



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA ESPECIE ANAGENÉTICAMENTE DERIVADA
ESCALLONIA CALLCOTTIAE HOOK. ET ARN. (ESCALLONIACEAE), ENDÉMICA DEL
ARCHIPIÉLAGO DE JUAN FERNÁNDEZ, Y SU PARENTAL *ESCALLONIA VIRGATA*
(RUIZ & PAV.) PERS.**

TESIS PARA OPTAR A TÍTULO DE BIOLOGA

POR: CATALINA TORO CONCHA

PROFESOR GUÍA: PATRICIO LÓPEZ SEPÚLVEDA

Concepción, Chile 2020.

AGRADECIMIENTOS

Primero agradecer al Proyecto FONDECYT N° 1160794 por el financiamiento brindado al proyecto, a CONAF Parque Nacional Archipiélago de Juan Fernández por la ayuda en el muestreo y a la Universidad de Concepción por facilitar los espacios necesarios para el desarrollo de esta tesis.

El mayor de los agradecimientos a Dr. Patricio López por, primero que nada, permitirme trabajar un año más con él y su equipo, por su apoyo y por no dejarme rendirme en los momentos más difíciles, acogerme y ayudarme en todo este proceso. A la Dra. Glenda Fuentes por acogerme cariñosamente, por ayudarme siempre que lo necesite, siempre levantarme el ánimo con cafecito, por presionarme cuando lo necesite, por su ayuda y paciencia para poder entender conceptos y análisis. A Hellen Montoya por acompañarme en todos los momentos de crisis, antojos y depresiones. Sin este maravilloso equipo no podría siquiera haber llegado a esta instancia de la carrera y creo que no hay palabras ni agradecimientos suficientes para todo lo que hicieron por mí.

Agradecer además a Francisco Vidal, mi pareja, por el constante apoyo en el trabajo, ayudarme a redactar, a conversar y conectar ideas, por nunca dejar que me rinda dándome fuerzas para pararme y seguir.

A mis amigos por darme un espacio de respiro, relajo y escape de la tesis siempre que necesite, subiendo el ánimo o bajoneando nos todos juntos para luego agarrar fuerzas y continuar. A mis guaguas, Maya y Luz, que siempre están para darme cariño cuando más lo necesito, jugar con ellas siempre me calma y relaja.

Y por último a mi familia, a mi padre por recomendarme esta universidad para mi desarrollo, definitivamente fue la mejor decisión que he tomado. A mi madre por llevarme por el camino de la biología, desde otra área a la que a ella le hubiera gustado, pero aun así siempre apoyo mi decisión. A mis hermanos, por su cariño y amor a distancia.

Sin alguno de ustedes, esta tesis no se podría haber realizado.

Muchas gracias a todos

CONTENIDO

Agradecimientos	2
Resumen	5
Abstract.....	6
INTRODUCCIÓN	7
Pregunta de investigación:	12
Hipótesis.....	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Figura 1.....	14
Tabla 1.....	15
Figura 2.....	16
Materiales y métodos.....	17
Especies en estudio	17
Recolección de muestras	17
Extracción de ADN.....	18
Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).....	18
Análisis de datos	19
Figura 3.....	20
Figura 4.....	21
Tabla 2.....	22
Tabla 3.....	23
Resultados.....	24
Diversidad Genética	24
Divergencia Genética	25
Distancia Genética	25
Estructura Genética.....	26
Tabla 4.....	27
Tabla 5.....	29
Tabla 6.....	30
Tabla 7.....	31
Figura 5.....	31
FIGURA 6.-	32
Tabla 8.....	33
Figura 7.....	34
Figura 8.....	35
Discusión	36

Modos de Especiación y Diversidad Genética	36
Distancia Genética	38
Estructura genética	39
Implicación en la conservación.....	39
Conclusión	41
Literatura citada	42



RESUMEN

En islas oceánicas se describen dos patrones principales de especiación cladogénesis y anagénesis, el resultado final de estos procesos es una o más especies nuevas, con distintos caracteres morfológicos y genéticos en comparación con sus progenitores continentales. Estos procesos son observables en el Archipiélago de Juan Fernández, donde el 36% de las especies divergieron a través de especiación anagenética, entre ellas *Escallonia callcottiae* en isla Robinson Crusoe. Estudios previos utilizando ADN cloroplastidial señalan a *E. virgata* como la especie parental más probable en el continente. Se plantea la hipótesis que por su origen anagenético, la especie *E. callcottiae* tiene una diversidad genética levemente diferente a su parental continental *E. virgata*. El objetivo general de esta investigación fue evaluar las consecuencias genéticas de la anagénesis en la especie insular, utilizando para ello la técnica molecular de polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP). Se analizaron trece poblaciones de *E. callcottiae* y diez poblaciones de *E. virgata*, que incluyeron un total de 426 individuos, en base a seis combinaciones de partidores, obteniendo 551 bandas. Los valores de diversidad y divergencia genéticas obtenidos en *E. callcottiae* son levemente inferiores a la especie continental, confirmando el patrón de una especie anagenética, además de evidenciar un proceso reciente de colonización en isla Robinson Crusoe, similar a lo que ocurre en *Rhaphithamnus venustus*. Finalmente se propone la conservación en isla Robinson Crusoe de tres poblaciones por su alta diversidad genética, estas son Mirador de Selkirk, Ramplones y Cerro Centinela.

PALABRAS CLAVES: CONSERVACIÓN, ANAGÉNESIS, ESCALLONIACEAE.

ABSTRACT

Two main speciation patterns are described in oceanic islands cladogenesis and anagenesis, the result of these processes is one or more new species, with different morphological and genetic characteristics compared to their continental progenitors. These processes are observable in Juan Fernández Archipelago, where 36% of the species diverged through anagenetic speciation, including *Escallonia callcottiae* on Robinson Crusoe Island. Previous studies using chloroplastial DNA point to *E. virgata* as the most probable parental species on the continent. It is hypothesized that due to its anagenetic origin, *E. callcottiae* species has slightly different genetic diversity than its continental parent *E. virgata*. The general objective of this investigation was to evaluate the genetic consequences of anagenesis in the insular species, using the amplified fragment length polymorphism (AFLP) molecular technique. Thirteen populations of *E. callcottiae* and ten populations of *E. virgata* were analyzed, included 426 individuals, based on six primers combinations, obtaining 551 bands. The genetic diversity and divergence values obtained in *E. callcottiae* are slightly lower than in the continental species, confirming the pattern of an anagenetic species, in addition to evidencing a recent colonization process on Robinson Crusoe Island, similar to that seen in *Rhaphithamnus venustus*. Finally, the conservation of three populations in Robinson Crusoe Island is proposed due to their high genetic diversity, these are Mirador de Selkirk, Ramplones and Cerro Centinela.

KEYWORDS: CONSERVATION, ANAGENESIS, ESCALLONIACEAE

INTRODUCCIÓN

El Archipiélago de Juan Fernández se ubica en el océano Pacífico, a 687 kilómetros al oeste de América del Sur frente a las costas chilenas (33°40'S, 79°00'W), administrativamente pertenece a la Región de Valparaíso (Instituto Geográfico Militar 2020; Fig. 1) y está compuesto por tres islas oceánicas: Robinson Crusoe (=Masatierra), Alejandro Selkirk (=Masafuera) y Santa Clara, las dos primeras poseen 187 km de distancia entre ellas. Estas islas emergieron del fondo marino debido a actividad volcánica (Baker 1967) hace aproximadamente 5,8 millones de años (Ma) en el caso de la isla Santa Clara, 4 Ma en la isla Robinson Crusoe y 2 Ma para la isla Alejandro Selkirk (Stuessy *et al.* 1984a). El punto más alto de la Isla Robinson Crusoe es el Cerro El Yunque con una altura de 915 m s.n.m., en el caso de la Isla Alejandro Selkirk corresponde al Cerro Los Inocentes con 1.319 m s.n.m. (Baker *et al.* 1987, Stuessy 1997). El archipiélago posee un clima templado cálido, caracterizado por estaciones secas y húmedas alternadas, con temperaturas cálidas que van desde los 11,6°C a 20,4°C (Hajek & Espinoza 1987), lluvia con un promedio anual de 956 mm (Hajek & Espinoza 1987) y vientos de 32 km/h (Hajek & Espinoza 1987).

La vegetación del Archipiélago ocupa en total 9.571 ha, de estas 3.907 ha corresponde a la isla Robinson Crusoe, 1.051 ha a la isla Santa Clara y 4.613 ha en la isla Alejandro Selkirk (CONAF 2009). La isla Robinson Crusoe, al igual que la isla Alejandro Selkirk muestran usualmente pastizales en las zonas más bajas (< 150 msnm), matorrales mixtos exótico-nativos en las zonas intermedias, y formaciones boscosas endémicas en las zonas más altas (> 400 m s.n.m.) con presencia de flora particularmente única en la cumbre del cerro El Yunque. La isla Santa Clara está cubierta principalmente por pastizales nativos e introducidos, con la presencia de algunas especies endémicas singulares (Danton *et al.* 2006).

La vegetación del Archipiélago de Juan Fernández es altamente diversa por lo que se considera, en la actualidad, uno de los *hotspots* mundiales de diversidad biológica (Mittermeier *et al.* 2004), ya que posee más plantas endémicas por

kilómetro cuadrado que cualquier otro sistema insular en el mundo, con un índice de 1,4 spp/km² (Stuessy *et al.* 1992). Esto porque posee 208 especies vegetales endémicas y nativas, además de 12 géneros y 1 familia endémica (Marticorena *et al.* 1998; Danton *et al.* 2006; Rodríguez *et al.* 2018; Stuessy *et al.* 2018). En el año 1935 este archipiélago fue declarado Parque Nacional de Chile (Diario Oficial de 16 de enero de 1925) y Reserva de la Biosfera en 1977 (Diario Oficial de 1977).

El Archipiélago de Juan Fernández ha sido considerado uno de los mini-*hotspots* de biodiversidad de mayor prioridad para la conservación a nivel mundial (Arroyo *et al.* 2006; Funk & Fa 2010), esto debido a los factores que afectan a las especies, entre ellas, las perturbaciones antrópicas (Stuessy *et al.* 2014) que incluyen talas selectivas, incendios y la introducción de animales y malezas (Skottsberg 1953; IREN-CORFO 1982; Sanders *et al.* 1982; Stuessy *et al.* 1984b; Ricci 1989; Matthei *et al.* 1993; Swenson *et al.* 1997; Stuessy *et al.* 1998; Greimler *et al.* 2002; Dirnböck *et al.* 2003; H 2004; Honeyman *et al.* 2005).

Uno de los factores que influye en el alto endemismo en islas oceánicas son los patrones de especiación, se consideran dos procesos fundamentales, cladogénesis y anagénesis (Stuessy *et al.* 1990), los resultados de estos procesos de especiación no solo se observan en la diversidad morfológica de las especies, sino también en la estructura y variabilidad genética de estas (Stuessy 2007). En ambos procesos, la población fundadora, es decir, aquella que coloniza la isla oceánica, lleva consigo una pequeña muestra de la variabilidad genética total que contiene la especie progenitora, ya que estos poseen una variabilidad mucho mayor y un rango de distribución más amplio (Frankham 1997). De esta manera a lo largo del tiempo (cientos o miles de generaciones) van acumulando diferencias genéticas, ecológicas y reproductivas que diferencian a la especie de origen de una especie derivada (García 2012).

La cladogénesis se define comúnmente como el proceso donde una especie parental da lugar a dos o más especies derivadas mientras la especie parental persiste, o se extingue (Boucot & Watkins 1978). En las islas oceánicas este

proceso suele ir asociado a radiación adaptativa (Stuessy *et al.* 2018), es un proceso que ocurre en un corto periodo de tiempo y conlleva un alto nivel de cambios en los requisitos ambientales de las especies derivadas (Boucot & Watkins 1978; Schlüter 2000; Gavrillets & Losos 2009), adaptándose a las condiciones ambientales diferentes que la isla les ofrece.

Este proceso se observa en géneros como: *Lobelia* L., *Argyroxiphium* DC. y *Bidens* L. en Hawaii (Helenurm & Ganders 1985; Carlquist *et al.* 2003; Givnish *et al.* 2009), *Echium* L. en las Islas Canarias (Böhle *et al.* 1996), *Scalesia* Arn. en las islas Galápagos (Eliasson 1974; Schilling *et al.* 1994), y en el Archipiélago de Juan Fernández destacan tres géneros que generaron especies a través de este proceso: (a) *Erigeron* L. con seis especies, de las cuales cinco se distribuyen en la Isla Alejandro Selkirk (*E. ingae* Skottsbo., *E. luteoviridis* Skottsbo., *E. rupicola* Phil., *E. stuessyi* Valdeb. y *E. turricola* Skottsbo.); (b) *Gunnera* L. con dos especies distribuidas en la Isla Robinson Crusoe (*G. peltata* Phil. y *G. bracteata* Steud. ex Benn); y (c) *Robinsonia* DC. con ocho especies, siete distribuidas en la Isla Robinson Crusoe (*Robinsonia berteroi* (DC.) Sanders, Stuessy & Martic., *R. evenia* Phil., *R. gayana* Decne, *R. gracilis* Decne, *R. macrocephala* Decne, *R. saxatilis* Danton y *R. thurifera* Decne) (López-Sepúlveda *et al.* 2015a; Takayama *et al.* 2015). El resultado son nuevas especies insulares que poseen un bajo nivel de variación genética con respecto a la especie parental, sin embargo, no hay estudios de diversidad genética que incluya a la especie parental, debido a las dificultades que conlleva la identificación de esta. La mayoría de las investigaciones se centra solo en las especies isleñas, un ejemplo, en el caso de *Bidens* en Hawaii, en términos de heterocigosidad, los valores en las especies isleñas variaban entre 0,075 y 0,137, siendo este último el valor más alto (Helenurm & Ganders 1985).

La anagénesis o especiación filética (Simpson 1953), es un proceso en el cual el linaje de inmigrantes provenientes desde el continente u otro sistema insular, se establece en la isla, manteniéndose como una sola gran población que lentamente acumula variación genética a través de la mutación y la recombinación en forma de deriva génica y/o selección natural. El resultado final de este proceso es una nueva

especie con distintos caracteres morfológicos y genéticos en comparación con su progenitor continental o insular. A pesar de esto, en términos de variabilidad genética, los valores de la especie insular se aproximan a los de la especie progenitora (Stuessy *et al.* 1990, 2006), esto es observable en especies de diversas islas, por ejemplo, en el género *Dystaenia* Kitag. y *Acer* L. en la isla Ullung (Takayama *et al.* 2012, 2013), donde *Acer takesimense* Nakai, posee valores de heterocigosidad levemente inferiores (0,38) con respecto a la especie continental, *A. pseudosieboldianum* (Pax) Kom. (0,40) (Takayama *et al.* 2013), o el caso de *Rhaphithamnus* Miers donde los valores de diversidad genética (H_e) fueron menores en la especie isleña, *R. venustus* (Phil.) B.L.Rob (0,17), respecto de aquella del continente *R. spinosus* (Juss.) Moldenke (0,42) (López-Sepúlveda *et al.* 2017). En el Archipiélago de Juan Fernández, un 36% de las especies vegetales derivaron a través de anagénesis (Stuessy *et al.* 2006; Tabla 1) como es el caso de *Myrceugenia schulzei* Johow, *Drimys confertifolia* Phil. y *Rhaphithamnus venustus* (López-Sepúlveda *et al.* 2013, 2015b, 2017), las cuales han sido ampliamente estudiadas.

Los patrones y procesos de especiación en las islas oceánicas han sido estudiadas largamente principalmente por los biólogos evolutivos (Drake *et al.* 2002; Rosindell & Phillimore 2011; Schaefer *et al.* 2011; Stuessy & Ono 1998). El gran conocimiento que se tiene de las islas oceánicas, como sus zonas de origen, edades geológicas, además de su aislamiento geográfico, área claramente delimitada y fauna y flora con hipótesis de su origen y diversificación más acotados a los continentales (Emerson 2002), ha llevado a que las islas oceánicas sean consideradas laboratorios naturales para el estudio de los procesos evolutivos en detalle, especialmente para el estudio genético, ecológico, biogeográfico, divergencia reproductiva y morfológica (Moore *et al.* 2002; Mort *et al.* 2002). Se han generado numerosas hipótesis sobre estudios comparativos entre taxones endémicos y las poblaciones de origen, hipótesis evolutivas sobre los procesos de especiación que se pueden probar con datos moleculares (Carlquist 1974; Grant *et al.* 1996; Stuessy *et al.* 2006).

Una de las técnicas moleculares mayormente usada en la evaluación de la variación genética es el análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés). Esta técnica requiere pequeñas cantidades de ADN (Blears *et al.* 1998), pero proporciona información de un gran número de loci, siendo una medida sensible de la variación genética entre individuos (Vos *et al.* 1995; Tremetsberger *et al.* 2003; Gaudoul *et al.* 2012). Se ha demostrado que también es útil en genética de poblaciones y en estudios de especies raras y en peligro de extinción (Juan *et al.* 2004; Maunder *et al.* 2001; Winfield *et al.* 1998). En el archipiélago de Juan Fernández se ha utilizado en diversas especies originadas por anagénesis como, por ejemplo, *Myrceugenia schulzei*, *Drimys confertifolia* y *Rhaphithamnus venustus* (López-Sepúlveda *et al.* 2013, 2015b, 2017; Fig. 2).

Otra especie endémica de la Isla Robinson Crusoe, apropiada para estudiar las consecuencias genéticas de la especiación anagenética es *Escallonia callcottiae* Hook. et Arn. Esta especie presenta problemas de conservación y se encuentra categorizada como Vulnerable por el Ministerio de medio Ambiente según el Reglamento de Clasificación de Especies Silvestres (RCE). *E. callcottiae* pertenece a la familia Escalloniaceae, la cual, en América del Sur, cuenta con aproximadamente 40 especies y 20 subespecies (Sleumer 1968), las que se distribuyen principalmente en hábitats montañosos (Young *et al.* 2002), desde norte de Venezuela hasta los extremos de Tierra del Fuego. Las especies pueden estar presentes a partir del nivel del mar en el sur del país hasta 4.000 m s.n.m. en el límite arbóreo en los Andes (Zapata *et al.* 2013). El género *Escallonia* Mutis ex L.f. posee 147 especies a nivel mundial siendo el género más diverso de la familia Escalloniaceae. En Chile, el género se encuentra representado por 14 especies y 11 variedades (Rodríguez *et al.* 2018).

Las relaciones filogenéticas de *Escallonia* en Sudamérica fueron analizadas por Sede *et al.* (2013, 2018), utilizando marcadores de ADN cloroplastidial (*trnS-trnG*, *trnV-ndhC*, *ndhF*, *trnH-psbA*, *trnS-trnG* y *trnV-ndhC*), encontrando que la mayoría de las especies del sur de los Andes se agrupan en un clado (clado B),

excepto *E. virgata* (Ruiz & Pav.) Pers. y *E. callcottiae*, que formaron un clado separado (clado D), que permitiría considerar a la primera de ellas como la especie más emparentada con aquella que habita en la isla Robinson Crusoe.

A partir de este panorama se hace necesario generar información que permita conocer la diversidad genética actual de especies de plantas vasculares, la cual puede ser utilizada en el desarrollo de planes de conservación para la flora endémica de las islas del Archipiélago de Juan Fernández. La protección de la diversidad está incorporada en muchas convenciones nacionales e internacionales (Moritz & Faith 1998) y el estudio de la variación genética, es ampliamente reconocido como una forma utilizada para la evaluación de la diversidad (Ehrlich & Wilson 1991; Humphries *et al.* 1995).

Por esto, en base a lo planteado se presenta la siguiente hipótesis:

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

- ¿Cuáles son las consecuencias en la diversidad genética de la especiación anagenética en *Escallonia callcottiae* en la isla Robinson Crusoe?

HIPÓTESIS

- Debido a su origen anagenético, la especie *Escallonia callcottiae* tiene una diversidad genética levemente diferente a su parental continental *Escallonia virgata*.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar las consecuencias genéticas de la especiación anagenética en la especie *Escallonia callcottiae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la diversidad genética de la especie *Escallonia callcottiae* en Isla Robinsón Crusoe con su parental *E. virgata* en el continente.
- Comparar la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones, tanto de *E. callcottiae*, como en las poblaciones de *E. virgata* en el continente.

- Evaluar la estructuración genética en *Escallonia callcottiae* en la isla Robinson Crusoe.
- Evaluar y recomendar áreas para la conservación de *Escallonia callcottiae* en la isla Robinson Crusoe.



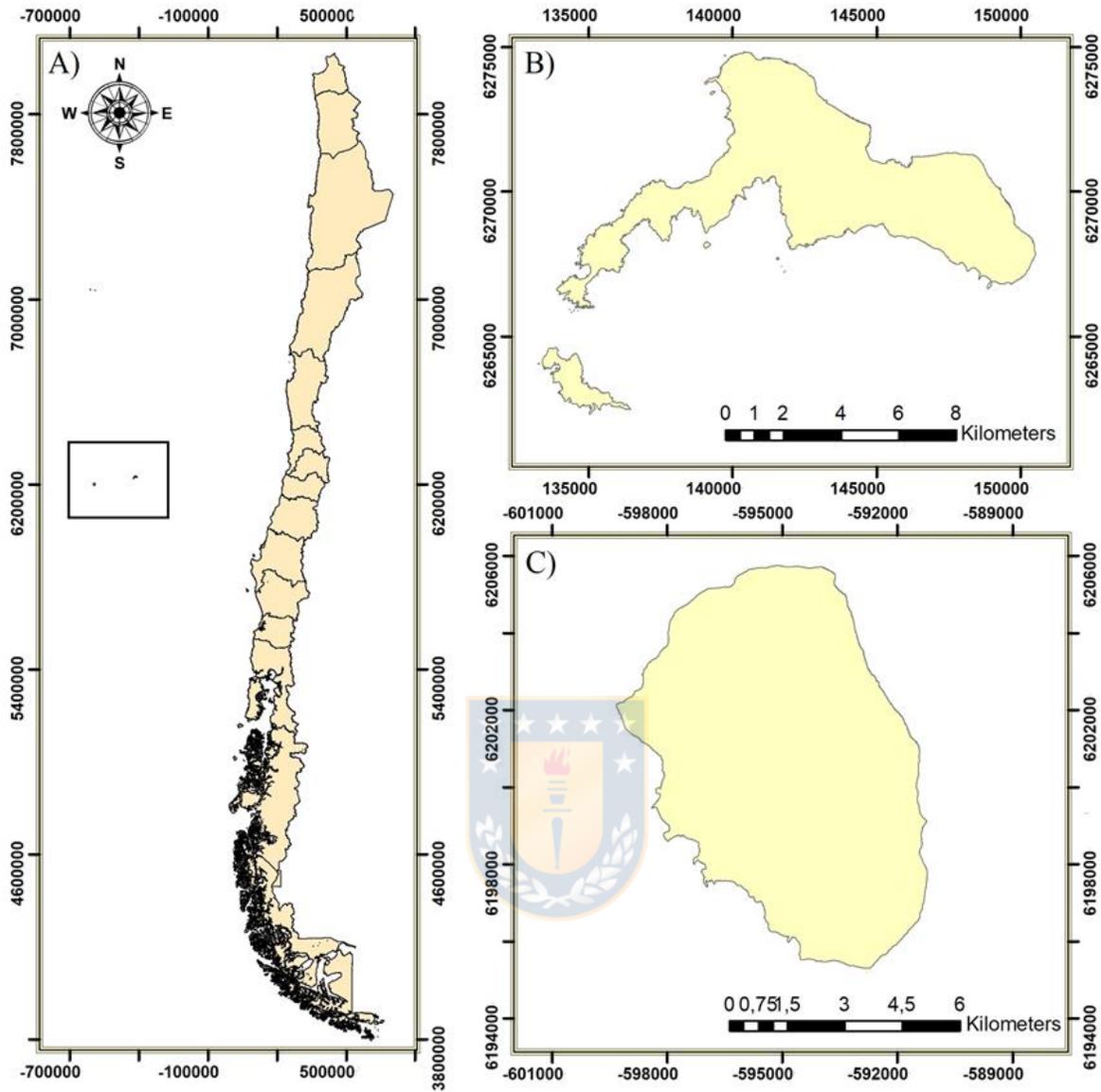


FIGURA 1.- Ubicación y conformación del Archipiélago de Juan Fernández. A) Ubicación del Archipiélago de Juan Fernández con respecto al continente. B) Isla Robinson Crusoe y Santa Clara. C) Isla Alejandro Selkirk.

TABLA 1.- Características del sistema de islas, heterogeneidad de la vegetación, número de especies endémicas y nivel de especiación a través de Anagénesis y Cladogénesis. (Fuente: Stuessy *et al.* 2006.)

Sistema insular	Número de islas	Heterogeneidad vegetación	Número de especies endémicas	Especiación anagenética (%)	Especiación cladogenética (%)
Oceánicas					
Hawái	8	6	828	7	93
Canaria	7	6	429	16	84
Tristán de Cunha	4	3	27	33	67
Juan Fernández	3	5	97	36	64
Cabo verde	12	2	68	37	63
Galápagos	16	4	133	43	57
Madeira	3	3	96	48	52
Ogasawara	12	3	118	53	47
St Helena	1	2	36	53	47
Ullung	1	2	33	88	12

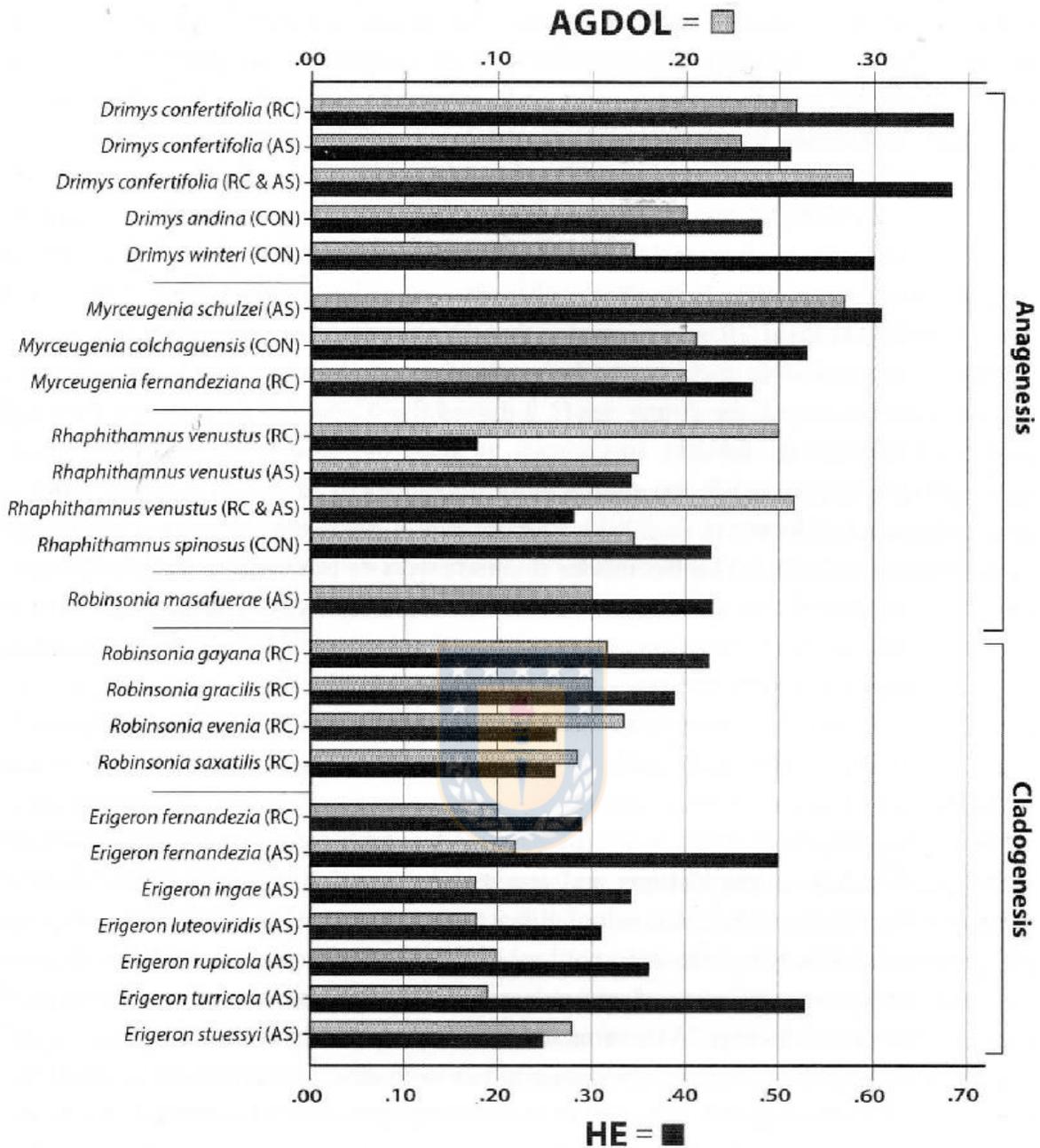


FIGURA 2.- Resumen de los valores de diversidad genética (AGDOL) y heterocigosidad (He), dentro de los géneros derivadas a través de anagénesis y cladogénesis en el Archipiélago de Juan Fernández. (Fuente: Takayama *et al.* 2015; Stuessy *et al.* 2018).

MATERIALES Y MÉTODOS

ESPECIES EN ESTUDIO

Escallonia es un género que incluye arbustos y árboles pequeños, de hasta 6 metros de alto. En Chile hay 14 especies y 11 variedades representantes de este género (Rodríguez *et al.* 2018), las que poseen hojas simples, con bordes aserrados y varían ampliamente en forma y tamaño. Las flores son solitarias o dispuesta en inflorescencias de pocas a muchas flores. Estas últimas poseen una gran diversidad en la longitud y forma de los sépalos y la longitud de los pétalos, los cuales varían de color desde un blanco-verdoso a rosado o rojo profundo.

E. virgata es una especie arbustiva de 0,5 a 2 m de alto. Hojas glabras, más o menos lustrosas, obovado-cuneadas hasta lanceoladas, fasciculadas en número de 3-13; ápice obtuso hasta agudo, base atenuada; con borde entero a ligeramente aserrados hacia el ápice. Flores de color blanco a rosado pálido (Fig. 3), fragantes, con 5 pétalos, dispuestas en pseudoracimos frondosos. El fruto es de tipo cápsula turbinado- obovoidea, truncada y levemente costada. Se distribuye desde la Región Metropolitana hasta la Región de Magallanes y la Antártica Chilena, desde el nivel del mar hasta los 2.300 m s.n.m. (Marticorena & Rodríguez 2011).

E. callcottiae, es una especie arbustiva o árbol pequeño, de hasta 5 metros de altura, con el tronco de hasta 20 centímetros de diámetro, muy ramificado desde la base. Hojas glabras o ligeramente pubescentes a lo largo del nervio medio, elíptica a espatulado-obovadas, levemente atenuadas en la base, agudas u obtusas en el ápice; margen aserrado, especialmente en el ápice. Las flores son hermafroditas, de color rojo o rosado (Fig. 3), dispuestas en panículas laxas, con disco lobulado, pequeño. El fruto es de tipo cápsula, con cáliz y estilo persistente. Semillas numerosas (Rodríguez *et al.* 1983; Marticorena & Rodríguez 2011). Especie endémica de la Isla Robinson Crusoe, del archipiélago de Juan Fernández.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se recolectaron 426 individuos, de los cuales 224 corresponden a *E. virgata* distribuida en 10 localidades entre la Región del Maule y de la Araucanía, mientras que para *E. callcottiae* se colectaron 182 individuos, distribuidos en 13 localidades

(Tabla 3, Fig. 4). De cada localidad es almacenado un voucher, el cual fue depositado en el herbario de la Universidad de Concepción (CONC). Se recolectaron trozos de hojas de cada individuo, los que posteriormente fueron etiquetados, almacenados en bolsas de té, y guardados con sílica gel en bolsas plásticas herméticas.

EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN se extrajo de 250 mg de material de hoja seca, el que fue homogeneizado adicionando microesferas de cerámica y con posterior lisis mecánica, a una velocidad de 6 ms^{-1} durante 15 segundos en FastPrep-24 TM 5G Homogenizer. La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit DNEasy Plant Mini (Qiagen) con el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN extraído se evaluó a través de electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), la cual se visualizó usando un transiluminador UV y su digitalización se realizó mediante fotografía digital.

POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

Se utilizó la técnica molecular de AFLP implementado por Vos *et al.* (1995), con modificaciones realizadas por Hasbún *et al.* (2012). Previo a la amplificación de la totalidad de las muestras se realizó un ensayo con 27 partidores selectivos (Tabla 2), de los cuales se seleccionaron 6 combinaciones de partidores (*EcoRI*-ACA/*MseI*-CAC, *EcoRI*-ACA/*MseI*-GAC, *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTA, *EcoRI*-ACT/*MseI*-TCG, *EcoRI*-ATA/*MseI*-TCG, *EcoRI*-AGT/*MseI*-GAC), donde el partidor *Eco* fue marcado con fluoróforos FAM, VIC y NED. Los fragmentos amplificados se enviaron para su análisis al servicio de secuenciación Austral-omics de la Universidad Austral de Chile.

Los perfiles de amplificación (bandas) se interpretaron utilizando el programa GeneMarker versión 1.85 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania, E.E. U.U.). Las muestras con calibración por debajo del 90% se ajustaron manualmente. Se generó un editor de panel automático para cada partidor selectivo (Curtin *et al.* 2007) con posterior modificación manual, para esto se utilizaron los siguientes parámetros: tamaño de los fragmentos entre 120-500 pares de bases, intensidad relativa mínima y máxima para el umbral de detección de pico de 1.000 y 20.000. Para el análisis,

las matrices generadas para cada partidador selectivo (Wooten & Tolley-Jordan 2009) se combinaron en una matriz binaria de bandas (1=presencia; 0=ausencia) con el cual se estimaron los parámetros genéticos.

ANÁLISIS DE DATOS

Se estimó la diversidad genética, mediante el número de alelos efectivos para cada población (N_e), número de bandas (N_b), número de bandas frecuentes mayor o igual a 5% (N_b Freq. $\geq 5\%$), número de bandas localmente comunes mayor o igual al 25% y al 50 %, Índice Diversidad de Shannon (H) e Índice de Heterocigosidad (H_e), adicionalmente para estimar la distancia genética entre las poblaciones se incluyó un análisis de distancia de Nei por pares de poblaciones, utilizando el programa GenAlEx 6.503 (Peakall & Smouse 2006). Para evaluar la conectividad genética entre pares de poblaciones, a través de flujo génico entre ellas, se evaluó el índice de Fijación (F_{ST}) utilizando el programa ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier *et al.* 2005), con el cual también se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) que permite definir la distribución de los individuos de cada población en un eje de dos dimensiones. La determinación de la distribución de la variación dentro y entre los grupos poblacionales se realizó mediante un Test de AMOVA. Por último, para identificar poblaciones atípicas se analizó la divergencia genética de las poblaciones con el número bandas Privadas (N_b Private) utilizando el programa GenAlEx 6.503.

La evaluación de la estructura genética se estimó mediante el número de grupos genéticos (K óptimo) usando el criterio de Evanno *et al.* (2005), utilizando para ello el método de agrupamiento Bayesiano proporcionado por el software STRUCTURE Harvester (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003, 2007, Hubisz *et al.* 2009), el set de parámetros utilizado fue un burnin con 1.000 iteraciones (eliminación cada 1.000 MCMC), con un número de iteraciones después del burn-in de 100.000. Con el modelo "Admixture", asumiendo cruce entre las poblaciones y un origen con ancestro común reciente, con frecuencia de alelos correlacionados. Por último, se realizó una red NeighborNet (Bryant & Moulton 2004) en función de la distancia en el software SplitsTree4 ver. 4.10 (Huson & Bryant 2006), para ver la distribución de las poblaciones y su distancia genética.

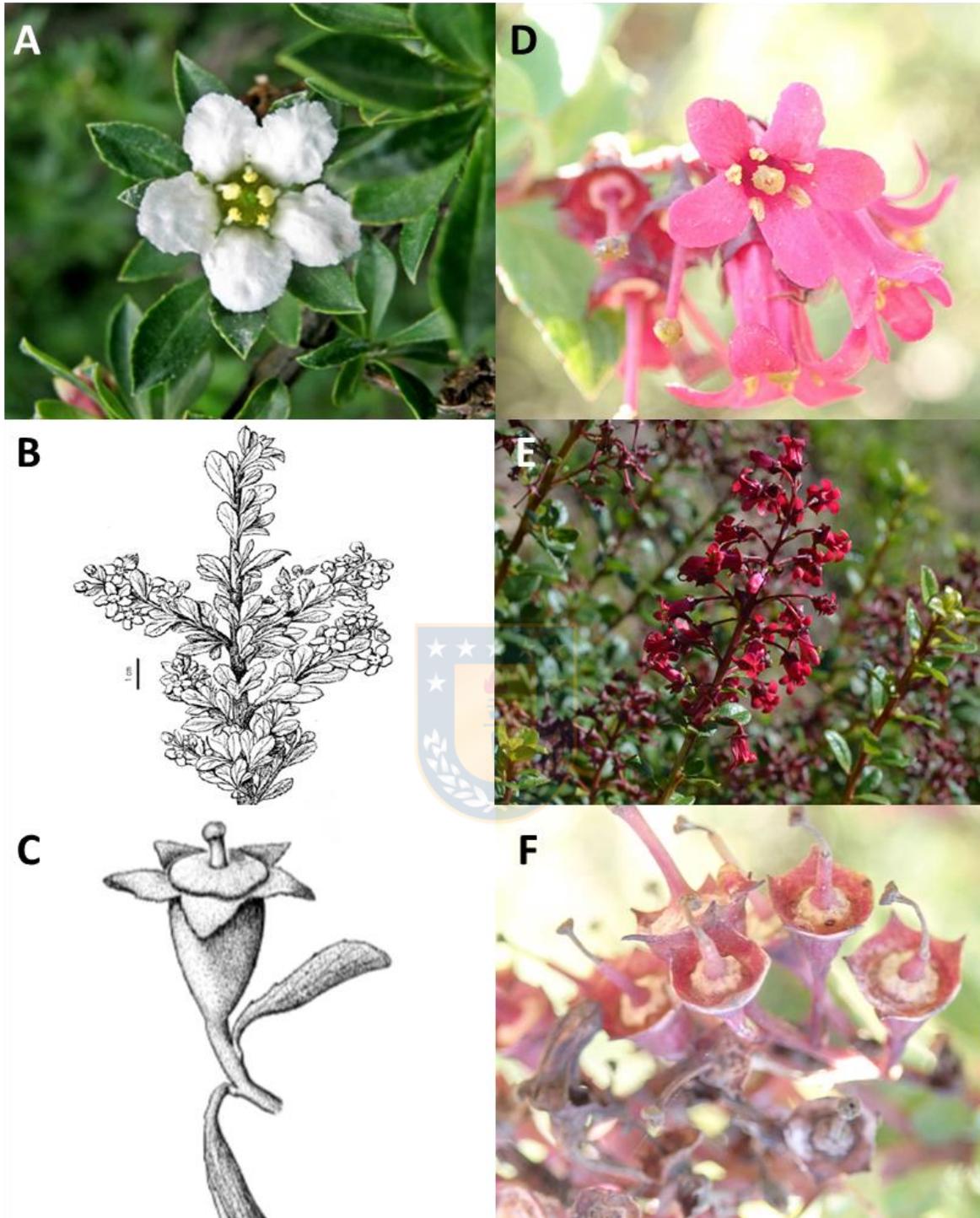


FIGURA 3.- Detalle de las inflorescencia y morfología floral de las especies *Escallonia virgata* (A, B, C) y *E. callcottiae* (D, E, F) respectivamente. A y D, color de la flor. B y E, tipo de inflorescencia. C y F, disco intraestaminal.

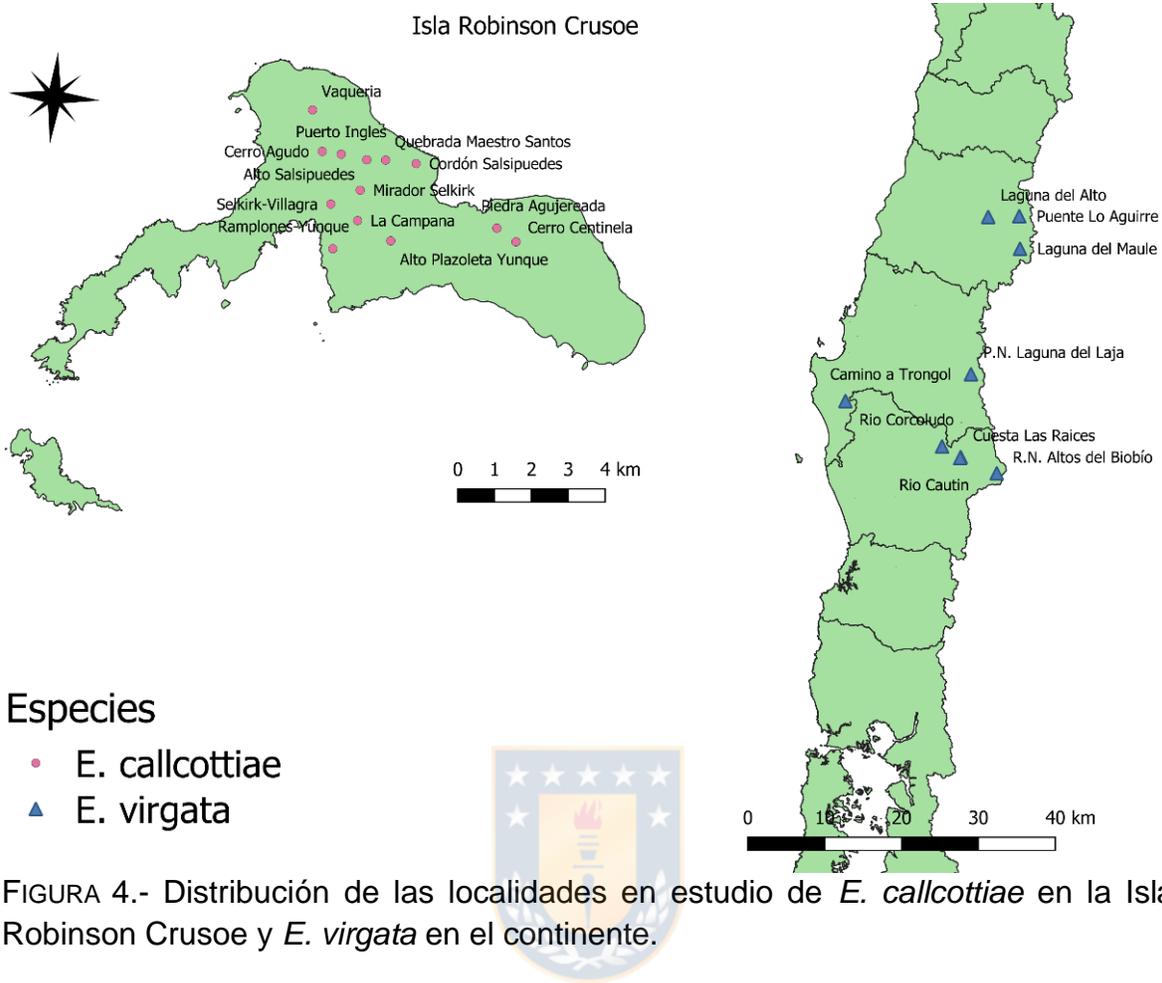


FIGURA 4.- Distribución de las localidades en estudio de *E. callcottiae* en la Isla Robinson Crusoe y *E. virgata* en el continente.

TABLA 2.- Listado con la combinación de partidores selectivos probados previo a la amplificación, se resaltan en negrita las combinaciones finalmente utilizadas.

	COMBINACIÓN	FLUORÓ-FORO		COMBINACIÓN	FLUORÓ-FORO		COMBINACIÓN	FLUORÓ-FORO
1	<i>EcoRI-AGC/MseI-AGG</i>	VIC	10	<i>EcoRI-ATC/MseI-CTC</i>	NED	18	<i>EcoRI-ATA/MseI-GAC</i>	FAM
2	<i>EcoRI-ACG/MseI-ACA</i>	VIC	11	<i>EcoRI-ACT/MseI-GAC</i>	NED	19	<i>EcoRI-ATA/MseI-CTA</i>	FAM
3	<i>EcoRI-ACA/MseI-GAC</i>	VIC	12	<i>EcoRI-ACT/MseI-CTA</i>	NED	20	<i>EcoRI-ATA/MseI-TCG</i>	FAM
4	<i>EcoRI-ACA/MseI-CTA</i>	VIC	13	<i>EcoRI-ACT/MseI-TCG</i>	NED	21	<i>EcoRI-AGG/MseI-GAC</i>	FAM
5	<i>EcoRI-ACA/MseI-TCG</i>	VIC	14	<i>EcoRI-ATC/MseI-GAC</i>	NED	22	<i>EcoRI-AGG/MseI-CTA</i>	FAM
6	<i>EcoRI-ACA/MseI-CAC</i>	VIC	15	<i>EcoRI-ATC/MseI-CTA</i>	NED	23	<i>EcoRI-AGG/MseI-TCG</i>	FAM
7	<i>EcoRI-ACA/MseI-AGG</i>	VIC	16	<i>EcoRI-ATC/MseI-TCG</i>	NED	24	<i>EcoRI-AGT/MseI-GAC</i>	FAM
8	<i>EcoRI-AGC/MseI-GAC</i>	VIC	17	<i>EcoRI-ATC/MseI-AGG</i>	NED	25	<i>EcoRI-AGT/MseI-CTA</i>	FAM
9	<i>EcoRI-AGC/MseI-CTA</i>	VIC				26	<i>EcoRI-AGT/MseI-TCG</i>	FAM
						27	<i>EcoRI-ATA/MseI-CTC</i>	FAM

TABLA 3.- Listado de las poblaciones recolectadas de *Escallonia* con su respectiva coordenadas y altitud.

N°	ESPECIE	LOCALIDAD	CÓDIGO	X	Y	ALTITUD (MSNM)
1	<i>E. callcottiae</i>	Mirador de Selkirk	RC-MS	33°38'30,47"S	78°50'44,26"O	553
2	<i>E. callcottiae</i>	Cordón Salsipuedes	RC-CS	33°37'50,94"S	78°50'06,09"O	250
3	<i>E. callcottiae</i>	Cerro Centinela	RC-CC	33°39'05,87"S	78°48'20,52"O	453
4	<i>E. callcottiae</i>	Quebrada Maestro Santos	RC-QMS	33°37'50,89"S	78°50'35,41"O	485
5	<i>E. callcottiae</i>	Plazoleta Yunque	RC-PY	33°39'0,43"S	78°50'35,21"O	274
6	<i>E. callcottiae</i>	Alto Salsipuedes	RC-AS	33°37'48,87"S	78°50'59,75"O	643
7	<i>E. callcottiae</i>	Vaquería	RC-VQ	33°37'04,68"S	78°51'56,33"O	351
8	<i>E. callcottiae</i>	Puerto Inglés	RC-PI	33°37'43,82"S	78°51'26,56"O	249
10	<i>E. callcottiae</i>	Piedra Agujereada	RC-PA	33°39'03,28"S	78°48'35,47"O	452
11	<i>E. callcottiae</i>	Villagra	RC-VG	33°38'12,73"S	78°51'28,73"O	486
12	<i>E. callcottiae</i>	Ramplones	RC-RP	33°39'06,93"S	78°51'36,31"O	159
13	<i>E. callcottiae</i>	Cerro Agudo Sitio 1	RC_CA1	33°37'41,2" S	78°51'46,5" O	340
14	<i>E. callcottiae</i>	Cerro Agudo Sitio 2	RC-CA2	33°37'41,2" S	78°51'46,5" O	387
15	<i>E. virgata</i>	Rio Cautín	CO-RC	38°26'29,3" S	71°30'45,1" O	1198
16	<i>E. virgata</i>	Cuesta Las Raíces Sitio 1	CO-CR1	38°25'50,6" S	71°30'15,4" O	1235
17	<i>E. virgata</i>	Laguna del Alto	CO-LA	35°37'14,4" S	71°01'06,8" O	2030
18	<i>E. virgata</i>	P.N. Laguna del Laja	CO-LL	37°27'41,8" S	71°19'14,4" O	1415
19	<i>E. virgata</i>	R.N. Altos del Biobío	CO-AB	38°37'49,5"S	70°58'22,0" O	1487
20	<i>E. virgata</i>	Laguna del Maule	CO-LM	36°00'09,1" S	70°34'09,0" O	2216
21	<i>E. virgata</i>	Puente Lo Aguirre	CO-PLA	35°58'11,1" S	70°34'19,6" O	1982
22	<i>E. virgata</i>	Cuesta Las Raíces Sitio 2	CO-CR2	38°25'38,26"S	71°30'16,19"O	1251
23	<i>E. virgata</i>	Rio Corcoludo	CO-CC	38°17'59,0" S	71°46'39,6" O	1019
24	<i>E. virgata</i>	Camino a Trongol	CO-CT	37°42'58,34" S	73°10'59,63"O	498

RESULTADOS

En total fueron evaluados 426 individuos con un total de 551 bandas, 102 para el marcador *EcoRI-ACA/Msel-CAC* (VIC), 87 con el marcador *EcoRI-ACA/Msel-GAC* (VIC), 77 para el marcador *EcoRI-ACT/Msel-CTA* (NED), 76 con el marcador *EcoRI-ACT/Msel-TCG* (NED), 126 para el marcador FAM (*EcoRI-ATA/Msel-TCG*) y 83 con el Marcador *EcoRI-AGT/Msel-GAC* (FAM).

DIVERSIDAD GENÉTICA

El número de alelos promedios obtenidos en *E. virgata* fue de 1,292, el valor más alto se presentó en la población CO-PLA en la Región del Maule, misma que presentó el valor más alto en términos de número de alelos efectivos junto con la población CO-LA ubicada un poco más al norte de la población anterior. La población CO-PLA, también obtuvo los valores más altos en el número de bandas localmente comunes, tanto al 25% como al 50% con un valor de 73 y 184, respectivamente (Tabla 4).

Estos valores de diversidad genética fueron superiores a los obtenidos para *E. callcottiae*, donde el número de alelos promedio fue de 0,930, con el valor más alto 1,372 en la población RC-MS, en términos del número de alelos efectivos, el promedio de la isla fue de 1,150, con la población de RC-VG presentando el valor más alto (1,231). Con respecto a las bandas localmente comunes, tanto al 25% como al 50% se repite el patrón, observándose valores inferiores a los observados en el continente, donde las poblaciones con los valores más altos son RC-MS (39, 123), RC-CS (37, 110) y RC-CA2 (39, 115) (Tabla 4).

Los valores de diversidad genética (Tabla 4) en términos de heterocigosidad de las poblaciones de *E. callcottiae* (0,099) registraron valores ligeramente inferiores a los obtenidos para la especie *E. virgata* (0,128). El índice de Diversidad de Shannon acentúa estas diferencias donde la especie isleña posee un valor de 0,163 mientras la especies continental 0,221. Las poblaciones con valores más bajos obtenidos en el archipiélago son RC-CC, RC-CS y RC-QMS.

DIVERGENCIA GENÉTICA

En el continente el número promedio de bandas privadas fue de 1,1 bandas, con un máximo de 5 en la población CO-PLA, mientras que en la isla Robinson Crusoe el promedio fue de 0,6 bandas, con el valor más alto en las poblaciones RC-PY y RC-PI (2 bandas).

DISTANCIA GENÉTICA.

El análisis de Coordenadas Principales (PCoA) (Fig. 8) muestra agrupamientos claros, con *E. callcottiae* mayormente agrupada en el cuadrante derecho, con los individuos de esta especie distribuidos mayoritariamente en la parte superior de este, y con unos pocos individuos pertenecientes a las poblaciones RC-MS y RC-RP, distribuidos a lo largo de la coordenada 2. Por otro lado, los individuos pertenecientes a *E. virgata* se encuentran distribuidas homogéneamente sobre la coordenada 2, con una zona de solapamiento entre las especies. Los ejes mostraron un porcentaje de explicación de la varianza de: eje 1= 20,67%, eje 2=7.83% y eje 3= 6,25%.

Con respecto a la distancia de Nei (Tabla 5), los mayores valores para *E. callcottiae* se encuentran entre el par de poblaciones RC-VG y RC-CA1 (0,080), mientras que para *E. virgata* ocurre entre las poblaciones CO-LA y CO-CT (0,040). Al comparar las poblaciones de ambas especies, el mayor valor encontrado es entre el par RC-PA y CO-LA (0,080).

El índice de fijación (F_{ST}) (Tabla 6), muestra los mayores valores entre pares de poblaciones en *E. callcottiae* entre RC-CS y RC-VG (0,341). Para *E. virgata* el mayor valor corresponde a las poblaciones CO-CR1 y CO-CT (0,301), finalmente al comparar entre especies, el valor más alto se encuentre entre RC-VG y CO-CT (0,452). Por otro lado, las poblaciones: RC-MS, RC-AS y RC-RP presentaron valores bajos con gran parte de las poblaciones de *E. virgata*.

Las redes de NeighborNet obtenido en SplitsTree (Fig. 7) muestra dos agrupaciones, un primer gran grupo perteneciente a *E. virgata* que incorpora un pequeño grupo de *E. callcottiae*, compuesto en su mayoría por individuos pertenecientes a la población de RC-VQ y un segundo grupo compuesto por el resto de los individuos de *E. callcottiae*.

El análisis de AMOVA (Tabla 7) muestra que las diferencias dentro de las poblaciones de ambas especies son de 82,80%, mayor a las diferencias que se presentan entre poblaciones de la misma especie con un 10,23%, mientras que los valores entre especies son de 6,97%. Los valores de fijación dieron FSC: 0,10997 ($p=0,000$), FST: 0,17200 ($p=0,000$) y FCT: 0,06969 ($p=0,00293$).

ESTRUCTURA GENÉTICA

Se estimó el número de grupos genéticos más probable entre las poblaciones, obteniendo como resultado un $K=2$ (Fig. 5). Se definió la presencia de las localidades a cada clúster, cuando los índices eran superiores a 0,500 (Tabla 8) por ende el clúster 1 (Rojo) (Fig. 6) está compuesto por casi la totalidad de poblaciones de *E. virgata* (CO-CR, CO-CR1, CO-LA, CO-LM, CO-PLA y CO-CC) y 1 población de *E. callcottiae* (RC-RP) mientras el clúster 2 (Verde) estaría mayormente representado por la especie *E. callcottiae* con 12 poblaciones (RC-MS, RC-CS, RC-CC, RC-QMS, RC-PY, RC-AS, RC-VQ, RC-PI, RC-PA, RC-VG, RC-CA1 y RC-CA2) y 4 poblaciones de *E. virgata* (CO-LL, CO-AB, CO-CR2 y CO-CT).

TABLA 4.- Análisis de diversidad genética, incluyendo número total de individuos (N), número de alelos (Na), Número de alelos efectivos (Ne), Numero de bandas (Nb), Número de bandas Frecuentes mayor o igual a 5% (Nb Freq. >=5%), Numero bandas Privadas (Nb Private), Número de bandas localmente comunes mayor o igual al 25% y al 50 %, Índice diversidad de Shannon (I), índice de Heterocigosidad (He) y Índice de Heterocigosidad esperada (uHe), para cada población, con sus respectivas media y desviación estándar.

Especie	Pop	Población		N	Na	Ne	No. Bands	No. Bands Freq. >= 5%	No. Private Bands	No. Lcomm Bands (<=25%)	No. Lcomm Bands (<=50%)	I	He	Uhe
<i>Escallonia callcottiae</i>	1	RC-MS	Mean	31	1,372	1,131	378	288	1	39	123	0,175	0,098	0,099
			Se	0	0,040	0,008							0,008	0,005
	2	RC-CS	Mean	26	1,229	1,106	339	246	0	37	110	0,146	0,080	0,081
			Se	0	0,041	0,007							0,007	0,004
	3	RC-CC	Mean	4	0,414	1,105	125	125	0	3	15	0,096	0,063	0,072
			Se	0	0,033	0,011							0,009	0,006
	4	RC-QMS	Mean	5	0,630	1,148	176	176	0	11	44	0,146	0,094	0,104
			Se	0	0,039	0,011							0,010	0,007
	5	RC-PY	Mean	6	0,777	1,155	215	215	2	15	51	0,164	0,102	0,111
			Se	0	0,041	0,011							0,010	0,006
	6	RC-AS	Mean	24	1,241	1,148	342	227	1	28	96	0,175	0,102	0,104
			Se	0	0,041	0,010							0,009	0,006
	7	RC-VQ	Mean	25	0,987	1,158	272	185	1	17	61	0,161	0,099	0,101
			Se	0	0,043	0,012							0,010	0,007
	8	RC-PI	Mean	29	1,093	1,135	301	215	2	32	99	0,157	0,093	0,094
			Se	0	0,042	0,010							0,009	0,006
	9	RC-PA	Mean	2	0,299	1,082	101	101	0	1	4	0,070	0,048	0,064
			Se	0	0,028	0,010							0,008	0,006
	10	RC-VG	Mean	6	1,000	1,231	287	287	0	22	73	0,223	0,144	0,157
			Se	0	0,042	0,013							0,011	0,007
	11	RC-RP	Mean	9	1,212	1,224	335	335	0	22	98	0,242	0,150	0,158

			Se	0	0,042	0,011					0,010	0,007	0,007		
	12	RC_CA1	Mean	3	0,623	1,155	184	184	0	14	40	0,150	0,098	0,117	
			Se	0	0,038	0,011						0,010	0,007	0,008	
	13	RC-CA2	Mean	12	1,220	1,176	336	336	1	39	115	0,208	0,123	0,129	
			Se	0	0,042	0,010						0,009	0,006	0,006	
			Mean		0,930	1,150	260,8	224,6	0,6	21,5	71,5	0,163	0,099	0,107	
<i>Escallonia virgata</i>	14	CO-RC	Mean	27	1,481	1,222	408	301	0	50	146	0,234	0,142	0,145	
			Se	0	0,037	0,013						0,010	0,007	0,007	
	15	CO-CR1	Mean	21	1,412	1,241	389	251	3	41	127	0,238	0,148	0,152	
			Se	0	0,039	0,014						0,010	0,007	0,008	
	16	CO-LA	Mean	23	1,475	1,253	407	320	0	52	146	0,260	0,161	0,164	
			Se	0	0,037	0,013						0,010	0,007	0,007	
	17	CO-LL	Mean	25	1,067	1,162	297	226	0	24	79	0,173	0,105	0,107	
			Se	0	0,042	0,011						0,009	0,006	0,007	
	18	CO-AB	Mean	18	1,205	1,158	332	332	0	26	88	0,187	0,110	0,113	
			Se	0	0,042	0,010						0,009	0,006	0,006	
	19	CO-LM	Mean	25	1,372	1,222	378	290	1	35	118	0,231	0,142	0,145	
			Se	0	0,040	0,013						0,010	0,007	0,007	
	20	CO-PLA	Mean	50	1,713	1,245	472	385	5	73	184	0,266	0,160	0,162	
			Se	0	0,030	0,013						0,009	0,007	0,007	
	21	CO-CR2	Mean	14	0,909	1,157	251	251	0	12	49	0,167	0,102	0,106	
			Se	0	0,042	0,011						0,009	0,006	0,007	
	22	CO-CC	Mean	21	1,470	1,234	405	289	0	46	139	0,243	0,149	0,152	
			Se	0	0,038	0,013						0,010	0,007	0,007	
	23	CO-CT	Mean	20	0,817	1,090	226	226	2	14	48	0,108	0,062	0,064	
			Se	0	0,042	0,008						0,007	0,005	0,005	
				Mean		1,292	1,198	356,5	287,1	1,1	37,3	112,4	0,211	0,128	0,131

TABLA 5.- Distancia genética de Nei entre las poblaciones de cada especie de *Escallonia*.

		<i>Escallonia callcottiae</i>												<i>Escallonia virgata</i>										
		RC-MS	RC-CS	RC-CC	RC-QMS	RC-PY	RC-AS	RC-VQ	RC-PI	RC-PA	RC-VG	RC-RP	RC_CA1	RC-CA2	CO-RC	CO-CR1	CO-LA	CO-LL	CO-AB	CO-LM	CO-PLA	CO-CR2	CO-CC	CO-CT
<i>Escallonia callcottiae</i>	RC-MS	0,000																						
	RC-CS	0,005	0,000																					
	RC-CC	0,042	0,044	0,000																				
	RC-QMS	0,021	0,016	0,058	0,000																			
	RC-PY	0,017	0,013	0,044	0,018	0,000																		
	RC-AS	0,008	0,009	0,026	0,024	0,016	0,000																	
	RC-VQ	0,024	0,027	0,015	0,040	0,029	0,013	0,000																
	RC-PI	0,010	0,006	0,048	0,009	0,010	0,014	0,029	0,000															
	RC-PA	0,063	0,064	0,037	0,076	0,062	0,044	0,038	0,066	0,000														
	RC-VG	0,066	0,070	0,096	0,076	0,067	0,067	0,075	0,068	0,124	0,000													
	RC-RP	0,013	0,017	0,046	0,035	0,028	0,016	0,030	0,025	0,069	0,049	0,000												
RC CA1	0,047	0,045	0,039	0,054	0,043	0,036	0,040	0,049	0,055	0,080	0,046	0,000												
RC-CA2	0,011	0,010	0,048	0,019	0,014	0,015	0,030	0,010	0,071	0,046	0,019	0,043	0,000											
<i>Escallonia virgata</i>	CO-RC	0,013	0,022	0,048	0,038	0,033	0,018	0,028	0,027	0,070	0,050	0,012	0,051	0,023	0,000									
	CO-CR1	0,020	0,032	0,054	0,048	0,042	0,025	0,034	0,037	0,077	0,058	0,018	0,062	0,033	0,006	0,000								
	CO-LA	0,024	0,035	0,053	0,053	0,045	0,028	0,034	0,041	0,080	0,052	0,017	0,060	0,034	0,008	0,008	0,000							
	CO-LL	0,015	0,023	0,034	0,036	0,032	0,014	0,024	0,027	0,056	0,069	0,022	0,039	0,025	0,018	0,023	0,026	0,000						
	CO-AB	0,005	0,008	0,034	0,025	0,021	0,006	0,020	0,015	0,054	0,061	0,011	0,036	0,014	0,011	0,020	0,022	0,011	0,000					
	CO-LM	0,012	0,022	0,046	0,039	0,033	0,017	0,028	0,028	0,067	0,053	0,013	0,046	0,022	0,009	0,013	0,014	0,013	0,011	0,000				
	CO-PLA	0,012	0,021	0,047	0,037	0,030	0,017	0,028	0,026	0,069	0,048	0,011	0,048	0,020	0,005	0,009	0,007	0,018	0,012	0,006	0,000			
	CO-CR2	0,012	0,020	0,036	0,033	0,028	0,011	0,024	0,024	0,056	0,066	0,019	0,039	0,021	0,015	0,021	0,024	0,005	0,009	0,012	0,015	0,000		
	CO-CC	0,015	0,025	0,047	0,043	0,036	0,019	0,027	0,031	0,070	0,055	0,014	0,055	0,027	0,005	0,005	0,005	0,020	0,015	0,011	0,005	0,018	0,000	
CO-CT	0,010	0,012	0,036	0,025	0,021	0,007	0,025	0,016	0,057	0,079	0,025	0,042	0,018	0,027	0,035	0,040	0,012	0,010	0,022	0,026	0,011	0,029	0,000	

TABLA 6.- Valores del Índice de Fijación (F_{ST}) entre las poblaciones de cada especie de *Escallonia*.

		<i>Escallonia callcottiae</i>												<i>Escallonia virgata</i>										
		RC-MS	RC-CS	RC-CC	RC-QMS	RC-PY	RC-AS	RC-VQ	RC-PI	RC-PA	RC-VG	RC-RP	RC_CA1	RC-CA2	CO-RC	CO-CR1	CO-LA	CO-LL	CO-AB	CO-LM	CO-PLA	CO-CR2	CO-CC	CO-CT
<i>Escallonia callcottiae</i>	RC-MS	0,000																						
	RC-CS	0,047	0,000																					
	RC-CC	0,158	0,203	0,000																				
	RC-QMS	0,129	0,099	0,264	0,000																			
	RC-PY	0,114	0,076	0,159	0,010	0,000																		
	RC-AS	0,068	0,081	0,039	0,145	0,085	0,000																	
	RC-VQ	0,207	0,246	-0,003	0,294	0,218	0,096	0,000																
	RC-PI	0,126	0,069	0,243	0,000	0,037	0,151	0,268	0,000															
	RC-PA	0,121	0,169	0,015	0,208	0,095	-0,008	0,057	0,206	0,000														
	RC-VG	0,288	0,341	0,333	0,266	0,237	0,303	0,395	0,337	0,294	0,000													
	RC-RP	0,063	0,137	0,134	0,145	0,121	0,101	0,224	0,213	0,070	0,109	0,000												
RC_CA1	0,148	0,179	0,113	0,146	0,065	0,091	0,192	0,201	0,004	0,186	0,064	0,000												
RC-CA2	0,094	0,094	0,162	0,047	0,031	0,119	0,236	0,087	0,120	0,119	0,081	0,053	0,000											
<i>Escallonia virgata</i>	CO-RC	0,090	0,195	0,185	0,213	0,198	0,139	0,227	0,242	0,145	0,207	0,021	0,156	0,161	0,000									
	CO-CR1	0,143	0,262	0,235	0,268	0,252	0,190	0,269	0,298	0,200	0,249	0,055	0,211	0,217	0,010	0,000								
	CO-LA	0,150	0,259	0,202	0,259	0,239	0,188	0,251	0,303	0,175	0,205	0,032	0,184	0,199	0,028	0,026	0,000							
	CO-LL	0,091	0,193	0,161	0,240	0,210	0,099	0,209	0,243	0,143	0,321	0,119	0,162	0,178	0,110	0,150	0,157	0,000						
	CO-AB	0,024	0,074	0,111	0,147	0,124	0,037	0,174	0,161	0,060	0,245	0,034	0,083	0,095	0,061	0,124	0,124	0,062	0,000					
	CO-LM	0,091	0,198	0,181	0,220	0,198	0,141	0,231	0,254	0,134	0,207	0,035	0,137	0,151	0,049	0,083	0,070	0,076	0,068	0,000				
	CO-PLA	0,084	0,174	0,149	0,182	0,165	0,129	0,199	0,217	0,104	0,164	0,009	0,109	0,124	0,019	0,042	0,023	0,099	0,069	0,022	0,000			
	CO-CR2	0,076	0,177	0,168	0,220	0,188	0,078	0,212	0,228	0,131	0,310	0,098	0,141	0,151	0,087	0,138	0,146	0,003	0,040	0,076	0,084	0,000		
	CO-CC	0,103	0,214	0,175	0,229	0,206	0,143	0,222	0,264	0,139	0,213	0,022	0,159	0,170	0,006	0,003	0,002	0,124	0,086	0,059	0,015	0,114	0,000	
CO-CT	0,097	0,125	0,267	0,245	0,204	0,070	0,263	0,196	0,273	0,452	0,224	0,266	0,182	0,237	0,301	0,296	0,142	0,105	0,211	0,202	0,129	0,251	0,000	

TABLA 7.- Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) para las especies *E. callcottiae* y *E. virgata*.

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de variación	Porcentaje de Variación	Índice de fijación	Valor p
Entre especies	1	1.013.743	395.237	Va 6,970	0,110	0,00000+-0,00000
Entre poblaciones dentro de cada especie	21	3.167.264	580.182	Vb 10,230	0,172	0,00000+-0,00000
Dentro de las poblaciones	403	18.923.422	4.695.638	Vc 82,800	0,070	0,00293+-0,00164
Total	425	23.104.430	5.671.058	100		

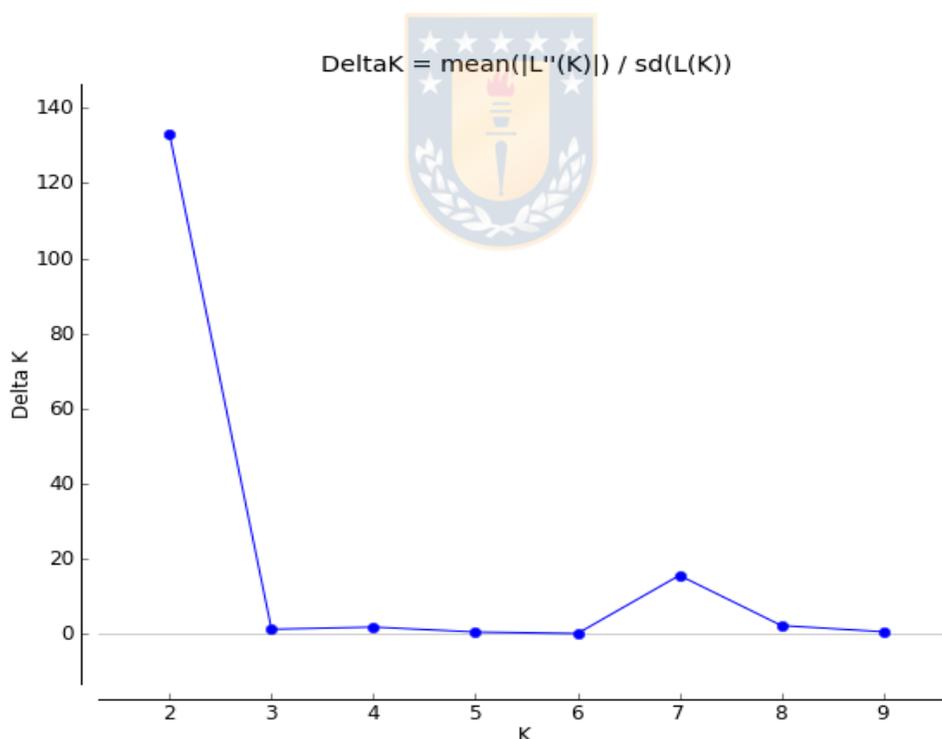


FIGURA 5.-Grafico obtenido en el programa STRUCTURE 2.3.3. (Pritchard *et al.* 2000) que grafica las probabilidades de obtener entre 1 a 9 grupos genéticos, se observa mayor probabilidad de un K=2.

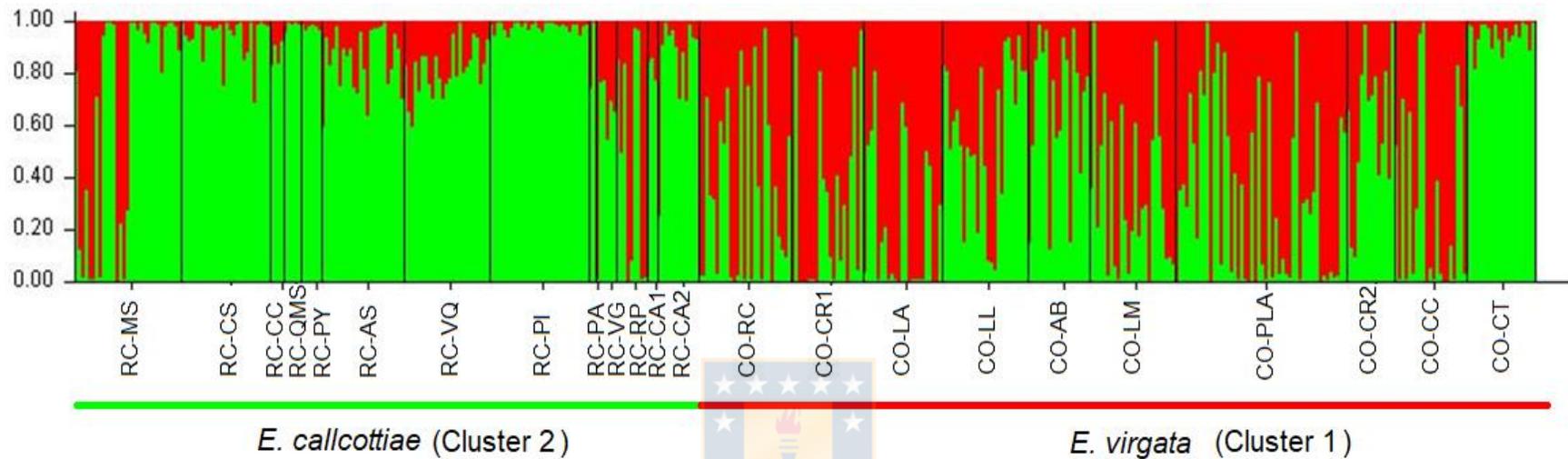
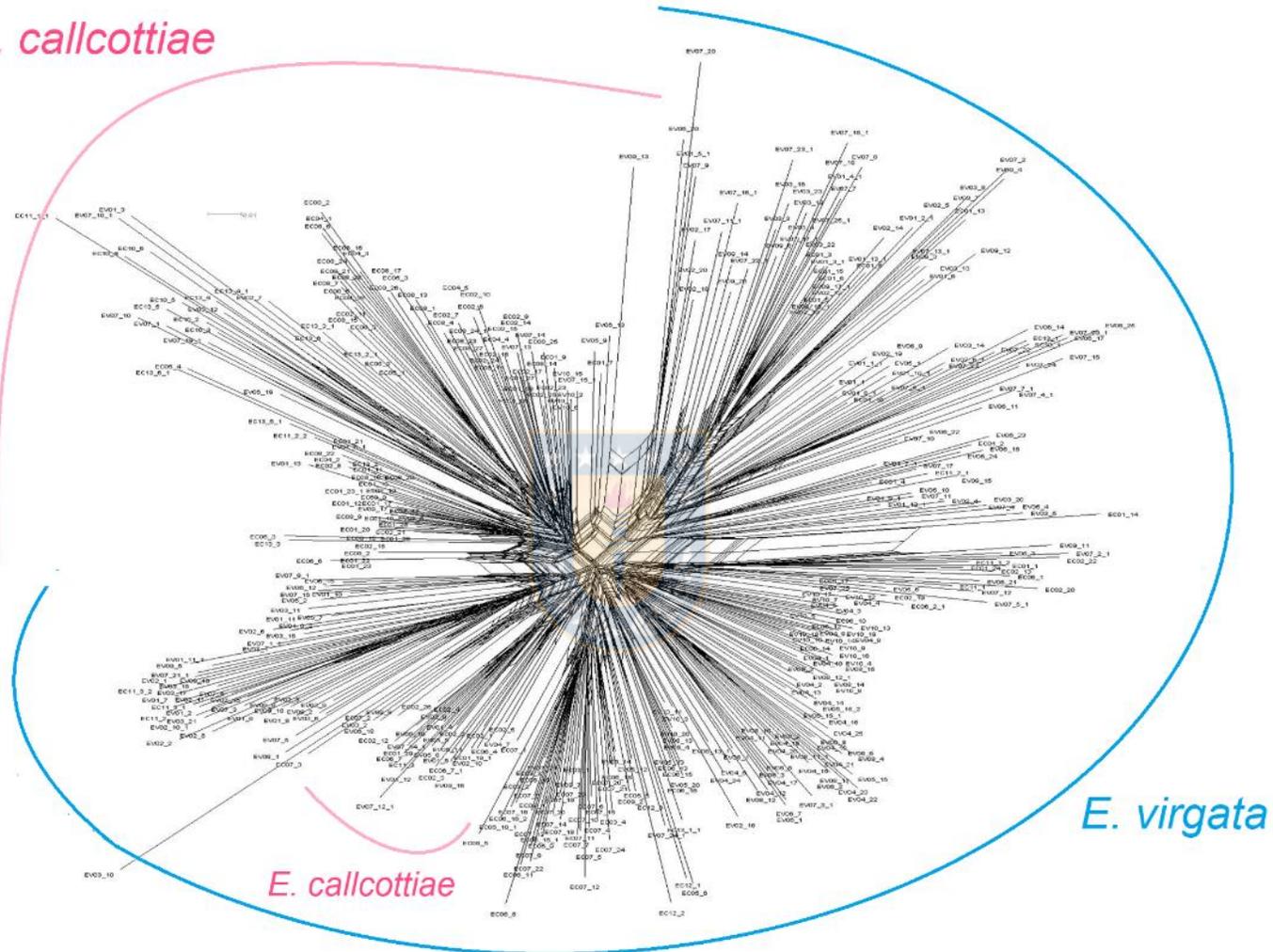


FIGURA 6.- Barplot obtenido en el programa STRUCTURE 2.3.3. (Pritchard *et al.* 2000) con K=2 y los porcentajes de asignación por individuo para cada grupo genético (clúster 1=rojo, clúster 2= verde).

TABLA 8.- Porcentaje de asignación de las poblaciones en estudio a los clústeres dados en el programa STRUCTURE 2.3.3.

	POBLACIÓN	Clúster 1	Clúster 2	Número de individuos
<i>E. callcottiae</i>	RC-MS	0,324	0,676	31
	RC-CS	0,056	0,944	26
	RC-CC	0,123	0,877	4
	RC-QMS	0,015	0,985	5
	RC-PY	0,019	0,981	6
	RC-AS	0,143	0,857	24
	RC-VQ	0,184	0,816	25
	RC-PI	0,018	0,982	29
	RC-PA	0,131	0,869	2
	RC-VG	0,425	0,575	6
	RC-RP	0,528	0,472	9
	RC-CA1	0,173	0,827	3
	RC-CA2	0,157	0,843	12
	<i>E. virgata</i>	CO-RC	0,658	0,342
CO-CR1		0,726	0,274	21
CO-LA		0,784	0,216	23
CO-LL		0,427	0,573	25
CO-AB		0,330	0,670	18
CO-LM		0,656	0,344	25
CO-PLA		0,670	0,330	50
CO-CR2		0,394	0,606	14
CO-CC		0,697	0,303	21
RC-MS		0,051	0,949	20

E. callcottiae



E. virgata

E. callcottiae

FIGURA 7- Redes de NeighborNet obtenido en SplitsTree con los agrupamientos por individuo de las especies, en violeta *E. callcottiae*, y en Azul *E. virgata*.

Principal Coordinates (PCoA)

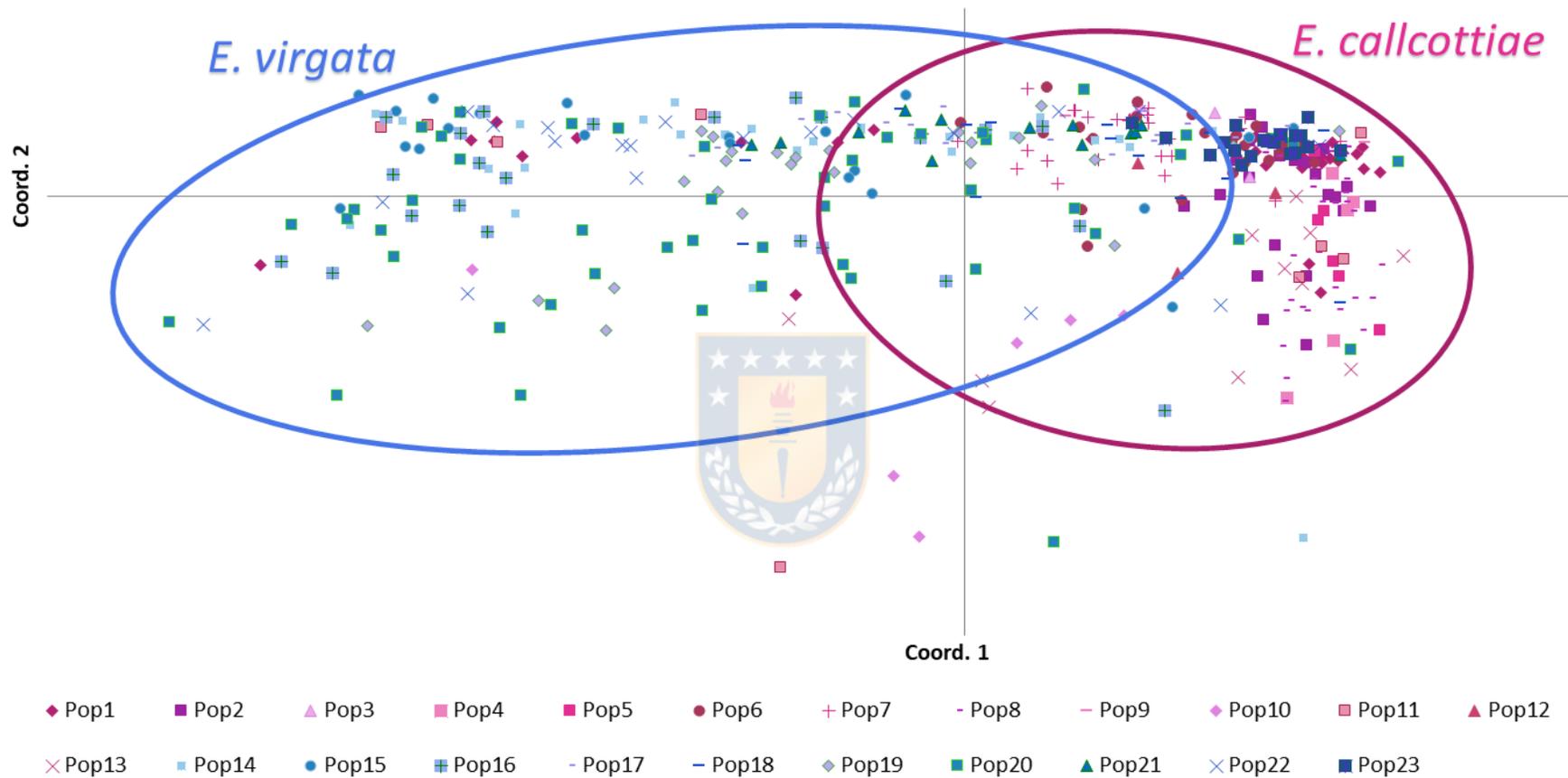


FIGURA 8.- Análisis de coordenadas principales (PCoA) para las 2 especies. Desde la población 1 hasta la 13, marcadas en tonalidades de violeta corresponden a la especie *E. callcottiae*, las poblaciones desde la 14 hasta la 23, en tonalidades de Azul pertenecen a la especie *E. virgata*

DISCUSIÓN

El análisis de AFLP fue muy eficaz en la detección de la variación genética en el genoma de *Escallonia*, se utilizaron seis combinaciones de partidores obteniendo un buen número de fragmentos de ADN polimórficos.

MODOS DE ESPECIACIÓN Y DIVERSIDAD GENÉTICA

Las islas oceánicas ofrecen numerosas oportunidades para la comprensión de los patrones y procesos de la evolución orgánica, proporcionando una configuración espectacular para testear hipótesis evolutivas y biogeográficas a través de la identificación de diferencias genéticas (Emerson 2002), que surgen dentro y entre las poblaciones mediante los procesos de deriva genética o selección natural (Whittaker & Fernández-Palacios 2007; Bramwell & Caujapé-Castells 2011). Por esto los mecanismos de especiación en islas oceánicas juegan un importante papel en los niveles de variación genética de las especies, por ejemplo, en una isla con baja heterogeneidad de hábitat, como es Robinson Crusoe, la población original puede ampliarse y extenderse sobre la isla, acumulando eventualmente cambios morfológicos y genéticos que finalmente se consideran taxonómica y biológicamente como una nueva especie (Stuessy *et al.* 1990). En el caso del Archipiélago de Juan Fernández se ha descrito dos mecanismos de especiación de la flora endémica, Anagénesis y Cladogénesis (Stuessy *et al.* 1990). Las consecuencias genéticas de tales eventos son la división del conjunto genético original en subconjuntos, en el caso específico de la anagénesis, la población original puede ampliarse y extenderse por la isla, acumulando eventualmente cambios morfológicos y genéticos que se consideran taxonómica y biológicamente como una nueva especie (Stuessy *et al.* 2006).

En el caso de la especiación anagenética, Stuessy *et al.* (1990) sugiere que la especie derivada posee valores de diversidad genética ligeramente diferentes a la especie progenitora. Los valores obtenidos para los índices de heterocigosidad (H_e)

y Diversidad de Shannon (I) en *Escallonia callcottiae* (He 0,099; I: 0,163) en isla Robinson Crusoe son levemente menores a la especie parental continental *E. virgata* (He 0,128; I: 0,211), evidenciando lo propuesto por Stuessy *et al.* (1990). Sin embargo, la magnitud de la diferencia entre estos valores es mayor que la reportada en otras especies anagenéticas del archipiélago de Juan Fernández, como sucede en las especies *Myrceugenia schulzei* (68,37 SDI, distribuida en isla Alejandro Selkirk) respecto de su parental continental *M. colchaguensis* (63,77 SDI) (López-Sepúlveda *et al.* 2013). En el caso del género *Drimys* J.R.Forst. & G.Forst. en el Archipiélago de Juan Fernández, la diversidad genética fue estimada a través de AGDOL (diversidad genética promedio sobre loci), con valores para la especie *D. confertifolia* en isla Robinson Crusoe (0,24) ligeramente superior a las especies más relacionadas en el continente *D. andina* (0,20) y *D. winteri* (0,17) (López-Sepúlveda *et al.* 2015b). Sin embargo, el patrón de *E. callcottiae* es más similar a los obtenidos para la especie *Rhaphithamnus venustus*, que en isla Robinson Crusoe presentó valores inferiores a los obtenidos en *R. spinosus* en el continente (50,38 SDI; 60,58 SDI respectivamente) (López-Sepúlveda *et al.* 2017). Este patrón se repite en islas como Ullung en Corea del Sur, en las especies del género *Acer*, donde la especie isleña *A. takesimense* (He 0,38) tenía un valor muy cercano en términos de heterocigosidad al parental *A. pseudosieboldianum* (He 0,40) (Takayama *et al.* 2013).

Las diferencias observadas en los patrones de diversidad genética de las distintas especies de origen anagenético, pueden estar relacionadas con diversos factores como son aquellos de tipo históricos, formas de vida y reproducción, así como tipos de dispersión. Por ejemplo, en *Escallonia callcottiae* la dispersión es mediante anemocoria, mientras que en *Drimys confertifolia* y *Rhaphithamnus venustus*, es a través de autocoria (Bernardello *et al.* 2006). Respecto a la forma de vida, *Escallonia* es un arbusto, mientras que *Myrceugenia schulzei*, *Drimys confertifolia* y *Rhaphithamnus venustus* son especies arbóreas. Además, las flores tanto de *D. confertifolia* como *M. schulzei* son dialipétalas mientras que las flores de *R. venustus* y *E. callcottiae* son más gamopétalas.

DISTANCIA GENÉTICA

Ruiz *et al.* (2004) planteó para el Archipiélago de Juan Fernández, que debido a las diferentes edades geológicas de las dos islas principales y sus diferentes distancias con Chile continental, la distancia genética entre el progenitor continental y la isla de mayor edad geológica (Robinson Crusoe, cuatro millones de años), debe ser mayor que entre el continente y la isla más joven (Alejandro Selkirk, 1–2 millones de años).

Los valores obtenidos para la distancia genética, en las especies estudiadas de *Escallonia*, entre las poblaciones de la isla y del continente son bajos, con un promedio de F_{ST} de 0,151. La mayor diferencia observada ocurre entre poblaciones de *E. callcottiae* con un F_{ST} de 0,141, mientras en la especie continental *E. virgata* es de 0,096.

Los valores observados en *Escallonia* son menores a los registrados entre la especie *Drimys confertifolia* distribuida en Isla Robinson Crusoe respecto de la especie continental *Drimys andina*, que muestran un valor de F_{ST} igual a 0,204, mientras que para el par *D. confertifolia*-*D. winteri* el valor de F_{ST} es igual a 0,266 (López-Sepúlveda *et al.* 2015b). Valores más cercanos al par *E. callcottiae*-*E. virgata* se observan entre las especies de *Rhaphithamnus venustus* y *R. spinosus* las cuales presentan un valor promedio de F_{ST} entre pares de poblaciones de 0.186 (López-Sepúlveda *et al.* 2017).

Los bajos valores del índice de fijación F_{ST} obtenidos en *E. callcottiae* en relación a otras especies insulares, podrían estar evidenciando un mayor flujo génico entre las poblaciones, menor al que se registraría entre las especies insulares y continentales. Esto es respaldado por la distancia de Nei, donde se aprecian valores muy bajos entre las poblaciones de las especies estudiadas, no superando el 0,100, lo que implicaría una baja distancia genética en términos de diferencias mutacionales entre las especies. Hay que destacar la baja estructuración observada entre las poblaciones de la especie *E. virgata*, lo que podría estar dando cuenta de un importante flujo génico en esta especie continental.

ESTRUCTURA GENÉTICA

El clúster 1 (rojo) se encuentra compuesto por casi la totalidad de las poblaciones de *E. virgata* (seis poblaciones) y 1 población de *E. callcottiae* (RC-RP), esta última población corresponde a aquella con menor altitud de las recolectadas, con 159 msnm. Por otro lado, en el clúster 2 (verde) mayormente representado por la especie *E. callcottiae* y las 4 poblaciones restantes de *E. virgata* (CO-LL, CO-AB, CO-CR2 y CO-CT), tres de estas (CO-LL, CO-AB, CO-CR2) ubicadas sobre los 1200 msnm en la zona cordillerana entre a Región del Biobío y Región de la Araucanía. La población camino a Trongol (CO-CT) es la que más comparte estructura con las poblaciones de isla Robinson Crusoe y se localiza en la costa de la octava Región (Cordillera de Nahuelbuta), es la población con la menor altura a 400 m s.n.m. muy similar a la altura de las poblaciones de la Isla.

Los patrones de agrupación de los individuos de *E. callcottiae* y *E. virgata* son menos estructurados que los patrones de agrupamiento genético observados en especies como *Drimys confertifolia* - *D. andina* - *D. winteri*, o bien en *Myrceugenia schulzei* - *M. fernandeziana* - *M. colchaguensis*, o en *Rhaphithamnus venustus* - *R. spinosus*, donde casi la totalidad de los individuos se separan en grupos genéticos de poblaciones insulares y continentales (López-Sepúlveda *et al.* 2013, 2015b, 2017).

IMPLICACIÓN EN LA CONSERVACIÓN

Stuessy *et al.* (1998) señala que la pérdida de área superficial más severa a largo plazo en la Isla Robinson Crusoe, se debe al hundimiento de esta cuando la Placa de Nazca se arrastra hacia el este y subduce bajo el continente sudamericano (González-Ferrán 1987). Por lo tanto, la erosión y el hundimiento alteran, lenta e inexorablemente, el espacio disponible para los organismos. De esta forma la isla Robinson Crusoe pudo haber sostenido muchos más taxones que los presentes hoy, en otras palabras, durante los últimos tres o cuatro millones de años, probablemente ha perdido el 95% de la superficie original, disminuyendo su altitud en 2.000 metros, produciendo la pérdida de numerosos ambientes, lo que ha

provocado la “contracción” de la distribución de muchas especies endémicas como ocurre en los géneros *Erigeron*, *Gunnera*, *Robinsonia* y *Escallonia*. Por esto razón, taxones que tienen pocos individuos y una base genética restringida son mucho más susceptibles a la extinción en condiciones ambientales cambiantes (Stuessy *et al.* 1998), por lo que es importante su protección, especialmente frente a los cambios climáticos.

Los valores de diversidad genética en *Escallonia callcottiae* muestran a la población de Piedra Agujereada (RC-PA) como aquella con menores valores de diversidad ($H_e: 0,72$; $I 0,96$), mientras que la población de Ramplones (RC-RP9) presento los valores más altos de diversidad genética. En relación a los valores detectados para el número de bandas localmente comunes tanto para el 25% y 50%, el cual se interpreta como el número de bandas exclusivas en cada población considerando el respectivo porcentaje de representación en la muestra total de dicha población, la localidad de Piedra Agujereada muestra los menores valores con 1 y 4 bandas respectivamente, mientras la población de Mirador Selkirk resulto ser aquella con mayores valores para estos índices, con 39 y 123 bandas respectivamente. Considerando estos valores, el contexto general que entregan los datos de este trabajo y los antecedentes en otras especies de la Isla Robinson Crusoe (López-Sepúlveda *et al.* 2013, 2015b, 2017) se propone la conservación de las poblaciones: a) Mirador de Selkirk, debido al valor que le otorga la presencia de un número considerable de alelos propios, esta localidad presenta además altos valores de diversidad genética, b) Ramplones, y c) Cerro Centinela, considerando los altos valores de diversidad genética que ambas poblaciones presentan.

CONCLUSIÓN

Los valores obtenidos tanto en Heterocigosidad como el Índice de Diversidad de Shannon, cumplen con los patrones propuestos para el tipo de especiación anagenética. Siendo los valores de diversidad genética menores en *E. callcottiae* respecto de *E. virgata*. Por lo tanto, se acepta la hipótesis El patrón observado en la especie insular es muy similar al obtenido en *Rhaphithamnus venustus*, lo que podría sugerir para *E. callcottiae* un proceso de colonización reciente en isla Robinson Crusoe. Este proceso se vería respaldado por la presencia de un alto flujo génico (F_{ST}) entre las poblaciones de la isla con las poblaciones continentales, sumado a una baja diferencia en términos de distancia de Nei, provocando una baja estructuración genética entre la especie derivada y progenitora, evidenciada en la ausencia de una separación clara entre las poblaciones de ambas especies. Esto también se observa en las redes de NeighborNet donde las especies se encuentran agrupadas muy cercanamente, incluyendo individuos de *E. callcottiae* en el agrupamiento de *E. virgata*.

Finalmente se propone la conservación de 3 poblaciones, Mirador de Selkirk, Ramplones y Cerro Centinela debido al valor que le otorga la presencia de un número considerable de alelos propios, y los altos valores de diversidad genética que presentan las poblaciones.

LITERATURA CITADA

- ARROYO, M. T. K., P. A. MARQUET, C. MARTICORENA, J. A. SIMONETTI, L. A. CAVIARES, F. A. SQUEO, R. ROZZI & F. MASSARDO. 2006. El hotspot chileno, prioridad mundial para la conservación. En: Biodiversidad de Chile: patrimonio y desafío, Sabal. Santiago, Chile. 94-99 pp.
- BAKER, P. E. 1967. An outline of the geology of the Juan Fernández Archipelago. *Geological Magazine*, 104: 110-115.
- BAKER, P. E., A. GLEDHILL, P. K. HARVEY & C. J. HAWKESWORTH. 1987. Geochemical evolution of the Juan Fernandez islands, SE Pacific. *Journal of the Geological Society*, 144(6): 933-944.
- BERNARDELLO, G., G. J. ANDERSON, T. F. STUESSY & D. J. CRAWFORD. 2006. The angiosperm flora of the Archipelago Juan Fernandez (Chile): origin and dispersal. *Botany*, 84(8): 1266-1281.
- BLEARS, M. J., S. A. DE GRANDIS, H. LEE & J. T. TREVORS. 1998. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21: 99-114.
- BÖHLE, U. T., H. H. HILGER & W. F. MARTIN. 1996. Island colonization and evolution of the insular woody habit in *Echium* L. (Boraginaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 11740-11745.
- BOUCOT, A. J. & R. WATKINS. 1978. Community evolution and rates of cladogenesis. In: *Evolutionary biology*. Springer, Boston, Massachusetts. 545-655 pp.
- BRAMWELL, D. & J. CAUJAPÉ-CASTELLS. 2011. *The biology of island floras*. Cambridge University Press, Cambridge, England. 522 pp.
- BRYANT, D. & V. MOULTON. 2004. Neighbor-net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 255-265.
- CARLQUIST, S., B.G. BALDWIN & G.D. CARR. 2003. *Tarweeds & silverswords: evolution of the Madiinae (Asteraceae)*. Missouri Botanical Garden Press, Missouri, USA. 294 pp.

- CONAF. 2009. Plan de Manejo Parque Nacional Archipiélago Juan Fernández. Corporación Nacional Forestal V Región de Valparaíso, Ministerio de Agricultura, Chile. 294 pp.
- CURTIN, C. D., J. R. BELLON & P. A. HENSCHKE. 2007. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeast isolated from Australian wineries. FEMS Yeast Research 7: 471-481.
- DANTON, P. H. 2004. Plantas silvestres de la Isla Robinson Crusoe, Guía de reconocimiento. Orgraf Impresores, Valparaíso, Chile. 194 pp.
- DANTON, P., C. PERRIER & G. M. DE REYES. 2006. Nouveau catalogue de la flore vasculaire de l'archipel Juan Fernández (Chili). Acta Botánica Gallica, 153(4): 399-587.
- DIRNBÖCK, T., J. GREIMLER, P. LÓPEZ & T. F. STUESSY. 2003. Predicting future treats to the native vegetation of Robinson Crusoe Island, Juan Fernández Archipelago, Chile. Conservation Biology, 17: 1650-1659.
- DRAKE, P. 2002. Chile, 1930-1958. In Historia de América Latina. Crítica. 219-254 pp.
- EHRlich, P. & E. WILSON. 1991. Biodiversity studies: Science and policy. Science, 253: 758-762.
- ELIASSON, U. 1974. Studies in Galapagos plants. XIV. The genus *Scalesia* Arn. Opera Botanica, 36: 1-117.
- EMERSON, B. C. 2002. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. Molecular Ecology, 11: 951-966.
- EVANNO G., S. REGNAUT & J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, 14 (8): 2611-2620.
- EXCOFFIER L., G. LAVAL & S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.
- FALUSH, D., M. STEPHENS & J. K. PRITCHARD. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164(4): 1567-1587.

- FALUSH, D., M. STEPHENS & J. K. PRITCHARD. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology*, 7: 574-578.
- FRANKHAM, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, 78: 311-327.
- FUNK, S. M. & J. E. FA. 2010. Ecoregion prioritization suggests an armoury not a silver bullet for conservation planning. *PLoS ONE*, 5(1): e8923.
- GARCÍA, E. C. 2012. Mecanismos de especiación ecológica en plantas y animales. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 14(2): 7-13.
- GAUDEUL, M., G. ROUHAN, M. F. GARDNER & P. M. HOLLINGSWORTH. 2012. AFLP markers provide insights into the evolutionary relationships and diversification of New Caledonian *Araucaria* species (Araucariaceae). *American Journal of Botany*, 99: 68-81.
- GAVRILETS, S. & J. B. LOSOS. 2009. Adaptive radiation: contrasting theory with data. *Science*, 323: 732-737.
- GIVNISH, T. G., K. C. MILLAM, A. R. MAST, T. B. PATERSON, T. J. THEIM, A. L. HIPPI, J. M. HENSS, J. F. SMITH, K. R. WOOD & K. J. SYSTMA. 2009. Origin, adaptive radiation and diversification of the Hawaiian Lobeliads (Asterales: Campanulaceae). *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 276: 407-416.
- GONZALEZ-FERRÁN, O. 1987. Geological evolution of Chilean Pacific Oceanic islands, pp. 39-54. In J. C. Castilla (ed.), *Islas Oceánicas chilenas: conocimiento científico y necesidades de investigaciones*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- GRANT, R. M. 1996. Toward a knowledge-based theory of the firm. *Strategic management journal*, 17(S2): 109-122.
- GREIMLER, J., T. F. STUESSY, U. SWENSON, C. M. BAEZA & O. MATTHEI. 2002. Plants invasions on an Oceanic Archipelago. *Biological Invasions*, 4: 73-85.
- HABEL, J. C. & F. E. ZACHOS. 2012. Past population history versus recent population decline-founder effects in island species and their genetic signatures. *Journal of Biogeography*, 40: 206-207.

- HAJEK, E., & G. A. ESPINOZA. 1987. Meteorology, climatology and bioclimatology of the Chilean Oceanic Islands. *Islas Oceánicas Chilenas: Conocimiento Científico y Necesidades de Investigaciones*. 55-83.
- HASBÚN, R., C. ITURRA, P. MORAGA, P. WACHTENDORFF, P. QUIROGA & S. VALENZUELA. 2012. An efficient and reproducible protocol for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection. *Tree Genetics & Genomes*, 8: 925-931.
- HELENURM, K. & F. R. GANDERS. 1985. Adaptive radiation and genetic differentiation in Hawaiian *Bidens*. *Evolution*, 39(4): 753-765.
- HONEYMAN, P. L., P. CRUZ & C. SCHULZE. 2005. Estudio de los factores bióticos asociados a la regeneración del bosque de Juan Fernández y propuesta de restauración. Informe final: Proyecto CONAF-Universidad Mayor. 55 pp.
- HUBISZ, M. J., D. FALUSH, M. STEPHENS & J. K. PRITCHARD. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-1332.
- HUMPHRIES, C. J., P. H. WILLIAMS & R. I. VANE-WRIGHT. 1995. Measuring biodiversity value for conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26: 93-111.
- HUSON, D. H. & D. BRYANT. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 254-267.
- INSTITUTO GEOGRÁFICO MILITAR, 2020. Geo Web Instituto geográfico militar. Recuperado de: <http://200.27.184.149/IGMChile/>. Accedido: junio 12, 2020.
- IREN-CORFO. 1982. Estudio de los recursos físicos del Archipiélago de Juan Fernández, Región de Valparaíso, Chile. 384 pp. + 3 apéndices.
- JUAN, A., M. B. CRESPO, R. S. COWAN, C. LEXER & M. F. FAY. 2004. Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology*, 13: 2679-2690.
- LÓPEZ-SEPÚLVEDA, P., K. TAKAYAMA, D. J. CRAWFORD, J. GREIMLER, P. PEÑAILILLO, M. BAEZA, E. RUIZ, G. KOHL, K. TREMETSBERGER, A. GATICA, L. LETELIER, P. NOVOA, J. NOVAK & T. F. STUESSY. 2015a. 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., K. TAKAYAMA, D. J. CRAWFORD, J. GREIMLER, P. PEÑAILILLO, M. BAEZA, E. RUIZ, G. KOHL, K. TREMETSBERGER, A. GATICA, L. LETELIER, P. NOVOA, J. NOVAK & T. F. STUESSY. 2017. 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(3): 223-237.

LÓPEZ-SEPÚLVEDA, P., K. TAKAYAMA, J. GREIMLER, D. J. CRAWFORD, P. PEÑAILILLO, M. BAEZA, E. RUIZ, G. KOHL, K. TREMETSBERGER, A. GATICA, L. LETELIER, P. NOVOA, J. NOVAK & T. F. STUESSY. 2015b. Progressive migration and anagenesis in *Drimys confertifolia* of the Juan Fernández Archipelago, Chile. *Journal of Plant Research*, 128: 73-90.

LÓPEZ-SEPÚLVEDA, P., K. TAKAYAMA, J. GREIMLER, P. PEÑAILILLO, D. J. CRAWFORD, M. BAEZA, E. RUIZ, G. KOHL, K. TREMETSBERGER, A. GATICA, L. LETELIER, P. NOVOA, J. NOVAK & T. F. STUESSY. 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.

MARTICORENA, C. & R. RODRÍGUEZ. (eds.). 2011. Misodendraceae a Zygophyllaceae. *Flora de Chile* 3(2). Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 148 pp.

MARTICORENA, C., T. F. STUESSY & C. M. BAEZA. 1998. Catalogue of the vascular flora of the Robinson Crusoe or Juan Fernández Islands, Chile. *Gayana Botánica*, 55: 187-211.

MATTHEI, O., C. MARTICORENA & T. F. STUESSY. 1993. La flora adventicia del Archipiélago de Juan Fernández. *Gayana Botánica*, 50: 69-102.

MAUNDER, M., R. S. COWAN, P. STRANC & M. F. FAY. 2001. The genetic status and conservation management of two cultivated bulb species extinct in the wild: *Tecophilaea cyanocrocus* (Chile) and *Tulipa sprengeri* (Turkey). *Conservation Genetics*, 2: 193-201.

- MITTERMEIER, R., R. GIL & M. HOFFMAN. 2004. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Ecoregions. CEMEX, Mexico DF, Mexico. 392 pp.
- MORITZ, C., & D. P., FAITH. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular ecology*, 7(4): 419-429.
- MORT, M. E., D. E., SOLTIS, P. S., SOLTIS, J., FRANCISCO-ORTEGA, & A. SANTOS-GUERRA. 2002. Phylogenetics and evolution of the Macaronesian clade of Crassulaceae inferred from nuclear and chloroplast sequence data. *Systematic Botany*, 27(2): 271-288.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, 13(5): 1143-1155.
- PEAKALL, R. & P. E. SMOUSE 2006. GENALEX 6: genetic análisis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS & P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959.
- RICCI, M. 1989. Programa de Conservación y Recuperación de Plantas Amenazadas de Juan Fernández. Informe Final, 1ª etapa, Proyecto CONAF-WWF-3313, Chile, 62 pp.
- RODRÍGUEZ, R., C. MARTICORENA, D. ALARCÓN, C. BAEZA, L. CAVIERES, V. L. FINOT, N. FUENTES, A. KIESSLING, M. MIHOC, A. PAUCHARD, E. RUIZ, P. SANCHEZ & A. MARTICORENA. 2018. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botánica*, 75(1): 1-430.
- RODRÍGUEZ, R., O. MATTHEI & M. QUEZADA. 1983. Flora arbórea de Chile. Editorial de la Universidad de Concepción, Chile. 364 pp.
- ROSINDELL, J., & A. B. PHILLIMORE. 2011. A unified model of island biogeography sheds light on the zone of radiation. *Ecology letters*, 14(6): 552-560.
- RUIZ, E., CRAWFORD, D. J., STUESSY, T. F., GONZÁLEZ, F., SAMUEL, R., BECERRA, J., & M. SILVA. 2004. Phylogeneic relationships and genetic divergence among endemic species of *Berberis*, *Gunnera*, *Myrceugenia* and *Sophora* of the Juan Fernandez Islands (Chile) and their continental progenitors bases on Isozymes and nrITS sequences. *Taxon* 53: 321-332.

- SANDERS, R. W., T. F. STUESSY & C. MARTICORENA. 1982. Recent changes in the flora of the Juan Fernández islands, Chile. *Taxon*, 31: 284-289.
- SCHAEFER, K., T., ZHANG, L., BRUHWILER, & A. P. BARRETT. 2011. Amount and timing of permafrost carbon release in response to climate warming. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*, 63(2): 168-180.
- SCHILLING, E. E., J. L. PANERO & U. H. ELIASSON. 1994. Evidence from chloroplast DNA restriction site analysis on the relationships of *Scalesia* (Asteraceae; Heliantheae). *American Journal of Botany*, 81: 248-254.
- SCHLÜTER, D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, Oxford, UK. 296 pp.
- SEDE, S. M. & S. S. DENHAM. 2018. Taxonomic Revision of *Escallonia* (Escalloniaceae) in Argentina. *Systematic Botany*, 43(1): 364-396.
- SEDE, S. M., S. I. DÜRNHÖFER, S. MORELLO & F. ZAPATA. 2013. Phylogenetics of *Escallonia* (Escalloniaceae) based on plastid DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173(3): 442-451.
- SIMPSON, G. G. 1953. *The major features of evolution*. Columbia University Press, New York, New York, USA. 413 pp.
- SKOTTSBERG, C. 1953. Notas sobre la Vegetación de las Islas de Juan Fernández. *Revista Universitaria*, 35(1): 195-207.
- SLEUMER, H. O. 1968. Die Gattung *Escallonia* (Saxifragaceae). Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. *Verhandelingen, Afd. Letterkunde*, 58: 1-146.
- STUESSY, T. F. 1997. Classification: more than just branching patterns of evolution. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 15(2): 113-124.
- Stuessy, T. F., & M., Ono. 1998. The current status of our knowledge and suggested research protocols in island archipelagos. *Evolution and Speciation of Island Plants*.
- STUESSY, T. F., D. J. CRAWFORD & C. MARTICORENA. 1990. Patterns of phylogeny in the endemic vascular flora of the Juan Fernandez Islands, Chile. *Systematic Botany*, 15: 338-346.

- STUESSY, T. F., D. J. CRAWFORD, P. LÓPEZ-SEPÚLVEDA, C. M. BAEZA & E. A. RUIZ. 2018. *Plants of Oceanic Islands: Evolution, Biogeography, and Conservation of the Flora of the Juan Fernández (Robinson Crusoe) Archipelago*. Cambridge University Press, Cambridge, England. 465 pp.
- STUESSY, T. F., G. JAKUBOWSKY, R. SALGUERO-GÓMEZ, M. PFOSSER, P. M. SCHLÜTER, T. FER, B. Y. SUN & H. KATO. 2006. Anagenetic evolution in island plants. *Journal of Biogeography*, 33: 1259-1265.
- STUESSY, T. F., J. GRAU & G. ZIZKA. 1992. Diversidad de plantas en las islas Robinson Crusoe. En: Grau J. & G. Zizka (eds.) *Flora Silvestre de Chile*. Stadt Frankfurt am Main. Frankfurt, Germany. 54-66 pp.
- STUESSY, T. F., K. A. FOLAND, J. F. SUTTER, R. W. SANDERS & M. SILVA. 1984a. Botanical and geological significance of potassium-argon dates from the Juan Fernandez Islands. *Science*, 225(4657): 49-51.
- STUESSY, T. F., K. TAKAYAMA, P. LÓPEZ-SEPÚLVEDA & D. J. CRAWFORD. 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., R. W. SANDERS & M. SILVA. 1984b. Phytogeography and evolution of the flora of the Juan Fernandez Islands: A progress report. In: F.J. Radvosky, P. H. Raven & S. H. Sohmer (eds.). *Biogeography of the tropical Pacific: Proceedings of a symposium*. Association of Systematics Collections and Bernice P. Bishop Museum, Kansas, USA. 55-69 pp.
- STUESSY, T. F., U. SWENSON, D. J. CRAWFORD, G. ANDERSON & M. SILVA. 1998. Plant conservation in the Juan Fernandez Archipelago, Chile. *Aliso*, 16: 89-101.
- 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. *Biogeography in a changing world*. CRC Press, Boca Raton. 117-133 pp.
- SWENSON, U., T. F. STUESSY, M. BAEZA & D. J. CRAWFORD. 1997. New and historical plant introductions, and potential pests in the Juan Fernández Islands, Chile. *Pacific Science*, 51: 233-253.

- TAKAYAMA, K., B. Y. SUN & T. F. STUESSY. 2012. Genetic consequences of anagenetic speciation in *Acer okamotoanum* (Sapindaceae) on Ullung Island, Korea. *Annals of Botany*, 109: 321-330.
- TAKAYAMA, K., B. Y. SUN & T. F. STUESSY. 2013. Anagenetic speciation in Ullung Island, Korea: genetic diversity and structure in the island endemic species, *Acer takesimense* (Sapindaceae). *Journal of Plant Research*, 126: 323-333.
- TAKAYAMA, K., P. LÓPEZ-SEPÚLVEDA, J. GREIMLER, D. J. CRAWFORD, P. PEÑAILILLO, M. BAEZA, E. RUIZ, G. KOHL, K. TREMETSBERGER, A. GATICA, L. LETELIER, P. NOVOA, J. NOVAK & T. F. STUESSY. 2015. 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.
- TREMETSBERGER, K., T. F. STUESSY, Y. P. GUO, C. M. BAEZA, H. WEISS & R. M. SAMUEL. 2003. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. *Taxon*, 52: 237-245.
- VOS P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. V. D. LEE, M. HORNES, A. FRITERS, J. POT, J. PALEMAN, M. KUIPER & M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- WHITTAKER, R. J. & J. M. FERNÁNDEZ-PALACIOS. 2007. *Island biogeography: ecology, evolution, and conservation*, 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, USA. 482 pp.
- WINFIELD, M. O., G. M. ARNOLD, F. COOPER, M. LERAY, J. WHITE, A. KARP & K. J. EDWARDS. 1998. Study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the upper Severn area in the UK using AFLP markers. *Molecular Ecology*, 7: 3-10
- WOOTEN, J. A., & L. R. TOLLEY-JORDAN. 2009. Validation of phylogenetic signals in amplified fragment length data: testing the utility and reliability in closely related taxa. *BMC Research Notes*, 2(1): 26.
- YOUNG, K. R., C. ULLOA, J. L. LUTEYN, & S. KNAPP. 2002. Plant evolution and endemism in Andean South America: An introduction. *Botanical Review*, 68: 4-21.

ZAPATA, F. 2013. A multilocus phylogenetic analysis of *Escallonia* (Escalloniaceae): Diversification in montane South America. *American Journal of Botany*, 100: 526-545.

