia* Arn. (Asteraceae, Eliasson, 1974) en el archipiélago de Galápagos (Lindhardt *et al.*, 2009); *Dendroseris* D.Don (Asteraceae) diversificado en las tres islas que componen el Archipiélago de Juan Fernández (Crawford *et al.*, 1998); *Erigeron* L. (Asteraceae, López-Sepúlveda *et al.*, 2015) en isla Alejandro Selkirk y *Robinsonia* DC. (Asteraceae, Crawford *et al.*, 1998; Takayama *et al.*, 2015) en isla Robinson Crusoe.

El resultado general de estos estudios indica que durante la cladogénesis la población inmigrante se divide, generando fragmentos que albergan un rango limitado de variación genética en comparación con la población parental continental (Baldwin *et al.*, 1998), de esta forma ocurre una máxima divergencia morfológica, pero con bajos niveles de variabilidad genética (Frankham, 1997).

La anagénesis es mediada principalmente por procesos microevolutivos de tipo neutrales (mutación, flujo y deriva génica) (Stuessy *et al.*, 2006). El migrante que llega a una isla, especialmente en aquellas con oportunidades ecológicas limitadas (baja heterogeneidad de hábitats), prolifera en tamaño poblacional y acumula variabilidad genética de manera paulatina (Emerson, 2002; Crawford, 2010), luego de numerosas generaciones, después de su establecimiento, la variación genética dentro y entre las poblaciones que se establecen en la isla, es acumulada mediante procesos de tipo neutrales, lo da como resultado que esta variación genética se aproxime o incluso supere ligeramente al ancestro, resultando de esta forma una especie genéticamente distinta (Stuessy *et al.*, 2006). Especies que habrían derivado mediante este tipo de especiación son escasos, pero relevantes, ya que este tipo de especiación es menos frecuente en las islas oceánicas. Stuessy *et al.* (2006) analizó un total de 10 complejos de islas y más de 2000 especies, documentando que la mayor proporción de especies derivadas vía anagénesis se encuentran en las islas Ullung en Corea y en el Archipiélago de Juan Fernández en Chile. Este último, con 52 taxas de plantas endémicas que se habrían originado anagenéticamente (Stuessy *et al.*, 2018). Otros ejemplos destacados, fuera del Archipiélago de Juan Fernández, incluyen a *Dystaenia ibukiensis* (Y.Yabe) Kitag. y *D. takesimana* (Nakai) Kitag. (Apiaceae, Pfosser *et al.*, 2006), *Acer takesimense* Nakai y *A. okamotoanum* Nakai (Aceraceae, Takayama *et al.*, 2013) en isla Ullong.

1.2 Antecedentes previos de anagénesis en el Archipiélago de Juan Fernández

En particular para el Archipiélago Juan Fernández la anagénesis se ha documentado en diversos géneros, la mayoría en plantas con hábito arbóreo como por ejemplo *Drimys confertifolia* Phil. (Winteraceae) que habita en las islas Robinson Crusoe (R. Crusoe) y Alejandro Selkirk (A. Selkirk), la cual estaría muy relacionada con las especies *D. andina* (Reiche) R.A.Rodr. et Quez. y *D. winteri* J.R.Forst. et G.Forst. que se encuentran en el continente (López-Sepúlveda *et al.*, 2014). Estos autores sobre la base de análisis moleculares indican que se habría originado vía anagénesis de la especie continental *D. winteri*, ya que los niveles de variación genética son similares, aunque ligeramente menores o mayores dependiendo del marcador molecular utilizado (AFLP o microsatélites).

Otro ejemplo es el género *Myrceugenia* (Myrtaceae), el cual posee dos especies en el Archipiélago Juan Fernández: *M. schulzei* Johow encontrada en isla Alejandro Selkirk y *M. fernandeziana* (Hook. y Arn.) Johow en isla Robinson Crusoe. En base a secuencias moleculares de ADN se ha demostrado que *M. fernandeziana*, sería extremadamente divergente de *M. schulzei*, al punto que *M. fernandeziana* ha sido transferida al género monotípico *Nothomyrcia* Kausel (Murillo *et al.*, 2013). Por otra parte, *M. schulzei* tendría como pariente continental a *M. cochalguensis* (Phil.) L.E. Navas, con la que estaría más emparentada filogenéticamente (Murillo *et al.*, 2013). López-Sepúlveda *et al.*, (2013) encontró

para ambas especies insulares una considerable variación genética dentro de las poblaciones, donde el grado de variabilidad genética dentro de *M. schulzei* es equivalente a la especie parental continental *M. colchaguensis*. Desde un punto de vista genético, ambas especies insulares forman una gran población en cada una de las islas, con poca estructura genética y sin estructuración geográfica (López-Sepúlveda *et al.*, 2013). Así, altos niveles de variabilidad genética y baja estructuración geográfica, son compatible con el concepto de especie derivada anagenéticamente (Stuessy, 2007).

Rhaphithamnus Miers. (Verbenaceae), es otro género representante de anagénesis en el Archipiélago de Juan Fernández. Posee una especie *Rhaphithamnus venustus* B.L. Rob., la cual se encuentra en las islas R. Crusoe y A. Selkirk, y que ha derivado de su ancestro continental *R. spinosus* (Juss.) Moldenke (López- Sepúlveda *et al.*, 2015). En los estudios realizados mediante AFLP y microsatélites se observa que la variabilidad genética es nuevamente mayor para la población en Robinson Crusoe, que la encontrada en la especie continental, aunque la variabilidad genética encontrada para *R. venustus* que se encuentra en A. Selkirk es considerablemente más baja que la población que habita en Robinson Crusoe (López-Sepúlveda *et al.*, 2016). Por último, el género *Robinsonia* DC. (Takayama *et al.*, 2015a), habría radiado en isla Robinson Crusoe mediante cladogénesis, sin embargo, *Robinsonia masafuerae* Skotts., habría divergido mediante anagénesis en isla Alejandro Selkirk de uno de sus parentales de Robinson Crusoe, *R. evenia* Phil. (Takayama *et al.*, 2015a). Los

resultados presentados por Takayama *et al.* (2015a) arrojaron que la variabilidad genética en *R. masafuerae* Skotts. es similar a la de su especie progenitora *R. evenia*.

Los estudios anteriores basados en marcadores multilocus han encontrado el mismo patrón, donde los valores de variabilidad genética medidos en términos de la riqueza alélica, la proporción esperada de heterocigotos, los coeficientes de endogamia y el número total de alelos, muestran valores estadísticamente iguales o levemente mayores a los que registran sus ancestros continentales o insulares. Además, en todos ellos existe una baja estructuración genética dentro de las poblaciones de especies originadas vía anagénesis, esto se debe a que los individuos que habrían divergido por este modo de especiación, se comportan como una sola gran población compartiendo el pool génico en toda la isla, lo que conlleva a que no exista un patrón genético en el paisaje, debido a que este posee baja heterogeneidad de hábitats (Takayama *et al.*, 2015b).

1.3 Sitio de estudio: Archipiélago de Juan Fernández

El Archipiélago de Juan Fernández, hoy considerado Reserva Mundial de la Biosfera (CONAF 2014), localizado a 33°40'S y 80°47' O a 667 km de las costas de Chile Central, está conformado por tres islas: Robinson Crusoe (con una superficie de 48 km² y 915 m de altitud máxima), Alejandro Selkirk (50 km² y 1.650 m de altitud) y Santa Clara (2 km² y 375 m de altitud) (Stuessy y Ono,

1998). Posee un origen volcánico (Castro *et al.*, 1995) compuesto por rocas de origen basáltico (Le Quesne *et al.*, 2002), lo que resulta en suelos minerales ricos en nutrientes. En general los suelos de Robinson Crusoe muestran una diferenciación en la composición en un gradiente altitudinal, con ceniza volcánica en las partes más elevadas y en algunas partes bajas presentan áreas con suelos arenosos, producto de los depósitos eólicos (Ortiz 1982). Estos tipos de suelo se vuelven muy susceptibles a la erosión, sobre todo por el pastoreo o la tala considerable de la isla (Stuessy y Ono, 1998; Greimler *et al.*, 2002a), problemas recurrentes en este hábitat y que han provocado que muchas especies de plantas endémicas se vean amenazadas. El clima del archipiélago se caracteriza por veranos secos e inviernos suaves pero húmedos y puede ser descrito como un clima mediterráneo con influencia oceánica (Hajek y Espinoza, 1987; Cereceda *et al.*, 1996). En Robinson Crusoe la temperatura media anual es de 15,2 °C y la precipitación anual total es de 922 mm (Muñoz 1969). La flora presente en el Archipiélago ha desarrollado una cubierta vegetal modificada por el ambiente y relieve sobre el sustrato en el cual se han desarrollado, dando origen a una composición de vegetación particular para cada isla, como consecuencia de los fenómenos evolutivos y de colonización (Stuessy y Ono, 1998). Si bien las composiciones de especies son similares para las dos islas mayores (R. Crusoe y A. Selkirk), estas difieren en los patrones altitudinales (Stuessy, 2007).

El archipiélago presenta un poco menos de 100 km² de masa terrestre, pese a ello, las islas concentran más del 5% de las plantas vasculares endémicas de

Chile (Marticorena *et al.*, 1998). La vegetación del Archipiélago Juan Fernández ocupa 3.907 ha solo en islas Robinson Crusoe y Santa Clara y 4.613 ha en Alejandro Selkirk (CONAF 2014). En el archipiélago se encuentran 475 especies de plantas vasculares, incluyendo 135 endémicas, 73 nativas y 267 introducidas, con un endemismo del 13% a nivel de género y un 64% a nivel de especie (Danton *et al.*, 2006; Stuessy *et al.*, 2018). El alto valor de endemismo que la flora del Archipiélago posee la transforma en un lugar único a nivel mundial, lo cual ha llevado a ser declarada como la isla con la mayor densidad de especies endémicas/km² en el mundo (Vargas *et al.*, 2014). En particular, la isla Robinson Crusoe, la única isla habitada permanentemente del archipiélago, presenta más plantas endémicas por área que cualquier otra isla del mundo con un estimado de 93 especies en 4.794 hectáreas, es decir 1.9 especies endémicas/km² (Stuessy *et al.*, 2017). La vegetación de esta isla se caracteriza por presentar pastizales en las zonas más bajas (<150 m s.n.m.), matorrales mixtos exótico-nativos en las zonas intermedias, y formaciones boscosas endémicas en las zonas más altas (> 400 m s.n.m.). La cumbre del cerro El Yunque (915 m s.n.m.), el más alto, presenta una flora particularmente única con plantas de distribución local como *Yunquea tenzii* (Danton *et al.*, 2006).

La mayoría de los géneros de especies vasculares en el Archipiélago de Juan Fernández posee un origen cosmopolita (27%), seguido por géneros de zonas tropicales y neotropicales (31%), zonas más alejadas como Australasia también están presentes dentro de los elementos florísticos (11%). Basado en más de

100 censos florísticos, Greimler *et al.* (2002b) realizaron una clasificación de las formaciones vegetales en Robinson Crusoe, las cuales incluyen catorce unidades vegetacionales siendo las principales 1) Bosque endémico montano alto (753,5 ha de extensión, 350-650 msnm), se encuentra en pendientes pronunciadas, dominada por las especies propias de las islas. 2) Bosque endémico montano bajo (441,9 ha 220-410 msnm), compuesto de bosques dominados por luma, naranjillo (*Fagaria mayu* (Bertero ex Colla) Engl.) y canelo. Los árboles endémicos Juan Bueno (*Rhaphithamnus venustus* (Phil.) B.L. Rob.), peralillo (*Coprosma pyrifolia* (Hook. et Arn.) Skotts.) y manzano (*Boehmeria excelsa* (Bertero ex Steud.) Wedd.) se encuentran con menos abundancia en este tipo de vegetación (Vargas y Bannister, 2003). 3) Matorral de murta (232,2 ha 200-600 m s.n.m.), es una comunidad de arbustos de hojas duras que ocurren a lo largo de las laderas superiores de Robinson Crusoe. La murta (*Ugni molinae* Turcz.), introducida desde el continente a finales de 1800 (Johow, 1896), se ha desarrollado de manera invasiva, donde se presentan usualmente especies endémicas como la murta de Juan Fernández (*Ugni selkirkii* (Hook. y Arn.) O.Berg) o el helecho pluma de indio (*Lomariocycas cycadifolia* (Colla) Gasper & A.R. Sm.). 4) Matorral de maqui-mora (718,3 ha 140-420 msnm). Este tipo de vegetación está formada por un denso matorral de las especies exóticas invasoras zarzamora (*Rubus ulmifolius* Schott) y maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz.), con baja o casi nula proporción de especies nativas (Greimler *et al.*, 2002b).

1.4 Diversidad genética mediada por procesos evolutivos

La diversidad genética, medida en términos de variabilidad genética, es la fuente primaria de variabilidad biológica en las poblaciones naturales (Campbell, 2003), la cual permite la aparición de variantes genéticas como alelos, genes o genotipos dentro y entre las poblaciones de una especie (Jiménez y Collada 2000), permitiendo a las especies y sus poblaciones responder a los cambios ambientales y evolutivos que se presentan a largo o corto plazo (Lande y Barrowclough, 1987; Rossetto *et al.*, 1995), siendo la responsable de la generación y mantención de la biodiversidad. La diversidad genética es considerada el principal componente de la biodiversidad y en los últimos años se ha prestado mayor atención por conservar este componente, entendido que las poblaciones con altos niveles de variabilidad genética están asociada a la prevalencia de las poblaciones naturales, permitiendo a las especies responder ante eventuales cambios en su hábitat, tales como la fragmentación o la inestabilidad ambiental (Sgrò *et al.*, 2011).

Los estudios sobre la variabilidad genética en especies de plantas en islas oceánicas y en particular para el Archipiélago Juan Fernández, están restringidos a loci neutrales, sin embargo, existe dentro de estos una proporción de loci denominados “potenciales loci bajo selección o *outlier*”, que son un tipo de loci neutrales que estarían siendo influenciados indirectamente por selección (mediante ligación) (Luikart *et al.*, 2003; Storz *et al.*, 2005; Holderegger *et al.*,

2006). Por lo tanto, la variabilidad genética mediante estos marcadores puede ser evaluada desde dos enfoques evolutivos: neutral y adaptativo. Ambos enfoques dan luces de diferentes procesos micro-evolutivos; aquellos que responden a un patrón de evolución neutral como mutación, deriva y flujo génico (Kopp, 2010), y la selección natural, proceso evolutivo direccional no neutral, que responde a la búsqueda de variantes que mejoran la función de individuos dentro de una población (*i.e.* selección adaptativa) (Lande y Arnold, 1983; Kingsolver y Pfenning, 2007). Al evaluar las poblaciones naturales desde estos dos enfoques, es posible visualizar mejor los procesos micro-evolutivos de tipo neutrales que son los que más influyen sobre la especiación anagenética (Stuessy *et al.*, 2006) y que estarían modelando la variabilidad genética de las especies que habitan en el Archipiélago. Además, evaluando estos dos aspectos (neutral y adaptativo), surgen alternativas para la conservación, permitiendo desarrollar estrategias en término de especies y áreas (Moritz, 2002).

1.5 Marcadores moleculares (AFLP y SNP)

Entre las diferentes herramientas moleculares que existen hoy en día para evaluar diversidad, diferenciación y estructura genética, el método de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), como un marcador dominante, se ha utilizado para una amplia gama de especies, incluyendo aquellas que habitan en islas oceánicas, proporcionando índices sobre la diversidad genética y la estructura a nivel poblacional (Tremetsberger *et al.*,

2003). Esta técnica es una poderosa herramienta aplicable a cualquier organismo, sin necesidad de conocimiento previo de la secuencia y se basa en un sistema de marcadores multilocus, reproducibles con amplificación selectiva por PCR (Vos *et al.*, 1995). Las principales ventajas de los AFLP, son los altos niveles de polimorfismo y los altos grados de capacidad discriminativa para las especies estrechamente relacionadas (Serrato y Ramos, 2014).

El polimorfismo de nucleótido único (SNP), son el marcador de elección por muchos genetistas para abordar patrones evolutivos (Seeb *et al.*, 2011). Debido a que se vinculan tanto a regiones genómicas codificantes como no codificantes, lo cual permite caracterizar polimorfismos que puedan tener importancia adaptativa o neutral (Morin *et al.*, 2004). Las ventajas que tiene este marcador molecular respecto a otros es que posee menores tasas de error, mayor automatización en el proceso de toma de muestra (Olsen *et al.*, 2011), son abundantes, poseen baja tasa de mutación (Morin *et al.*, 2004) y permite la caracterizar loci afectados por selección natural y estimar divergencia adaptativa a gran escala (Everett *et al.*, 2011).

1.6 Especie de estudio

Dentro de las especies herbáceas que habrían divergido mediante anagénesis, particularmente en la isla Robinson Crusoe del Archipiélago de Juan Fernández, se encuentra la especie *Dysopsis hirsuta* (Müll. Arg.) Skotts. (Euphorbiaceae),

la cual se distribuye en parches de 1 a 3 m de extensión. Esta especie se encuentra muy asociada a especies arbóreas como son *Nothomyrcia fernandeziana* (Hook. Arn.) Kausel. (creciendo bajo dosel) y de helechos como *Arthropteris altescandens* (Colla) J.Sm., especies endémicas importantes de la vegetación de isla Robinson Crusoe. *D. hirsuta* habría derivado mediante anagénesis de su ancestro continental más próximo *D. glechomoides* (A. Rich.) Müll. Arg. distribuida en Chile y Argentina (Castro, 2018). Este género además incluye una tercera especie *D. paucidentata* (Müll. Arg.) Lozano y Murillo distribuida por el pacífico desde Bolivia hasta Costa Rica (Lozano y Murillo, 2001).

La especie insular *D. hirsuta* es una excelente modelo de planta herbácea para estudiar los efectos de los procesos anagenéticos en la diversidad genética de sus poblaciones. Además, se encuentra con serios problemas de conservación, categorizada en peligro crítico (DS-33 MMA, 2012), debido a que en las últimas décadas ha estado sometida a graves efectos de la deforestación y la invasión de especies exóticas invasoras tales como *Rubus ulmifolius* *Aristotelia chilensis* y *Ugni molinae*, principalmente por ocupación de los espacios para establecimiento de nuevos individuos y además, posibles deslizamientos de tierra (Ricci, 2006), provocando que las poblaciones se redujeran considerablemente.

1.7 Marco de estudio

Numerosos estudios respaldan que la especiación anagenética sería uno de los principales modeladores de la variabilidad genética en la flora vascular del Archipiélago de Juan Fernández (Crawford *et al.*, 1993; Sang *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2004; López-Sepúlveda *et al.*, 2013, 2015; Takayama *et al.*, 2015b) Estudios previos han mostrado niveles relativamente altos de variación genética en las poblaciones de especies insulares anagenéticamente derivadas, (Pfosser *et al.*, 2006; Takayama *et al.*, 2013; López-Sepúlveda, *et al.*, 2016), no obstante, en ninguno de estos trabajos se propone estudiar cuál o cuáles de los procesos micro-evolutivos estarían modelando la variabilidad genética de la flora presente en el Archipiélago Juan Fernández. De esta manera, la formación de una sola especie en anagénesis podría estar dando cuenta de una mayor influencia de procesos neutrales, al contrario de la cladogénesis, donde la mayor influencia estaría dada por la selección mediada por el proceso de radiación adaptativa con la formación de un mayor número de especies (López-Sepúlveda *et al.*, 2016). Por tanto, debido a los antecedentes expuestos, se generan las siguientes interrogantes: ¿Cómo es la diversidad genética entre la especie insular *Dysopsis hirsuta* y la continental *D. glechomoides*? y ¿La especie que deriva anagenéticamente es influenciada en mayor medida por procesos de tipo neutrales?

Para poder responder estas interrogantes es necesario conocer la diversidad genética mediante herramientas moleculares. Su uso en los últimos 20 años ha permitido mejorar la comprensión de la variación genética inter e intrapoblacional,

evidenciando los procesos micro-evolutivos que acompañan a la especiación y cuál de ellos estaría ejerciendo mayor presión sobre las islas oceánicas. Además, estas herramientas moleculares presentan una buena oportunidad para entender como las especies evolucionan y divergen a una escala de tiempo más acotada en comparación al continente (Stuessy *et al.*, 2017). Por otra parte, este tipo de estudios permite entregar información relevante respecto a conservación, debido a que los datos genéticos medidos en valores de diversidad que se obtendrán en este trabajo, permitirían dilucidar si existe o no una pérdida de diversidad genética dentro de las poblaciones insulares, obteniendo un panorama general de las poblaciones. Este trabajo propone obtener las unidades de conservación (UC), las cuales se definen como poblaciones de organismos que poseen alguna característica distintiva que pueda utilizarse para ayudar a dirigir los esfuerzos de la gestión y conservación de especies (Allendorf y Luikart, 2007; Nora *et al.*, 2011; Funk *et al.*, 2012). Por ello, la delimitación e identificación de las UC son una pieza clave en la planificación para estrategias de conservación de la variabilidad genética y ecológica de la biodiversidad (Nora *et al.*, 2011), por tanto las UC nos permiten aplicar estrategias de conservación dentro del archipiélago para la especie *D. hirsuta*, como la restauración a través de la generación de bancos de semilla de las poblaciones identificadas como relevantes debido a sus valores de diversidad genética y estructuración

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En islas oceánicas se ha encontrado que las especies originadas vía procesos anagenéticos presentan una variabilidad genética mayor o igual respecto a sus ancestros continentales, en este trabajo se proponen las siguientes hipótesis:

HIPÓTESIS 1: Siendo *Dysopsis hirsuta* una especie derivada anagenéticamente presentaría una diversidad genética mayor o igual que su ancestro continental *D. glechomoides*.

HIPÓTESIS 2: Dado que *D. hirsuta* es una especie derivada anagenéticamente, los procesos que modelan la diversidad genética dentro y entre sus poblaciones estarían mayormente influenciados por procesos neutrales

OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad genética en las especies *Dysopsis hirsuta* y *D. glechomoides*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar la variabilidad genética neutral y selectiva mediante la identificación de *loci outliers* en ambas especies.
2. Determinar la estructura genética poblacional a nivel de especie, tanto neutral como selectiva.

3. Evaluar la diversidad y divergencia genética entre las especies en estudio.
4. Sugerir criterios de conservación para las poblaciones de *Dysopsis hirsuta* en base a la estructura y diversidad genética que se encuentren más afectadas genéticamente dentro de la isla.



3 METODOLOGÍA

3.1 Especies

El género *Dysopsis* Müll. Arg. se encuentra conformado por tres especies: *D. hirsuta* (Müll. Arg.) Skotts., *D. glechomoides* (A. Rich.) Müll. Arg. y *D. paucidentata* (Müll. Arg.) Lozano y Murillo, la primera de ellas posee una distribución insular, mientras que las últimas dos se encuentran en el continente. El género es considerado un elemento de origen Austral-Antártico, el cual ha migrado a lo largo de los Andes hacia el norte del continente. Esto pudo haber ocurrido desde el Mioceno cuando la temperatura mundial descendió y al mismo tiempo aumentaron los procesos de orogénesis de los Andes, de modo que la vegetación se desplazó hacia sitios más calientes en el Ecuador (Van der Hammen y Cleef, 1983). Son hierbas monoicas, postradas, perennes, de un tamaño máximo de 8 cm de alto, que crecen formando parches densos que llegan hasta los 10 m², cubriendo el suelo de zonas húmedas y sombrías. La lámina foliar está cubierta por pelos unicelulares de 0,8-1 mm de longitud, con forma ovada 2-3 x 1,3-2,3 cm, obtusa a cuneada en la base; margen con 14-15 crenaciones y venación compuesta de 4-5 pares de venas secundarias (Lozano y Murillo, 2001). Las flores son pequeñas, pediceladas y de muy difícil observación, de coloración blanquecino-verdoso, generalmente solitarias, unisexuales, con cáliz gamosépalo, apétalas y ovario con un óvulo por lóculo. Su

fruto es una cápsula que presenta una dispersión de tipo balística (balacoria) y el polen posee una dispersión por anemofilia (Bernardello *et al.*, 2006), además presenta reproducción vegetativa a través de enraizamiento de los nudos (Ricci 2003). Los caracteres vegetativos que ayudan a diferenciar las especies son el número de crenaciones del margen foliar y el número de pares de venas secundarias, en tanto que la característica reproductiva más relevante corresponde al número de estambres (Lozano y Murillo, 2001).

La especie insular *D. hirsuta* (Müll. Arg.) Skotts. se encuentra distribuida solo en la isla Robinson Crusoe del Archipiélago de Juan Fernández, encontrándose desde las quebradas del sector Puerto Francés a la Quebrada Villagra (Ricci, 1990). Generalmente asociada a los sectores más altos de la isla, entre los 350 y 600 m s.n.m., en suelos de bosques húmedos, con hojarasca, lugares oscuros, o en esquinas muy sombrías donde crecen otras especies, formando carpetas en el suelo (Skottsberg, 1922, 1952). Citológicamente, esta especie posee un número cromosómico haploide $n = 13$ (Sanders *et al.*, 1983). Sus hojas son ovaladas de borde sinuoso, con catorce a quince crenaciones y cuatro pares de venas secundarias (Skottsberg, 1952) y presenta seis estambres (Lozano y Murillo, 2001).

La especie continental *D. glechomoides* se distribuye en Chile en las regiones de Coquimbo, Valparaíso, B. O'Higgins, Biobío, Los Ríos, Los Lagos y Magallanes (Figura 1) y en Argentina en las regiones de Chubut, Neuquen, Río Negro, Santa

Cruz y Tierra del Fuego (Govaerts *et al.*, 2000). Posee tres estambres, con un número de crenaciones que pueden variar de nueve a trece y tres pares de venas secundarias. La otra especie continental *D. paucidentata*, se distribuye desde Bolivia a Costa Rica y se diferencia de las otras dos especies por la presencia de 1-2 estambres (Lozano y Murillo, 2013).

Los resultados basados en análisis filogenéticos de tres regiones de ADN cloroplastidial (psbA-trnH, rpl16 e YCF1) y una nuclear (ITS-2) para las especies del género *Dysopsis* (Castro, 2018), indican que la especie insular *D. hirsuta* se encuentra más emparentada filogenéticamente a la especie continental *D. glechomoides*, siendo esta su ancestro.

3.2 Área de estudio y poblaciones empleadas

El área de estudio comprende la isla Robinson Crusoe (Archipiélago de Juan Fernández) y las regiones continentales de Chile. En el territorio insular se recolectaron un total de 321 individuos para nueve poblaciones, para la especie continental *D. glechomoides* se recolectaron un total de 215 individuos para nueve poblaciones (Tabla1).

Junto con el registro de la localidad de muestreo mediante GPS, también fueron referenciados todos los individuos recolectados. Para la especie insular, las muestras fueron procesadas y extraído el ADN total durante el terreno realizado en el mes de febrero del año 2017 en Isla Robinson Crusoe.

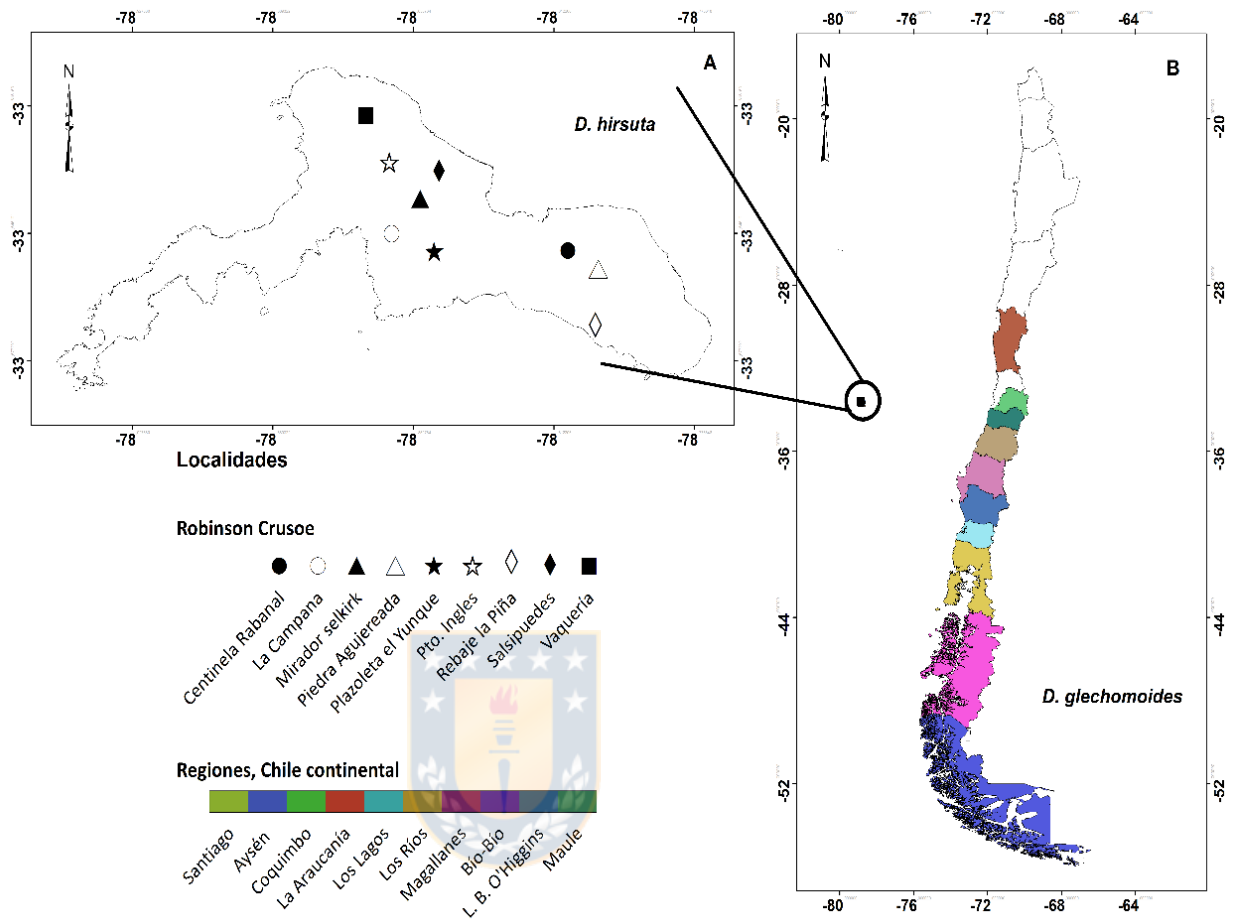


Figura 1. A. Mapa de distribución de las poblaciones muestreadas de *D. hirsuta* en isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández. B. Distribución de la especie continental *D. glechomoides*.

Tabla 1: Poblaciones de las especies *Dysopsis hirsuta* y *D. glechomoides* empleadas en marcadores SNP y AFLP con su respectiva ubicación geográfica.

Especies	Cod. Pop	Poblaciones	AFLP	SNP	Indv. Extraídos	Coordenada geográfica
<i>D. hirsuta</i>	5014	Mirador de Selkirk	✓	✓	25	-33,637S -78,852O
	5019	Plazoleta El Yunque	✓	✓	25	-33,652S -78,844O
	5022	Centinela-Rabanal	✓	✓	26	-33,650S -78,808O
	5026	Salsipuedes	✓	✓	24	-33,630S -78,844O
	5033	Rebaje La Piña	✓	✓	25	-33,668S -78,801O
	5041	Vaquería	✓	✓	26	-33,618S -78,864O
	5044	Puerto Inglés	✓	✓	7	-33,628S -78,858O
	5046	Piedra Agujereada	✓	✓	25	-33,655S -78,800O
	5050	La Campana	✓	✓	25	-33,646S -78,857O
<i>D. glechomoides</i>	5058	Parque Katalapi	✓	✓	16	-41,521S -72,752O
	5145	Reserva Nacional Isla Mocha	✓	✓	24	-38,396S -73,901O
	7	Punta Arenas	✓	X	20	-53,155S -70,955O
	CH	Chiloé	✓	✓	24	-43,254S -74,065O
	ET	P.N. Magallanes	✓	X	25	-53,143S -70,974O
	FJ	Parque Nacional Fray Jorge	✓	✓	19	-30,659S -71,680O
	PU	Pucatrihue	✓	✓	25	-40,544S -73,705O
	18	Cordillera de Nahuelbuta	✓	X	17	-37,812S -73,089O
	5600	Coyhaique	✓	X	26	-45,565S -71,909O

3.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN total de las muestras foliares se realizó en 20-30 individuos por localidad mediante el kit DNeasyPlant Mini Kit (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad del ADN se visualizó en geles de agarosa al 1% teñido con RedGel, a 70 volts durante 30 min., la visualización se

realizó a través de un transiluminador UV, corroborando la extracción de ADN total para proseguir a la amplificación de ADN mediante AFLP. Para garantizar la genotificación mediante SNP's, se cuantificó la cantidad de ADN y su calidad utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

3.4 AFLPs

Se utilizó la metodología propuesta por Vos *et al.*, (1995) y modificada por Hasbún *et al.* (2012), utilizando seis combinaciones de partidores: Eco ACA/Msel CAC, Eco ATC/Msel ACC, Eco ATA/Msel ACC, Eco ACG/MCAC, Eco ATC/MACT y Eco ATA/MCCT. Esta metodología consta de tres etapas:

Digestión/Ligación. Corte y digestión del ADN genómico con enzimas de restricción y unión de adaptadores a los fragmentos digeridos. Se generó un volumen total por muestras de 11 ul conteniendo: 0,25 µL de EcoRI, 0,1 µL de Msel, 0,05µL de BSA, 0,1µL de buffer T4 y 0,025 T4 ligasa, agua estéril ultra pura y 5,5µL de ADN. El volumen final fue incorporado en placas de 96 tubos para ser procesadas en el termociclador con su correspondiente programa. El producto es observado en un gel de agarosa al 1% a 70 volts durante 40 minutos.

Preselectiva. Consiste en una primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se lleva a cabo con iniciadores que corresponden a la secuencia específica del adaptador que se unió a los extremos digeridos más un nucleótido extra (A, G, C, o T) en el extremo 3'. Este proceso permite discriminar entre todos

los fragmentos de restricción que se forman, y amplificar solo aquellos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para la base adicional. Este etapa se utiliza el producto de la digestión-ligación diluido en proporción 1:5, tomando 5 μ L de la dilución, 2.5 μ L de buffer 10X de PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8.0) y 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂ 0.10 mM dNTPs, 0.2 pmol de cebadores específicos de preselección EcoRI y MseI con un nucleótido selectivo, 0.5 U de enzima TaqPolimerasa (Invitrogen®) y 0.8 μ g/mL en un volumen final de 25 μ L. El programa de PCR empleado consta de 5 minutos de desnaturalización a 72°C, 28 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C durante 1 minuto, 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. El producto de esta reacción fue corroborado en gel de agarosa al 1.5%.

Selectiva. Esta etapa consiste en una segunda PCR la cual tiene como fin una reducción del número de fragmentos amplificados en primera instancia, utilizando cebadores específicos que contienen dos o tres bases adicionales a las que componen los cebadores preselectivos, dependiendo de la complejidad del genoma, por lo que sólo se amplifica una porción del genoma fragmentado. En esta etapa se utilizan 2.5 μ L de la preselectiva diluída (1:10), 1 μ L de buffer 10X de PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8.0) y 500 mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 0.10mM dNTPs, 1.5 μ M y 1 μ M de cebadores específicos EcoRI/MseI (nombrados con anterioridad) con nucleótidos selectivos y 0.5 U de Taqplatinum (Invitrogen®). El programa para esta reacción es: 5 minutos de desnaturalización a 94°C, 30 ciclos a 94°C por 20 seg., 66°C por 60 seg., 72°C por 2 min., 60°C por 30 min. Los

productos de PCR selectiva obtenidos fueron enviados a Macrogen Korea para su secuenciación mediante electroforesis. Posteriormente los fragmentos de ADN obtenidos de la secuenciación fueron procesados en el software GeneMarker ver. 1,85 (SoftGenetics LLC, PA, EE.UU.), en el cual cada uno de los fragmentos es considerado como un carácter y la presencia o ausencia de ellos son los estados de carácter (0,1), expresados en una matriz final.

3.5 Tipificación de SNP's

Se genotipificaron (SNP) 113 individuos en 14 poblaciones (detallados en Tabla 1) para las dos especies propuestas. Se utilizó el servicio provisto por el Museo de Historia Natural y Ambiental de Shizuoka (Japón) para la construcción de las bibliotecas de ADN genómico. La obtención de los SNP se realizó mediante la técnica MigSequence (MIG-seq), propuesta por Suyama y Matsuki (2015), que permite obtener más de mil SNP's para cada individuo a partir de las muestras recolectadas. Esta metodología se basa en reacciones de PCR para construir librerías reducidas pero representativas, sin utilizar el paso de digestión utilizando enzimas de restricción como se usa en la técnica de ISSR (Davey y Blaxter, 2010). La técnica del MIG-seq representa una forma nueva, rápida y efectiva de identificar SNP, su ventaja frente a las otras técnicas de NGS que utilizan enzimas de restricción, es que requieren de ADN genómico de alta calidad, que son necesarios para las etapas de digestión como una condición imperante para la obtención de resultados.

Para obtener la librería se amplifican múltiples regiones ISSR a partir de ADN genómico mediante PCR multiplexada con primers ISSR tailed (1ª PCR). Los productos de la 1ª PCR se utilizan posteriormente como plantillas para la 2ª PCR (PCR tailed). Este paso permite la adición de secuencias complementarias para los sitios de unión de la celda de flujo Illumina e índices (barcodes) para cada muestra incorporada en la 1ª PCR, utilizando cebadores comunes directos e inversos indexados. Después de determinar la concentración aproximada de cada producto de PCR obtenido, se combinan en concentraciones equimolares como una librería de mezcla única. Luego, la mezcla se purifica, aislando los fragmentos que poseen un rango de tamaño de 300 a 800 pb, la concentración final se mide mediante PCR cuantitativa y luego se utiliza para la secuenciación de Illumina y la del barcode obteniendo la secuenciación final de la librería. Una vez obtenido los fragmentos, fueron alineados en el software programa Stack 2.5 (<http://catchenlab.life.illinois.edu/stacks/>).

3.6 Detección de loci *outlier* en AFLP y SNP

Se identificaron los potenciales loci bajo selección, utilizando el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005), tanto para matrices binarias dominantes y codominantes. Este programa, tiene como objetivo identificar los posibles loci candidatos a selección a partir de datos genéticos, utilizando las diferencias en las frecuencias de los alelos entre las poblaciones. La diferencia en la frecuencia de alelos entre este conjunto de genes común y cada subpoblación se mide

mediante un coeficiente de FST específico para la subpoblación. Se consideraron candidatos a potenciales loci bajo selección o también llamados *outlier*, a aquellos loci con valores FST $p < 0.05$, dentro de la dispersión de los datos neutrales. Esto se realizó tanto para los marcadores dominantes como codominantes.

3.7 Obtención de matrices Neutrales y *outlier*

Para obtener ambas matrices en ambos marcadores se realizaron análisis por separado de ambas especies, es así como en AFLP en el programa GeneMarker se obtuvieron dos matrices tanto para *D. hirsuta* como para *D. glechomoides*. De la misma manera en SNP se realizaron análisis en el programa Stack 2.5 por separado de las especies considerando un criterio más estricto ($r=0,75$ y $p=2$) para obtener SNP significativos en cada una de las especies obteniendo como resultado dos matrices. En cada una de ellas los loci *outlier* fueron extraídos de las matrices completas obtenidas, generando de esta manera una matriz neutral (sin valores *outlier*) y una matriz de datos *outlier* con los potenciales loci bajo selección. Ambas matrices son analizadas para obtener los parámetros de diversidad y divergencia genética.

3.8 Diversidad genética

La diversidad genética se estimó utilizando el programa GenAIEx 6.51b2 (Peakall y Smouse, 2006), mediante los valores calculados correspondientes al número

total de fragmentos, índice de diversidad de Shannon, porcentaje de bandas polimórficas, heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada y riqueza alélica. La variabilidad genética promedio sobre los loci, además del índice de rareza se calculó con Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005). Para evaluar si existe correlación entre los valores en los distintos parámetros de diversidad genética, se realizaron pruebas estadísticas de Pearson y Man-Whitney en el programa R (R Development Core Team, 2010).

3.9 Divergencia genética

Para determinar la estructura genética espacial se utilizó una aproximación basada en individuos mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en distancias genéticas individuales, que permite de una manera exploratoria evaluar la presencia de más de un pool génico (poblaciones) usando programa GenAlEx 6.5.1b2. En segundo lugar, se usaron las distancias genéticas individuales para un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), para cuantificar los componentes jerárquicos de la varianza genética (PhiPT y PhiPR) dentro y entre las poblaciones, utilizando el programa GenAlEx 6.5.1b2. En tercer lugar, se utilizó la asignación individual, con el fin de determinar el número de poblaciones o pool génicos (K), implementando inferencias Bayesianas con el uso del software STRUCTURE v.2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000) utilizando el criterio de Evanno *et al.* (2005). Por último, utilizando los valores de PhiPT y FST se realizó un análisis de aislamiento por distancia, con la prueba de

Mantel, estimando la correlación entre matrices de distancia genética y distancia geográfica en GenAlEx 6.5.1b2.

3.10 Tamaño efectivo poblacional (N_e)

Se estimó el tamaño efectivo contemporáneo (N_e) para medir la tasa de pérdida de heterocigotos que se encuentra vinculado a la tasa de migración, infiriendo la deriva génica a través de los valores de F_{ST} (Wright, 1965). Para determinar N_e , se cuantificó el desequilibrio de ligamiento (LD) entre alelos de loci no ligados, que surge únicamente de deriva génica en una población aislada con apareamiento al azar (Hill, 1981). Se usó el programa LDNe (Waples, 2006), el cual asume poblaciones cerradas, apareamiento al azar y requiere solo una muestra a diferencia del método temporal (Waples y Do, 2008).

3.11 Determinación de Unidades de Conservación (UC) en Isla Robinson Crusoe.

Las unidades de conservación son definidas como grupos de organismos que, aislados por tiempo suficiente de otros grupos, tienen particularidades genéticas por las que pueden ser reconocidos (Nora *et al.*, 2011). Los valores de diversidad genética obtenidos en esta tesis (H_e , H_o , I , N_a , N_e , NBL , NBP), en especial el índice de endogamia F_{is} obtenidos en Genepop (4.7.3) (Raymond y Rousset,

1995; Rousset, 2008) y el tamaño poblacional efectivo (N_e) obtenidos en LDNe (Waples, 2006) para cada población, fueron utilizados para determinar unidades de conservación dentro de la isla Robinson Crusoe.



4 RESULTADOS

4.1 AFLPs

Para la selección de partidores, se realizó un ensayo con 45 combinaciones de partidores y cinco individuos de cada una de las nueve poblaciones de *D. hirsuta*, seleccionándose seis combinaciones de partidores. El número de *loci* resultantes por las seis combinaciones de partidores AFLP seleccionados fueron 407 loci totales con 274 neutrales: Combinaciones VIC Msel-CAC/EcoRI-ACA y Msel-CAC/EcoRI-ACG un total de 45 loci; combinaciones NED Msel-ACC/EcoRI-ATC y Msel-ACT/EcoRI-ATC un total de 92 loci; combinaciones FAM Msel-ACC /EcoRI-ATA y Msel- CCT /EcoRI-ATA un total de 137 loci. El total de potenciales loci bajo selección fue de 133: combinaciones VIC Msel-CAC/EcoRI-ACA y Msel-CAC/EcoRI-ACG un total 42; combinaciones NED Msel-ACC/EcoRI-ATC y Msel-ACT/EcoRI-ATC un total de 32; combinaciones FAM Msel-ACC /EcoRI-ATA y Msel- CCT /EcoRI-ATA un total de 59 (Tabla 2).

Tabla 2: Detalles del número de loci obtenidos para los marcadores AFLP, en las distintas matrices utilizadas: matriz completa que incluye las dos especies y matrices neutrales y *outliers* para cada una de las especies.

	Especies	<i>D. hirsuta/D. glechomoides</i>	<i>D. hirsuta</i>		<i>D. glechomoides</i>	
	Matrices	Completa	Neutral	<i>outlier</i>	Neutral	<i>outlier</i>
Partidores	Eco ACA/MCAC	63				
	Eco ACG/MCAC	62	45	42	104	18
	Eco ATC/MACC	71				
	Eco ATC/MACT	95	92	32	101	21
	Eco ATA/MACC	81				
	Eco ATA/MCCT	67	137	59	95	68
	Total	439	274	133	315	107



4.2 SNP

Un total de 326 individuos perteneciente a 9 poblaciones de *D. hirsuta* y 5 poblaciones de *D. glechomoides*, fueron analizados en el programa Stack ver 2.5 con los criterios relajado y estricto. Los resultados de los análisis con ambos criterios no presentaron diferencias para ninguna de las matrices analizadas en relación con los valores de diversidad y estructura genética, por lo que se decidió realizar los análisis para la obtención de parámetros genéticos bajo el criterio estricto, detectando un total de: a) 2243 loci para la matriz completa, es decir aquella que incluyo la totalidad de individuos de ambas especies, b) 855 loci para

la especie insular y c) 1079 loci en la especie continental. Del total de loci encontrados para la especie insular, se trabajó con 534 loci neutrales y 321 potenciales loci bajo, en tanto para la especie continental se obtuvieron 938 loci neutrales y 141 potenciales *loci* bajo selección (Tabla 3).

Tabla 3: Detalles del número de loci obtenidos para los marcadores SNP, en matrices utilizadas para cada una de las especies de *Dysopsis* analizadas.

Matriz	<i>D. hirsuta</i>	<i>D. glechomoides</i>
Neutral	534	938
<i>outlier</i>	321	141
Total	855	1079

4.3. Diversidad genética

4.3.1 Estadísticos de diversidad genética AFLP Neutral y *outlier*

Los valores de riqueza alélica, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para las matrices neutral y *outlier* en el análisis combinado de ambas especies insular y continental se presentan en la Tabla 4. Los valores encontrados en la matriz neutral permiten dar cuenta que la localidad Salsipuedes presenta valores de diversidad genética ($N_a = 1,847$,

Ne= 1,388 y He= 0,247) mayor con respecto de las poblaciones insulares y continentales, donde los valores más altos de diversidad genética (Na= 1,580, Ne=1,373 y He= 0,225) en el continente, son los presentados por la población de Coyhaique. En general los valores promedios, Na=1,366, Ne=1,324 y He=0,192, en la especie continental son levemente mayores o iguales que la especie insular Na= 1,280, Ne=1,273 y He= 0,1067 con una significancia de $p>0.001$.

En la matriz de potenciales *loci* bajo selección (*outlier*) se observa la misma tendencia que los valores presentados en la matriz neutral. Sin embargo, en la matriz *outlier* los mayores valores de diversidad obtenidos en el continente están representados por la localidad de Pucatrihue (Na=1,720, Ne=1,366 y He=0,227) (Tabla 4). Los resultados muestran que los valores promedio de diversidad genética son significativamente diferentes ($p>0.0001$) entre las especies *D. hirsuta* y *D. glechomoides*, siendo levemente mayores en la especie continental.

4.3.2 Estadísticos de diversidad genética SNP Neutral y *outlier*

Los valores de diversidad presentados en las matrices neutrales de ambas especies (Tabla 5) dan cuenta que *D. hirsuta* presenta mayores valores de diversidad genética (Na=1,014; Ne=0,857 y He=0,089) en comparación a la especie continental (Na=0,949; Ne=0,822 y He=0,075) con $p>0.001$. Distinto al patrón encontrado en los valores de diversidad para la matriz *outlier*, donde los valores de diversidad para la especie insular (Na=1,141 Ne=0,988 He=0,112),

son menores que para la especie continental ($N_a=1,285$ $N_e=1,153$ $H_e= 0,193$). Los mayores valores de diversidad en la especie insular para las matrices neutral y *outlier* corresponderían a la localidad de Mirador de Selkirk ($H_e=0,142$; $H_e=0,146$). Por otra parte, en la especie continental los mayores valores estarían representados, para las poblaciones de Katalapi en la matriz neutral ($H_e=0,125$) y para Fray Jorge en la matriz *outlier* ($H_e=0,224$).

4.4. Divergencia Genética

4.4.1 Estimación de la estructura genética Neutral para *D. hirsuta* y *D. glechomoides* utilizando marcadores AFLP y SNP



Con la matriz completa de datos preliminares (detallada en Tabla 2), para AFLP se realizó un análisis de redes basados en la estimación del vecino más cercano el cual separó las poblaciones en cuatro grupos, dos de ellos correspondientes a la especie continental y otros dos conformados por poblaciones de Robinson Crusoe (Figura 2 A). Para observar las relaciones genéticas entre la especie continental e insular, los resultados del análisis de agrupamiento Bayesiano realizado para determinar el número de grupos genéticos, mostro cuatro grupos o *pool* genéticos ($k=4$) (Figura 3) a los cuales se les nombro Clados (Figura 4): (1) Clado A, constituido por las poblaciones Plazoleta el Yunque, Mirador Selkirk, Salsipuedes, Centinela Rabanal y Puerto Inglés, que además incluye la zona

continental de Coyhaique. (2) Clado B constituido por Vaquería, Piedra Agujereada, La Campana y Rebaje la Piña y se relaciona con los sectores continentales pertenecientes al Clado D. (3) Clado C, constituido por los sectores continentales de Punta Arenas y Magallanes, los cuales se separan claramente del resto de las poblaciones continentales y aparece en pequeña proporción en las poblaciones isleñas de Puerto Inglés, Salsipuedes, Centinela Rabanal (Clado A), Piedra Agujereada y La Campana (Clado B). (4) Clado D, conformado por Isla Mocha, Fray Jorge, Nahuelbuta, Pucatrihue, Chiloe y Katalapi. Estos resultados permiten dar cuenta que existen relaciones entre isla y continente, donde algunas poblaciones insulares solo tienen relación con poblaciones particulares en el continente (Figura 4).



De la misma manera que se trabajaron los datos de AFLP se realizaron análisis con la matriz completa de SNP, los resultados del análisis de redes basado en la estimación del vecino más cercano arrojaron la existencia de dos grandes grupos que separan a cada una de las especies y agrupamiento bayesiano que da cuenta de un $K=2$ (Figura 2B, Figura 5), es así como se puede apreciar una gran separación de las poblaciones insulares y continentales, sin agrupamientos particulares en ambas especies. Las proyecciones de los porcentajes de asignación para ambas especies con marcadores SNP muestran en las poblaciones continentales un solo grupo genético marcado, siendo la población continental de Katalapi aquella que posee una parte del genotipo de la isla (Figura 6).

Tabla 4. Estimación de la diversidad genética basadas en análisis de las matrices neutrales y *outlier* del marcador AFLP para 9 poblaciones de *Dysopsis hirsuta* y 9 poblaciones de *D. glechomoides*; N: total de muestras analizadas; Na: número de alelos diferentes; Ne: número de alelos efectivos; He: Heterocigosidad esperada; uHe Heterocigosidad observada; %P: Porcentaje de *loci* polimorficos y ES: Error estándar

AFLP					Completa					Neutral					<i>outlier</i>				
Spp	Localidad	COD	Pop	N	Na	Ne	He	uHe	%P	Na	Ne	He	uHe	%P	Na	Ne	He	uHe	%P
<i>D. hirsuta</i>	Mirador Selkirk	5014	Pop1	25	1,261	1,244	0,151	0,154	55,73%	1,157	1,214	0,132	0,135	49,64%	1,278	1,227	0,146	0,149	57,89%
	Plazoleta de Yunque	5019	Pop2	25	1,271	1,268	0,164	0,167	55,73%	1,139	1,234	0,141	0,144	47,45%	1,406	1,274	0,174	0,178	65,41%
	Centinella Rabanal	5022	Pop3	25	1,475	1,336	0,208	0,212	72,29%	1,369	1,315	0,194	0,198	66,42%	1,594	1,296	0,19	0,194	78,20%
	Salsipuedes	5026	Pop4	24	1,860	1,364	0,237	0,242	92,99%	1,847	1,388	0,247	0,253	92,34%	1,789	1,339	0,22	0,225	89,47%
	Rebaje la Piña	5033	Pop5	24	1,182	1,212	0,134	0,137	53,50%	1,084	1,198	0,123	0,126	47,45%	1,459	1,219	0,146	0,149	66,17%
	Vaquería	5041	Pop6	18	1,166	1,232	0,143	0,147	51,59%	1,069	1,21	0,128	0,131	45,26%	1,406	1,278	0,175	0,18	63,91%
	Puerto Inglés	5044	Pop7	7	1,236	1,354	0,206	0,222	58,60%	1,164	1,346	0,200	0,215	54,74%	1,263	1,308	0,186	0,200	60,90%
	Piedra Agujereada	5046	Pop8	25	1,334	1,282	0,173	0,177	64,65%	1,259	1,29	0,174	0,178	60,58%	1,579	1,288	0,186	0,19	76,69%
	La campana	5050	Pop9	24	1,494	1,269	0,168	0,172	71,66%	1,431	1,257	0,160	0,163	67,52%	1,602	1,323	0,199	0,203	78,20%
Promedio										1,280	1,273	0,167	0,171	59,04%	1,486	1,283	0,180	0,185	70,76%
ES										0,018	0,007	0,004	0,004	5,00%	0,024	0,009	0,005	0,005	3,45%
<i>D. glechomoides</i>	Nahuelbuta	18	Pop10	16	1,554	1,410	0,242	0,250	75,80%	1,480	1,388	0,229	0,236	72,33%	1,523	1,362	0,215	0,222	71,96%
	Coyhaique	5600	Pop11	20	1,637	1,378	0,229	0,235	79,30%	1,580	1,373	0,225	0,231	76,67%	1,570	1,295	0,184	0,188	74,77%
	Isla Mocha	5145	Pop12	22	1,468	1,311	0,189	0,194	72,61%	1,467	1,314	0,190	0,195	72,67%	1,374	1,277	0,173	0,177	66,36%
	Punta Arenas	7	Pop13	20	1,169	1,294	0,172	0,176	57,64%	1,070	1,266	0,156	0,160	52,67%	1,402	1,374	0,217	0,222	69,16%
	Chiloé	CH	Pop14	23	1,548	1,349	0,208	0,213	75,16%	1,487	1,334	0,198	0,202	72,33%	1,664	1,342	0,212	0,216	79,44%
	P.N. Magallanes	ET	Pop15	25	1,277	1,286	0,172	0,175	63,06%	1,237	1,272	0,163	0,167	61,33%	1,355	1,294	0,178	0,182	66,36%
	Fray Jorge	FJ	Pop16	19	1,277	1,303	0,177	0,182	60,51%	1,217	1,298	0,172	0,177	58,00%	1,243	1,262	0,159	0,163	57,01%
	Pucatrihue	PU	Pop17	24	1,573	1,359	0,216	0,221	76,75%	1,513	1,345	0,205	0,210	74,00%	1,720	1,363	0,227	0,232	84,11%
	Katalapi	5058	Pop18	16	1,277	1,322	0,187	0,193	63,06%	1,243	1,325	0,188	0,194	61,67%	1,168	1,285	0,166	0,171	55,14%
Promedio					1,392	1,310	0,188	0,193	66,70%	1,366	1,324	0,192	0,197	66,85%	1,447	1,317	0,192	0,197	69,37%
ES					0,012	0,005	0,002	0,003	2,59%	0,018	0,007	0,004	0,004	2,83%	0,028	0,011	0,006	0,006	3,18%

Tabla 5. Estimación de la diversidad genética basadas en análisis de las matrices neutrales y *outlier* del marcador SNP para 9 poblaciones de *Dysopsis hirsuta* y 5 poblaciones de *D. glechomoides*; N: total de muestras analizadas; Na: número de alelos diferentes; Ne: número de

alelos efectivos; Ho: Heterocigocidad observada; He: Heterocigocidad esperada; uHe: Heterocigocidad esperada imparcial; Fis: Índice de fijación; %P: Porcentaje de Loci polimórficos; ES: Error estándar

SNP					Neutral							outlier						
Spp	Localidad	COD	Pop	N	Na	Ne	Ho	He	uHe	Fis	%P	Na	Ne	Ho	He	uHe	Fis	%P
<i>D. hirsuta</i>	M. de Selkirk	5014	Pop1	16	1,423	1,138	0,114	0,142	0,147	0,220	51,87%	1,414	1,177	0,177	0,146	0,151	-0,064	48,91%
	P. el Yunque	5019	Pop2	16	1,361	1,080	0,112	0,135	0,140	0,216	50,56%	1,405	1,156	0,186	0,145	0,149	-0,091	49,84%
	C. Rabanal	5022	Pop3	16	1,169	1,001	0,095	0,101	0,105	0,101	33,90%	1,249	1,087	0,169	0,112	0,116	-0,274	36,45%
	Salsipuedes	5026	Pop4	16	1,178	0,960	0,094	0,096	0,099	0,093	37,27%	1,327	1,083	0,183	0,127	0,131	-0,160	46,42%
	R. la Piña	5033	Pop5	7	0,736	0,645	0,044	0,054	0,059	0,156	17,79%	0,922	0,828	0,131	0,094	0,102	-0,274	26,17%
	Vaquería	5041	Pop6	9	0,972	0,858	0,068	0,077	0,082	0,155	24,16%	1,072	0,952	0,156	0,108	0,116	-0,284	31,15%
	Puerto Inglés	5044	Pop7	5	0,629	0,598	0,052	0,043	0,049	-0,156	10,86%	0,863	0,835	0,128	0,076	0,087	-0,611	17,13%
	P. Agujereada	5046	Pop8	14	0,938	0,808	0,086	0,096	0,100	0,135	29,40%	1,090	0,930	0,154	0,107	0,111	-0,238	34,89%
	La Campana	5050	Pop9	14	0,721	0,625	0,061	0,060	0,062	0,035	19,66%	0,928	0,841	0,142	0,096	0,100	-0,335	26,17%
	Promedio					1,014	0,857	0,081	0,089	0,094	0,140	30,61%	1,141	0,988	0,158	0,112	0,118	-0,216
ES					0,011	0,009	0,003	0,002	0,002	0,009	4,75%	0,014	0,011	0,006	0,003	0,004	0,012	3,79%
<i>D. glechomoides</i>	Fray Jorge	FJ	Pop10	8	1,083	0,912	0,076	0,056	0,060	-0,206	25,27%	1,567	1,389	0,398	0,224	0,245	-0,642	54,61%
	Katalapi	5058	Pop11	6	1,086	0,926	0,141	0,125	0,143	-0,107	36,78%	1,163	1,030	0,296	0,185	0,206	-0,511	44,68%
	Isla Mocha	5145	Pop12	8	1,098	0,949	0,133	0,113	0,122	-0,138	34,01%	1,163	1,041	0,289	0,180	0,195	-0,503	43,26%
	Chiloé	CH	Pop13	6	0,799	0,713	0,065	0,046	0,052	-0,294	15,78%	1,397	1,278	0,378	0,213	0,236	-0,697	46,81%
	Putrapihue	P	Pop14	5	0,678	0,611	0,048	0,036	0,041	-0,241	12,15%	1,135	1,027	0,296	0,165	0,187	-0,687	39,01%
	Promedio					0,949	0,822	0,093	0,075	0,084	-0,173	24,80%	1,285	1,153	0,331	0,193	0,214	-0,609
ES					0,011	0,009	0,003	0,002	0,002	0,006	4,85%	0,033	0,029	0,016	0,009	0,010	0,016	2,57%

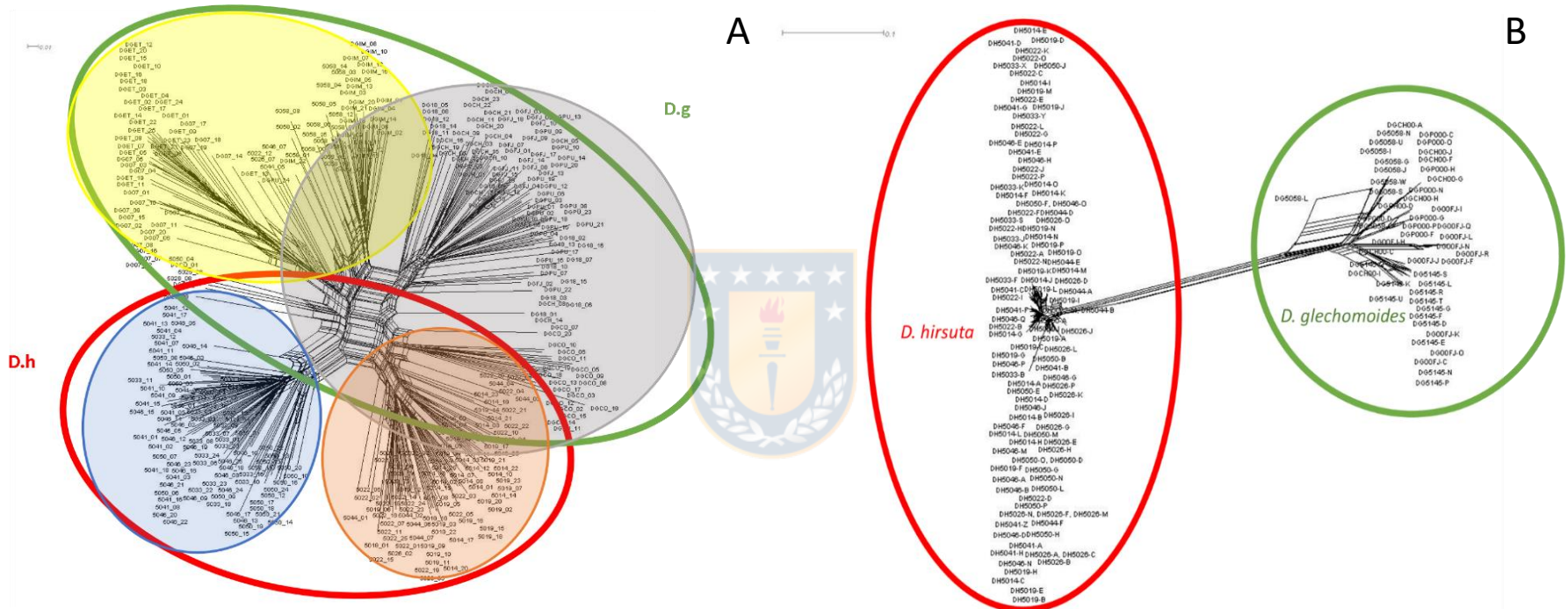


Figura 2. Estimación de las relaciones genéticas por poblaciones de *D. hirsuta* (D.h) y *D. glechomoides* (D.g) en base a análisis de agrupamiento de redes de vecino más cercano con marcador AFLP (A) y SNP (B).

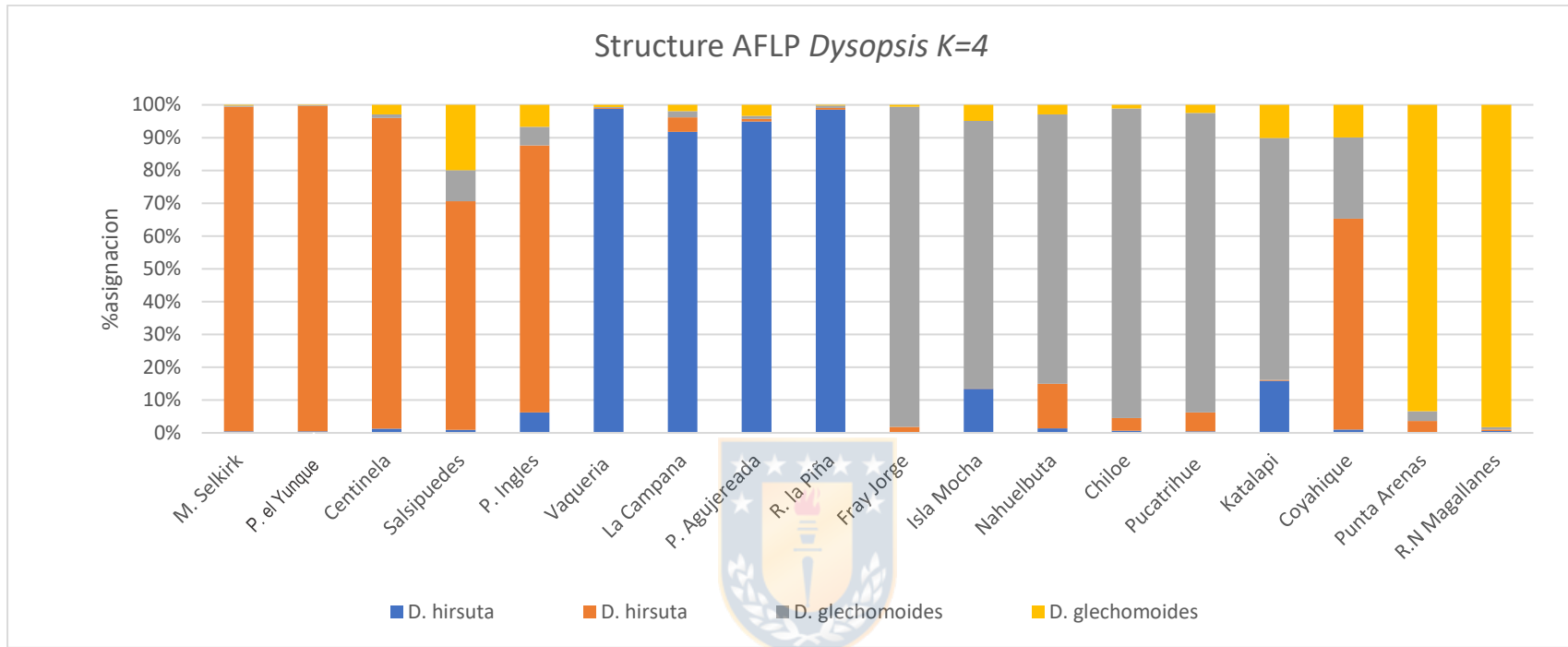


Figura 3. Gráfico de barras de los porcentajes de asignación de los individuos para la matriz completa (Neutral) para *D. hirsuta* y *D. glechomoides*

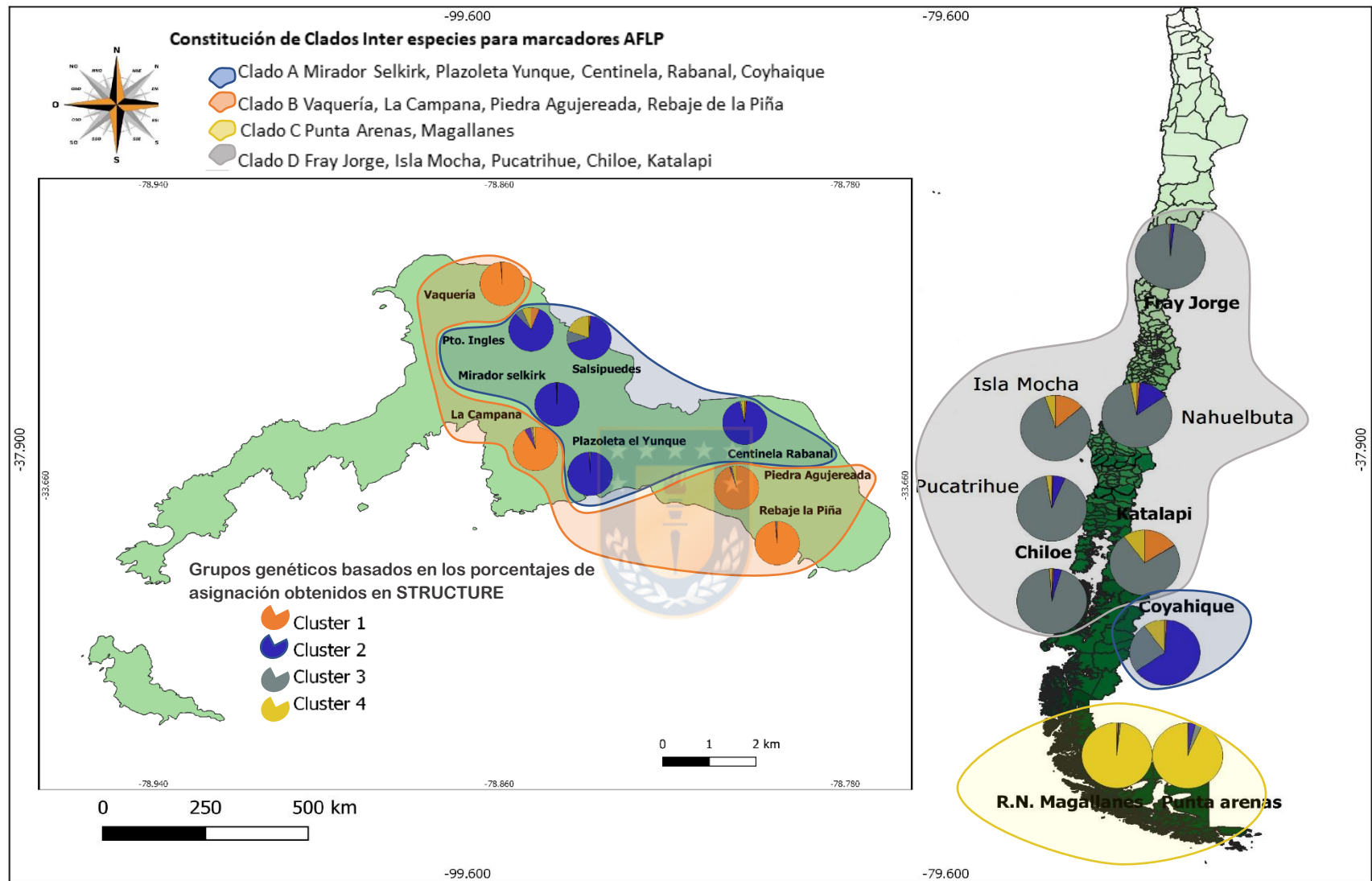


Figura 4. Porcentajes de asignación obtenidos en el análisis de estructura genética y constitución de clados inter especies para marcadores AFLP en *D. hirsuta* y *D. glechomoides*.

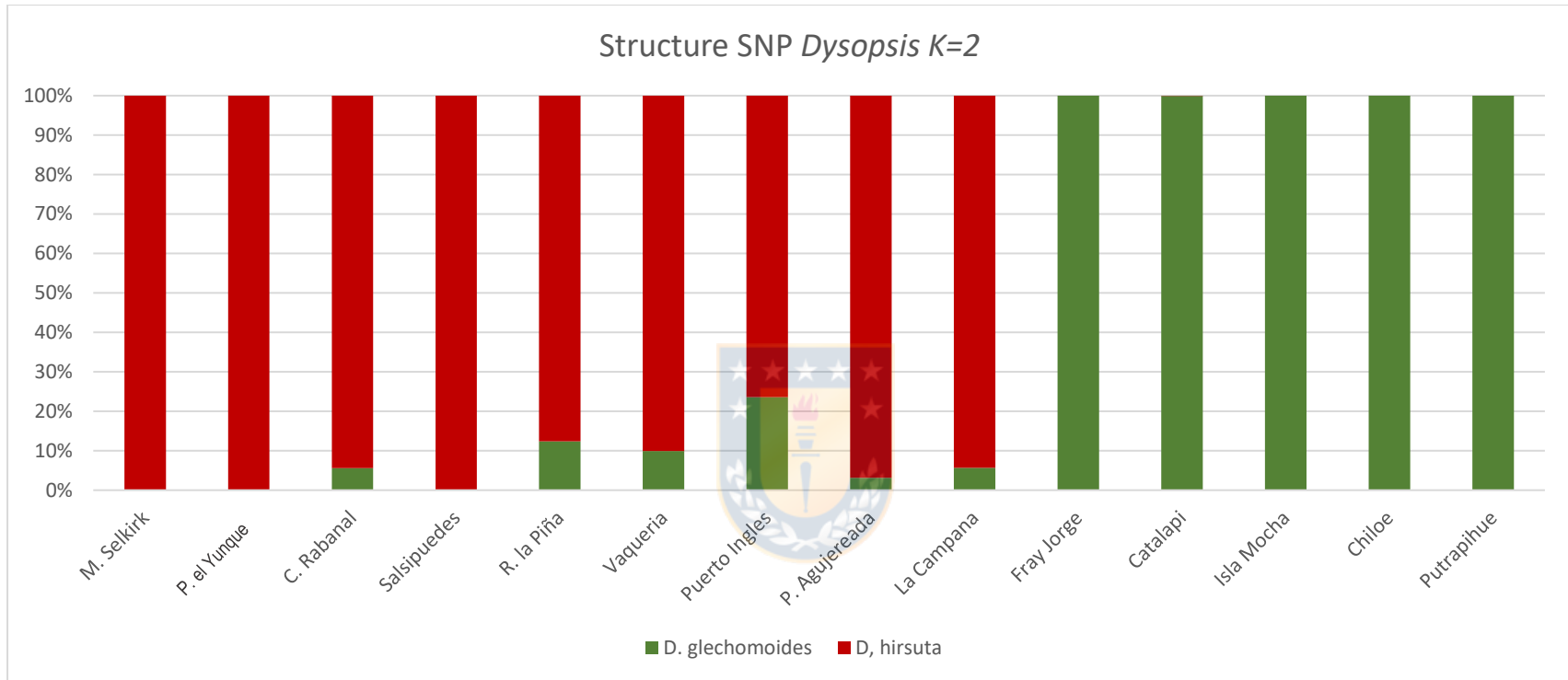


Figura 5. Gráfico de barras de los porcentajes de asignación de los individuos para la matriz completa (Neutral) para *D. hirsuta* y *D. glechomoides*.

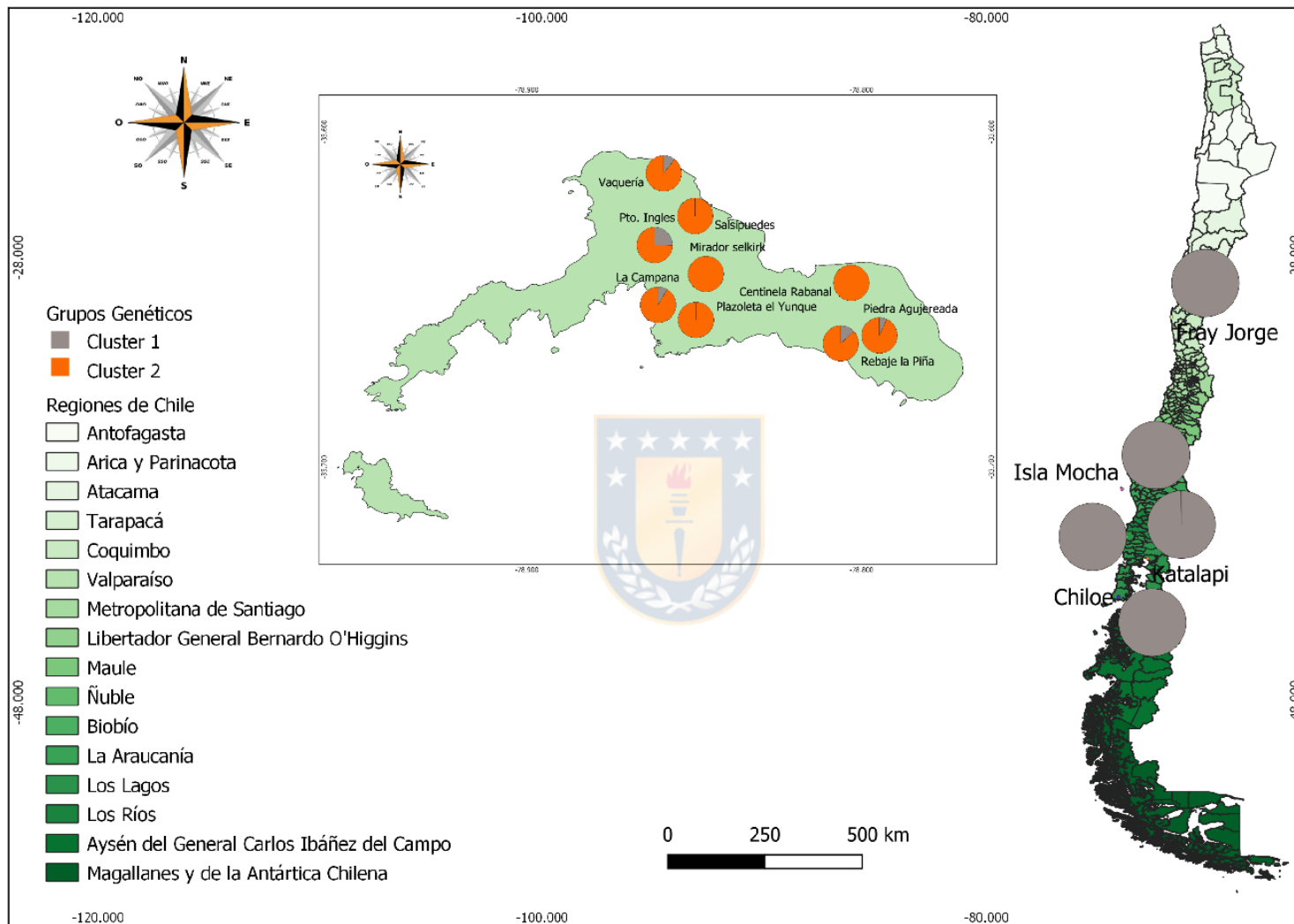


Figura 6. Porcentajes de asignación obtenidos en el análisis de estructura genética para marcadores SNP en *D. hirsuta* y *D. glechomoides*.

4.4.2 Estimación de la estructura genética basada en individuos con marcadores AFLP SNP para las matrices Neutral y *outlier*

El PCoA basado en distancias genéticas entre individuos (Figura 7), evidencia claramente el grado de diferenciación genética entre las poblaciones. Se puede observar que para las matrices de AFLP (neutral y *outliers*) se forman tres nubes de puntos, dentro de las Figuras 7A y 7B en el cuadrante superior derecho se aprecia una nube de puntos que incluye a las poblaciones de Mirador Selkirk, Plazoleta el Yunque, Centinela Rabanal, y Puerto Inglés en color amarillo, poblaciones que pertenecen al lado Oeste de la isla y en las cuales no se puede observar una diferenciación clara excepto por Salsipuedes en color morado, que se localiza en el cuadrante inferior derecho de estas figuras. La segunda nube de punto que corresponde al cuadrante superior izquierdo encontramos las poblaciones Rebaje de la Piña, Vaquería, Piedra Agujereada y La Campana en color rosa, que corresponden al lado este de la isla, excepto Vaquería, población que geográficamente queda en el extremo más oeste de la isla.

Contrario a lo observado en AFLP, los marcadores SNP para la matriz neutral genera una nube de dispersión de puntos que abarcan los cuatro cuadrantes (Figuras 7 C), en ellos se puede apreciar una clara diferenciación entre las poblaciones, en cambio la matriz *outlier* presenta una dispersión de puntos más agrupada, indicando dos cuadrantes. Para el cuadrante superior derecho se encuentran las poblaciones Rebaje

la Piña, Vaquería, Puerto Inglés, Piedra Agujereada y en el extremo superior izquierdo La Campana en color verde (Figura 7 D).

La distribución de la variación genética entre/dentro de las poblaciones fue examinada mediante AMOVA para la especie insular, tanto neutral como *outlier* (Tablas 6 y 7). Se observa que el mayor porcentaje de variación en los marcadores AFLP es explicada por diferencias dentro de las poblaciones con un 69%, $F_{ST}=0.308$ ($p \geq 0.001$) en la matriz neutral (Figura 8A) y 61%, $F_{ST}=0.588$ ($p \geq 0.001$) la matriz *outlier* (Figura 8B). Por el contrario, en los marcadores de SNP la mayor varianza molecular se explica entre las poblaciones con un 59%, $F_{ST}= 0.308$ ($p \geq 0.001$) en la matriz neutral (Figura 9A) y un 55% $F_{ST}= 0.393$ ($p \geq 0.001$) en la matriz *outlier* (Figura 9B).



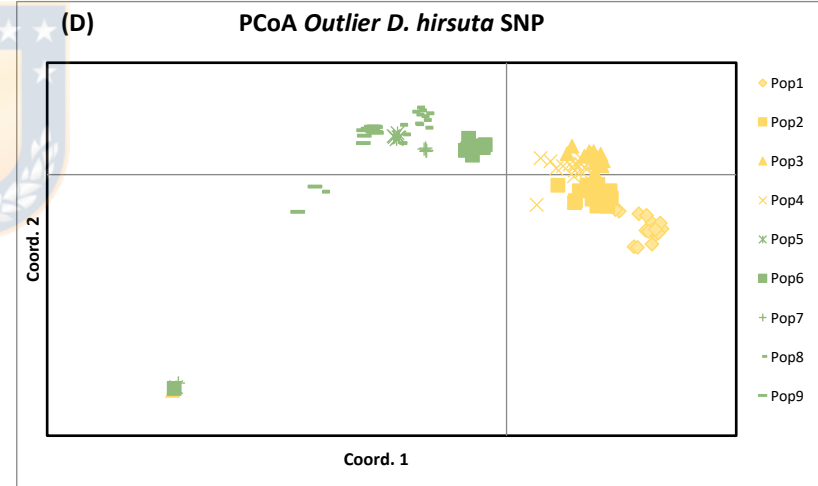
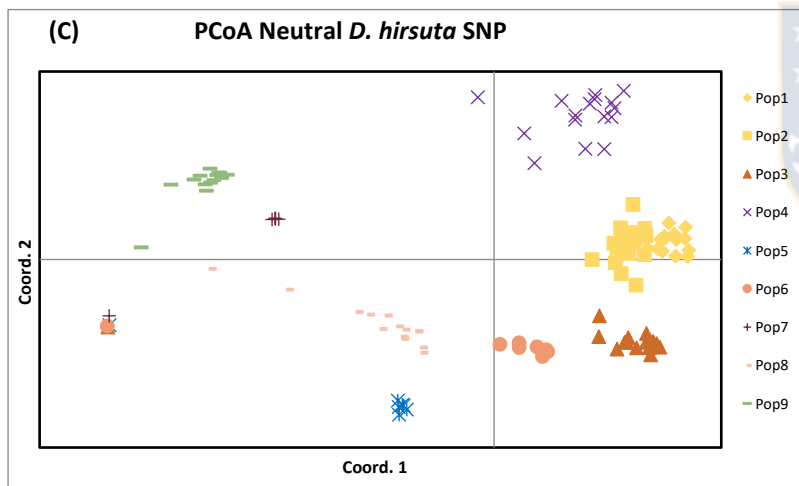
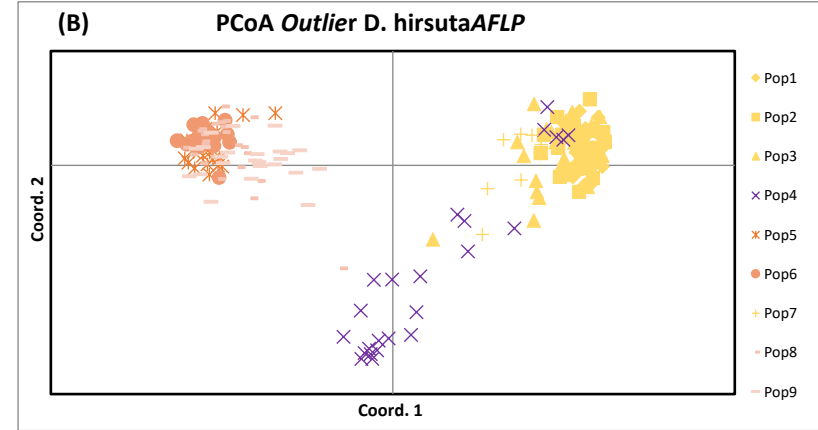
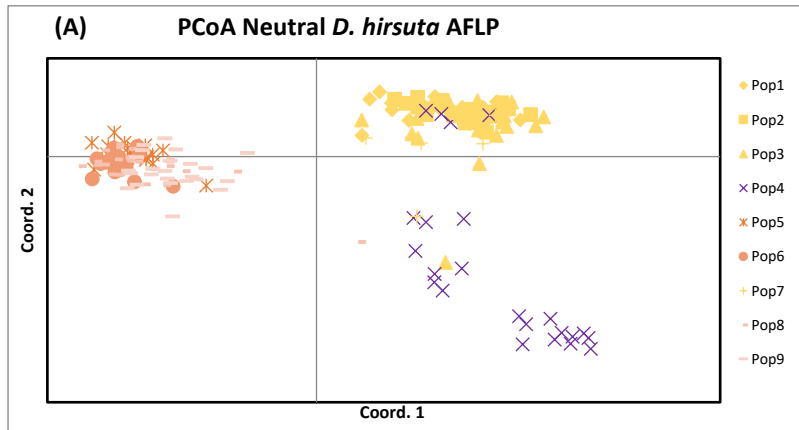


Figura 7. Gráficos PCoA para las matrices neutral y *outlier* de la especie *D. hirsuta*. (A): Matriz neutral con marcador AFLP; (B) Matriz *outlier* con marcador AFLP; (C): Matriz neutral con marcador SNP; (D) Matriz *outlier* con marcador SNP.

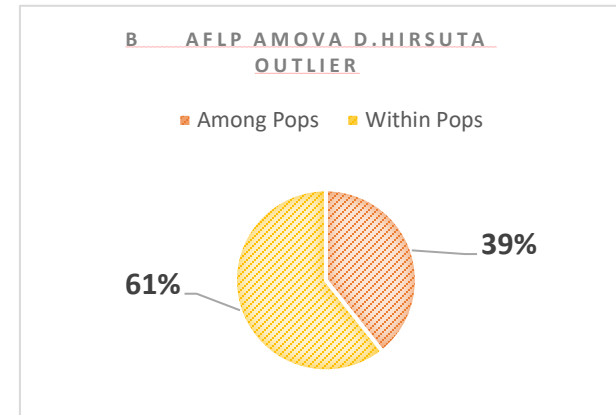
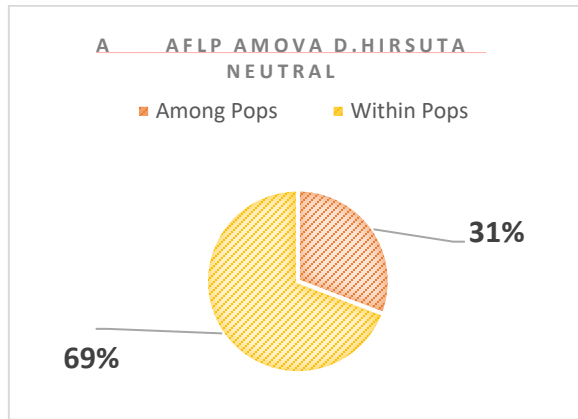


Figura 8. Gráficos de la distribución de la varianza molecular para la especie *D. hirsuta* con marcador AFLP. A: distribución de la varianza molecular entre poblaciones 69% y dentro de poblaciones 31%. B: distribución de la varianza molecular entre poblaciones 61% y dentro de poblaciones 39%.

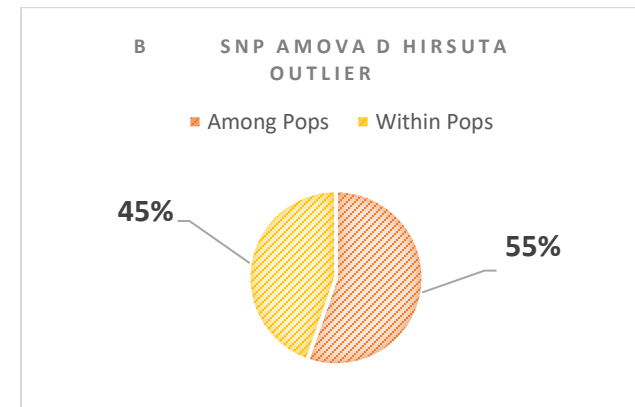
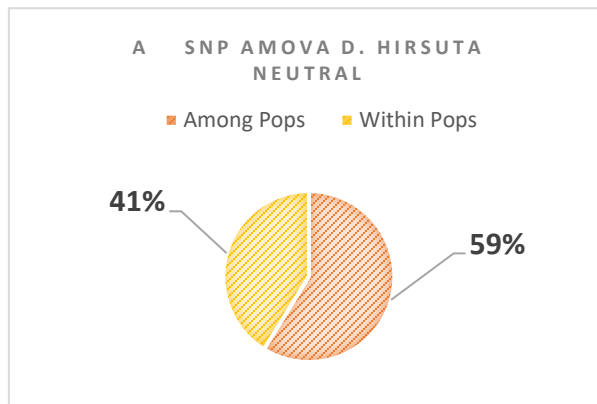


Figura 9. Gráficos de la distribución de la varianza molecular para la especie *D. hirsuta* con marcador SNP. A: distribución de la varianza molecular entre poblaciones 59% y dentro de poblaciones 41%. B: distribución de la varianza molecular entre poblaciones 55% y dentro de poblaciones 45%.

Tabla 6. Resumen de los análisis de varianza molecular (AMOVA) para la especie *D. hirsuta* con marcador AFLP para matrices neutrales y *outlier* analizados mediante GENALEX 6.5. df: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CV: componentes de la varianza; VE: Variación estándar; %: variancia total que contribuye entre /dentro de las poblaciones (para cada especie)

<i>D. hirsuta</i> AFLP	df	SS	CV	VE	%
Neutral					
Entre pop	8	2102,849	262,856	10,975	31%
Dentro pop	188	4633,689	24,647	24,647	69%
Total	196	6736,538		35,622	100%
<i>outlier</i>					
Entre pop	8	1780,532	222,567	9,573	39%
Dentro pop	188	2778,716	14,780	14,780	61%
Total	196	4559,249		24,353	100%

Tabla 7. Resumen de los análisis de varianza molecular (AMOVA) para la especie *D. hirsuta* con marcador SNP para matrices neutrales y *outlier* analizados mediante GENALEX 6.5. df: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CV: componentes de la variancia; VE: Variación estándar; %: variancia total que contribuye entre /dentro de las poblaciones (para cada especie)

<i>D. hirsuta</i> SNP	df	SS	CV	VE.	%
Neutral					
Entre pop	8	25858,379	3232,297	246,970	59%
Dentro pop	104	17996,081	173,039	173,039	41%
Total	112	43854,460		420,009	100%
<i>outlier</i>					
Entre pop	8	10965,252	1370,656	103,885	55%
Dentro pop	104	8716,447	83,812	83,812	45%
Total	112	19681,699		187,697	100%

Los análisis de inferencias Bayesianas utilizando el método de Evanno para estimar el número de *pool* génicos sugieren que existen varios valores de K para las distintas matrices examinadas. En el marcador AFLP para la matriz neutral se observa que el valor óptimo de según los valores obtenidos de ΔK , (Evanno *et al.*, 2005) es un $K=4$ (Tabla 8, Figura 10), donde existen dos grandes *poos* génicos que incluyen las poblaciones de Mirador Selkirk, Plazoleta el Yunque, Centinela Rabanal, representado en los gráficos de barra por el color amarillo, Cluster 1 (Figura 10A). El siguiente *pool* génico con mayor número de individuos es el Cluster 2 representado en los gráficos de barra por el color verde, este grupo se constituye por las poblaciones Rebaje la Piña, Vaquería, Piedra Agujereada y La Campana (Figura 10A). Los otros dos *pools* génicos corresponden al Cluster 3 y 4 en su mayoría a la población Salsipuedes, diferenciándola como una identidad genética única, sin embargo, también posee genotipos de los otros cuatro grupos genéticos (Figura 10 A). Contrario a la matriz de loci neutrales, la matriz de loci *outlier* presenta un valor de $\Delta K=2$, por lo que sólo existen dos grandes poblaciones genéticas, además se observa que la población de Puerto Inglés presentaría mayor concordancia con el Cluster 1 con un porcentaje de asignación a este del 98,1% (Tabla 8, Figura 10 B). Los resultados de la matriz de loci neutrales con marcador SNP (Figura 10 C) muestran seis grupos genéticos $k=6$, contrario a lo que muestra la matriz de loci *outlier* donde $\Delta K=3$. Es así como las poblaciones de Mirador Selkirk con Plazoleta el Yunque constituyen el Cluster 1, La Campana y Pto. Inglés el Cluster 2, Rebaje la Piña y Vaquería Cluster 3, por otra parte, Piedra Agujereada, Centinela Rabanal y Salsipuedes constituyen por sí solos grupos genéticos particulares (Tabla 9, Figura 10 D), cabe destacar que el grupo genético de La Campana comparte los genotipos con la mayoría de los *pools* génicos encontrados. Los *pools* génicos

encontrados para la matriz *outlier* en SNP presenta un patrón concordante con el Cluster 1 de la matriz neutral, el Cluster 3 agrupa la mayoría de las poblaciones que en la matriz neutral poseían el genotipo de La Campana

Tabla 8. Porcentajes de asignación de grupos genéticos obtenidos en STRUCTURE para marcadores AFLP en ambas matrices neutral y *outlier* para la especie *D. hirsuta*

% Asignación AFLP	NEUTRAL				OUTLIER	
	Cluster 2	Cluster 1	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 1	Cluster 2
Mirador Selkirk	97,2	1,6	0,1	1,1	99,8	0,2
Plazoleta de Yunque	98,9	0,7	0,1	0,2	99,5	0,5
Centinela Rabanal	92,5	0,9	0,2	6,4	97,4	2,6
Salsipuedes	23,3	2	42,5	32,2	62,5	37,5
Rebaje la Piña	0,4	98,5	0,3	0,8	0,8	99,2
Vaquería	0,2	97,7	0,1	2	0,5	99,5
Puerto Inglés	74,4	6,1	0,5	19	94,9	5,1
Piedra Agujereada	0,3	92,1	0,3	7,3	1,9	98,1
La Campana	3,2	89,5	2,8	4,5	5,5	94,5

Tabla 9. Porcentajes de asignación de grupos genéticos obtenidos en STRUCTURE para marcadores SNP en ambas matrices neutral y *outlier* para la especie *D. hirsuta*

% Asignación SNP	NEUTRAL		OUTLIER					
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6
Mirador Selkirk	99,2	0,8	0,2	0,4	95,9	0,6	0,7	2,3
Plazoleta de Yunque	98,8	1,2	0,1	1,9	3,6	1,8	1,1	91,5
Centinela Rabanal	92,4	7,6	6,3	0,1	1	1,4	91,1	0,1
Salsipuedes	93,9	6,1	0,6	97,5	0,1	1	0,7	0,1
Rebaje la Piña	41,5	58,5	14,2	0,1	0	85,5	0,1	0
Vaquería	74	26	11,7	0,3	5	57,7	14	11,3
Puerto Inglés	13,7	86,3	20	0,2	12,1	67,5	0,1	0,1
Piedra Agujereada	43,2	56,8	3,6	0	0,9	94,6	0,8	0,1
La Campana	0,1	99,9	4,7	0,1	0	95,2	0	0

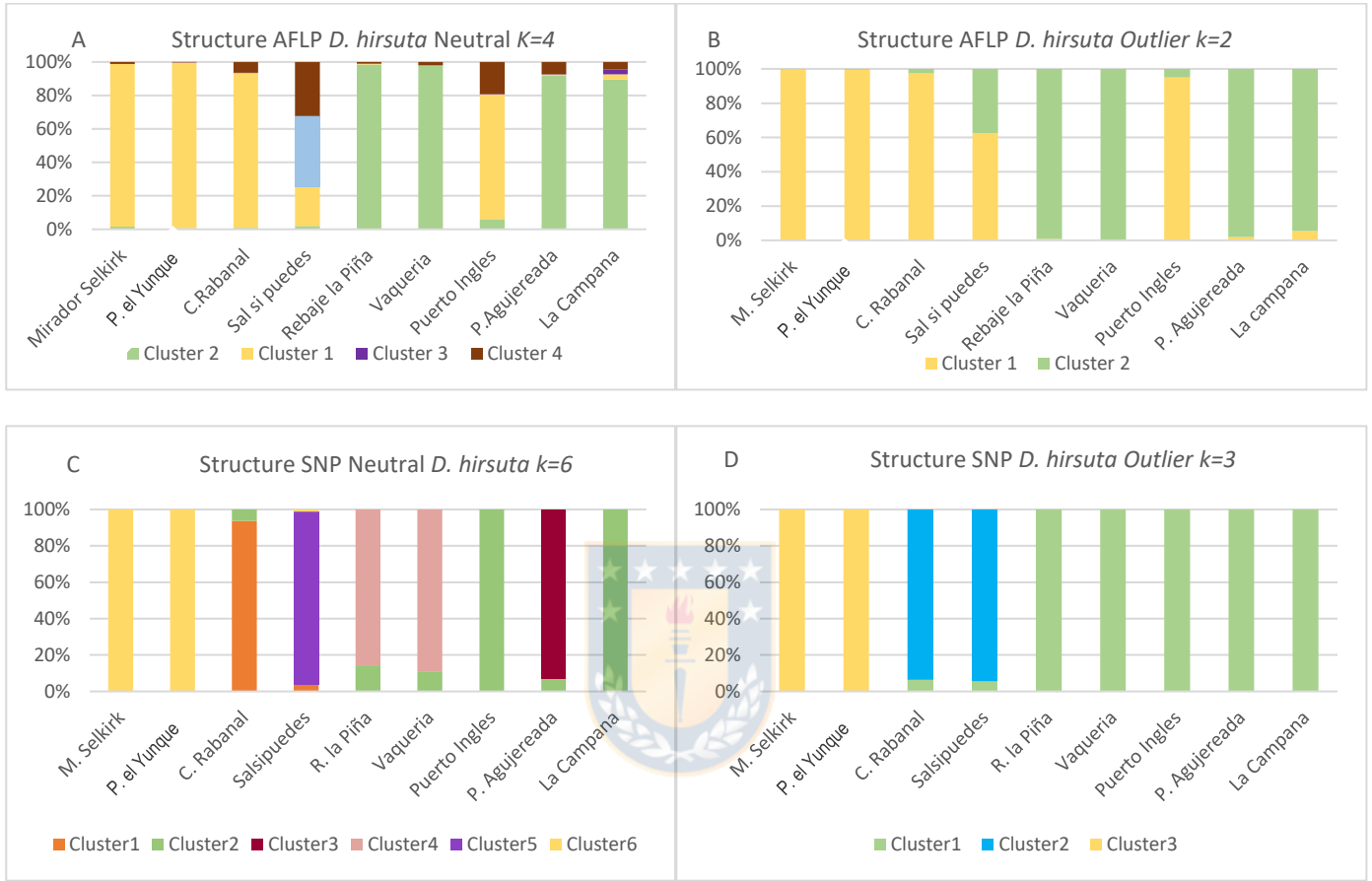


Figura 10. Barplots de asignación de grupos genéticos para las matrices neutrales y *outlier* en marcadores AFLP y SNP en la especie *D. hirsuta*. A: Barplot matriz neutral con marcador AFLP; B: Barplot matriz *outlier* con marcador AFLP; C: Barplot matriz neutral con marcador AFLP; D: Barplot matriz *outlier* con marcador SNP.

El cálculo de la distancia genética entre poblaciones se presenta en la Tabla 10 y 11 y se representan de manera gráfica en la Figura 11 en la cual se muestran las matrices de distancias genéticas F_{ST} para las matrices de AFLP. Se aprecia en la matriz neutral que la mayor distancia genética se encontró entre la población de Salsipuedes y Vaquería con $F_{ST}=0,202$ (Tabla 10). Para la matriz *outlier* de AFLP los valores más altos de distancia genética se encuentran entre las poblaciones de Mirador Selkirk, Plazoleta el Yunque y Centinela Rabanal con Rebaje la Piña y Vaquería (Tabla 11), lo cual coincide con los resultados de estructura genética.

Los valores F_{ST} para las matrices de marcador SNP presentan valores de que van desde $F_{ST}=0.2$ hasta máximos de $F_{ST}=0.9$ (Tabla 12 y 13), lo que indica que existe una alta diferenciación entre las poblaciones. El comportamiento de F_{ST} en la matriz neutral indica que la población La Campana presenta los mayores valores con todos los pares de poblaciones, en tanto los menores valores se presentan para a las poblaciones de Mirador Selkirk y Plazoleta el Yunque.

En la evaluación de aislamiento por distancia entre pares de poblaciones, la prueba de Mantel realizado para las matrices de ambos marcadores arrojó que no existe correlación entre los valores de F_{ST} versus la distancia geográfica (Figura 12). En este análisis se obtiene para el marcador AFLP en la matriz neutral un $r^2= 0,0005$ con un $p = 0,580$ y *outlier* $r^2= 0,0034$ con un $p = 0,373$. En el caso de los marcadores SNP en la matriz neutral se obtiene un $r^2= 0,0113$ con un $p = 0,250$ y para la matriz *outlier* un $r^2= 0,027$ con un $p = 0,270$. Estos resultados sugieren que la especie estudiada no presenta aislamiento por distancia bajo estos loci y marcador.

Tabla 10: Valores de distancia genética (FST) entre pares de poblaciones para la matriz de AFLP neutral para *D. hirsuta*.

M.Selkirk	P. el Yunque	C.Rabanal	Salsipuedes	R. la Piña	Vaquería	P. Inglés	P. Agujereada	La Campana	Poblaciones
0,000									M.Selkirk
*0,023	0,000								P. el Yunque
0,034	*0,030	0,000							C.Rabanal
0,178	0,182	0,109	0,000						Salsipuedes
0,110	0,121	0,105	0,190	0,000					R. la Piña
0,127	0,140	0,118	0,202*	0,032	0,000				Vaquería
0,061	0,059	0,038	0,104	0,098	0,115	0,000			P. Inglés
0,109	0,122	0,091	0,136	0,019*	0,036	0,084	0,000		P. Agujereada
0,107	0,115	0,098	0,148	0,032	0,054	0,082	0,033	0,000	La Campana



Tabla 11: Valores de distancia genética (FST) entre pares de poblaciones para la matriz de AFLP outlier para *D. hirsuta*.

M.Selkirk	P. el Yunque	C.Rabanal	Salsipuedes	R. la Piña	Vaquería	P. Inglés	P. Agujereada	La Campana	Poblaciones
0,000									M.Selkirk
0,017*	0,000								P. el Yunque
0,031	0,026	0,000							C.Rabanal
0,133	0,118	0,079	0,000						Salsipuedes
0,337*	0,323*	0,271	0,181	0,000					R. la Piña
0,369*	0,351*	0,294	0,192	0,023*	0,000				Vaquería
0,069	0,056	0,025	0,067	0,231	0,252	0,000			P. Inglés
0,291	0,276	0,216	0,127	0,024	0,027	0,179	0,000		P. Agujereada
0,268	0,246	0,197	0,113	0,044	0,048	0,164	0,038	0,000	La Campana

Tabla 12: Valores de distancia genética (FST) entre pares de poblaciones para la matriz de SNP neutral para *D. hirsuta*.

M.Selkirk	P. el Yunque	C.Rabanal	Salsipuedes	R. la Piña	Vaquería	P. Inglés	P. Agujereada	La Campana	Poblaciones
0,000									M.Selkirk
0,240*	0,000								P. el Yunque
0,343	0,365	0,000							C.Rabanal
0,364	0,377	0,474	0,000						Salsipuedes
0,591	0,577	0,661	0,680	0,000					R. la Piña
0,431	0,423	0,542	0,558	0,683	0,000				Vaquería
0,637	0,636	0,746	0,734	0,829*	0,778	0,000			P. Inglés
0,507	0,494	0,581	0,572	0,696	0,618	0,765	0,000		P. Agujereada
0,636	0,631	0,714	0,709	0,805*	0,736	0,790	0,722	0,000	La Campana



Tabla 13: Valores de distancia genética (FST) entre pares de poblaciones para la matriz de SNP outlier para *D. hirsuta*.

M.Selkirk	P. el Yunque	C.Rabanal	Salsipuedes	R. la Piña	Vaquería	P. Inglés	P. Agujereada	La Campana	Poblaciones
0,000									M.Selkirk
*0,202	0,000								P. el Yunque
0,261	0,286	0,000							C.Rabanal
0,271	0,264	0,302	0,000						Salsipuedes
0,463	0,445	0,505	0,471	0,000					R. la Piña
0,390	0,365	0,420	0,408	0,555	0,000				Vaquería
0,477	0,462	0,538	0,488	0,626*	0,605*	0,000			P. Inglés
0,407	0,376	0,420	0,399	0,514	0,484	0,553	0,000		P. Agujereada
0,486	0,451	0,496	0,457	0,574	0,561	0,631	0,516	0,000	La Campana

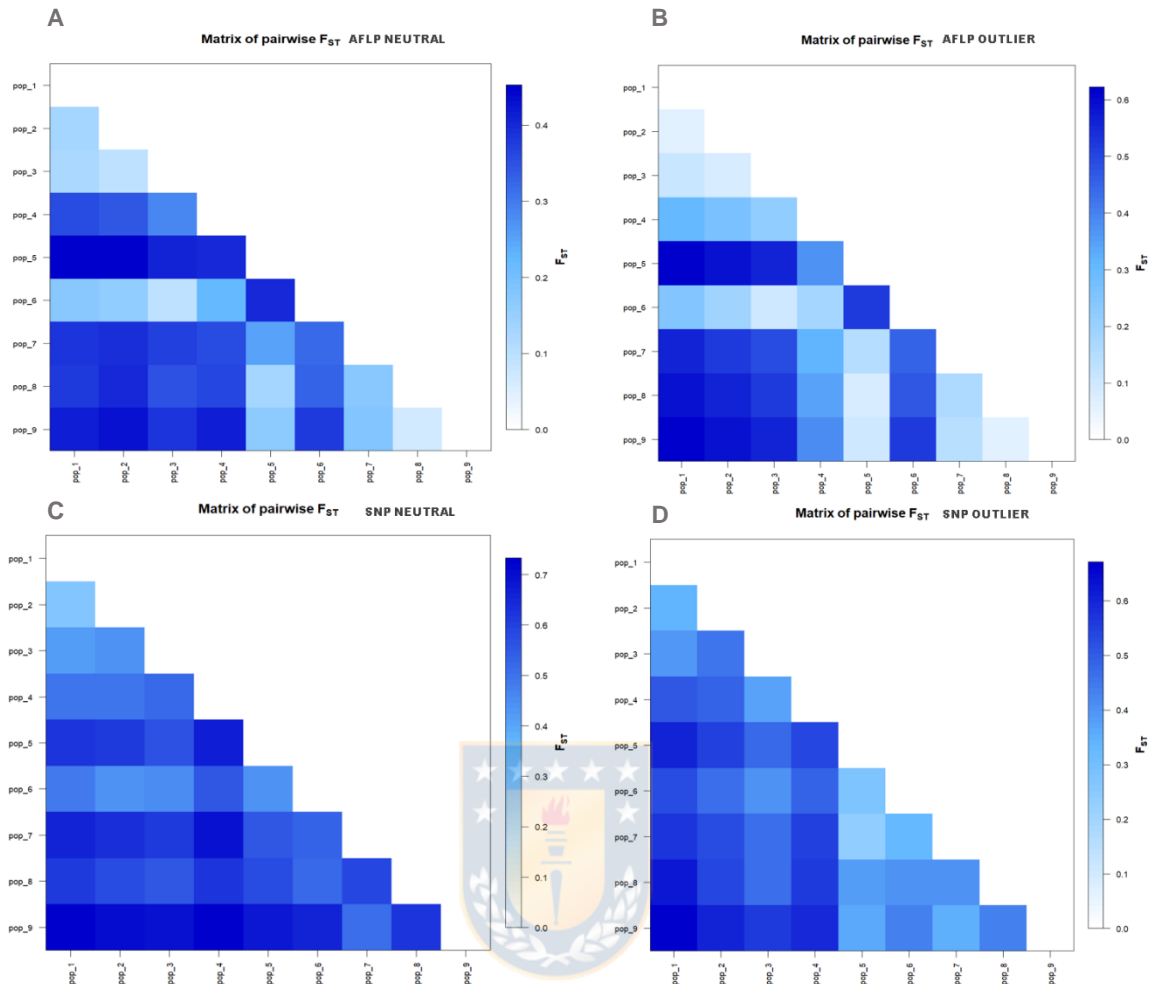


Figura 11. Gráficos de la distancia genética entre pares de poblaciones para los marcadores AFLP y SNP en matrices neutrales y *outlier* para la especie *D. hirsuta*. A: matriz neutral con marcador AFLP; B: matriz *outlier* con marcador AFLP; C: matriz neutral con marcador AFLP; D: matriz *outlier* con marcador SNP.

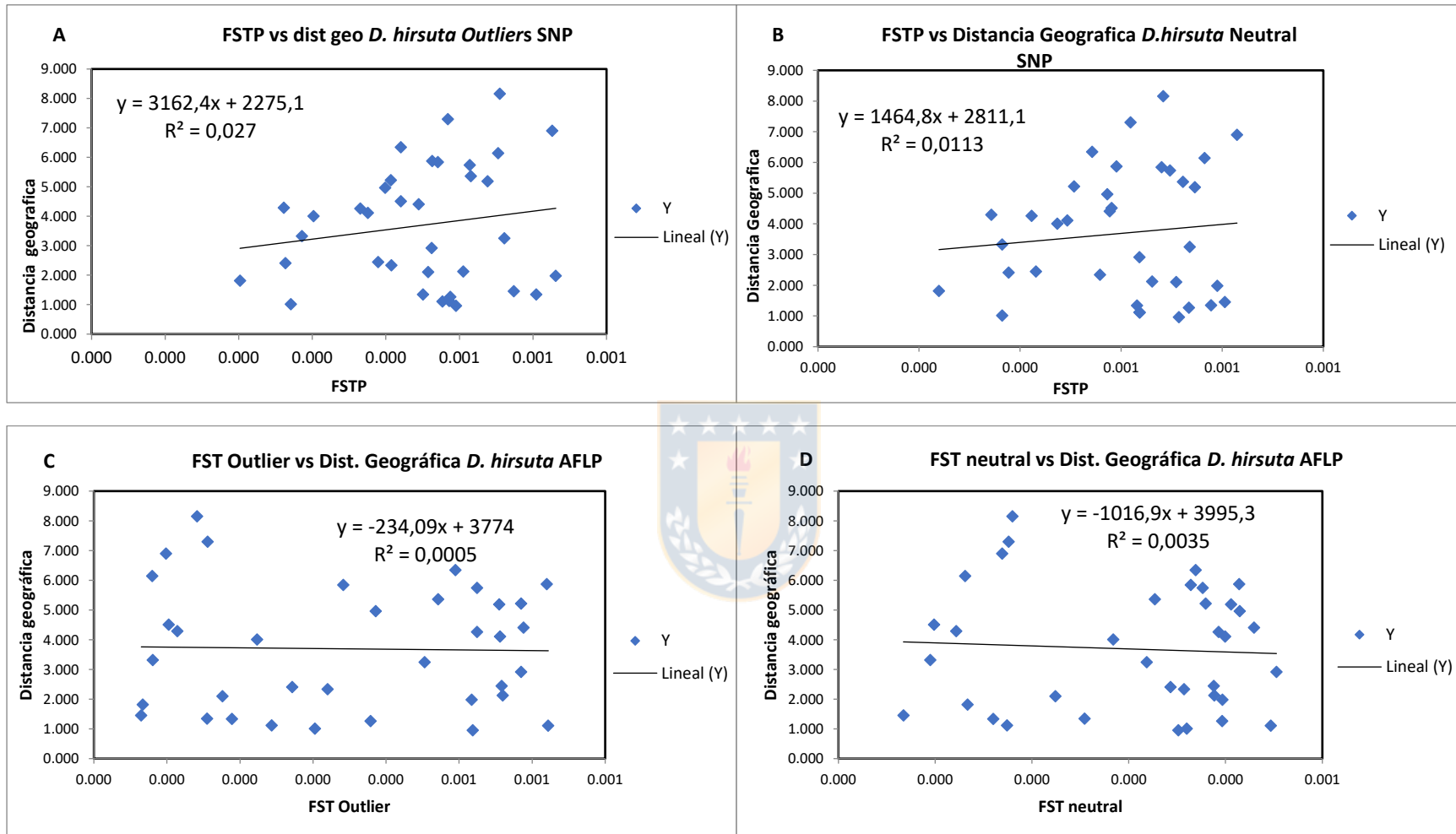


Figura 12. Modelo de regresión obtenido a partir del Test de Mantel para la especie *D. hirsuta* en las matrices neutrales y *outlier* para cada marcador AFLP y SNP. Eje Y: Distancia geográfica. Eje X: Distancia genética. A: matriz neutral con marcador AFLP; B: matriz *outlier* con marcador AFLP; C: matriz neutral con marcador SNP; D: matriz *outlier* con marcador SNP.

El análisis de los árboles de redes basados en la estimación del vecino más cercano para la especie *D. hirsuta* para marcadores AFLP utilizando la matriz neutral y *outlier* (Figura 13 y 14) muestra una separación de las poblaciones en tres grupos, separando a Salsipuedes como una sola gran población, segundo conformado por las poblaciones Mirador Selkirk, Plazoleta el Yunque, Centinela Rabanal y Puerto Inglés y el tercero conformado por Rebaje la Piña, Vaquería, Piedra Agujereada y La Campana. Por el contrario, SNP tanto para las matrices neutral y *outlier* presentaría diferenciación entre todas las poblaciones (Figura 15 y 16), pero destacando siempre en ambas matrices la separación de Salsipuedes como una población particular.



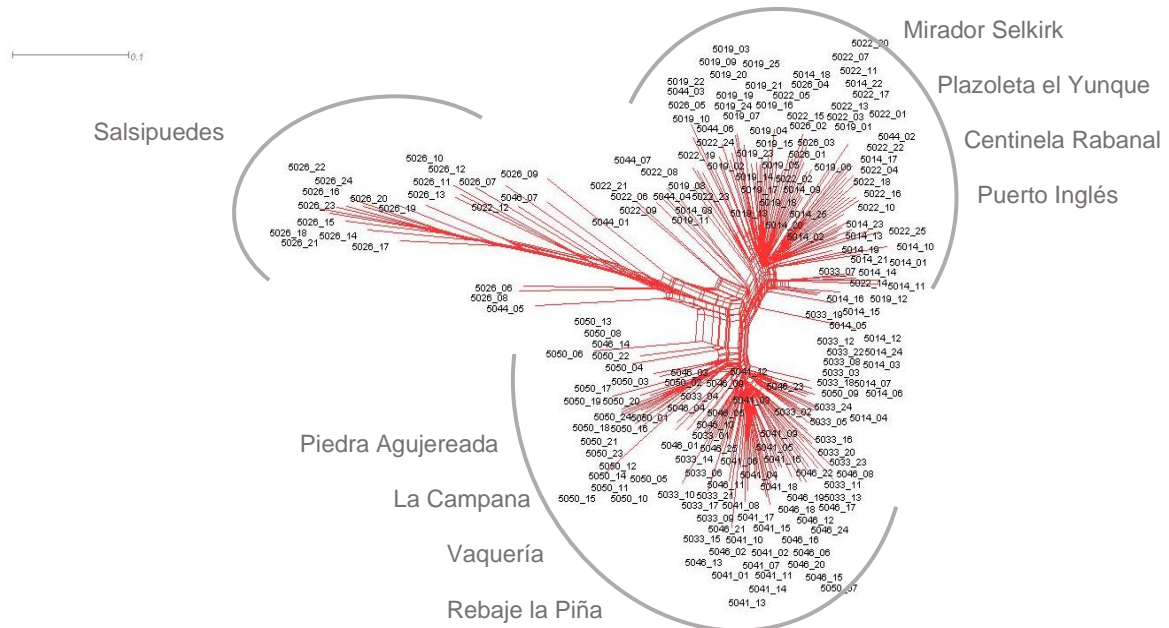


Figura 13. Árbol de redes basado en la estimación del vecino más cercano de las poblaciones de *Dysopsis hirsuta* obtenidas mediante la matriz neutral de AFLP.

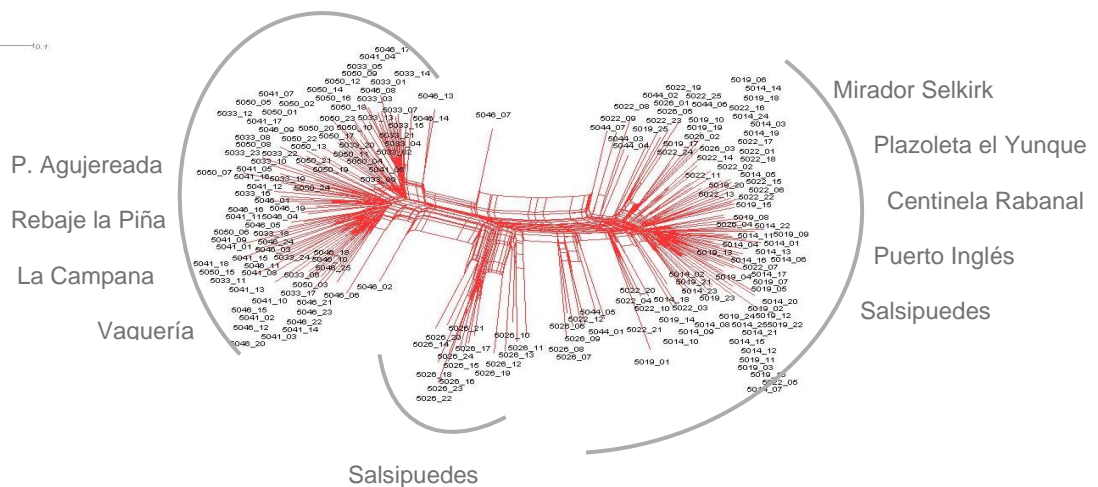


Figura 14. Árbol de redes basado en la estimación del vecino más cercano con las de las poblaciones de *Dysopsis hirsuta* obtenidas mediante la matriz *outlier* de AFLP.

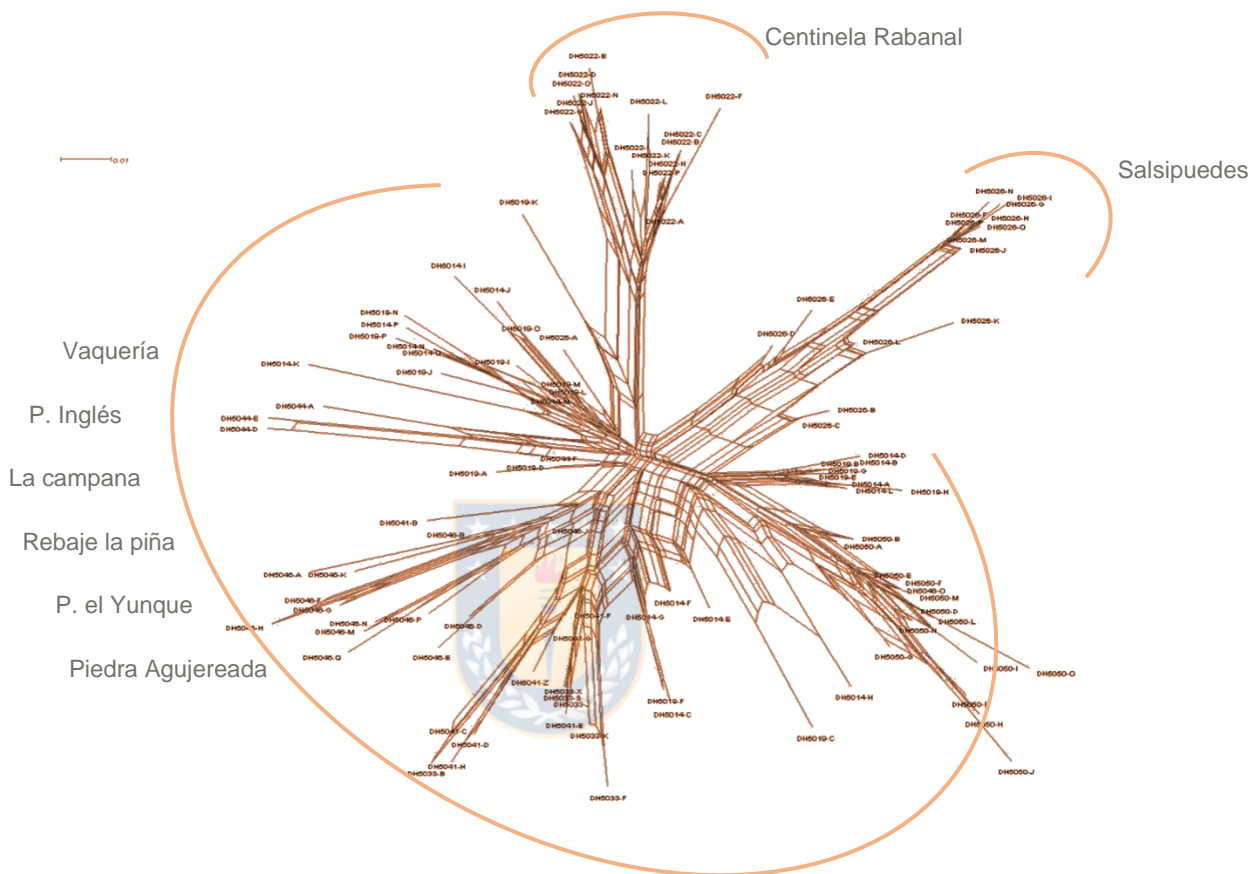


Figura 15. Árbol de redes basados en la estimación del vecino más cercano de las poblaciones de *Dysopsis hirsuta* obtenidas mediante la matriz neutral de SNP.

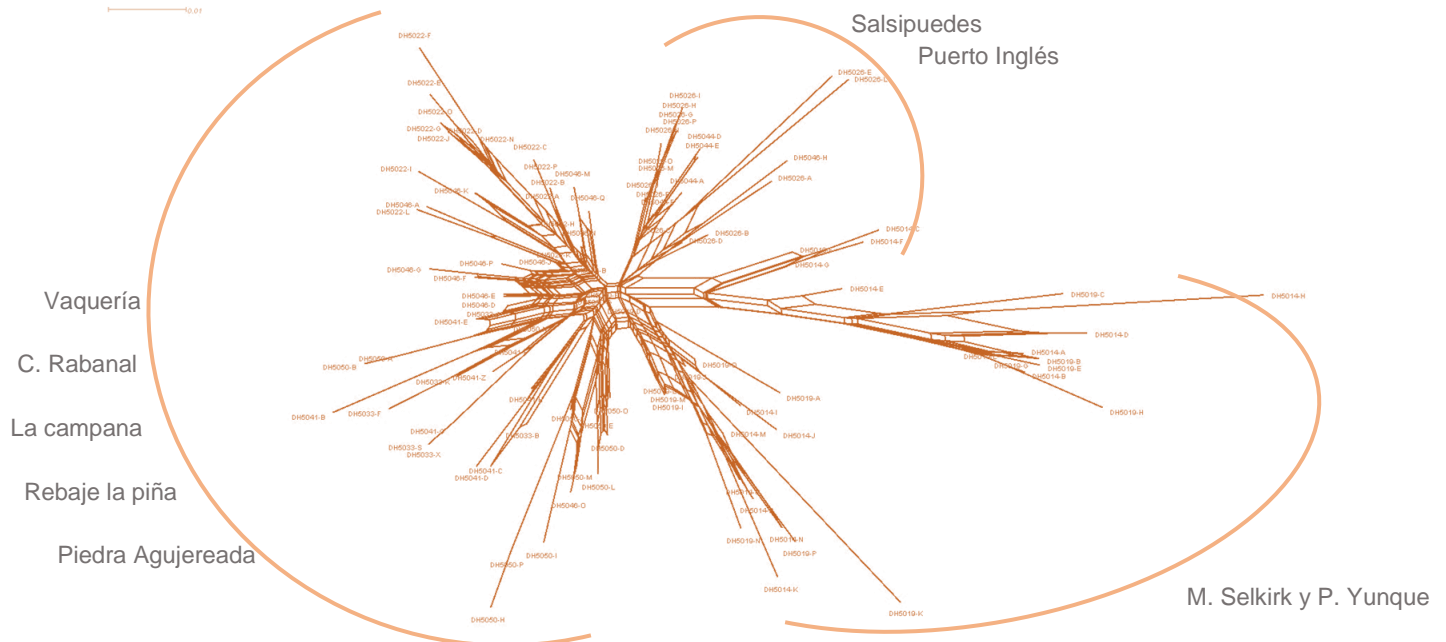


Figura 16. Árbol de redes basado en la estimación del vecino más cercano de las poblaciones de *Dysopsis hirsuta* obtenidos mediante la matriz *outlier* de SNP.



4.5 Tamaño efectivo poblacional (N_e)

Los valores de tamaño efectivo poblacional (N_e) y su respectivo intervalo de confianza (IC) obtenidos a través del programa LDNe permitieron inferir la deriva génica en las poblaciones dentro de la isla. Los valores promedio presentados por las poblaciones oscilan entre 5,7 para Mirador Selkirk y 0,4 en Piedra Agujereada (Figura 17). Dentro de la isla los menores valores de N_e están representados para las poblaciones Salsipuedes, Piedra Agujereada y La Campana las cuales presentan diferencias estadísticamente significativas en base al test de Mann-Whitney aplicado ($p=0.042$), lo cual indican que estarían siendo sometidas a deriva génica.

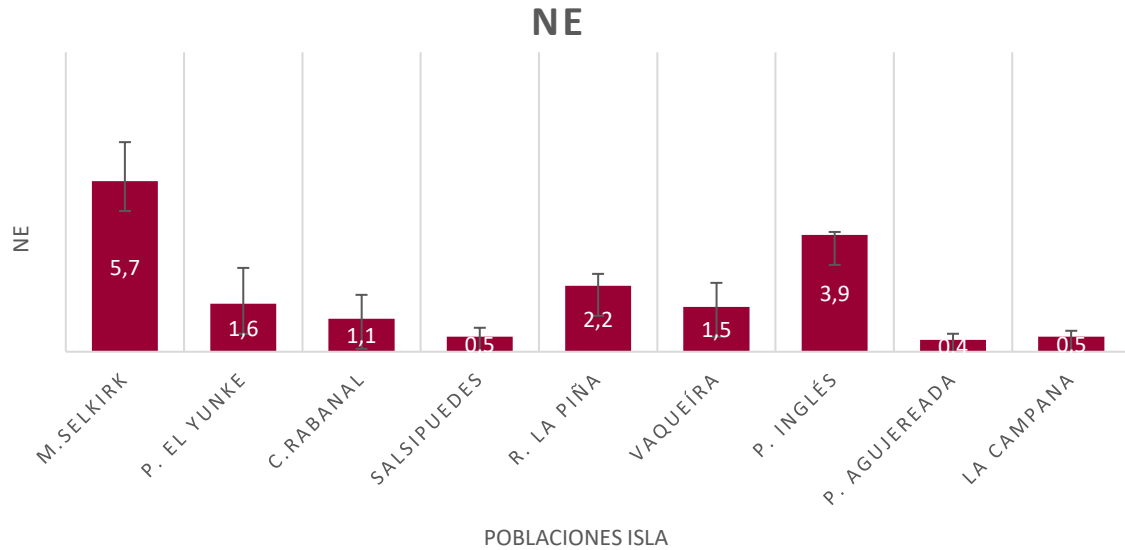


Figura 17. Tamaño efectivo poblacional (N_e) con su respectivo intervalo de confianza (barra de error) en la Isla Robinson Crusoe en la especie *D. hirsuta*.



4.6. Unidades de Conservación Genética en isla Robinson Crusoe

Los parámetros genéticos evaluados en la matriz neutral para los marcadores AFLP muestran a las poblaciones de Salsipuedes, Centinela Rabanal y Rebaje de la Piña como aquellas que registran los valores más altos en la mayoría de los índices. En tanto los resultados obtenidos en la matriz *outliers* de AFLP señalan a las poblaciones de Salsipuedes y Rebaje de la Piña como aquellas que presentan los mayores valores en los distintos índices evaluados (Tabla 14). Para la matriz de SNP se observan que las poblaciones de Mirador Selkirk y Plazoleta del Yunque son las que registran los mayores valores en todos los índices de diversidad genética, tanto en la matriz neutral

como *outliers*, destacando además la población de Salsipuedes que presenta altos valores en el número de alelos privados (NPA) en la matriz *outliers*.



Tabla 14. Valores de diversidad genética para marcadores AFLP y SNP en matrices Neutrales y *outlier* para la especie *D. hirsuta*. N: Número de individuos; I: índice de Shannon; NBF: Número de bandas frecuentes; NBP: Número de bandas privadas; NBLC: Número de bandas poco comunes; NAP: n° de alelos privados; NALC: n° de alelos poco comunes. ES: error estándar.

		AFLP								SNP				
COD		Pop	N	I	No. Bandas	NBF >= 5%	NBP	NBLC (<=25%)	NBLC (<=50%)	N	I	NAP	NALC (<=25%)	NALC (<=50%)
<i>D. hirsuta</i> Neutral	M. Selkirk	Pop1	25	0,207	181	162	1	2	18	16	0,221	0,067	0,184	0,410
	P. Yunque	Pop2	25	0,216	182	164	0	2	22	16	0,211	0,051	0,144	0,343
	C. Rabanal	Pop3	25	0,3	193	173	3	5	24	16	0,154	0,045	0,109	0,258
	Salsipuedes	Pop4	24	0,39	253	231	15	9	44	16	0,151	0,051	0,071	0,260
	P. Inglés	Pop9	24	0,193	167	142	2	1	15	7	0,084	0,017	0,039	0,125
	Vaquería	Pop5	18	0,197	169	169	0	2	21	9	0,117	0,024	0,067	0,159
	La Campana	Pop6	7	0,297	169	169	0	2	17	5	0,063	0,017	0,013	0,066
	P. Agujereada	Pop8	25	0,267	179	152	1	1	21	14	0,146	0,011	0,067	0,193
	R. la Piña	Pop7	24	0,253	207	165	0	8	31	14	0,092	0,022	0,024	0,109
	Promedio			0,258	189	170	2	4	24		0,138	0,034	0,080	0,214
ES			0,005	-	-	-	-	-		0,055	0,020	0,056	0,114	
<i>D.hirsuta outlier</i>	M. Selkirk	Pop1	25	0,233	93	82	0	2	5	16	0,222	0,081	0,112	0,336
	P. Yunque	Pop2	25	0,275	100	89	0	1	6	16	0,221	0,078	0,128	0,296
	C. Rabanal	Pop3	25	0,304	108	93	0	1	7	16	0,167	0,044	0,056	0,193
	Salsipuedes	Pop4	24	0,354	119	111	1	1	7	16	0,195	0,118	0,050	0,193
	P. Inglés	Pop9	24	0,237	106	89	0	1	8	7	0,139	0,028	0,031	0,056
	Vaquería	Pop5	18	0,274	102	102	0	1	7	9	0,161	0,025	0,056	0,137
	La Campana	Pop6	7	0,286	87	87	1	1	2	5	0,108	0,009	0,003	0,031
	P. Agujereada	Pop8	25	0,298	108	94	0	1	8	14	0,162	0,053	0,037	0,097
	R. la Piña	Pop7	24	0,313	109	94	0	2	9	14	0,141	0,006	0,028	0,065
	Promedio			0,286	103,6	93,4	0,2	1,2	6,6		0,169	0,049	0,056	0,156
ES			0,007	-	-	-	-	-		0,038	0,037	0,040	0,108	

5 DISCUSION

La evolución y divergencia de las plantas en islas oceánicas se debe a procesos de especiación dentro de los cuales se encuentran cladogénesis y anagénesis. En el Archipiélago de Juan Fernández la anagénesis es la responsable de la divergencia y evolución de la mayor parte de su flora endémica. Una de las especies que habría evolucionado a través de este proceso de especiación es *D. hirsuta*, concordando además con estudios de parentescos realizados en otras especies de plantas (Bernardello y Anderson, 2018) que confirman, además, que existe una mayor relación entre los individuos del Archipiélago de Juan Fernández con especies continentales de Chile que el resto de Sudamérica.

Respecto de la primera hipótesis planteada en este estudio, el análisis de los resultados indica que la especie *D. hirsuta* posee una variabilidad genética menor a su ancestro continental *D. glechomoides* en los valores de loci neutrales y *outlier* para ambos marcadores moleculares, y en particular en los valores presentados por la heterocigosidad. Estos resultados no concuerdan con la mayoría de patrones observados en especies de plantas estudiadas a la fecha y que habrían divergido mediante este modo de especiación en islas oceánicas, donde se observa que los valores de diversidad genética mayores o iguales a su ancestro continental (Pfosser *et al.*, 2006 Takayama *et al.*, 2013; Takayama *et al.*, 2015b), sin embargo otros trabajos como los realizados por López-Sepúlveda *et al.* (2016) y Yang *et al.* (2019) muestran resultados similares con esta tesis, es decir valores promedio de diversidad genética menorea en la especie insular en relación a la especie parental continental, por lo cual

se sugieren que cada caso de estudio debe ser tratado por sí solo debido a los muchos factores que pueden afectar la diversidad genética en las plantas de las islas, como hibridación, reducción de hábitat o modos de reproducción (Stuessy *et al.*, 2014).

Al analizar la estructura genética de las especies *D. hirsuta* y *D. glechomoides*, con marcadores AFLP se aprecia una estructuración genética dentro de ambas especies, observando dos genotipos para la especie insular y dos genotipos para la especie continental. Muy contrario a lo presentado por los marcadores SNP donde no existe separación de grupos dentro de las especies, pudiendo observar dos genotipos uno presente en las poblaciones de *D. hirsuta* y el otro en las poblaciones de *D. glechomoides*. Si bien pareciese existir una incongruencia entre los resultados de los marcadores AFLP y SNP, esto podría radicar en la cantidad de poblaciones incluidas en los marcadores SNP los cuales excluyeron a las poblaciones de Nahuelbuta, Coyhaique, Punta Arenas y P.N. Magallanes, poblaciones que en los marcadores AFLP conforman clados distintos, concordando con estudios donde estos sectores poseen genotipos únicos, debido a que estas zonas son consideradas como refugios glaciares del cuaternario (Sérsic *et al.*, 2011).

En relación con la influencia de los distintos procesos micro-evolutivos sobre la diversidad genética de *D. hirsuta*, que se plantean para la hipótesis II, los resultados de FST y estructura muestran que existe flujo génico histórico entre las poblaciones pertenecientes a un mismo clado genético en la isla (Clado 2), ya que las poblaciones que conforman este clado, la mayoría no poseen conexiones geográficas cercanas, este es el caso de La Campana. Se observa además la presencia del efecto deriva en las poblaciones de Salsipuedes, Piedra Agujereada y La Campana. En tanto la

presencia de un alto número de potenciales *loci* bajo selección obtenidos en ambos marcadores muestra que no se puede descartar procesos de selección actuando sobre las poblaciones de *D. hirsuta* en Robinson Crusoe. Sin embargo, el flujo génico logra equilibrar el efecto de la deriva y la selección, en la mayoría de las poblaciones de *D. hirsuta*, por lo que no se rechaza la hipótesis II, ya que los procesos micro-evolutivos neutrales tienen un mayor efecto sobre la diversidad genética de las poblaciones de esta especie.

Los resultados entregan valiosa información para la elaboración de futuros planes de manejo de *D. hirsuta* en la isla Robinson Crusoe. El estado genético particular de cada una de poblaciones de *D. hirsuta* considerando los valores de diversidad y estructura genética entregan datos sobre parámetros genéticos como los altos valores de riqueza genética que posee Puerto Inglés, pese a que en terreno presenta una severa degradación, además esta población muestra los valores más altos de tamaño efectivo poblacional. Otro ejemplo son los bajos valores de N_e de las poblaciones de La Campana, Piedra Agujereada y Salsipuedes, esta última con características particulares como altos valores de diversidad genética, lo que indica que esta población podría estar siendo sometida a procesos de deriva génica.

5.1 Diversidad y estructura genética

Para ambos marcadores los valores de diversidad genética de los distintos parámetros los valores promedio son levemente mayores y significativos en la especie parental *D. glechomoides*, tanto para los resultados neutral como *outliers*, esto es un patrón

concordante con el estudio realizado en el archipiélago Juan Fernández con la especie *Rhaphitamnus venustrus* (derivada de la especie continental *R. spinosus*), la cual posee menores valores de diversidad genética promedio en la isla ($H_e = 0,17$) en comparación a los valores promedio de la especie parental ($H_e = 0,42$), producto de un tipo de reducción secundaria de la diversidad genética, explicada por la disminución en tamaño geográfico de la isla, debido a procesos naturales como erosión o intervención humana, lo que resultaría en la extinción y contracción de poblaciones, con una pérdida de la diversidad genética a través de procesos como endogamia y deriva génica en poblaciones pequeñas (López-Sepúlveda *et al.*, 2016).

Estos resultados no concordarían con la base del proceso de especiación anagenético, en donde la especie insular es originada a partir de un único evento fundador (Takayama *et al.*, 2015b). Si bien la norma y la mayoría de la evidencia sugiere un sólo origen para las especies endémicas que habrían derivado mediante anagénesis, existen pocas excepciones, como lo encontrado en especies como *Rubus takesimensis* (Rosaceae; Lee *et al.*, 2017) y *Scrophularia takesimensis* (Scrophulariaceae; Gil *et al.*, 2020) que habrían colonizado desde variadas localidades geográficas la isla Ulleung. Cabe destacar que estas especies poseen un hábito de tipo herbáceo, con baja dispersión de semillas y reproducción de tipo vegetativa, los resultados de estos estudios concuerdan con los valores obtenidos para *D. hirsuta*.

En general los patrones de estructura genética que se presentan en las especies insulares derivadas mediante anagénesis como *Nothomyrcia fernandeziana*, *Rhaphitamnus venustrus*, *Dystaenia takesimana* y *Acer takesimense* muestran que no existe una evidente estructuración y división geográfica de la variación genética entre

las poblaciones dentro de las islas (Pfosser *et al.*, 2006; Takayama *et al.*, 2013; López-Sepúlveda *et al.*, 2014, 2016). Sin embargo, en las poblaciones de *D. hirsuta* en isla Robinson Crusoe se observa un claro patrón de estructuración cuando se analiza mediante marcadores ALFP, esta separación de las poblaciones de *D. hirsuta* en dos grupos genéticos en Robinson Crusoe podría ser la evidencia de dos eventos de colonización independientes (Clegg *et al.*, 2002), originados desde propágulos provenientes de distintas poblaciones geográficas del continente. Este patrón también se observa en Isla Ulleung con la especie derivada mediante anagénesis *Rubus takesimensis*, donde los resultados obtenidos mediante el análisis de genes cloroplastidial, indican que el origen de *R. takesimensis* fue debido a la colonización de varias poblaciones de origen continentales con distribuciones geográficamente diversas (Yang *et al.*, 2019).

La evidencia que existen dos eventos de colonización independiente se observa en la presencia de distintos grupos genéticos (Clados) en el continente que se relacionan de forma independiente con los grupos encontrados en la isla (Figuras 4 y 6). Estos resultados evidencian los dos eventos de colonización independientes, los cuales se ven respaldados por: (1) Los resultados encontrados por Castro (2018) basados en secuencias de nucleótidos, donde se establece que probablemente la colonización del género en el Archipiélago de Juan Fernández fue a partir de uno o varios individuos provenientes de Chile central, más específicamente desde la cordillera Nahuelbuta (Clado D). (2) los resultados de esta tesis muestra la población continental de Coyahique muy relacionado con un grupo de poblaciones de la isla Robinson Crusoe, ya que comparte gran parte del pool génico de la isla, esta zona además posee junto a

la población de Nahuelbuta los mayores valores de diversidad genética, esto podría reflejar el potencial rol de refugio para la zona de Coyahique, siendo uno de los lugares más ancestrales que dieron origen a poblaciones de la especie insular, lo que concuerda con antecedentes presentados para una gran diversidad de plantas vasculares como *Hypochaeris palustris* (Phil.) De Wild, *H. incana* (Hook & Arn), *Podocarpus nubigena* (Lindl.) F.Muell y *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser (Muellner *et al.*, 2005; Tremetsberger *et al.*, 2009; Quiroga y Premoli, 2010; Mathiasen y Premoli, 2010), donde se aprecian patrones de diversidad y estructura genética similares a los encontrados en este grupo y en donde se reconocen potenciales áreas refugio en esta zona que se establecieron desde el cuaternario en el extremo sur de Chile (Sérsic *et al.*, 2011)

5.2 Procesos Micro-evolutivos que modelan la diversidad genética en *D. hirsuta* en la isla Robinson Crusoe



Los resultados de diversidad y estructura genética muestran que los procesos de tipo neutrales son los principales actores que modelan la diversidad genética dentro de la isla. Como se desarrolla más adelante, la presencia de flujo génico histórico estaría compensando los efectos de la deriva que se estaría presentando en algunas poblaciones.

En primer lugar al comparar los resultados de diversidad genética para ambos marcadores con matrices neutrales y *outlier* dan cuenta que no se puede descartar la selección en algunas poblaciones de la isla, sin embargo la predominancia significativa de los valores en los parámetros genéticos (%P, H_e) que se registran en la matriz

neutral en relación a los obtenidos en las matrices *outlier*, lo que indica que los procesos de tipo neutrales estarían primando sobre la selección (Luikart *et al.*, 2003). Cabe mencionar también que en ambos marcadores las poblaciones que poseen una mayor diversidad genética serían los sectores en los cuales aún permanecen los bosques originales de Robinson Crusoe, los que presentan en general una composición arbórea similar con un dosel superior de *Nothomyrcia fernandeziana*, e individuos emergentes de *Fagaria mayu*, asociada a condiciones de mayor cobertura y humedad (Vargas, 2004; Alarcón *et al.*, 2019), otorgándoles a estos sectores características de bosques relictuales, los cuales son importantes para la realización en estudios de conservación.

La estructura genética intra-poblacional medida en términos del coeficiente de endogamia F_{is} , el cual establece comparaciones entre individuos de una misma población (Wright, 1965; Zhivotovsky, 2013), muestra que en la matriz neutral para marcadores SNP, los valores son positivos y cercanos a cero lo que es reflejo de poblaciones en equilibrio de H-W con una leve tendencia a mayor presencia de heterocigotos (Tong *et al.*, 2020), sin embargo la única población que posee valores negativos es Puerto Inglés, por lo que se le atribuye a que esta población estaría siendo sometida a procesos de deriva génica. En tanto los *loci outliers* presenta valores cercanos a cero, pero negativos, si bien están en equilibrio de H-W denotan una leve influencia de selección (Özdemir y Cassandro, 2017), lo que es concordante con el tipo de dato, potenciales *loci* bajo selección.

Los resultados de los análisis de los valores de las AMOVA nos dan cuenta en general que el porcentaje de la distribución de la varianza genética es diferente entre los marcadores, siendo mayor el porcentaje de varianza para SNP entre poblaciones en

ambas matrices neutrales y *outlier* (59% y 55%, respectivamente) que en AFLP (31% y 39%, respectivamente). En SNP se aprecia que ambas matrices superan el 50% de la variación de la especie. Los factores que pueden explicar el mayor porcentaje de variación entre poblaciones son: el hábito herbáceo debido a que poseen tiempos generacionales mucho más cortos en comparación con especies de hábito leñoso (Hamrick y Gogt, 1996). Patrones similares de la distribución de la varianza se han detectado en isla Ulleung con la especie *Rubus takesimensis* (Yang *et al.*, 2019), donde el porcentaje de la varianza entre poblaciones es del 57%.

La estructura genética y los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones muestran que existe flujo génico histórico entre las poblaciones que constituyen el cluster 2 (Figura 10), el cual está representado en todos los gráficos de estructura para *D. hirsuta* independiente del marcador y la matriz, siendo constante las mismas poblaciones representadas en dicho cluster. En tanto se podría hipotetizar la separación del resto de las poblaciones en distintos grupos genéticos podría estar evidenciando la influencia de deriva génica mediada por cuello de botella genético y/o selección.

En el PCoA basado en distancias genéticas entre individuos, podemos evidenciar claramente el grado de diferenciación genética entre las poblaciones dentro de la isla para la matriz neutral mediante marcador SNP (Figura 7C). Para el resto, si bien evidencian con mayor o menor grado de diferenciación la separación de las poblaciones, estas no son del todo claro, exceptuando los resultados de la matriz neutral AFLP (Figura 7B). El agrupamiento observado en los gráficos de PCoA coinciden con los patrones de estructura genética obtenidos para ambos marcadores en las matrices neutrales.

Los bajos valores de tamaño efectivo poblacional (N_e) reportados evidencian el efecto de la deriva genética en Salsipuedes, Piedra Agujereada y La Campana. A pesar de que la pérdida de variabilidad genética se rige por el tamaño efectivo poblacional (Dlugosch y Parker, 2008), se evidencia que la población de Salsipuedes logra mantener la variabilidad genética a pesar de no poseer grandes valores de N_e , por tanto, se atribuye exclusivamente al flujo génico histórico como responsable de la diversidad en dicha población. Contrario es el caso de La Campana y Piedra Agujereada que poseen menores valores de diversidad genética, lo que supone un evento fundador, un cuello de botella en el tamaño de la población, un crecimiento gradual en el tamaño de la población, una inmigración o un evento de hibridación en el pasado o cualquier combinación de estos eventos (Wang, 2005, 2009). De las nueve poblaciones estudiadas, dos de ellas Mirador Selkirk y Puerto Inglés presentaron los mayores valores de tamaño poblacional efectivo (N_e). Mirador Selkirk es una población que conserva su hábitat original, al igual que Puerto Inglés, pese a ser una población altamente degradada (CONAF, 2014). En ambas poblaciones se registra la presencia de especies como *Fagara mayu* y *Nothomyrcia fernandeziana* (Vargas y Bannister, 2003), que les confieren un carácter relictual, esto explicaría los altos valores de diversidad genética registrados para Mirador Selkirk y Puerto Inglés. Existe evidencia que fragmentos de pequeño tamaño que conservan la riqueza de especies de bosques ancestrales de mayor envergadura, las cuales han sido afectados por fragmentación de hábitat, pueden albergar niveles altos de diversidad genética comparados con fragmentos de mayor tamaño pero que poseen una menor riqueza de especies (Fuentes *et al.*, 2017).

Por tanto, el efecto del flujo genético histórico estaría compensando el posible efecto de la deriva genética originada por la reducción de tamaño poblacional (Ellstrand y Schierenbeck, 2000) especialmente en Puerto Inglés. Los resultados de N_e dan cuenta que las localidades de Mirador Selkirk y Plazoleta el Yunque poseen valores similares en aporte de alelos efectivos. Un caso particular es lo que sucede con Rebaje la Piña, donde se aprecia valores altos de N_e , lo que indicaría que posee un gran aporte de alelos. Interesante es el caso de La Campana, población que posee un pool génico que se comparte con el resto de las poblaciones, además es una de las poblaciones más prístinas de la isla (CONAF, 2014), conservando el hábitat original, posee patrones de diversidad genética bajos, con una alta estructuración genética y el menor valor de tamaño efectivo poblacional registrado en este estudio, lo cual hace suponer un fuerte efecto de deriva génica en esta población no compensado por el flujo génico histórico. Los resultados de esta tesis muestran que los procesos de tipo neutrales principalmente el flujo génico histórico son los actores que modelan la diversidad genética en la especie anagenética *D. hirsuta*. Sin embargo, en esta tesis no se evalúa el flujo génico actual y sus efectos en la diversidad genética a largo plazo. Se muestra además el efecto de deriva génica que presentan algunas poblaciones, lo que sería el reflejo de la fragmentación reciente de hábitat que presenta la especie dentro de la isla. El flujo génico histórico aun compensa este efecto en la mayoría de las poblaciones, sin embargo, se sugiere realizar futuros estudios que permitan determinar el flujo génico actual y analizar las señales de selección detectadas en esta tesis y su efecto en la diversidad y estructura genética de *D. hirsuta*.

5.3 Implicancias para la conservación

Es conocida la importancia de la diversidad genética en el fitness de las especies, es así como valores bajos de diversidad disminuyen el fitness lo que incrementa el riesgo de extinción (Reed y Frankham, 2003). Los resultados de esta tesis permiten visualizar el estado genético de las poblaciones de *D. hirsuta* en la isla Robinson Crusoe, proporcionando valiosa información sobre la distribución de la diversidad genética, así como también los patrones de estructuración genética de la especie lo que en conjunto permite delimitar unidades de conservación dentro de la isla Robinson Crusoe para esta especie.

La estructura genética detectada en *D. hirsuta* con ambos marcadores no entrega un patrón claro sobre la separación de la especie en grupos genéticos particulares, sin embargo, en todas las matrices evaluadas se observa que:

- 1) Las poblaciones de Mirador Selkirk y Plazoleta Yunque conforman una única unidad genética, ambas poblaciones presentan además altos valores de diversidad genética en todos los parámetros evaluados para la determinación de unidades de conservación obtenidos con los marcadores SNP en ambas matrices (neutral y *outliers*), confirmando el valor de bosques bien conservados (Vargas *et al.*, 2010)
- 2) La población de Salsipuedes presenta los mayores valores de diversidad genética en todos los parámetros evaluados para la especie *D. hirsuta* SNP en ambas matrices (neutral y *outliers*). Este resultado también se ha observado con otras especies como *Rhaphithamnus. venustrus* y *Drymis confertifolia* (López-Sepúlveda *et al.*, 2014, 2016). Por lo tanto, esta población muestra una singularidad genética, con altos valores de

diversidad, la formación de un único grupo genético, además de presentar información genética única posee un bajo valor de tamaño efectivo poblacional (N_e), lo que se le atribuye al efecto de deriva genética.

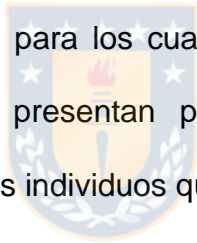
3) La población de La Campana presenta un alto número de bandas privadas, los menores valores de H_e y los más altos valores de F_{ST} entre pares de poblaciones, lo cual puede dar cuenta de aislamiento y altos niveles de endogamia entre los individuos de esta población (Wang, 2009). Si se considera además que La Campana es una de las poblaciones que exhibe bajos valores de tamaño efectivo poblacional (N_e) y por ende evidencia de un fuerte efecto de deriva genética, la diversidad genética de esta población está en riesgo ya que tendera a ver reducida su diversidad genética debido a los procesos micro-evolutivos que presenta.

4) Otra población que exhibe singularidades genéticas importantes es Puerto Inglés, la cual pese a poseer un deteriorado estado de conservación (observaciones de campo) en términos del número de individuos, posee altos valores de diversidad genética y tamaño poblacional efectivo (N_e). Mostrando además en los análisis de estructura genética la presencia de múltiples genotipos, lo que podría dar de su estado de población relictual.

De esta forma se propone considerar de manera prioritaria las poblaciones antes mencionadas, Mirador Selkirk, Plazoleta Yunque, Salsipuedes, La Campana y Puerto Inglés, en el desarrollo de estrategias de conservación para la especie, para ello se delimitan tres Unidades de Conservación (**UC**), la primera de ellas (**UC1**) conformada por: Mirador Selkirk, Plazoleta el Yunque, Puerto Inglés, Centinela Rabanal, una

segunda **(UC2)** por Vaquería, La Campana, Piedra Agujereada y Rebaje de la Piña, finalmente la tercera unidad de conservación propuesta **(UC3)** estaría constituida por la localidad de Salsipuedes. Esta delimitación facilitaría la elaboración de estrategias para la conservación genética de la especie ya que separa las singularidades genéticas que comparten distintos grupos de poblaciones.

Se sugiere considerar herramientas que incluyan la conservación de semillas de estos sitios (conservación *in situ*) y el estableciendo de planes de manejo para aumentar los niveles de variación genética de la población La Campana que incluya la incorporación de individuos procedentes de la unidad de conservación genética 2 (restauración *ex situ*). Casos particulares que requieren un monitoreo especial son las poblaciones de Salsipuedes y Puerto Inglés, que para los cuales se sugiere no alterar la dinámica poblacional que allí ocurre ya presentan patrones singulares que no afectan mayormente la conservación de los individuos que allí crecen.



6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, D., López-Sepúlveda, P., Fuentes, G., Montoya, H., Peñailillo, P., Carrasco, P. (2019). Parches invadidos por *Ugni molinae* en isla Robinson Crusoe: ¿Hay plantas nativas y endémicas capaces de vivir en ellos? *Gayana. Botánica*, 76(1), 126-131.
- Allendorf, W.F. Luikart, G. (2007). Conservation and genetics of populations. *Nature reviews Genetics*, 11, 697-709.
- Baldwin, B.G. Crawford, D.J. Francisco-Ortega, J. Kim, S.C. Sang, T. y Stuessy, T.F. (1998). Molecular phylogenetic insights on the origin and evolution of oceanic island plants. En: Barberab, J.C. Ortégac, J.F. Santos-Guerra, A. Marreroe, A. y Jansenf, R.K. (2000). Evolution of Endemic *Sideritis* (Lamiaceae). Macaronesia: Insights from a Chloroplast DNA Restriction. *Anales Systematic Botanical*, 25(4), 633-647.
- Bernadello, G. Anderson, G.J. Stuessy, T.F. y Crawford, D. (2006). The angiosperm flora of the Juan Fernández Archipiélago (Chile): origin and dispersal. *Canadian Journal of Botany*, 48, 1266-1281.
- Bernardello, G. y Anderson, G.J. (2018). Plant Origins and Dispersal. En: Stuessy, T. Crawford, D. López-Sepúlveda, P. Baeza, C. and Ruiz, E. *Plants of Oceanic Islands, Evolution, Biogeography, and Conservation of the Flora of the Juan Fernández (Robinson Crusoe) Archipelago* (335-353 pp). Cambridge, Cambridge University Press,

- Böhle, U.R., Hilger, H.H. y Martin, W.F. (1996). Island colonization and evolution of the insular woody habit in *Echium* L. (Boraginaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11740-11745.
- Bretting, P. K. y Widrechner, M. P. (1995). Genetic markers and plant genetic resources management. *Plant Breeding Review*, 13, 11-86
- Campbell, A.K. (2003). Save those molecules! Molecular biodiversity and life. *Journal of Applied Ecology*, 40, 193-203.
- Castro, C. Brignardello, L. y Cereceda, P. (1995). Determinación de Áreas con Riesgo Morfodinámico en San Juan Bautista, Isla Robinson Crusoe, Comuna de Juan Fernández, V región. *Revista Geográfica de Chile Terra Australis*, 40, 43-61
- Castro, S. (2017). *Relaciones de parentesco del género Dysopsis Baill. (Euphorbiaceae)* (Tesis de pregrado). Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Cereceda, P. Castro, C. Schemenauer, R. Ponce, R. y Osses, P. (1996). Comportamiento de las Precipitaciones en cinco Sectores de la Isla Robinson Crusoe durante los inviernos de los años 1992 a 1995. *Revista Geográfica de Chile Terra Australis*, 41-48.
- Clegg, S.M. Degnan, S.M. Kikkawa, J. Moritz, C. Estoup, A. y Owens, I.P.F. (2002). Genetic consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8127-8132

- CONAF (2014). Documento de Trabajo N° 103 Plan de Manejo, Parque Nacional Archipiélago Juan Fernández (83pp). Santiago, Chile, Informe CONAF.
- Crawford, D.J. (2010). Progenitor-derivative species pairs and plant speciation. *Taxon*, 59(5), 1413-1423.
- Crawford, D.J. Brauner, S. Cosner, M.B. y Stuessy, T.F. (1993). Use of RAPD markers to document the origin of the intergeneric hybrid × *Margyraciaena skottsbergii* (Rosaceae) on the Juan Fernandez Islands. *American Journal of Botany*, 80(1), 89-92.
- Crawford, D.J. Sang, T. Stuessy, T.F. Kim, S-C. & Silva, M. (1998). *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae) and *Robinsonia* (Asteraceae; Senecioneae) on the Juan Fernandez Islands: similarities and differences in biology and phylogeny. En: Soltis, D.E. Soltis, P.S. y Doyle, J.J. (1998). *Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing* (245-247 pp). Alemania.
- Danton, P. Perrier, C. y Martinez de Reyes, G. (2006). Nouveau catalogue de la flore vasculaire de l'archipel Juan Fernández (Chili). *Acta Botanica Gallica*, 153(4), 399-587.
- Davey, J.W. y Blaxter, M.L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, 9(5), 416-423.
- Dlugosch, K.M. y Parker, I.M. (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution and the role of multiple introductions. *Molecular ecology*, 17, 431-44

- Drake, D.R. Mulder, C.P.H. Towns, D.R. y Daugherty, C.H. (2002). The biology of insularity: an introduction. *Journal of Biogeography*, 29(5-6), 563-569.
- Eliasson, U.H. 1974. Studies in Galapagos Plants XIV. The genus *Scalesia* Arn. *Opera Botanica*, 36, 1-117.
- Ellstrand, N. y Schierenbeck, C. (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), 7043-7050
- Emerson, B.C. (2002). Evolution on oceanic islands: Molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Molecular Ecology*, 11(6), 951-966.
- Emerson, B.C. y Patiño, J. (2018). Anagenesis, Cladogenesis and Speciation on Islands. *Trends in Ecology y Evolution*, 33(7), 488-491.
- Evanno, G. Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Everett, M.V. Grau, E.D. y Seeb, J.F. (2011). Short reads and non-model species: exploring the complexities of next generation sequence assembly and SNP discovery in the absence of a reference genome. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 93 -108.

- Excoffier, L. Smouse, P.E. y Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-91.
- Excoffier, L. Laval, G. y Schneider, S. (2005). Arlequin (VERSION 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Frankham, R. (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland populations?. *Heredity*, 78, 311-327.
- Frankham, R. (2005). Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(4), 750-755.
- Fuentes, G. Cisternas, A. Valencia, G. Mihoc, M. Ruiz, E. Hasbún, R. Valenzuela, S. y Baeza, C.M. (2017). Diversidad taxonómica y genética del sitio prioritario Península de Hualpén, Región del Bío-Bío, Chile. Implicancias para la conservación. *Gayana Botánica*, 74(1), 94-110.
- Funk, W.C. McKay, J. Hohenlohe, P. y Allendorf, F.W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology and Evolution*, 27 (9), 489-496.
- Gil, H-Y. Maki, M. Pimenova, EA. Taran, A. y Kim, S-C. (2020) Origin of the critically endangered endemic species *Scrophularia takesimensis* (Scrophulariaceae) on Ulleung Island, Korea: implications for conservation. *Journal Plant Research*, 133, 765-782

- Givnish, T.J. Millam, K.C. Mast, A.R. Paterson, T.B. Theim, T.J. Hipp, A.L. Henss, J.M. Smith, J.F. Wood, K.R. y Sytsma, K.J. (2009). Origin, adaptive radiation and diversification of the Hawaiian lobeliads (Asterales: Campanulaceae, *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 276, 407-416.
- Greimler, J. Stuessy, T.F. Swenson, U. Baeza C.M. y Matthei O. (2002a). Plants invasions on an Oceanic Archipelago, *Biological Invasions*, 4, 73-85.
- Greimler J, Lopez-Sepúlveda, P. Stuessy, T.F. y Dirnböck T. (2002b). The vegetation of Robinson Crusoe Island (Isla Masatierra), Juan Fernández Archipelago, Chile. *Pacific Science*, 56, 263-284.
- Govaerts, R. Frodin, D.G. y Radcliffe-Smith, A. (2000). *World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)* (417-921 pp), London, Royal Botanical Garden
- Hahn, I. Römer, U. y Schlatter, R.P. (2005). Distribution, habitat use, and abundance patterns of landbird communities on the Juan Fernández Islands, Chile. *Ornitología Neotropical* 16, 371-385.
- Hajek, E. y Espinoza, G.A. (1987). Meteorología, climatología y bioclimatología de las Islas Oceánicas Chilenas. Islas Oceánicas Chilenas: Conocimiento Científico y Necesidades de Investigaciones. *Ediciones Universidad Católica de Chile*, 114, 55-83.

- Hamrick, J.L. y Godt, M.J.W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 351, 1291-1298.
- Hasbún, R. Iturra, C. Moraga, P. Wachtendorff, P. Quiroga, P. y Valenzuela, S. (2012). An efficient and reproducible for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection. *Tree Genetics y Genome*, 8(4), 925-931.
- Hill, W.G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research*, 38(3), 209-216.
- Holderegger, R. Kamm, U. y Gugerli, F. (2006). Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21, 797-807
- Jensen, R.J. Schwoyer, M. Crawford, D.J. Stuessy, T.F. Anderson, G.J. Baeza, C.M. Silva, M. y Ruiz, E. (2002). Patterns of morphological and genetic variation among populations of *Myrceugenia fernandeziana* (Myrtaceae) on Masatierra Island: implications for conservation. *Systematic Botany*, 27(3), 534-547.
- Jiménez, P. y Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 9(2), 237-248.
- Johow, F.R.A. (1896). *Estudios sobre la flora de las islas de Juan Fernández*. Santiago de Chile Editorial.

- Jorgensen, T.H. y Olesen, J.M. (2001). Adaptive radiation of island plants: evidence from *Aeonium* (Crassulaceae) of the Canary Islands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 4(1), 29-42.
- Keeley, S. y Funk, V.A. (2011). Origin and evolution of Hawaiian endemics: new patterns revealed by molecular phylogenetic studies. En: Bamwell, D. y Caujapé-Castells J. *The Biology of Island Floras* (57-88 pp). Cambridge, Cambridge University Press.
- Kingsolver, J. G. y Pfennig, D.W. (2007). Patterns and Power of Phenotypic Selection in Nature. *BioScience*, 57(7), 561-572.
- Kopp, M. (2010). Speciation and the neutral theory of biodiversity, modes the speciation affect patterns of biodiversity in neutral communities. *Bioessays*, 32, 564-570.
- Lande, R. y Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 38(6), 1210-1226.
- Lande, R. y Barrowclough, G.F. (1987). Effective population size, genetic variation, and their use in population management. En: Soule, M.E.(2010). *Viable populations for Conservation*. Cambridge University Press.
- Lee, W. Yang, JY. Jung, K-S, Pak, J-H. Maki, M. y Kim, S-C. (2017) Chloroplast DNA assessment of anagenetic speciation in *Rubus takesimensis* (Rosaceae) on Ulleung Island, Korea. *Journal Plant Biology*, 60, 163-174.

- Le Quesne, C. Donoso, C. Lara, P. y Murúa, R. (2002). *Factores Bióticos Asociados a la Regeneración del bosque de Juan Fernández* (15 pp). Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile.
- Lindhardt, M. Philipp, M. Tye, A. y Nielsen, L. (2009). Molecular, Morphological, and Experimental Evidence for Hybridization between Threatened Species of the Galapagos Endemic Genus *Scalesia* (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences*, 170(8), 1019-1030.
- Liu, H-Y. (1989). Systematics of *Aeonium* (Crassulaceae). *Special Publications of the National Museum of Natural Science (Taichung)*, 3,1-102.
- López-Sepúlveda, P. Takayama, K. Crawford, D.J. Greimler, J. Peñailillo, P. Baeza, M. Ruiz, E. Kohl, G. Tremetsberger, K. Gatica, A. Letelier, L. Novoa, P. Novak, J. y Stuessy, T.F. (2013). Genetic variation (AFLPs and nuclear microsatellites) in two anagenetically derived endemic species of *Myrceugenia* (Myrtaceae) on the Juan Fernández Islands, Chile. *American Journal of Botany*, 100, 722-734.
- López-Sepúlveda, P. Takayama, K. Crawford, D.J. Greimler, J. Peñailillo, P. Baeza, M. Ruiz, E. Kohl, G. Tremetsberger, K. Gatica, A. Letelier, L. Novoa, P. Novak, J. y Stuessy, T.F. (2014). Progressive migration and anagenesis in *Drimys confertifolia* of the Juan Fernández Archipelago, Chile. *Journal of Plant Research*, 128, 73-90.
- López-Sepúlveda, P. Takayama, K. Crawford, D.J. Greimler, J. Peñailillo, P. Baeza, M. Ruiz, E. Kohl, G. Tremetsberger, K. Gatica, A. Letelier, L. Novoa, P. Novak, J. y Stuessy, T.F. (2015). Speciation and biogeography of *Erigeron* (Asteraceae)

endemic to the Juan Fernández Archipelago, Chile, based on AFLPs and SSRs. *Systematic Botany*, 40(3), 888-899.

López-Sepúlveda, P. Takayama, K. Crawford, D.J. Greimler, J. Peñailillo, P. Baeza, M. Ruiz, E. Kohl, G. Tremetsberger, K. Gatica, A. Letelier, L. Novoa, P. Novak, J. y Stuessy, T.F.(2016). Biogeography and genetic consequences of anagenetic speciation of *Rhaphithamnus venustus* (Verbenaceae) in the Juan Fernández archipelago, Chile: insights from AFLP and SSR markers. *Plant Species Biology*, 32, 223-237.

Lozano, G. y Murillo, J. (2001). El género *Dysopsis* (Euphorbiaceae). *Caldasia*, 23(2), 419-426.

Luikart, G. England, P.R. Tallmon, D. Jordan, S. y Taberlet, P. 2003. The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetic*, 4(12), 981-994.

Martcorena, C. Stuessy, T.F. y Baeza, C.M. (1998). Catalogue of the vascular flora of the Robinson Crusoe or Juan Fernandez Islands, Chile. *Gayana Botánica*, 55, 187-211.

Mathiasen, P. y Premoli, A.C. (2010). Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular Ecology*, 19, 371-385.

- Ministerio del medio ambiente. (2014). *Quinto Informe Nacional de Biodiversidad de Chile ante el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD)* (140 pp). Santiago, Chile, Ministerio del Medio Ambiente
- Morin, P.A. Luikart, G. Wayne, R.K. y S.N.P. W.grp. (2004). SNP in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology y Evolution*, 19(4), 208-216.
- Moritz, C. (2002). Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Processes That Sustain It. *Systematic Biology*, 51(2), 238-254.
- Muellner, A.N. Tremetsberger, K. Stuessy, T.F. Baeza, C.M. (2005). Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Astraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology*, 14, 203-212.
- Muñoz, C. (1969). El Archipiélago de Juan Fernández y la Conservación de sus Recursos naturales renovables. *Boletín de la Academia de Ciencias del Instituto de Chile*, 1(2), 84-103.
- Murillo, J. Stuessy, T.F. y Ruiz, E. (2013). Phylogenetic relationships among *Myrceugenia*, *Blepharocalyx*, and *Luma* (Myrtaceae) based on paired-sites models and the secondary structures of ITS and ETS sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 299(4), 713-729.
- Nora, S. Albaladejo, R.G. González Martínez, S.C. Robledo-Arnuncio, J.J.y Aparicio, A. (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas*, 20(2), 35- 45

- Olsen, M.T. Volny, V.H. Berube, M. Dietz, R. Lydersen, C. Kovacs, K.M. Dood, R.S. y Palsbøll, J. (2011). A simple route to single nucleotide polymorphisms in a non-model species: identification and characterization of SNPS in the Arctic ringed seal (*Pusa hispida hispida*). *Molecular Ecology Resources*, 11(s1), 9-19.
- Ortiz, A. (1982). Estudio de los Recursos Físicos del Archipiélago de Juan Fernández. Instituto Nacional Recursos Naturales. Valparaíso, Chile: 116-200.
- Özdemir, D. y Cassandro, M. (2017). *Conservation of Poultry Genetic Resources in Turkey*. Conference: Prospettive del Settore Avicolo Nell'area del Mediterraneo, Fiera di Farli.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6(1), 288-295.
- Pfossen, M. Jakubowsky, G. Schlüter, P.M. Fer, T. Kato, H. Stuessy, T.F. y Sun, B-Y. (2006). Evolution of *Dystaenia takesimana* (Apiaceae), endemic to Ullung Island, Korea. *Plant Systematic and Evolution*, 256, 159-170.
- Pritchard, J.K. Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Quiroga, M.P. y Premoli, A.C. (2010). Genetic structure of *Podocarpus nubigena* (Podocarpaceae) provides evidence of Quaternary and ancient historical events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 285, 186-193.
- Raymond, M. y Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3), 248-249.

- R Development Core Team. (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
- Reed, D.H. y Frankham, R. (2003). Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*, 17(1), 230-237
- Ricci, M. (1990). Programa de conservación y recuperación de plantas amenazadas de Juan Fernández. Informe Final, 2ª etapa, Proyecto CONAF-WWF-3313, Chile. 53 pp.
- Ricci, M. (2003). Conservación ex situ de la flora endémica del Archipiélago de Juan Fernández, Chile. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 38: 14.
- Ricci, M. (2006). Conservation status and ex-situ cultivation efforts of endemic flora of the Juan Fernández Archipelago. *Biodiversity and Conservation*, 15, 3111-3130.
- Rossetto, O. Deloye, F. Poulain, B. Pellizzari, R. Schiavo, G. y Montecucco, C. (1995). The metallo-proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins. *Journal of Physiology-Paris*, 89(1), 43-50.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- Ruiz, E. Crawford, D.J. Stuessy, T.F. González, F. Samuel, R. Becerra, J. y Silva, M. (2004). Phylogenetic relationships and genetic divergence among endemic species of *Berberis*, *Gunnera*, *Myrceugenia* and *Sophora* of the Juan Fernández

- Islands (Chile) and their continental progenitors based on isozymes and nrITS sequences. *Taxon*, 53(2),321-332.
- Sanders, R.W. Stuessy, T.F. y Rodriguez, R. (1983). Chromosome numbers from the flora of the Juan Fernandez Islands. *American Journal of Botany*, 70(6), 799-810.
- Sang, T. Crawford, D.J. Stuessy, T.F. y Silva, M. (1995). ITS sequences and the phylogeny of the genus *Robinsonia* (Asteraceae). *Systematic Botany*, 20(1), 55-64.
- Schlüter, D. (2000). *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, Oxford. 288 pp. En: Kondrashov, A. 2001. A close-up look at adaptive radiation. *TRENDS in Ecology y Evolution*, 16: 264
- Seeb, J.E. PascaL, C.E. Grau, E.D. Seeb, L.W. Templin, W.D. Harkins, T. y Roberts, S.B. (2011). Transcriptome sequencing and high-resolution melt analysis advance single nucleotide polymorphism discovery in duplicated salmonids. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 335-348.
- Serrato, A. y Ramos, S. (2014). AFLP: *Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (127-147pp). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC).Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).
- Sérsic, A. N. Cosacov, A. Cocucci, A.A. Johnson, L.A. Pozner, R. Avila, L. J. y Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial

vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 475-494.

Sgrò, C.M. Lowe, A.J. y Hoffmann, A.A. (2011). Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary Applications*, 4(2), 326-337.

Skottsberg, C. (1922). The phanerogams of the Juan Fernández Islands. En: C. Skottsberg, *The Natural History of Juan Fernández and Easter Island*, (95-240pp.) (Vol. 2) Uppsala, Sweden. Botany.

Skottsberg, C. (1952). The vegetation of the Juan Fernández Islands. En: Skottsberg, C. *The Natural History of Juan Fernández and Easter Island*, (793- 959pp) (Vol.2). Uppsala, Sweden. Botany.

Stanley, M.S. (1975). A theory of Evolution above the species level. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(2), 646-650

Storz, J.F. (2005). Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology*, 14(3), 671-688.

Stuessy, T.F. (2007). Evolution on specific and genetic diversity during ontogeny of island floras: the importance of understanding process for interpreting island biogeographic patterns. En: Ebach, M.C. y Tangney, R.S. *Biogeography in a changing world* (117-133 pp). Boca Raton: CRC Press.

- Stuessy, T.F. Crawford, D.J. y Marticorena, C. (1990). Patterns of phylogeny in the endemic vascular flora of the Juan Fernandez Islands, Chile. *Systematic Botany*, 15(2), 338-346.
- Stuessy, T.F. y Ono, M. (1998). *Evolution and speciation of Island Plant*. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Stuessy, T.F. Jakubowsky, G. Salguero-Gómez, R. Pfosser, M. Schlüter, P.M. Fer, T. Sun, B-Y. y Kato, H. (2006). Anagenetic evolution in island plants. *Journal Biogeography*, 33(7), 1259-1265.
- Stuessy, T.F. Takayama, K. y López-Sepúlveda, P. (2012). Founder effects are invisible in endemic species of oceanic islands. *Journal of Biogeography*, 39(9), 1565-1566.
- Stuessy, T.F. Takayama, K. López-Sepúlveda, P. y Crawford, D.J. (2014). Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 174(3), 276-288.
- Stuessy, T.F. Crawford, D.J. López-Sepúlveda, P. Baeza, C.M. y Ruíz, E. (2018). *Plants of Oceanic Island. Evolution Biogeography and Conservation of the flora of the Juan Fernández (Robinson Crusoe) Archipelago*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Suyama, Y. y Matsuki, Y. (2015). MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports*, 5, 16963

- Takayama, K. Sun, B-Y. y Stuessy, T.F. (2013). Anagenetic speciation in Ullung Island, Korea: genetic diversity and structure in the island endemic species, *Acer takesimense* (Sapindaceae). *Journal of Plant Research*, 126(3), 323-333.
- Takayama, K. López-Sepúlveda, P. Greimler, J. Crawford, D.J. Peñailillo, P. Baeza, M. Ruiz, E. Kohl, G. Tremetsberger, K. Gatica, A. Letelier, L. Novoa, P. Novak, J. y Stuessy, T.F. (2015a). Relationships and genetic consequences of contrasting modes of speciation among endemic species of *Robinsonia* (Asteraceae, Senecioneae) of the Juan Fernández Archipelago, Chile, based on AFLPs and SSRs. *New Phytologist*, 205, 415-428.
- Takayama, K. López-Sepúlveda, P. Greimler, J. Crawford, D. J. Peñailillo, P. Baeza, M. Ruiz, E. Kohl, G. Tremetsberger, K. Gatica, A. Letelier, L., Novoa, P., Novak, J., y Stuessy, T.F. (2015b). Genetic consequences of cladogenetic vs. anagenetic speciation in endemic plants of oceanic islands. *AoB PLANTS*, 7, 102.
- Takayama, K. Crawford, D.J. López-Sepúlveda, P. Greimler, J. y Stuessy, T.F. (2018). Factors driving adaptive radiation in plants of oceanic islands: a case study from the Juan Fernández Archipelago. *Journal of Plant Research*, 131(3), 469-485.
- Tremetsberger, K. Stuessy, T.F. Guo, Y-P. Baeza, C.M. Weiss, H. y Samuel, R.M. (2003). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis*. (Asteraceae) of Andean southern South America. *Taxon*, 52(2), 237-245
- Tremetsberger, K. Urtubey, E. Terrab, A. Baeza, C.M. Ortiz, M.A. Talavera, M. König C. Temsch, E.M. Kohl, G. Talavera, S. y Stuessy, T.F. (2009). Pleistocene refugia

and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Ecology*, 18, 3668–3682.

Tong, Y. Lewis, B. Zhou, W.M. Cheng, R.M. Wang, Y. Zhou, L. Yu, D.P. Li M.D. Lin, Q. (2020). Genetic Diversity and Population Structure of Natural *Pinus koraiensis* Populations. *Forest*, 11(39), 1-12

Van Der Hammen, T. y Cleef, A. (1983). Datos para la historia de la flora andina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 56, 97-107

Vargas, R. (2004). Caracterización de los bosques originales de isla Robinson Crusoe. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales, Valdivia.

Vargas, R. y Bannister, J. (2003). Informe de práctica profesional en Isla Robinson Crusoe. Estructura de los Bosques prístinos de la isla Robinson Crusoe. CONAF V región. Valparaíso.

Vargas, R. Reif, A. y Danton, P. (2010). Los bosques de la isla Robinson Crusoe: el tesoro en peligro. *Bosque Nativo*, 45, 13-19

Vargas, R. Smith-Ramírez, C. González, C. y Fernández, M. (2014). Reserva de la Biosfera Archipiélago Juan Fernández: endemismo para la conservar. En: Moreira-Muñoz, A. y Borsdorf, A. *Reservas de la Biosfera de Chile: Laboratorios para la Sustentabilidad*, (126-143 pp) (vol. 17). Santiago. Geolibros.

Vera-Escalona, I. D'elía, G. Gouin, N. Fontanella, F.M. Muñoz-Mendoza, C. Sites, J.W. y Victoriano, P.F. (2012). Lizards on Ice: Evidence for Multiple Refugia in

- Liolaemus pictus* (Liolaemidae) during the Last Glacial Maximum in the Southern Andean Beech Forests. *PLoS ONE*, 7(11), e48358
- Vos, P. Hogers, R. Bleeker, M. Reijans, M. Van De lee, T. Hornes, M. Frijters, A. Pot, J. Peleman, J. Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids. Research*, 23(21), 4407-4414.
- Wang, J. (2005). Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transaction of Royal Society Botany*, 360, 1395-1409
- Wang, J. (2009). A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology*, 18, 2148-2164.
- Waples R. (2006). A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, 7, 167-184.
- Waples, R.S. y Do, C. (2008). LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, 8(4),753-756.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3), 395-420.
- Yamada, T. y Maki, M. (2012). Impact of geographical isolation on genetic differentiation in insular and mainland populations of *Weigela coraeensis* (Caprifoliaceae) on Honshu and the Izu Islands. *Journal of Biogeography*, 39(5), 901-917.
- Yang, J-Y. Pak, J-H. Maki, M. y Kim, S-C. (2019). Multiple origins and the population genetic structure of *Rubus takesimensis* (Rosaceae) on Ulleung Island:

Implications for the genetic consequences of anagenetic speciation. PLOS ONE.
14. e0222707.

Zhivotovsky, L.A. (2013). Relationships Between Wright's F_{ST} and F_{IS} Statistics in a Context of Wahlund Effect. *Journal of Heredity*, 106(3), 306-309.

