



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Pregrado

Patrones de estructuración y flujo genético en cuatro taxa del género *Eriosyce* (Cactaceae) en el Sitio Prioritario para la Conservación Los Molles – Pichidanguí

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo Ambiental

ÍTALO FRANCISCO TAMBURRINO WIDNER

Dr. Pablo Guerrero Martin

Director del Seminario de Título:

Dr. Rodrigo Medel

Patrocinante

Enero 2018

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

ÍTALO FRANCISCO TAMBURRINO WIDNER

“Patrones de estructuración y flujo genético en cuatro taxa del género *Eriosyce* (Cactaceae) en el Sitio Prioritario para la Conservación Los Molles – Pichidanguí”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Biólogo con mención en Medio Ambiente

Dr. Pablo Guerrero Martín

Director Seminario de Título

Dr. Rodrigo Medel Contreras

Prof. Patrocinante del Seminario

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. David Veliz Baeza

Presidente

Dra. Alejandra González Vásquez

Correctora

Santiago, enero de 2018

Biografía



Ítalo Francisco Tamburrino Widner nació en La Serena el 5 de Abril de 1993. Vivió junto a su madre, Teresa, quien le grababa El mundo del Profesor Rossa y Maravillozoo en VHS; su padre, Enzo, quien coleccionaba -y lo hace hasta el día de hoy- antigüedades y cactus en el patio de su casa, y su hermana, María Teresa, con quien recreaba la muerte de Mufasa. Realizó sus estudios en el Colegio Andrés Bello Pampa de La Serena. El 2011 se mudó a Santiago para estudiar Biología Ambiental en la Universidad de Chile, donde actualmente cursa el programa de Magíster en Ciencias Biológicas. Tuvo dos perros, Bobby y Jack, y dos ratonas, Trigo y Niebla, además de dos perras, Donna y Reina, que aún viven en la casa de sus padres. Hoy, en su departamento, solo tiene plantas a medio morir. En su tiempo libre lee, ve series para niños y carretea. También escribe cuentos, que son, a veces, un poco más entretenidos que éste.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres, Enzo y Teresa, por creer en la carrera que quería estudiar y por su apoyo constante durante el proceso. A mí hermana, María Teresa, por su compañía y su cariño. Agradezco también a mi abuela, tías y tíos y primas y primos. Agradezco profundamente haber crecido junto a todos ustedes, por hacerme sentir siempre amado y especial.

Agradezco a mi tutor, Pablo Guerrero, por darme la oportunidad de trabajar junto a él, por introducirme al mundo de las cactáceas y por todos los conocimientos compartidos conmigo. Agradezco también el financiamiento de esta tesis a través de los proyectos FONDECYT 1160583 y 3130456 y del fondo FIBN 9/2015.

Agradezco a mis revisores, Alejandra González y David Veliz, por su tiempo, disposición y sus valiosos comentarios y sugerencias.

Agradezco a Paola Jara y Paula Vidal por sus enseñanzas y su paciencia. A Mary T. Kalin por recibirme en su laboratorio y por la confianza en el nuevo trabajo que comenzamos. También agradezco a todos en el Laboratorio de Sistemática y Ecología Vegetal, Romina, Don Juan, Carla, Valeria, Francisca, Marcela y Alejandra, por su ayuda, comentarios y por hacer de nuestro lugar de trabajo un segundo hogar.

Agradezco a Camila Munso, Glenda Fuentes y Daniela Fernández por su inmensa cooperación en la realización de esta tesis. Agradezco su esfuerzo, sus enseñanzas y su tiempo.

Agradezco a mis compañeros y amigos Raúl Araya, Esteban San Juan, Jaime Caro, Joaquín Araya, Paula Formas, Catalina Escanilla, Juan Hernández, Amanda Osorio, Naijem Aqueveque, Francisca Briones, Bárbara Maldonado, Israel Pavez, Márion Díaz, Sofía Figueroa y Sofía Zamudio

por ser mi familia aquí en Santiago. Agradezco infinitamente haberlos conocido, por los increíbles momentos que hemos pasado juntos y por todo lo que han hecho por mí. Agradezco también a Matías por su compañía, sus palabras y por quien soy junto a él.

Agradezco a mis amigos serenenses Roberto, Felipe, William, Alberto, Mauricio, Ignacio, Patricio y Francisca. Valoro su amistad y cariño a pesar de la distancia y el paso del tiempo. A Luis Felipe, Andrés, Milena, Eric, Alex, Johan y Paula, por hacer que me reencontrara con mi ciudad y por las nuevas aventuras.

Agradezco a Claudio Ponce por la espuma de nuestros días, por todo lo que me ayudó a crecer y por su apoyo sincero durante gran parte de la realización de esta tesis.

Agradezco a los reyes del pasado que nos miran desde las estrellas.

Agradezco a los cactus, a los pequeños y a los grandotes. Agradezco a las palmas, a las nuestras y a las exóticas. Agradezco a los bosques, a los secos y a los lluviosos. Agradezco a todo lo que nos rodea, a lo que nos causa curiosidad, a lo que nos mantiene aprendiendo y estudiando.

Índice de Contenidos

Biografía	iii
Agradecimientos	iv
Índice de Contenidos	vi
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	viii
Resumen	xi
Abstract.....	xiii
Introducción.....	1
Hipótesis	8
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos	9
Metodología.....	10
Sitio de estudio	10
Muestreo de individuos y extracción de ADN	11
Análisis de AFLP y procesamiento de datos.....	12
Análisis estadísticos	14
Resultados.....	17
Análisis de AFLP.....	17
Diversidad genética.....	17
Estructuración genética y flujo génico.....	18
Aislamiento por distancia	25
Discusión	28
Diversidad genética.....	28
Estructuración genética y aislamiento por distancia	29
Escenario de hibridación.....	32
Comentarios sobre AFLP.....	38
Conclusiones	40
Referencias.....	42
Anexo	55

Índice de Tablas

Tabla 1. Número de loci obtenidos para cada combinación de partidores.	17
Tabla 2. Número de loci polimórficos, porcentaje que representan con respecto al total y diversidad genética para cada uno de los taxa estudiados.	18
Tabla 3. Resumen de valores obtenidos para test exacto y análisis de diferenciación genética entre cada una de las comparaciones entre taxa, donde EC corresponde a <i>E. chilensis</i> ; ECA, <i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i> ; ECM, <i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> y ES <i>E. subgibbosa</i> . Se muestran valores de probabilidad combinada de obtener error tipo I al rechazar H_0 para cada par de combinaciones en test exacto y valores de F_{ST} y Φ_{iPT} . Para valores de F_{ST} y Φ_{iPT} , número de asteriscos indica valor de P (* $P<0,05$; ** $P<0,005$; *** $P<0,005$).	19
Tabla 4. Flujo génico calculado (Nem; Wright, 1949) para cada combinación de taxa.	19
Tabla 5. Análisis molecular de varianza considerando el complejo <i>E. chilensis</i> - <i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i> (n=49, $P=0,033$)	23
Tabla 6. Análisis molecular de varianza considerando los tres grupos (<i>E. chilensis</i> - <i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i> , <i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> y <i>E. subgibbosa</i> , n=90, $P=0,001$).	24
Tabla A1. Medidas estadísticas para estimar el mejor valor del número de grupos (K) inferidos a partir de cinco corridas independientes en Structure para cada valor de K. $\ln P(K)$ corresponde al promedio del logaritmo de verosimilitud para cada valor K y ΔK es una medida basada en la tasa de cambio de segundo orden de la función de verosimilitud con respecto a K (Evanno et al., 2005). Notar que ΔK no puede ser calculado para el primer y último valor de K.....	55

Índice de Figuras

Figura 1. Individuos en periodo de floración de A) <i>Eriosyce chilensis</i> , B) <i>Eriosyce chilensis</i> var. <i>albidiflora</i> , C) <i>Eriosyce subgibbosa</i> y D) <i>Eriosyce curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> en la localidad de Los Molles. Fotografías de Pablo Guerrero.	6
Figura 2. Mapa del sitio de estudio y ubicación de individuos muestreados y usados en el análisis de AFLP. El color de los puntos indica identidad del individuo, rosado para <i>E. chilensis</i> , blanco para <i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i> , amarillo para <i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> y verde para <i>E. subgibbosa</i> . Cinco individuos de <i>E. subgibbosa</i> fueron muestreados más al norte de la distribución mostrada en el mapa y un individuo de <i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> hacia el este.	12
Figura 3. Gráfico triangular de asignación a clusters definidos por análisis de estructura, para individuos de <i>E. chilensis</i> - <i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i> (puntos verdes), <i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> (puntos rojos) y <i>E. subgibbosa</i> (puntos azules).	21
Figura 4. Gráfico de barras indicando mezcla genética de los 90 individuos correspondientes a los cuatro taxa estudiados revelado por análisis bayesiano de estructura genética. Subdivisiones con numeración asignada indican identidad de los individuos; (1) <i>E. chilensis</i> , (2) <i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i> , (3) <i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> y (4) <i>E. subgibbosa</i> . El color de la barra indica porcentaje de asignación de cada individuo a un determinado grupo, para K=3.	21
Figura 1. Análisis de discriminantes de componentes principales, donde se distinguen tres cluster, de los cuales además se muestra su densidad a lo largo de dos funciones discriminantes que los separan.	23

Figura 6. Gráficos de distribución de varianza genética entre y dentro de grupos considerando A) Ambas variedades de *E. chilensis* (n=49) y B) Los tres grupos (*E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa*, n=90)25

Figura 7. Test de Mantel para Distancia geográfica y Distancia genética de Nei (Nei, 1978) para A) *E. chilensis*; B) *E. chilensis* var. *albidiflora*; C) *E. curvispina* var. *mutabilis*; D) *E. subgibbosa*; E) Cuatro taxa combinados y F) Complejo *E. chilensis*- *E. chilensis* var. *albidiflora*. En cada gráfica se indica ecuación de la línea de tendencia, coeficiente de correlación (R^2) y valor de P.26-27

Figura 8. Diagrama de escenario de hibridización que daría origen a complejo *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora*. Grosor de flechas azules indica frecuencia relativa del flujo genético entre los distintos taxa para dos tiempos A (periodo de generación de híbridos) y B (periodo actual). Siglas identifican a las especies, correspondiendo ES a *E. subgibbosa*, ECM a *E. curvispina* var. *mutabilis* y EC a *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*. En periodo A, el flujo genético se da principalmente entre individuos de su mismo taxa, aunque habrían existido cruces ocasionales entre *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis*, los que habrían dado origen a *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*. En periodo B, debido a proliferación de *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora* y similitudes en microhabitat, el flujo genético entre taxa distintos se da principalmente entre éstas y *E. subgibbosa*, limitando flujo con *E. curvispina* var. *mutabilis*.....35

Figura A1. Hipótesis filogenética molecular de *Eriosyce* basada en cinco loci (cuatro partidores plastidiales y uno nuclear) de 82 taxa. Probabilidades bayesianas posteriores se muestran en nodos y en color de ramas (desde azul oscuro=1 a rojo= 0,3). Con estrellas se indican la ubicación de los taxa de este estudio. Análisis e imagen de Guerrero et al. (datos no publicados).....57

Figura A2. Aproximación visual sobre probabilidad de cada número de agrupaciones. Diferencia en probabilidad con el resto de los escenarios es indicador de potencia de la estimación (Evanno et al., 2005).....	57
Figura A3. Microhábitat ocupado por <i>E. chilensis</i> y <i>E. subgibbosa</i> . A) Individuo de <i>E. chilensis</i> creciendo entre rocas, B) Individuos de <i>E. subgibbosa</i> creciendo entre rocas y C) Grupo de individuos de <i>E. chilensis</i> en roqueríos. Fotografías de A) Juan Acosta, B) Herman Olivares y C) Francisca Esperanza.	58
Figura A4. Microhábitat ocupado por <i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i> y <i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> . A) Grupo de individuos de <i>E. chilensis</i> creciendo en roqueríos, B) y C) Individuo de <i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i> creciendo a ras de suelo. Fotografías de A) Juan Acosta, B) y C) Patricio Novoa.	59
Figura A5. Variaciones morfológicas y fisiológicas en <i>E. chilensis</i> . A) Flores de un único individuo de <i>E. chilensis</i> que presentan distinto grado de apertura de perianto, B) Flores bicolors de un único individuo de <i>E. chilensis</i> con distinto grado de apertura de perianto, C) Gradiente morfológico de forma de flor de cuatro individuos de <i>E. chilensis</i> y un individuo de <i>E. subgibbosa</i> , donde se muestra variabilidad en grado de apertura de perianto y coloración, y D) Flores de un único individuo de <i>E. chilensis</i> que presentan distinto grado de estoconasticidad (movimiento de cierre al anochecer). Imágenes de Walter (2008).....	60

Resumen

Las herramientas moleculares han permitido analizar la estructura y diversidad genética en especies de las que se tiene poca información previa, y a detectar procesos como la pérdida de variabilidad genética y estimar flujo genético entre taxa. Estos análisis cobran especial relevancia en especies de distribución restringida, las cuales son más susceptibles a efectos de la deriva génica y la depresión por consanguinidad.

En la familia Cactaceae es frecuente la hibridación interespecífica y este proceso ha sido propuesto como parte del mecanismo que da origen a algunas especies pertenecientes a este linaje. En el en el Sitio Prioritario para la Conservación Los Molles – Pichidangui de Chile central cohabitan *Eriosyce chilensis* y *Eriosyce chilensis* var. *albidiflora*, dos cactáceas endémicas exclusivamente de esa zona. En base a evidencias moleculares y a sus características morfológicas se ha propuesto un origen híbrido a partir del entrecruzamiento entre *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis*, taxa con los que crecen en simpatría. El objetivo de esta tesis es analizar la diversidad y estructura genética y el flujo genético entre *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis* mediante el uso de AFLP.

Los resultados principales indican niveles similares de diversidad genética en *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis*, además baja estructuración entre *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*; y la existencia de flujo genético (hibridación) entre *E. chilensis* y *E. subgibbosa*. Por otro lado, *E. curvispina* var. *mutabilis* posee la mayor diferenciación genética con el resto de los taxa. Solo se encuentran patrones de aislamiento genético por distancia en *E. chilensis*.

Los niveles de diversidad genética en *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* pueden ser explicados por el efecto de la polinización biótica y la longevidad de estos

taxa, como también por el flujo genético con *E. subgibbosa*. La tendencia a la exogamia, el ámbito de hogar de los polinizadores y la dimensión del hábitat de los taxa estudiados daría cuenta de la carencia de estructuración intrapoblacional en el complejo *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora* y de los patrones de aislamiento genético por distancia. Solo se encuentra mezcla genética de *E. subgibbosa* en *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, por lo que en base a la evidencia obtenida en este trabajo y otros, se apoya parcialmente la hipótesis del origen híbrido y se propone un escenario que explica el origen de estos taxa. La técnica de AFLP muestra efectividad para el cumplimiento de los objetivos planteados en esta tesis, aunque se sugiere ampliar el muestreo y el número de partidores utilizados para mayor resolución en los resultados.

Abstract

Molecular tools have allowed analyzing the genetic structure and diversity of species with low information available, detecting processes as genetic variability loss, and estimating genetic flux between taxa. These analysis may be particularly relevant in narrowly distributed species, which are more susceptible to the effect of genetic drive and inbreeding.

Interspecific hybridization is frequent in the Cactaceae family and this process has been proposed as part of the mechanism that originates some species in this lineage. *Eriosyce chilensis* and *Eriosyce chilensis* var. *albidiflora*, two endemic cacti, cohabitate exclusively in central Chile's Priority Site for Conservation Los Molles – Pichidangui. Based on molecular evidence and morphological characterization, an hybrid origin of these taxa has been proposed, from the cross between *E. subgibbosa* and *E. curvispina* var. *mutabilis*, with whom they grow in sympatry. The aim of this thesis is to analyze the genetic structure, genetic diversity and the genetic flux between *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. subgibbosa* and *E. curvispina* var. *mutabilis* using the AFLP technique.

Principal results indicate similar levels of genetic diversity between *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. subgibbosa* and *E. curvispina* var. *mutabilis*, and low genetic structuration between *E. chilensis* and *E. chilensis* var. *albidiflora*; besides the existence of genetic flux (hybridization) between *E. chilensis* and *E. subgibbosa*. On the other side, *E. curvispina* var. *mutabilis* is genetically isolated from the other taxa. Genetic isolation by distance is only found in *E. chilensis*.

Eriosyce chilensis and *E. chilensis* var. *albidiflora*'s genetic diversity levels may be explained by the effect of biotic pollination and the longevity of these taxa, as by the genetic flux with *E. subgibbosa*. Tendency to outcrossing, pollinator's home range and

habitat dimension of the studied taxa may account for the lack of intrapoblational substructuring in the *E. chilensis* – *E. chilensis* var. *albidiflora* complex and for the genetic isolation by distance patterns. Genetic admixture only of *E. subgibbosa* is found in *E. chilensis* and *E. chilensis* var. *albidiflora*, thus, based on evidence found on this study and others, the hybrid origin hypothesis is partially supported, and an explicative scenario of the taxa's origin is proposed. AFLP technique shows effectiveness on the accomplishment of the objectives of this thesis, although it is suggested to expand the sampling and the number of primers for a better resolution in the results.

Introducción

El uso de herramientas moleculares ha permitido describir y analizar los patrones de diversidad genética en distintos grupos de organismos, ayudando a entender procesos genéticos, ecológicos y evolutivos (Agarwal et al., 2008), como por ejemplo, la hibridación y su rol en el origen de nuevas especies (Rieseberg et al., 1993; Soltis & Soltis, 2009). A su vez, el desarrollo de la genética de la conservación ha permitido mejorar y acelerar la toma de decisiones en conservación biológica, abriendo un nuevo ámbito en la caracterización de especies raras (*sensu* Rabinowitz, 1981) o en peligro de extinción (DeSalle & Amato, 2004). En este sentido, diversos estudios se han dedicado a analizar patrones de estructuración poblacional (Donaldson, 2000; Schmidt & Jensen, 2000; Van der Hulst et al., 2000; Larson et al., 2004; Smulders et al.; 2008), niveles de diversidad genética en poblaciones de especies vulnerables (Winfield et al., 1998; Schmidt & Jensen, 2000; Maguire et al., 2002; Li et al., 2008) y tasas de flujo génico entre éstas (Krauss, 2000; Juan et al; 2004). La importancia de esta información radica en que altos niveles de diversidad genética, la cual es explicada por procesos genéticos y eco-evolutivos que generan su incremento y/o disminución, se asocia a un mayor potencial de respuesta ante amenazas como enfermedades, nuevos parásitos, depredadores y ambientes cambiantes (Amos & Hardwood, 1998).

Si algunas especies presentan rangos de distribución restringidos, bajos niveles de abundancia y/o alta especificidad de hábitat, pueden ser categorizadas como “raras” (Rabinowitz, 1981). Poblaciones que cumplen con algunas de estas categorías son más susceptibles a los efectos de la deriva génica (Barrett & Kohn, 1991), a mayores niveles de consanguineidad debido a autogamia y polinización restringida (Turner et al., 1982) y a mayor impacto del flujo genético (Handel, 1983). La disminución de la abundancia,

sumado a estos procesos y a la fuerza de la estocasticidad ambiental podrían generar pérdida de diversidad genética, incremento en la diferenciación interpoblacional y disminución de la adecuación biológica como consecuencia de la depresión por consanguineidad (Haig et al., 1990; Fischer & Matthies, 1997), aumentando así el riesgo de extinción local para poblaciones (Ellstrand & Elam, 1993), lo que ha sido evidenciado tanto en experimentos de laboratorio como en poblaciones naturales (Newman & Pilson, 1997; Saccheri et al., 1998; Reed et al., 2002; Reed & Frankhman, 2003; Reed et al., 2003). Gitzendanner y Soltis (2000) encuentran que existe una tendencia indicando que especies con amplia distribución geográfica poseen mayor diversidad genética que sus congéneres de distribución restringida, sin embargo, estas últimas muestran gran variabilidad en este parámetro, superando en algunos casos la diversidad genética de especies de amplio rango de distribución. Estas excepciones a la regla demuestran que hay procesos eco-evolutivos que no están siendo considerados; como por ejemplo, la hibridación, que pueden modular la genética poblacional de las especies.

La hibridación, que ocurre cuando dos linajes se cruzan exitosamente dejando descendencia (Soltis & Soltis, 2009), se ha registrado a nivel global en al menos el 9% de las especies vegetales, aunque en ciertas regiones –como en las islas británicas– puede alcanzar el 25% (Whitney et al., 2010). A nivel poblacional, el cruce de individuos de poblaciones divergentes podría revertir o empantanar los procesos de diferenciación genética, sin embargo, la hibridación entre especies diferentes puede provocar nuevos eventos de especiación a través de la recombinación adaptativa o alopoloidización (Abbott et al., 2013), por lo que su rol en la generación de nuevas taxa ha sido sujeto de amplio debate en las últimas décadas (Soltis & Soltis, 2009). La prevalencia de la especiación por hibridación constituye un fenómeno altamente variable entre distintos linajes (Mallet,

2005) y está ampliamente documentada en angiospermas. Ha sido registrada en géneros de monocotiledóneas, como *Spartina* (Ainouche et al., 2004), *Leucocoryne* (Salas & Mansur, 2004), *Tillandsia* (Gardner, 1984) y *Puya* (Schulte et al., 2010), y dicotiledóneas como *Cardamine* (Urbanska et al., 1997), *Helianthus* (Rieseberg et al., 2003) y *Senecio* (Abbott & Lowe, 2004). Asimismo, en la familia Cactaceae, el fenómeno es frecuente y ha sido propuesto como modelo de origen para especies de los géneros *Opuntia* (Griffith, 2001; Pinkava, 2002), *Melocactus* (Lambert et al, 2006a, Lambert et al, 2006b), *Micranthocereus* (Machado, 2008) e *Hylocereus* (Cisneros & Tel-Zur, 2013).

La familia Cactaceae presenta altos valores de riqueza con respecto al resto de las angiospermas (más de 1450 especies en ca. 127 géneros), es casi endémica de América y está especialmente adaptada a condiciones de aridez, aunque se encuentra en una gran variedad de ambientes y presenta una amplia gama de formas de crecimiento (Hunt, 2006). Miembros de este grupo cumplen roles fundamentales en ecosistemas áridos y semiáridos, siendo fuentes de alimento para la fauna silvestre y seres humanos y ejerciendo el rol de nodriza en algunos casos (Parker, 1989; Mandujano et al., 1996; Cares et al., 2013) y debido a las particularidades de la familia se han constituido como modelo de estudio en algunas disciplinas como fisiología y evolución (Hernández-Hernández et al., 2011). Entre las principales amenazas a las que están expuestas las cactáceas se encuentra el cambio de uso de suelo y el desarrollo urbano, la extracción de individuos y el impacto de la ganadería (Goettsch et al., 2015). Dentro de esta familia se encuentra el género *Eriosyce* (Cactoideae: Notocactaeae), presente en la zona centro y norte de Chile, el noroeste de Argentina y el sur del Perú, donde los mayores niveles de diversidad se a las pendientes occidentales de los Andes desde el nivel del mar hasta los 2800 m de altitud, entre los 13°S y 37°S, aunque también

existen especies cuyo hábitat se encuentra a mayores alturas, entre los 24°S y los 36°S en el lado este de los Andes (Guerrero et al., 2011). Los valores más altos de diversidad se encuentran entre los 26°S y los 30°S a altitudes inferiores a los 1500m (Guerrero et al., 2011).

Eriosyce chilensis (Hildmann ex K. Schum.) Katt. es una especie globular o elongada con flores infundibuliformes (con forma de embudo) presente en el borde costero de las provincias del Choapa y de Petorca, de Chile central, en el sitio prioritario para la conservación Los Molles – Pichidanguí. Hacia el sur de la distribución, el color de las flores de *E. chilensis* poseen mayor similitud con el resto de subsect. *Neoporteria*, excepto por el perianto interior, que se encuentra abierto completamente hacia afuera, y a medida que los individuos se encuentran más hacia el norte, el color de las flores se torna blanco-amarillento, manteniendo toques rosas en las puntas de los tépalos exteriores. Estos individuos fueron descritos por Ritter (1959) como *E. chilensis* var. *albidiflora*, diferenciándose de *E. chilensis* que posee una fuerte coloración fucsia (Figura 1). *Eriosyce chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* ocupan un área menor a 100 Km², limitada al norte y el sur por bahías y asentamientos humanos, lo que constituye una importante amenaza a su conservación (Katterman, 1994). La especie se encuentra en peligro de extinción por su distribución restringida y fuerte artificialización del hábitat por urbanización y construcción de caminos (Belmonte et al., 1998; MMA, 2017). *Eriosyce chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* crecen en simpatria con una especie de la subsección *Neoporteria* (*E. subgibbosa* (Haw.) Katt) y una especie perteneciente a la subsección *Horridocactus* (*E. curvispina* (Bertero ex Colla) Katt. var. *mutabilis* (F. Ritter) Katt.) (Guerrero et al., 2011). *Eriosyce subgibbosa* puede encontrarse desde el norte de Los Vilos hasta Concepción, usualmente en la línea costera, rodeando por completo la

zona de distribución de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*. Estas dos especies son muy similares en sus estructuras vegetativas y solo pueden diferenciarse por su morfología floral. Por último, *Eriosyce curvispina* var. *mutabilis*, de forma globular o subglobular (nunca elongada), posee flores infundibuliformes de color amarillo con líneas centrales rojizas en el perianto. Se encuentra presente entre Pichidangui y Los Molles, extendiéndose hacia el norte, este y sur, compartiendo hábitat con las dos especies antes mencionadas. La morfología de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* posee características morfológicas intermedias entre las de *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis* (Guerrero et al., 2011), siendo la mayor diferencia entre ellas con respecto a *E. subgibbosa*, la forma tubular de la flor de esta última y la coloración blanquecina de *E. chilensis* var. *albidiflora*, aspecto en el que guarda similitud con la flor de *E. curvispina* var. *mutabilis*, cuya flor posee forma de embudo al igual que las de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* (Figura 1). Estas asociaciones morfológicas han dado origen a una serie de problemas de clasificación taxonómica (Guerrero et al., 2011).

El posicionamiento taxonómico de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* es un tema que ha generado controversia y opiniones divididas. Debido a sus características morfológicas, estas taxa han sido clasificadas tanto dentro de la subsección *Neoporteria* por Nyffeler & Egli (1997) y Hunt et al. (2006), dentro de *Pyrrhocactus* (Ritter, 1959) y dentro de *Horridocactus* (Hoffman & Walter, 2004). Los estudios filogenéticos también entregan resultados discordantes según la metodología empleada, posicionando los taxa dentro de diferentes grupos o en distintas posiciones dentro de ellos. Guerrero et al. (2017, datos no publicados), a través de un muestreo exhaustivo y un enfoque multilocus usando cinco partidores (tres intrones plastidiales no codificantes, un gen plastidial y un gen nuclear), indica que *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora* y *E. subgibbosa* se

encuentran íntimamente emparentadas dentro de *Neoporteria*; mientras que *E. curvispina* var. *mutabilis* pertenecería a subsección *Horridocactus*, distante del resto de los taxa de estudio (Ver Anexo: Figura A1). Esto sugiere que la morfología de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* puede presentar varias homoplasias, lo que habría dificultado su clasificación taxonómica, y que podría ser explicada por un posible origen híbrido de los taxa, generando el fenómeno de rasgos pertenecientes a ambos grupos en *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, lo que es coherente con la existencia exclusiva de estos taxa en la zona de solapamiento entre *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa* (Guerrero et al., 2011).



Figura 2. Individuos en periodo de floración de A) *Eriosyce chilensis*, B) *Eriosyce chilensis* var. *albidiflora*, C) *Eriosyce subgibbosa* y D) *Eriosyce curvispina* var. *mutabilis* en la localidad de Los Molles. Fotografías de Pablo Guerrero.

El sitio prioritario Pichidanguí-Los Molles, en donde se emplazan estas taxa, y sus alrededores cobra especial relevancia al considerar la alta frecuencia de especies híbridas en la zona, fenómeno que ha sido descrito tanto para plantas como animales (Frías, 2005; Schulte et al., 2010; Correa et al., 2013). Las evidencias de sitios con alta frecuencia de hibridación han incrementado en las últimas décadas, asociados a la existencia de barreras geográficas naturales, gradientes ambientales a macro y micro escala –los cuales facilitan la coexistencia de especies diferentes pero emparentadas– y ciertas características de los ensambles de polinizadores –los cuales permitirían el cruce entre éstas–. (Hewitt, 1988; Aldridge & Campbell, 2006). El porcentaje de especies endémicas en esta zona alcanza el 56,7% del total y a su vez se encuentra un porcentaje de especies alóctonas asilvestradas mayor al promedio nacional -29% contra un 11,44%- (Marticorena, 1990; Lund & Teillier, 2012), lo que da cuenta del grado de perturbación que presentan algunas formaciones vegetacionales como lo es el matorral costero; que, al igual que el resto de los ecosistemas de tipo mediterráneo, presentan altos niveles de endemismo pero están sujetos a altos niveles de perturbación humana por cambio de uso de suelo e introducción de especies invasoras (Armesto et al., 2007).

Al ser taxa con distribución particularmente acotada y emplazados en una zona con alto grado de intervención humana, *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* plantean un desafío tanto desde la biología de la conservación como también de la biología evolutiva. La oportunidad de usar herramientas moleculares para el estudio de esta especie y otras congéneres con las que podría estar íntimamente relacionadas puede entregar información sobre el estado genético de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, su origen evolutivo y de los procesos genéticos subyacentes.

Hipótesis

Se propone que el flujo genético entre *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa* en el área de solapamiento de su distribución dio origen a *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*. Debido a la distribución acotada de éstos últimos, el grado de perturbación de su hábitat, sus características morfológicas y su origen híbrido, se espera encontrar:

1. Menores valores de diversidad genética para *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* que para *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa*.
2. Subestructuración dentro de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* y menores niveles de estructuración genética entre *Eriosyce chilensis* y *E. subgibbosa* y entre *E. chilensis* var. *albidiflora* y *E. curvispina* var. *mutabilis*, indicando así la existencia de flujo génico entre ellas.
3. Que la caracterización genética de los individuos de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* muestre que poseen carga genética representativa de los otros taxa involucrados, lo que apoyaría su origen híbrido.

Objetivo general

Analizar la estructuración poblacional y los niveles de diversidad genética de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* y aportar evidencias sobre el posible origen híbrido y retrocruces mediante la evaluación de la existencia de flujo génico entre *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis*.

Objetivos específicos

1. Cuantificar los índices de diversidad genética de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* y compararlos con los obtenidos para *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis*.
2. Analizar la estructuración poblacional en *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis* y evaluar la existencia de aislamiento genético por distancia a nivel intra e interpoblacional.
3. Determinar la ocurrencia de flujo génico (hibridación) entre *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis* en la actualidad o en el pasado reciente.

Metodología

Sitio de estudio

Los individuos muestreados se encuentran entre las localidades de Los Molles (32,239°S; 71,515°O), en la V Región de Valparaíso, y Pichidangui (32,133°S; 71,533°O), en la IV Región de Coquimbo, en una franja de aproximadamente 12 Km de largo y no más de 2 Km desde la costa (Figura 2). El área donde fueron muestreados los individuos, que comprende a la totalidad de su área de ubicación, posee una superficie de aproximadamente 13 Km² y se encuentra dentro del Sitio Prioritario para la Conservación Los Molles-Pichidangui (Benoit, 1989; Squeo et al., 2001).

La localidad de estudio presenta clima de tipo mediterráneo semiárido (Di Castri & Hayek, 1976), con una precipitación media anual de 312 mm, donde el 70% de esta cantidad se concentra en los meses de invierno. La temperatura media anual corresponde a 16,6°C, con una amplitud térmica anual de solo 5°C, lo que da cuenta de la influencia reguladora del mar (Lund & Teillier, 2012). La vegetación de la zona, denominada *Lithreo-Lucumetum* por Mooney & Schlegel (1967) presenta una fisionomía de matorral achaparrado, con árboles siempreverdes. Entre las especies más características del sector se encuentran *Pouteria splendens* (Sapotaceae), *Lithrea caustica* (Anacardiaceae), *Bahia ambrosioides*, *Baccharis macraei*, *Eupatorium salvia*, *Haplopappus foliosus* (Asteraceae), *Sphacele salviae* (Lamiaceae), *Puya chilensis* (Bromeliaceae) y *Fuchsia lycioides* (Onagraceae).

Geomorfológicamente, la zona se caracteriza por la presencia de terrazas marinas paralelas a la costa, generando pendiente en el borde oceánico. Los suelos son poco profundos y con poca capacidad de retención de agua, por lo que las

precipitaciones escurren superficialmente provocando erosión y disponibilidad reducida de agua para la vegetación (Squeo et al., 2001).

La zona presenta altos niveles de ocupación e intervención humana, desarrollándose actividades turísticas y económicas en el ámbito de distribución de los taxa estudiados. Por estos motivos, el paisaje se encuentra intervenido, afectado por destrucción y extracción de ejemplares, quema, depredación por ganado y pérdida de hábitat por urbanización (Squeo et al., 2001).

Muestreo de individuos y extracción de ADN

Entre los años 2014 y 2016, durante varias campañas de terreno, se tomaron muestras de areolas, flores o raíces de 121 individuos de *E. chilensis* y 84 individuos de *E. chilensis* var. *albidiflora* entre las localidades de Los Molles y Pichidangui. Adicionalmente, se recolectó material de 92 individuos de *E. subgibbosa* y 91 individuos de *E. curvispina* var. *mutabilis* en la misma zona y en otras localidades más al norte (hasta la altura de Los Vilos) (Figura 2). El material colectado fue guardado en etanol o en buffer de NaCl a -20°C para la posterior extracción de ADN.

Se extrajo ADN del material vegetal usando protocolo de extracción de DNeasy Plant Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). El producto de la extracción fue visualizado mediante geles de agarosa al 1%, con lo que se pudo confirmar el éxito en la extracción para 115 individuos pertenecientes a los cuatro taxa estudiados.

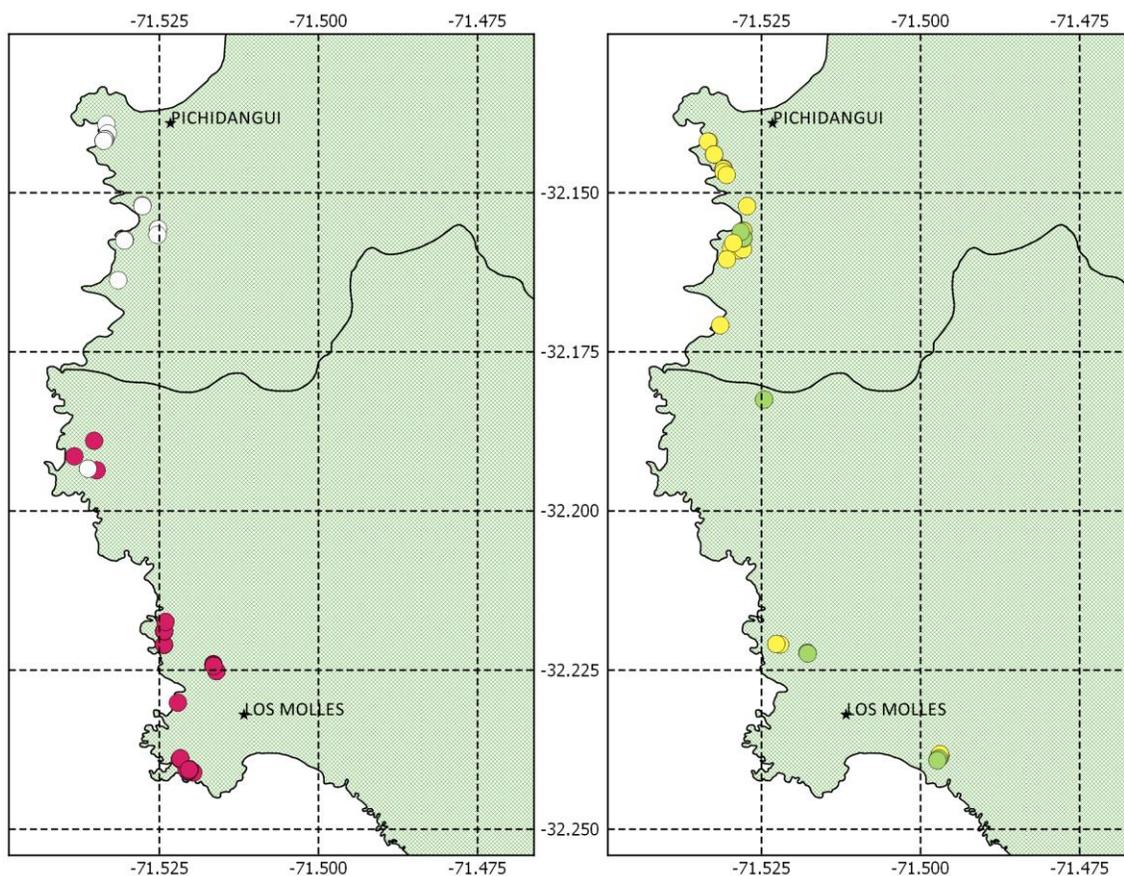


Figura 3. Mapa del sitio de estudio y ubicación de individuos muestreados y usados en el análisis de AFLP. El color de los puntos indica presencia e identidad del individuo, rosado para *E. chilensis*, blanco para *E. chilensis* var. *albidiflora*, amarillo para *E. curvispina* var. *mutabilis* y verde para *E. subgibbosa*. Cinco individuos de *E. subgibbosa* fueron muestreados más al norte de la distribución mostrada en el mapa y un individuo de *E. curvispina* var. *mutabilis* hacia el este.

Análisis de AFLP y procesamiento de datos

Los ensayos de AFLP fueron realizados siguiendo el protocolo de Vos et al. (1995). Muestras de ADN que formaban bandas concentradas y visibles en el gel de agarosa fueron diluidas en proporción 1:5, de lo cual se sacaron 5,5 µl para la reacción

de digestión/ligación. Para cada muestra de ADN, la mezcla de reacción contenía 1µl de buffer T4 10X; 1µl de NaCl 0,5M; 0,5µl de BSA (1mg/ml); 1 µl de adaptador EcoRI (5 pmol/µl); 1 µl de adaptador MseI (5pmol/µl) y 1 µl de mix de enzimas, que a su vez contiene 0,1 µl de buffer T4 10X; 0,1µl de NaCl 0,5M; 0,05 de BSA (1mg/ml); 0,25 µl de enzima EcoRI (20U/µl); 0,1 µl de enzima MseI (10U/µl); 0,025 µl de enzima ligasa T4 (400U/µl) y 0,375 µl de H₂O nanopura, llegando a un volumen final de 11µl. La reacción de digestión/ligación fue incubada en una máquina de PCR a 37°C por una hora, seguido de otra hora a 16°C, un periodo de 20 min 60°C y mantenida posteriormente a 4°C hasta ser retirada. El producto fue visualizado en geles de agarosa al 1% antes de continuar con los siguientes pasos.

El producto de la digestión/ligación fue diluido en proporción 1:5 para ser agregado a la reacción para PCR pre-selectiva que incluye 2,5 µ de buffer de PCR 10X; 0,75 µl de MgCl₂ 50mM; 0,25 µl de dNTPs 10mM; 0,5 µl de partidor Eco+0 (10pmol/µl); 0,5 µl de partidor Mse+0 (10pmol/µl); 0,1 µl de BSA (1mg/ml); 0,1 µl de enzima Taq recombinante (5U/µl); 15,3 µl de H₂O nanopura y 5 µl de producto de digestión/ligación en dilución 1:5. El volumen final de 25 µl se incubó en una máquina de PCR por un periodo inicial de 2 min a 72°C seguido de otro de 30 s a 94°C, para luego pasar por 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 58°C y 2 min a 72°C; para terminar con un periodo de 10 min a 72°C y quedar a 4°C hasta ser retirado. Se visualizaron 10 µl del producto en un gel de agarosa al 1% para confirmar éxito de la reacción.

El producto de la PCR pre-selectiva se diluyó en proporción 1:10 y 2,5 µl de éste fueron agregados a la mezcla para PCR selectiva, que contiene además 1,25 µl de buffer PCR 10X; 0,375 µl de MgCl₂ 50mM; 0,125 µl de dNTPs 10mM; 0,25 µl de partidor Eco+3 5µM; 0,625 µl de partidor Mse+3 10µM; 0,1 µl de BSA (1mg/ml); 0,1 µl de enzima Taq

Platinum (5U/ μ l) y 7,175 μ l de H₂O nanopura hasta completar un volumen inicial de 12,5 μ l. La reacción de PCR selectiva se incubó en una máquina de PCR por un periodo inicial de 2 min a 94°C, para luego pasar por 30 ciclos de 20 s a 94°C, 1 min a 63°C y 2 min a 72°C; para terminar con un periodo de 30 min a 60°C y quedar a 4°C hasta ser retirado. Se visualizaron 5 μ l del producto en un gel de agarosa al 2% para confirmar éxito de la reacción y registrar la calidad de las bandas.

Se probaron en primera instancia 80 combinaciones de marcadores EcoRI(+3)/MseI(+3) en las PCR selectivas con 16 individuos (4 de cada uno de los taxa estudiados). Posteriormente se realizó el ensayo completo con los 115 individuos usando las cuatro combinaciones de marcadores cuyas bandas presentaban mayor homogeneidad, polimorfismo, definición y similitud en intensidad. Los productos de los ensayos de AFLP fueron secuenciados en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

Los fragmentos de ADN fueron analizados usando el software GeneMarker v1.85 (Hulce et al., 2011), seleccionando manualmente la ubicación de los loci y verificando visualmente la presencia o ausencia del alelo en cada uno de estos. Los resultados fueron exportados y procesados a los distintos formatos para posteriores análisis estadísticos.

Análisis estadísticos

Con la matriz de presencia/ausencia de fragmentos para cada loci se calculó el índice de diversidad genética de Nei (H_S) (Nei, 1978) para cada uno de los taxa de estudios mediante el software TFPGA 1.3 (Miller, 1997). Se comparó H_S entre los taxa usando un test no paramétrico de Kruskal-Wallis en R (R Core Team, 2017).

Se utilizaron cuatro enfoques para evaluar el grado de estructuración de las poblaciones definidas previamente (el uso de concepto “población” solo se refiere a un conjunto de muestras agrupadas según una categoría y no necesariamente a la definición ecológica de la palabra). En primera instancia, se realizó un test exacto para diferenciación de poblaciones con el software TFGPA 1.3 y el cálculo de F_{ST} usando el software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) y de su análogo PhiPT en la extensión GenAlEx 6.5 de Excel (Peakall & Smouse, 2006). Usando los valores de F_{ST} obtenidos, se estimó el flujo genético entre taxa según la Ecuación 1 (Wright, 1949).

$$N_e m = 0,25 \times (1/F_{ST} - 1) \quad \text{Ecuación 1}$$

En segundo lugar, se llevó a cabo un análisis bayesiano de agrupamientos en el software Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000). Los análisis fueron hechos asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg, con loci no ligados y en equilibrio de ligamiento. El alelo presente fue considerado como el alelo dominante mientras que la ausencia de banda indicaba la presencia de un alelo recesivo. Se aplicó un modelo de mezcla genética bajo el supuesto de frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones. En el software se realizó una prueba preliminar con valores de K (número de grupos estructurados) entre 1 y 10, con tres repeticiones para cada valor para diez mil generaciones en fase de prueba y otras diez mil generaciones luego de ésta. A partir de los resultados de esta simulación, se volvió a realizar el análisis con los mismos parámetros pero para valores de K entre 1 y 5 con cinco repeticiones en cada escenario. El número más probable de agrupamientos (K) se eligió según las indicaciones de Evanno (2005), quien señala que el número más probable de agrupamientos está dada por la tasa de cambio de segundo orden en la función de verosimilitud respecto a K (ΔK). La diferencia entre el valor de ΔK

para cada escenario con respecto a los otros es indicador de la probabilidad del número de agrupamientos (Evanno, 2005).

Como indicador de la fuerza de la estructuración, se realizó un AMOVA (Análisis Molecular de Varianza) para determinar la repartición de la varianza genética en los grupos previamente definidos, en la extensión GenAlEx 6.5 de Excel.

Por último, se realizó un análisis de discriminantes de componentes principales (DAPC, por sus siglas en inglés); el cual, a diferencia del análisis en Structure, es un análisis multivariado en el que se maximiza la variación entre grupos y se minimiza la diferencia dentro de los grupos, con el fin de definir el número de agrupamiento en el que mejor se cumplan estas condiciones (Jombart et al., 2010).

Usando la extensión GenAlEx 6.5 se llevó a cabo un test de Mantel (Diniz-Filho, 2013) para cada uno de los taxa, para *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* formando un solo grupo y para los cuatro taxa en conjunto, con el fin de determinar si existe aislamiento genético por distancia entre los individuos, a partir de los valores de distancia genética de Nei (Nei, 1978) y la distancia calculada usando las coordenadas geográficas de muestreo.

Resultados

Análisis de AFLP

De las cuatro combinaciones de partidores utilizadas para el análisis, se descartó una de ellas debido a la mala calidad del análisis de los fragmentos en gran parte de las muestras. A partir de las tres combinaciones restantes se pudo codificar un total de 164 loci de tamaño variable entre 70 y 500 pb para un total de 90 individuos, que presentaban secuencias electroferogramas de buena calidad en cada una de ellas (Tabla 1). Según la identidad asignada en la colecta, se analizaron 31 individuos de *E. chilensis*, 18 individuos de *E. chilensis* var. *albidiflora*, 29 individuos de *E. curvispina* var. *mutabilis* y 12 individuos de *E. subgibbosa*.

Tabla 1. Número de loci obtenidos para cada combinación de partidores.

Combinación	N° de loci obtenidos
Eco+ACA/Mse+CAG	44
Eco+ACA/Mse+CAC	0
Eco+ACG/Mse+CTC	61
Eco+ACG/Mse+GAC	59

Diversidad genética

El porcentaje de loci polimórficos para cada uno de los taxa analizados fue mayor para *E. curvispina* var. *mutabilis* (97,6%) y menor para *E. subgibbosa* (89,6%). Los valores obtenidos para la diversidad genética de Nei (H_s) no difieren significativamente entre los taxa según el test de Kruskal-Wallis ($P=0,27$) (Tabla 2).

Tabla 2. Número de loci polimórficos, porcentaje que representan con respecto al total y diversidad genética para cada uno de los taxa estudiados.

Taxa	N° de loci polimórficos (%)	H_s
<i>Eriogyce chilensis</i>	155(94,5)	0,3194
<i>Eriogyce chilensis var. albidiflora</i>	148(90,2)	0,3156
<i>Eriogyce curvispina var. mutabilis</i>	160(97,6)	0,3420
<i>Eriogyce subgibbosa</i>	147(89,6)	0,3210

Estructuración genética y flujo génico

Mediante el test exacto llevado a cabo para *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa* se encontró diferenciación significativa para *E. curvispina* var. *mutabilis* con respecto a los tres otros grupos y para *E. chilensis* var. *albidiflora* con respecto a *E. subgibbosa*. El cálculo del índice de fijación (F_{ST}) y su análogo Φ_{iPT} , indicó diferenciación significativa entre todos los taxa (Tabla 3).

Los valores más altos para los índices F_{ST} y Φ_{iPT} se obtienen al comparar *E. curvispina* var. *mutabilis* con el resto de los grupos, seguido de *E. chilensis* var. *albidiflora* con respecto a *E. subgibbosa*. Los valores más bajos se obtienen para *E. chilensis* con respecto a *E. chilensis* var. *albidiflora* seguido de la primera en relación a *E. subgibbosa*.

Tabla 3. Resumen de valores obtenidos para test exacto y análisis de diferenciación genética entre cada una de las comparaciones entre taxa, donde EC corresponde a *E. chilensis*; ECA, *E. chilensis* var. *albidiflora*; ECM, *E. curvispina* var. *mutabilis* y ES *E. subgibbosa*. Se muestran valores de probabilidad combinada de obtener error tipo I al rechazar H_0 para cada par de combinaciones en test exacto y valores de F_{ST} y PhiPT. Para valores de F_{ST} y PhiPT, número de asteriscos indica valor de P (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$).

	Prob. combinada de test exacto			F_{ST}			PhiPT		
	EC	ECA	ECM	EC	ECA	ECM	EC	ECA	ECM
ECA	0,4275	-	-	0,046**	-	-	0,024*	-	-
ECM	<0,001	<0,001	-	0,151***	0,179***	-	0,137***	0,160***	-
ES	0,0979	0,0148	<0,001	0,062*	0,104***	0,171***	0,033***	0,070***	0,146***

Las tasas más altas de flujo génico se obtienen entre *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, y en segunda medida se encuentra *E. subgibbosa* con *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*. *Eriosyce curvispina* var. *mutabilis* presenta los menores niveles de flujo genético con respecto las otras taxa (Tabla 4).

Tabla 4. Flujo génico calculado ($N_e m$; Wright, 1949) para cada combinación de taxa.

	<i>E. chilensis</i>	<i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i>	<i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i>
<i>E. chilensis</i> var. <i>albidiflora</i>	5,185	-	-
<i>E. curvispina</i> var. <i>mutabilis</i>	1,406	1,147	-
<i>E. subgibbosa</i>	3,782	2,154	1,212

El análisis en Structure para determinar el número más probable de agrupamientos basado en las frecuencias alélicas asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg (Condición de panmixia, tamaño poblacional infinito, sin selección natural ni mutaciones), evaluando la probabilidad de 1 a 5 grupos estructurados con 5 simulaciones para cada escenario, entregó un valor $K=3$ (Ver Anexo: Tabla A1, Figura A2).

La visualización de individuos en un gráfico triangular (Figura 3), con cada *cluster* en uno de los vértices muestra un grupo ocupado exclusivamente por individuos de *E. curvispina* var. *mutabilis*, aunque algunos individuos de esta categoría son asignado a otros grupos. En torno a un segundo *cluster* se agrupan los individuos de *E. subgibbosa* mientras que los individuos de *E. chilensis* se agrupan principalmente en el último *cluster*, pero con presencias en el agrupamiento característico de *E. subgibbosa*. El gráfico de barras también permite visualizar la estructuración del grupo compuesto por individuos de *E. curvispina* var. *mutabilis*, a diferencia de los otros otros grupos, cuyos individuos presentan mayores niveles de mezcla genética (Figura 4).

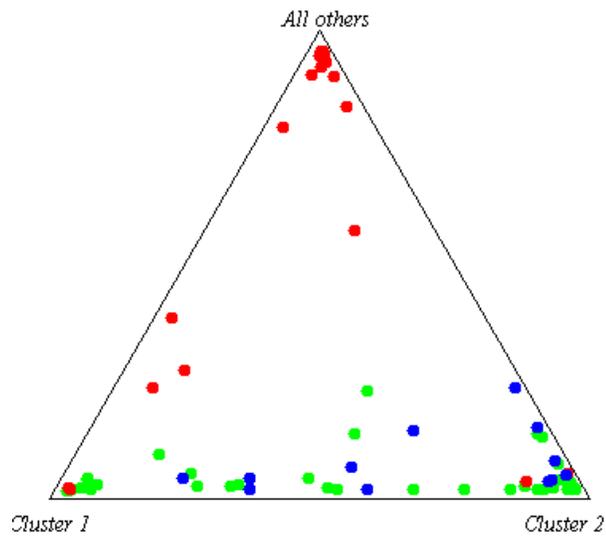


Figura 4. Gráfico triangular de asignación a clusters definidos por análisis de estructura, para individuos de *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora* (puntos verdes), *E. curvispina* var. *mutabilis* (puntos rojos) y *E. subgibbosa* (puntos azules).

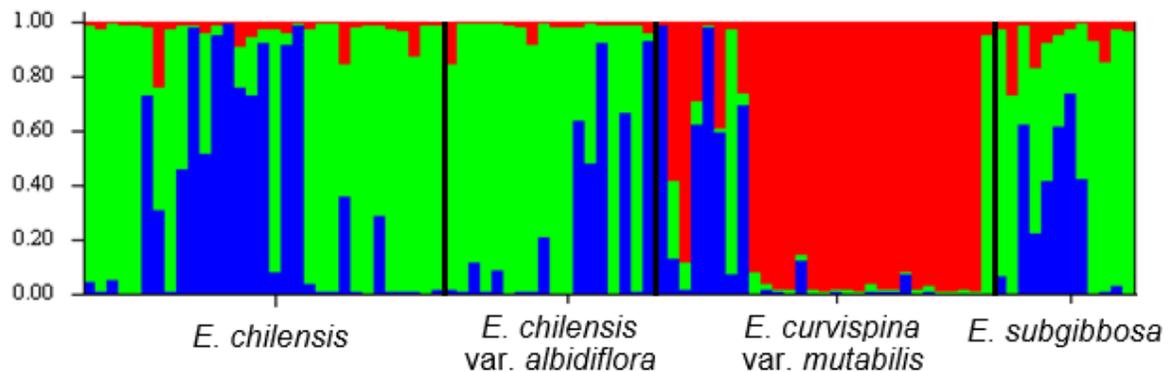


Figura 5. Gráfico de barras indicando mezcla genética de los 90 individuos correspondientes a los cuatro taxa estudiados revelado por análisis bayesiano de estructura genética. Subdivisiones con barras negras indican identidad asignada inicialmente a los individuos. El color de la barra indica porcentaje de asignación de cada individuo a un determinado grupo, para $K=3$.

El análisis de discriminantes de componentes principales logró determinar tres agrupamientos, con consistencia por los entregados por análisis de Structure (Figura 5). Uno de los *clusters* presenta individuos pertenecientes a todos los taxa en proporciones similares (*Cluster 1*), el segundo (*Cluster 2*), contiene la mayoría de los individuos de *E. chilensis* y el tercero (*Cluster 3*) está compuesto principalmente por individuos de *E. curvispina* var. *mutabilis*. Aun así, los tres *clusters* incluyen individuos de todos los taxa, lo que da cuenta de similitudes genéticas importantes. Esto se refleja también en la distribución de los *cluster 2* y *3* en la segunda función discriminante, en la que existe un solapamiento no despreciable.

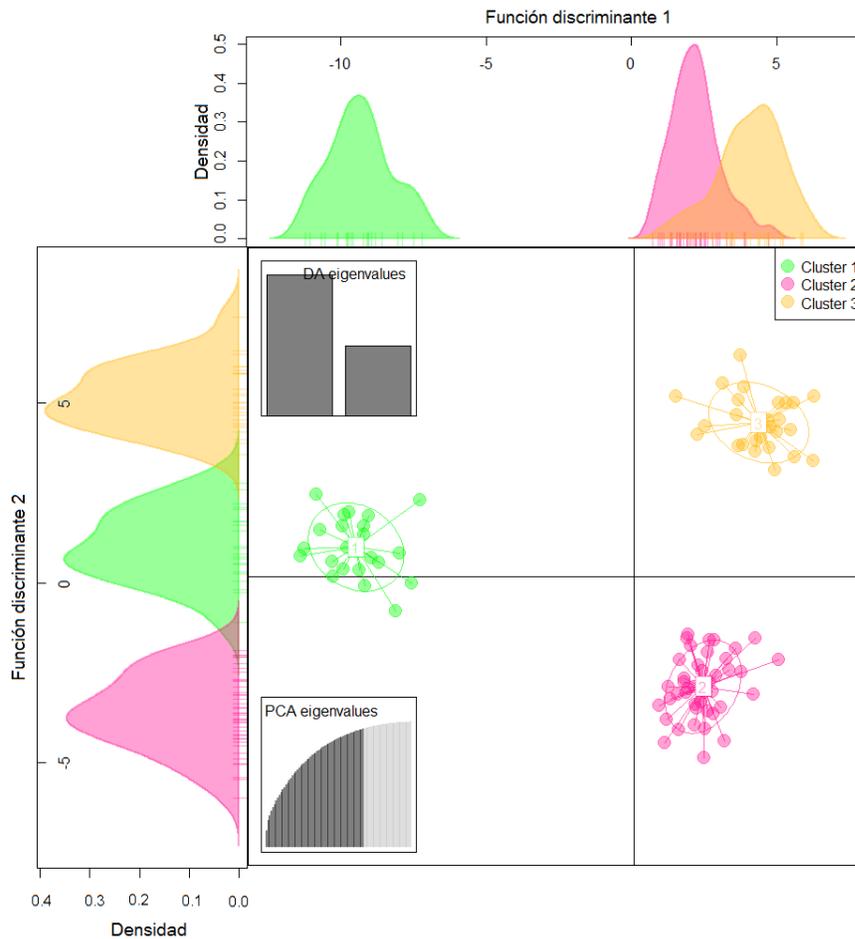


Figura 6. Análisis de discriminantes de componentes principales, donde se distinguen tres cluster, de los cuales además se muestra su densidad a lo largo de dos funciones discriminantes que los separan.

El análisis molecular de varianza dentro de *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora* atribuyó solo un 2% de varianza a la diferencia entre ambas taxa (Tabla 5), encontrándose la mayor parte de la variabilidad genética dentro de los grupos, dando apoyo al carácter no diferenciado de esta población. Al repetir el análisis con los cuatro taxa estudiados, el porcentaje de varianza explicada por la distinción entre ellas aumenta al 12% debido al efecto de los otros dos taxa (Tabla 6; Figura 6).

Tabla 5. Análisis molecular de varianza considerando el complejo *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora* ($n=49$, $P=0,033$)

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre grupos	1	43,653	43,653	0,695	2%
Dentro de Grupo	47	1307,367	27,816	27,816	98%
Total	48	1351,020		28,512	100%

Tabla 6. Análisis molecular de varianza considerando los tres grupos (*E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa*, $n=90$, $P=0,001$).

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre grupos	2	248,892	124,446	3,689	12%
Dentro de Grupo	87	2421,075	27,828	27,828	88%
Total	89	2669,967		31,518	100%

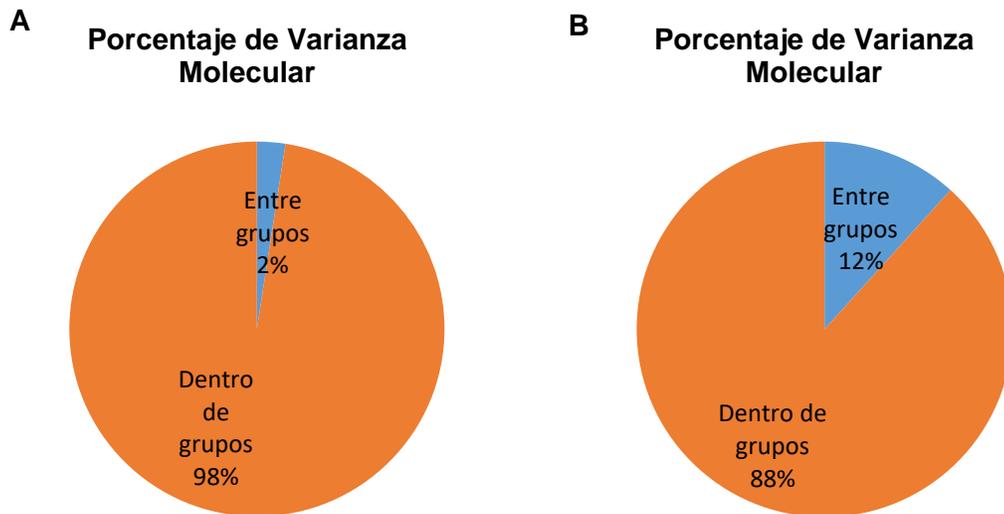


Figura 7. Gráficos de distribución de varianza genética entre y dentro de grupos considerando A) Ambas variedades de *E. chilensis* (n=49) y B) Los tres grupos (*E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora*, *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa*, n=90)

Aislamiento por distancia

El test de Mantel arroja una pendientes levemente positivas, aunque significativamente distinta de cero solo para el grupo con individuos pertenecientes a *E. chilensis* (P=0,019), indicando que este es el único grupo donde existe correlación entre las distancias genéticas entre pares de individuos y su distancia geográfica (Figura 7). En el resto de los taxa o agrupamientos no se observa aislamiento genético por distancia.

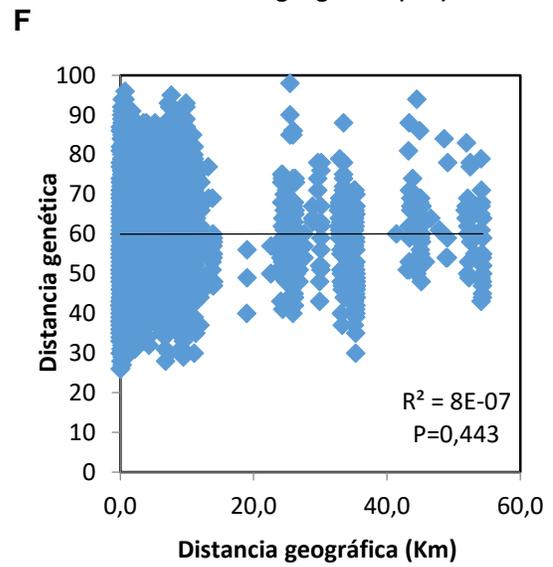
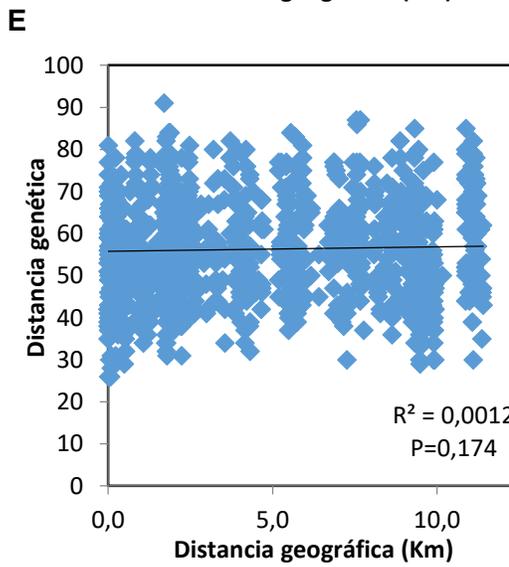
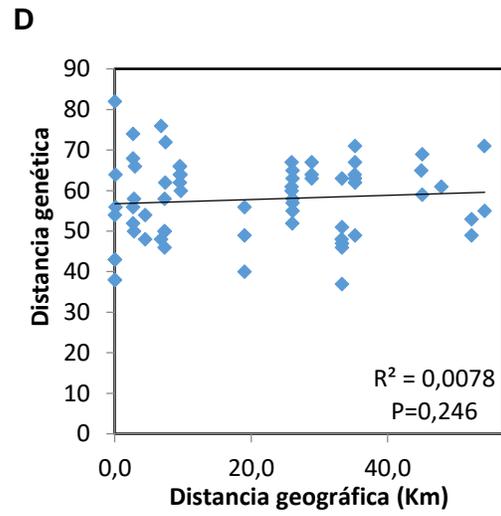
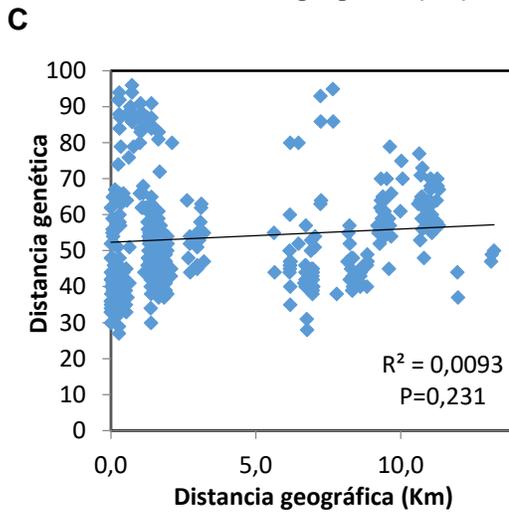
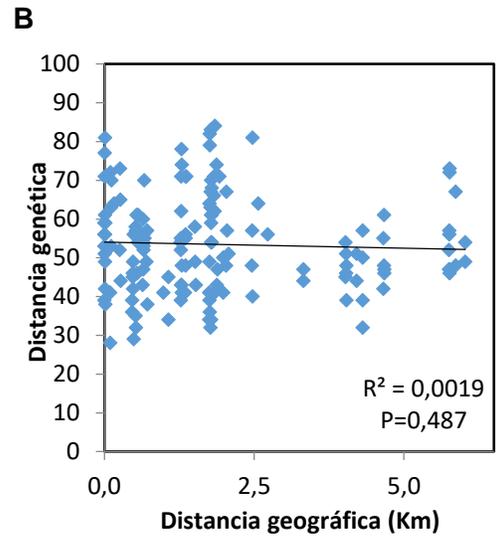
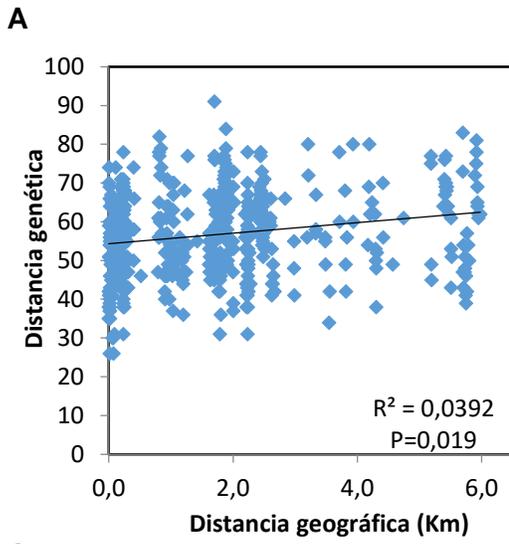


Figura 8. Test de Mantel para Distancia geográfica y Distancia genética de Nei (Nei, 1978) para A) *E. chilensis*; B) *E. chilensis* var. *albidiflora*; C) *E. curvispina* var. *mutabilis*; D) *E. subgibbosa*; E) Cuatro taxa combinados y F) Complejo *E. chilensis* - *E. chilensis* var. *albidiflora*. En cada gráfica se indica coeficiente de correlación (R^2) y valor de P.

Discusión

Diversidad genética

La estimación de la diversidad genética para los cuatro taxa estudiados no muestra diferencias significativas entre ellas. Este resultado no es coherente con la hipótesis planteada, que sugería niveles deficientes para los taxa de distribución restringida *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, ni con las visiones tradicionales sobre diversidad genética en especies raras (Ellstrand & Ellam, 1993). Según Rabinowitz (1981), las especies raras corresponden a una categoría que engloba taxa de abundancia reducida, distribución acotada o alta especificidad de hábitat y que cada una de ellas está sujeta a procesos ecológicos distintos y propios a su historia. En base a esto, Gitzendanner y Soltis (2000) defienden la idea de que, si bien existe una correlación negativa entre rango de distribución y diversidad genética, las especies raras no exhiben exclusivamente bajos niveles de diversidad y que cada una de éstas debe ser estudiada y tratada por su cuenta. A su vez, sugieren que los estudios en que se mida diversidad genética se realicen comparando los niveles observados con los de especies congéneres de distribución amplia, tal como se realizó en este trabajo; de esta forma se evita caer en interpretaciones basadas en generalizaciones o en comparaciones con otros casos de estudio que, debido a las distintas condiciones del sistema, carecerían de validez. Es importante considerar que para este trabajo no se considera la totalidad de la distribución de *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis*, por lo que sus niveles de diversidad genética podrían estar subestimados, sin embargo, el muestreo realizado permite analizar de forma suficiente la diversidad y estructuración genética de éstos taxa en la zona de interés. Expandir el área de muestreo para *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis* permitiría conocer con mayor precisión sus valores de diversidad genética en toda su distribución geográfica.

Eriosyce chilensis y *E. chilensis* var. *albidiflora*, a pesar de su restringido rango de distribución, presentan niveles de diversidad genética similares que los otros taxa estudiados en este trabajo y a valores obtenidos en otros estudios sobre diversidad genética en Cactaceae (Parker & Hamrick, 1992; Nassar et al., 2003; Parra et al., 2008; Figueredo et al., 2010). Esto puede ser explicado tanto por la historia de vida como por el sistema reproductivo de éstos. Las especies con mayor tendencia a la exogamia presentan usualmente mayores niveles de diversidad genética que otras especies donde la principal forma de reproducción sea en base a la autogamia; y a su vez, las especies de mayor longevidad tienden a sufrir menos erosión genética que aquellas de vida muy corta o anual (Hamrick & Godt, 1996; Nybom, 2004). *Eriosyce chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* pueden llegar a vivir varias décadas y el género *Eriosyce* se reproduce principalmente de forma exógama (Katterman, 1994; Walter, 2008; Guerreto et al., 2011). Además, nuestros resultados confirman que *E. chilensis* mantendría un nivel de flujo génico importante con *E. subgibbosa*, lo que podría mantener constantes los niveles de diversidad genética dentro de la población.

Estructuración genética y aislamiento por distancia

Tanto los resultados de estructuración genética, obtenidos mediante el test exacto y el cálculo de F_{ST} y Φ_{iPT} , como el análisis bayesiano y multivariado de *clusters* y el AMOVA dan luces sobre el escenario de relaciones evolutivas entre los taxa estudiados. El test exacto indica que, en base a las frecuencias alélicas de cada locus, *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* consituyen una única población desde el punto de vista genético, mientras que los valores de F_{ST} y Φ_{iPT} arrojan las cifras más bajas para esta combinación. Esto coincide con el test de AMOVA que atribuye solo un 2% de la varianza genética a la distinción entre *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* (que

aumenta al 12% al incluir a *E. curvispina* var. *mutabilis* y a *E. subgibbosa*) y al análisis bayesiano de agrupamientos, donde los individuos muestran niveles variados de mezcla genética correspondiente a dos de los tres grupos determinados. Todo esto sugiere la existencia de un complejo reproductivo *E. chilensis* - *E. chilensis* var. *albidiflora* que no se encuentra subestructurado, tal como se postulaba en la segunda hipótesis de esta tesis. En los dos *clusters* donde se asigna a individuos de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, también se encuentran todos los individuos de *E. subgibbosa*, dando cuenta de la cercanía genética y de la existencia de flujo génico con esta especie. Con respecto a ésta última, el test exacto no indica diferenciación significativa con *E. chilensis* pero sí con *E. chilensis* var. *albidiflora*, lo que indica mayores niveles de flujo genético (y posible hibridación reciente y actual) con la primera que con la segunda. A su vez, los valores de F_{ST} y Φ_{IPT} para *E. subgibbosa* muestran un mayor nivel de estructuración con *E. chilensis* var. *albidiflora* que con *E. chilensis*. *Eriosyce curvispina* var. *mutabilis* presenta los mayores niveles de estructuración y además constituye un grupo distinto en el análisis bayesiano de *clusters*, aunque algunos individuos de *E. curvispina* var. *mutabilis* presentan altos grado de asignación a otros grupos, indicando que el flujo genético de los otros taxa con éste debe ser escaso o inusual. Sin embargo, en el análisis de discriminantes de componentes principales, los *clusters* conformados principalmente por *E. chilensis* y *E. curvispina* var. *mutabilis* presentan solapamientos en una de las funciones discriminantes, lo que daría cuenta de cercanía genética a pesar de la distancia filogenética entre estos taxa.

Altos niveles de estructuración genética (y subestructuración intrapoblacional) habían sido asociados a especies de rango acotado mediado por la acción de la deriva génica (Hamrick & Godt, 1996). Sin embargo, revisiones más recientes indican que no

existe diferencia en la repartición de la varianza genética en o entre poblaciones de especies de distribución amplia o restringida (Gitzendanner & Soltis, 2000), tal como indicaban Loveless & Hamrick (1984), quienes aseguraban que el rango de distribución de especies es un mal predictor de la estructuración genética de las poblaciones. El sistema reproductivo varía en plantas de distribución restringida, desde especies completamente autocompatibles hasta otras que requieren de polinizadores bióticos (Karron, 1991). Estas diferencias tendrían fuertes efectos en los niveles de estructuración genética en poblaciones de especies raras, en la medida que la tendencia a la exogamia prevendría la subestructuración, ya que, al verse favorecida la recombinación genética, se vería reducida la erosión genética (Hamrick & Godt, 1996). Se ha encontrado que especies de distribución restringida especializadas a la polinización por abejas, como *Desmodium nudiflorum* (Fabaceae), presentan bajos niveles de estructuración poblacional (Schaal & Smith, 1980), lo cual es el caso para *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* que presentan flores vistosas y son visitadas por una amplia diversidad de polinizadores, principalmente abejas (Guerrero, datos no publicados). Este tipo de reproducción puede explicar la carencia de subestructuración genética en *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*.

En base a las similitudes morfológicas entre los taxa, se esperaba menores niveles de estructuración genética entre *E. chilensis* y *E. subgibbosa* y entre *E. chilensis* var. *albidiflora* y *E. curvispina* var. *mutabilis*. Esto solo se cumple en el primer caso y puede entenderse al considerar los ensambles de polinizadores y los microhábitats asociados a cada taxón. *E. chilensis*, *E. chilensis* var. *albidiflora* y *E. subgibbosa* ocupan principalmente la línea de la costa y crecen en las grietas de los afloramientos rocosos que son característicos de la zona (Ver Anexo: Figura A3 y A4). Si bien, la flor de *E.*

subgibbosa está especializada para la polinización por colibríes, también es polinizada por pequeñas abejas, al menos en partes del rango de su distribución (Walter, 2008). Esta coexistencia podría explicar los altos niveles de flujo genético entre *E. chilensis* y *E. subgibbosa*, que pueden poseer nichos de polinización solapados favoreciendo el cruzamiento interespecífico. *Eriogyne curvispina* var. *mutabilis*, si bien, habita la misma zona geográfica, está segregado del resto de los taxa del lugar si se considera una menor escala espacial, ya que ocupa otro tipo de microhábitat, fuera de las formaciones rocosas, a ras de suelo y más alejada de la costa (Ver Anexo: Figura A4).

La carencia de aislamiento genético por distancia en la mayoría de los taxa puede deberse tanto al reducido rango geográfico de ocupación o muestreo de éstos y al efecto de polinizadores de amplio ámbito de hogar como los picaflores, que presentan además bajos niveles de selectividad en su elección (Walter, 2008). El único grupo donde se encontró una tendencia significativa fue en *E. chilensis*, lo cual es coherente con los gradientes morfológicos en la flor descritos por Walter (2008) en esta especie (Ver Anexo: Figura A5), a diferencia de *E. chilensis* var. *albidiflora*, menos variable en estos rasgos. Este gradiente morfológico podría dar cuenta del efecto de polinizadores de ámbito de hogar reducido como las abejas.

Escenario de hibridación

La hipótesis planteada, sustentada en el escenario propuesto por Guerrero et al. (2011), propone un origen híbrido de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, basándose en sus características morfológicas que permiten asociarlo tanto a *Neoporteria* como a *Horridocactus* y a modelos predictivos de distribución, en donde la distribución de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* coincide con el solapamiento en las áreas de ocupación de *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa*; no obstante, la mayoría de

los análisis realizados muestran solo mezcla genética con *E. subgibbosa*. Esto indica que *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* poseen flujo genético interespecífico sólo con *E. subgibbosa* en la historia reciente, lo que genera la carga genética mixta entre estos taxa. El análisis de discriminantes de componentes principales es el único que, en cierta medida, entrega evidencia de cierta similitud genética entre *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora* y *E. curvispina* var. *mutabilis*.

A pesar de que solo el DAPC sugiere similitud entre *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora* y *E. curvispina* var. *mutabilis*, no se descarta necesariamente un escenario de hibridación entre *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa* en una época anterior, cuya huella genética quedaría parcialmente fuera de la resolución de la técnica de AFLP. Resultados preliminares de reconstrucciones filogenéticas, usando partidores plastidiales y nucleares, asignan a *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* en la base de la subsección *Neoporteria*, pero al generar un árbol filogenético incluyendo varios individuos de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, éstos se ubican junto a *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa*, formando una gran politomía y desarmando los clados *Neoporteria* y *Horridocactus* (Guerrero, datos no publicados), lo que sugiere la cercanía de los híbridos putativos (*E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*) a ambas subsecciones y que ambos taxa poseen información genética de origen mixto entre *Neoporteria* y *Horridocactus*, apoyando la posibilidad de hibridación ancestral de antigüedad tal que no es detectable mediante AFLP, la cual mostraría dinámicas de retrocruces más recientes. La evidencia conjunta de factores genéticos, ecológicos y evolutivos obtenida tanto en este trabajo como en otros sobre el mismo sistema de estudio relevaría un escenario de mayor complejidad a lo inicialmente contemplado,

donde procesos históricos y contemporáneos entre los taxa afectarían sus dinámicas ecológicas y evolutivas.

En base a los antecedentes entregados, no se descarta completamente la hipótesis del origen híbrido de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* pero se abre un escenario a distintas escalas temporales. Al menos, en la actualidad, es posible visualizar la oportunidad ecológica de hibridación ya que el periodo de floración de *E. subgibbosa* se inicia a finales de junio y termina a finales de octubre (Walter, 2008; obs. de campo), mientras que la de *E. curvispina* var. *mutabilis* empieza a finales de octubre y se extiende hasta mediados de diciembre (obs. de campo). Se han encontrado en terreno individuos de ambos taxa floreciendo simultáneamente (Octubre de 2016), por lo que puede haber existido transferencia ocasional de polen entre éstas en el pasado a través polinizadores comunes como las abejas. Se propone que este fenómeno pudo haber ocurrido en el pasado, donde se generaron individuos de morfología intermedia entre *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa*. Los posteriores cruzamientos sucesivos de estos híbridos entre sí y los retrocruces con individuos de *E. subgibbosa* daría cuenta del patrón genético obtenido mediante AFLP en el complejo *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora* y de los niveles de flujo génico con *E. subgibbosa* (mayores para *E. chilensis* que para *E. chilensis* var. *albidiflora*) (Figura 8). Este modelo es coherente con las observaciones realizadas por Walter (2008) quien describe una alta variabilidad en la forma de la flor para *E. chilensis* (desde completamente infundibuliforme hasta casi tubulares, incluso en un mismo individuo; ver Anexo: Figura A5) mientras que *E. chilensis* var. *albidiflora* presentaría menor variación en la forma del perianto, manteniendo la forma de embudo característica de *Horridocactus*. Tras el periodo de generación de los híbridos que habrían prosperado en la zona, los polinizadores de *E. chilensis*, *E. chilensis*

var. *albidiflora* y *E. subgibbosa* –quienes comparten microhábitat en los florecimientos rocosos– habrían limitado sus visitas a *E. curvispina* var. *mutabilis*, descartando así a éste del complejo reproductivo y generando los actuales niveles y patrones de diferenciación y estructuración genética.

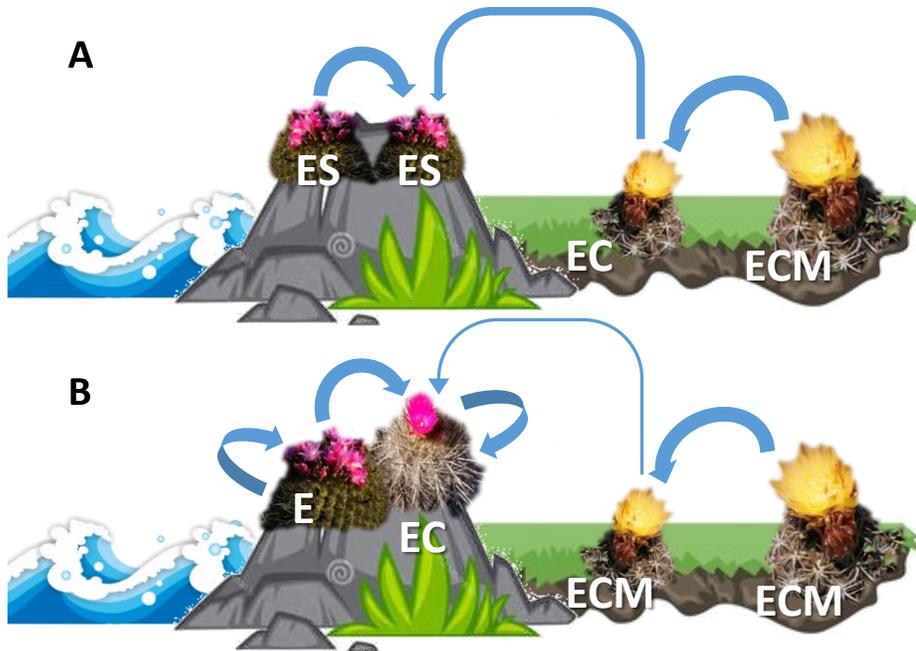


Figura 8. Diagrama de escenario de hibridación que daría origen a complejo *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora*. Grosor de flechas azules indica frecuencia relativa del flujo genético entre los distintos taxa para dos tiempos A (periodo de generación de híbridos) y B (periodo actual). Siglas identifican a las especies, correspondiendo ES a *E. subgibbosa*, ECM a *E. curvispina* var. *mutabilis* y EC a *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora*. En periodo A, el flujo genético se da principalmente entre individuos de su mismo taxa, aunque habrían existido cruces ocasionales entre *E. subgibbosa* y *E. curvispina* var. *mutabilis*, los que habrían dado origen a *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*. En periodo B, debido a proliferación de *E. chilensis*-*E. chilensis* var. *albidiflora*

y similitudes en microhábitat, el flujo genérico entre taxa distintos se da principalmente entre éstas y *E. subgibbosa*, limitando flujo con *E. curvispina* var. *mutabilis*.

El tamaño del ámbito de hogar, la preferencia y la constancia de los polinizadores en una red planta-polinizador juega un rol esencial en la ocurrencia de híbridos en especies vegetales, en tanto que polinizadores con mayor labilidad en su selección de especies favorecerían procesos de hibridación con respecto a polinizadores con mayor constancia (Aldridge & Campbell, 2006). La hibridación entre y *E. subgibbosa*, polinizada por picaflores, y *E. curvispina* var. *mutabilis*, polinizada por abejas, como también con *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, polinizadas por abejas, son escenarios posibles debido a los solapamientos observados en sus periodos de floración y debido al comportamiento de sus polinizadores. Las abejas que polinizan flores infundibuliformes usualmente no polinizan flores tubulares como las de *E. subgibbosa*, sin embargo, podrían llegar a hacerlo especialmente si es que esta ya ha sido visitada por picaflores, los cuales aumentan la apertura del tubo floral en flores visitadas y, a su vez, los picaflores podrían visitar fácilmente ambos tipos de flores si es que están hambrientos (Walter, 2008). El ámbito de hogar reducido de las abejas jugaría un rol importante en la exclusión de *E. curvispina* var. *mutabilis* del complejo reproductivo tras el origen de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, ya que ocupa un micro-habitat distinto al de los otros taxa.

Existen casos en la familia Cactaceae que guardan similitud en ciertos aspectos con el escenario aquí presentado; *Melocactus albicephalus* (Tribu: Cereeae) existe en una única locación y presenta morfología intermedia entre otras dos especies simpátricas *Melocactus glaucescens* y *M. ernestii*, de las que solo se distingue por las características de su cefalio –estructura lanuda donde se desarrollan los meristemas

florales y que está presente en algunos cactus– (Taylor y Zappi, 2004). La caracterización genética realizada en la especie no permite confirmar conclusivamente el origen híbrido de ésta, lo que es atribuido al proceso de diferenciación posterior experimentado por *M. albicephalus* (Lambert et al., 2006b). *Micranthocereus streckeri* (Tribu: Cereeae) también se ubica en una única locación y es el único miembro del subgénero *Micranthocereus* con un cefalio lateral. Esta especie crece en simpatria con *Micranthocereus purpureus*, perteneciente al subgénero *Austrocephalocereus*, que presenta un cefalio lateral más prominente que *M. streckeri*. Se propone que la introgresión de *M. purpureus* en algún taxa ancestral dio origen y fue reemplazado por *M. strickeri* (Machado, datos no publicados). La generación de híbridos fértiles capaces de cruzarse entre sí o con especies parentales es una de las barreras que debe ser sorteada en el escenario propuesto, lo cual ha sido descrito para otras cactáceas. *Opuntia spinosior* y *O. versicolor* (Tribu: Opuntieae) crecen simpátricamente y presentan solapamiento en su floración. Ambas especies se reproducen principalmente de forma sexual, mientras que la reproducción vegetativa es un fenómeno inusual. El cruce entre estas dos especies produce híbridos fértiles y abundantes, capaces de producir introgresiones con las especies parentales y que presentan un alto grado de variedad morfológica (Grant & Grant, 1971), tal como el descrito por Walter (2008) para *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*.

La aplicación de nuevas tecnologías en la detección de eventos de hibridación posee especial relevancia ya que, a diferencia de las visiones clásicas (e.g. Wagner Jr., 1969), los híbridos en algunos linajes de plantas son más frecuentes de lo que se pensaba hace varias décadas y no presentan necesariamente morfología intermedia respecto a los taxa parentales, sino que puede corresponderse exclusivamente con la

de uno solo de ellos o exhibir rasgos extremos o novedosos (Rieseberg et al., 1993), lo que haría indispensable el uso de herramientas moleculares para su correcta identificación. Esto puede explicar el hallazgo de individuos muestreados y catalogados como *E. curvispina* var. *mutabilis* basados en sus características morfológicas que presentan mezcla genética importante asociada a los otros taxa estudiados (Figura 5).

Comentarios sobre AFLP

Los AFLP son útiles en una amplia gama de aplicaciones, como la medición de la diversidad genética, descripción de los patrones de estructuración poblacional, asignación e identificación de individuos, mapeo de ligamientos, reconstrucción filogenética básica y la detección de hibridación entre linajes (Meudt & Clarke, 2007), aunque al ser un marcador molecular dominante, esta metodología presenta algunas limitaciones, como la necesidad de asumir condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg en algunos análisis o la incapacidad de estimar parámetros genéticos que requieran el valor real de individuos heterocigotos.

En algunas de estas aplicaciones, se ha demostrado que esta técnica es más eficiente que otras metodologías similares, como RAPD, que necesita una cantidad sustancialmente mayor de combinación de partidores para obtener la misma cantidad de información (Mayer et al., 2011); a diferencia de AFLP, en la que solo un par de combinaciones de partidores bastan para distinguir linajes genéticamente diferenciados, aunque cuando se estudian relaciones entre taxa altamente emparentados o vinculados genética o filogenéticamente, un mayor número de combinaciones es necesario para aumentar la resolución de la técnica (Congiu et al., 2001). Si se usa un alto número de combinaciones de partidores (mayor a 10), la resolución de AFLP en sistemas complejos, como clados de radiación acelerada, pueden entregar mayor información

referente a las relaciones evolutivas y ecológicas entre los taxa que otras técnicas moleculares como microsatélites (Albertson et al., 1999). El uso de AFLP tiene especial utilidad en especies raras, sin utilidad económica o de escaso interés científico, las cuales usualmente carecen de secuenciación de genoma o genomas de referencia a partir del cual se puedan producir otro tipo de marcadores moleculares, ya que esta técnica no necesita ningún tipo de información previa o genoma referencial (Meudt & Clarke, 2007).

En cuanto a su aplicación en la detección de hibridación, la técnica de AFLP ha probado eficacia descartando o confirmando el origen híbrido de especies de plantas (Congiu et al., 2001; Shasany et al., 2005; Yang et al., 2009; Mayer et al., 2011), aunque puede fallar en detectar eventos de hibridación si estos no ocurrieron recientemente (Machado, 2008), debido a la diferenciación del genoma que se produce a lo largo del tiempo por eventos de deriva y mutación, lo que causa la pérdida de alelos provenientes de especies parentales y la aparición de alelos exclusivos en la nueva especie (Levin, 1993, Zhou et al., 2005). Para el caso de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, este podría ser el motivo por el cual la huella genética de *E. curvispina* var. *mutabilis* no aparece en la mezcla genética de los otros taxa. Al proliferar las primeras y establecerse en el territorio, el flujo génico entre éstas y *E. curvispina* var. *mutabilis* pudo haber disminuido drásticamente, lo cual se ha mantenido hasta la época actual, a diferencia de *E. subgibbosa* con quien se habría mantenido polinización cruzada, en mayor medida para *E. chilensis* que para *E. chilensis* var. *albidiflora*.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y su posterior análisis, se pueden decantar las siguientes conclusiones:

1. *Eriosyce chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* constituyen un complejo reproductivo conformado por una única población desde el punto de vista genético y presentan valores similares de diversidad genética que *E. curvispina* var. *mutabilis* y *E. subgibbosa* dentro del área de ocupación de las primeras.
2. Se encontró evidencia de flujo genético interespecífico entre *E. subgibbosa* y *E. chilensis* y, en menor medida, con *E. chilensis* var. *albidiflora*. Este hallazgo es relevante ya que demuestra la existencia de hibridación entre grupos. *Eriosyce curvispina* var. *mutabilis* constituye un grupo genéticamente diferenciado del resto, aunque se encontraron indicios de casos aislados de hibridación con los otros taxa estudiados.
3. De la hipótesis planteada, los resultados solo evidencian el flujo génico abundante entre *E. chilensis* y *E. subgibbosa*, mientras que apoyan parcialmente el origen híbrido de *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora*, lo que puede deberse a la brecha temporal en la que ocurrieron estos eventos y la actualidad.
4. El sistema estudiado constituye un caso de taxa de distribución acotada que no presentan niveles deficientes de diversidad genética con respecto a otras especies congéneres de distribución amplia, que va en contra de las visiones clásicas respecto al tema, y aporta evidencia sobre la existencia de flujo genético interespecífico en taxa pertenecientes el género *Eriosyce*, dando cuenta de la importancia que podría tener este fenómeno en la generación de nuevos linajes.

5. Los resultados y conclusiones de este estudio pueden ayudar a mejorar el manejo del Sitio Prioritario para la Conservación Pichidanguí-Los Molles, al definir al complejo *E. chilensis* - *E. chilensis* var. *albidiflora* como una única población, al demostrar la existencia de flujo genético entre *E. chilensis* y *E. chilensis* var. *albidiflora* con *E. subgibbosa* y su posible importancia en la mantención de los niveles de diversidad genética y al aportar evidencias sobre la historia evolutiva y origen de taxa en peligro crítico que habitan exclusivamente en esta zona.

Referencias

- Abbott, R. J., & Lowe, A. J. (2004). Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 467-474.
- Abbott, R. et al. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 229-246.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27(4), 617-631.
- Albertson, R. C., Markert, J. A., Danley, P. D., & Kocher, T. D. (1999). Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 5107-5110.
- Aldridge, G., & Campbell, D. R. (2007). Variation in pollinator preference between two *Ipomopsis* contact sites that differ in hybridization rate. *Evolution*, 61(1), 99-110.
- Ainouche, M. L., Baumel, A., Salmon, A., & Yannic, G. (2004). Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist*, 161(1), 165-172.
- Amos, W., & Harwood, J. (1998). Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1366), 177.
- Armesto, J.J., M.T.K Arroyo & L.F. Hinojosa (2007) The Mediterranean Environment of central Chile. En: (T.T. Veblen, K.R. Young & A.R. Orme, eds), *The Physical Geography of South America*, pp. 184-199. Oxford University Press, New York.

- Barrett, S. H., Kohn, J.R. (1991). Genetic and evolutionary consequences of small population size. En *Genetics and Conservation of Rare Plants*. ed. D.A. Falk, K.E. Holsinger, pp. 3-30. New York: Oxford Univ. Press.
- Belmonte, E., Faúndez, L., Flores, J., Hoffmann, A., Muñoz, M., & Teillier, S. (1998). Categorías de conservación de cactáceas nativas de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*, 47, 69-89.
- Benoit, I. (1989). Libro Rojo de la Flora Terrestre de Chile. CONAF, Chile.
- Cares, R. A., Munoz, P. A., Medel, R., & Botto-Mahan, C. (2013). Factors affecting cactus recruitment in semiarid Chile: A role for nurse effects?. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 208(5), 330-335.
- Cisneros, A., & Tel-Zur, N. (2013). Genomic analysis in three *Hylocereus* species and their progeny: evidence for introgressive hybridization and gene flow. *Euphytica*, 194(1), 109-124.
- Congiu, L., Dupanloup, I., Patarnello, T., Fontana, F., Rossi, R., Arlati, G., & Zane, L. (2001). Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon. *Molecular Ecology*, 10(9), 2355-2359.
- Correa, C., Mendez, M. A., Araya, S., Lobos, G., & Palma, R. E. (2013). A hybrid zone of two toad sister species, *Rhinella atacamensis* and *R. arunco* (Anura: Bufonidae), defined by a consistent altitudinal segregation in watersheds. *Revista Chilena de Historia Natural*, 86(2).
- DeSalle, R., & Amato, G. (2004). The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 702-712.

Di Castri, F., & Hajek, E. R. (1976). *Bioclimatología de Chile* (p. 128). Santiago, Chile: Vicerrectoría Académica de la Universidad Católica de Chile.

Diniz-Filho, J. Soares, T., Lima, J., Dobrovolski, R., Landeiro, V., Telles, M. & Bini, L. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology*, 36(4), 475-485.

Donaldson, S. L., Chopin, T., & Saunders, G. W. (2000). An assessment of the AFLP method for investigating population structure in the red alga *Chondrus crispus* Stackhouse (Gigartinales, Florideophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 12(1), 25-35.

Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 217-242.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.

Figueredo, C. J., Nassar, J. M., García-Rivas, A. E., & González-Carcacia, J. A. (2010). Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereeae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. *Journal of Arid Environments*, 74(11), 1392-1398.

- Fischer, M., & Matthies, D. (1997). Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, 84(12), 1685-1685.
- Frías, L.D. (2005). *Trupanea simpatica* a new species of *Tephritinae* (Diptera: Tephritidae) infesting an endemic *Haplopappus* hybrid (Asteraceae) in Chile. *Acta Entomologica Chilena* 29, 13-45.
- Gardner, C. S. (1984). Natural hybridization in *Tillandsia* subgenus *Tillandsia*. *Selbyana*, 7(2/4), 380-393.
- Gitzendanner, M. A., & Soltis, P. S. (2000). Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*, 87(6), 783-792.
- Griffith, M. P. (2001). Experimental Hybridization of Northern Chihuahuan Desert Region *Opuntia* (Cactaceae). *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 20(1), 37-42.
- Goettsch, B., Hilton-Taylor, C., Cruz-Piñón, G., Duffy, J. P., Frances, A., Hernández, H. M., Taylor, N. P., et al. (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*, 1(10): 15142.
- Grant, V., & Grant, K. A. (1971). Natural hybridization between the cholla cactus species *Opuntia spinosior* and *Opuntia versicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(9), 1993-1995.
- Guerrero, P. C., Arroyo, M. T., Bustamante, R. O., Duarte, M., Hagemann, T. K., & Walter, H. E. (2011). Phylogenetics and predictive distribution modeling provide insights into the

geographic divergence of *Eriosyce* subgen. *Neoporteria* (Cactaceae). *Plant systematics and evolution*, 297(1-2), 113.

Haig, S. M., Ballou, J. D., & Derrickson, S. R. (1990). Management options for preserving genetic diversity: reintroduction of Guam rails to the wild. *Conservation Biology*, 4(3), 290-300.

Hamrick, J. L., & Godt, M. J. W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 1291-1298.

Handel, S.N. (1983). Pollination ecology, plant population structure, and gene flow. En *Pollination Biology*, ed. L Real, pp. 163-211. Orlando: Academic Press.

Hernández-Hernández, T., Hernández, H. M., De-Nova, J. A., Puente, R., Eguiarte, L. E., & Magallón, S. (2011). Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany*, 98(1), 44-61.

Hewitt, G. M. (1988). Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology & Evolution*, 3(7), 158-167.

Hoffman, J. A., & Walter, M. H. (2004). Cactáceas en la flora silvestre de Chile: Una guía para la identificación de los cactus que crecen en el país. Segunda Edición Revisada y Aumentada. *Santiago, Chile*.

Hunt, D. R., Taylor, N. P., & Charles, G. (2006). *New cactus lexicon*. dh books.

Jombart T., Devillard S. & Balloux F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*. 11(1), 94.

Juan, A., Crespo, M. B., Cowan, R. S., Lexer, C., & Fay, M. F. (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(9), 2679-2690.

Karron, J. D. (1991). Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. En D. A. Falk and K. E. Holsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, 87–98. Oxford University Press, New York, New York, USA.

Kattermann, F. (1994). *Eriosyce* (Cactaceae). The genus revised and amplified. In D. Hunt and N. Taylor [eds.], *Succulent plant research*, vol. 1. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Krauss, S. L. (2000). Patterns of mating in *Persoonia mollis* (Proteaceae) revealed by an analysis of paternity using AFLP: implications for conservation. *Australian Journal of Botany*, 48(3), 349-356.

Lambert, S. M., Borba, E. L., & Machado, M. C. (2006a). Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* × *albicephalus* (*Melocactus ernestii* × *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. *Plant Species Biology*, 21(2), 93-108.

Lambert, S. M., Borba, E. L., Machado, M. C., & Andrade, S. C. D. S. (2006b). Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany*, 97(3), 389-403.

- Larson, S. R., Jones, T. A., & Jensen, K. B. (2004). Population structure in *Pseudoroegneria spicata* (Poaceae: Triticeae) modeled by Bayesian clustering of AFLP genotypes. *American Journal of Botany*, 91(11), 1789-1801.
- Levin, D. A. (1993). Local speciation in plants: the rule not the exception. *Systematic Botany*, 197-208.
- Li, X., Ding, X., Chu, B., Zhou, Q., Ding, G., & Gu, S. (2008). Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP. *Genetica*, 133(2), 159-166.
- Loveless, M. D., & Hamrick, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics*, 15(1), 65-95.
- Lund, R. & S. Teillier. (2012). Flora vascular de Los Molles, Región de Valparaíso, Chile. *Chloris Chilensis*, Año 2; N°2
- Machado, M. (2008). What is the role of hybridization in the evolution of the Cactaceae?. *Bradleya*. 26. 1-18.
- Maguire, T. L., Peakall, R., & Saenger, P. (2002). Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 104(2), 388-398.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 229-237.
- Mandujano, M. D. C., Montana, C., & Eguiarte, L. E. (1996). Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan Desert: why are sexually derived recruitments so rare?. *American Journal of Botany*, 63-70.

- Martcorena, C. (1990). Contribución a la estadística de la flora vascular de Chile. *Gayana, Botánica* 47 (3-4): 85-113.
- Mayer, M. S., Gromova, A., Hasenstab-Lehman, K., Lippitt, M., Barnett, M., & Rebman, J. P. (2011). Is *Cylindropuntia* × *fosbergii* (Cactaceae) a Hybrid?. *Madroño*, 58(2), 106-112.
- Meudt, H. M., & Clarke, A. C. (2007). Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science*, 12(3), 106-117.
- Miller, M. P. (1997). Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: a Windows Program for the Analysis of Elysium and Molecular Population Genetic Data. <http://www.marksgeneticsoftware.net/>.
- Ministerio del Medio Ambiente. (2017). Ficha Resumen de Especie: *Eriosyce chilensis*. Consultado: 5 de Septiembre de 2017.
- Mooney, H. A. & Schelegel, F. (1967). La vegetación costera del cabo Los Molles en la provincia de Aconcagua. *Boletín Universidad de Chile* 75: 27-32
- Nassar, J. M., Hamrick, J. L., & Fleming, T. H. (2003). Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous columnar cacti (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 90(11), 1628-1637.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
- Newman, D., & Pilson, D. (1997). Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution*, 51(2), 354-362.

- Nyffeler, R., & Egli, U. (1997). Comparative stem anatomy and systematics of *Eriosyce* sensu lato (Cactaceae). *Annals of Botany*, 80(6), 767-786.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13(5), 1143-1155.
- Parker, K. C. (1989). Nurse plant relationships of columnar cacti in Arizona. *Physical Geography*, 10(4), 322-335.
- Parker, K. C., & Hamrick, J. L. (1992). Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii*. *American Journal of Botany*, 86-96.
- Parra, F., Pérez-Nasser, N., Lira, R., Pérez-Salicrup, D., & Casas, A. (2008). Population genetics and process of domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Arid Environments*, 72(11), 1997-2010.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources*, 6(1), 288-295.
- Pinkava, D. J. (2002). On the evolution of continental North American Opuntioideae. *Succulent Plant Research* 6: 59-98.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rabinowitz, D. (1981). Seven forms of rarity. En *The Biological Aspects of Rare Plant Conservation*, ed. H. Synge, pp. 205- 17. London: Wiley

- Reed, D. H., Briscoe, D. A., & Frankham, R. (2002). Inbreeding and extinction: the effect of environmental stress and lineage. *Conservation Genetics*, 3(3), 301-307.
- Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17(1), 230-237.
- Reed, D. H., Lowe, E. H., Briscoe, D. A., & Frankham, R. (2003). Inbreeding and extinction: effects of rate of inbreeding. *Conservation Genetics*, 4(3), 405-410.
- Rieseberg, L. H., Ellstrand, N. C., & Arnold, M. (1993). What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization?. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 12(3), 213-241.
- Rieseberg, L. H., Raymond, O., Rosenthal, D. M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., Durphy, J. L., Schwarzbach, A. E., Donovan, L.A. & Lexer, C. (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, 301(5637), 1211-1216.
- Salas, P., & Mansur, L. (2004). Gene flow between parents with different ploidy levels in a natural population of *Leucocoryne* Lindley. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(6), 833-835.
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W., Hanski, I. (1998). Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392, 491–494.
- Schaal, B. A., & Smith, W. G. (1980). The apportionment of genetic variation within and among populations of *Desmodium nudiflorum*. *Evolution*, 34(2), 214-221.
- Schmidt, K., & Jensen, K. (2000). Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to

population size and reproductive components. *American Journal of Botany*, 87(5), 678-689.

Schulte, K., Silvestro, D., Kiehlmann, E., Vesely, S., Novoa, P., & Zizka, G. (2010). Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(3), 1105-1119.

Shasany, A. K., Darokar, M. P., Dhawan, S., Gupta, A. K., Gupta, S., Shukla, A. K., Patra N.K. & Khanuja, S. P. (2005). Use of RAPD and AFLP markers to identify inter-and intraspecific hybrids of *Mentha*. *Journal of Heredity*, 96(5), 542-549.

Smulders, M. J. M., Cottrell, J. E., Lefèvre, F., Van der Schoot, J., Arens, P., Vosman, B., Krystufek, V., et al. (2008). Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: consequences for conservation and restoration. *Forest Ecology and Management*, 255(5), 1388-1399.

Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561-588.

Squeo, F.A., Arancio, G., Gutierrez, J.R. (2001). Libro rojo de la flora nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo. Ediciones Universidad de La Serena, Chile.

Taylor, N. P., & Zappi, D. C. (2004). *Cacti of eastern Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew.

Turner, M. E., Stephens, J. C., & Anderson, W. W. (1982). Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(1), 203-207.

Van der Hulst, R. G. M., Mes, T. H. M., Den Nijs, J. C. M., & Bachmann, K. (2000). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal that population structure of triploid dandelions (*Taraxacum officinale*) exhibits both clonality and recombination. *Molecular Ecology*, 9(1), 1-8.

Wagner Jr, W. H. (1969). The role and taxonomic treatment of hybrids. *Bioscience*, 19(9), 785-795.

Whitney, K. D., Ahern, J. R., Campbell, L. G., Albert, L. P., & King, M. S. (2010). Patterns of hybridization in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12(3), 175-182.

Winfield, M. O., Arnold, G. M., Cooper, F., Le Ray, M., White, J., Karp, A., & Edwards, K. J. (1998). A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. *Molecular Ecology*, 7(1), 3-10.

Wright, S. (1949). The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323–354.

Urbanska, K. M., Hurka, H., Landolt, E., Neuffer, B., & Mummenhoff, K. (1997). Hybridization and evolution in *Cardamine* (Brassicaceae) at Urnerboden, Central Switzerland: biosystematic and molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution*, 204(3), 233-256.

Yang, M., Zhou, Y., Zhu, Q., Lu, F., Wang, Y., Chen, J., Wu, Q. & Zhang, W. (2009). AFLP markers in the detection of *Scirpus x mariqueter* (Cyperaceae) hybrid in China. *Aquatic Botany*, 91(4), 298-302.

Zhou, R., Shi, S., & Wu, C. I. (2005). Molecular criteria for determining new hybrid species—an application to the *Sonneratia* hybrids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(3), 595-601.

Anexo

Tabla A1. Medidas estadísticas para estimar el mejor valor del número de grupos (K) inferidos a partir de cinco corridas independientes en Structure para cada valor de K. LnP(K) corresponde al promedio del logaritmo de verosimilitud para cada valor K y ΔK es una medida basada en la tasa de cambio de segundo orden de la función de verosimilitud con respecto a K (Evanno et al., 2005). Notar que ΔK no puede ser calculado para el primer y último valor de K.

K	LnP(K)	ΔK
1	-11473,92	-
2	-10952,34	1,641891
3	-10380	6,907789
4	-10356,52	0,002545
5	-10332,92	-

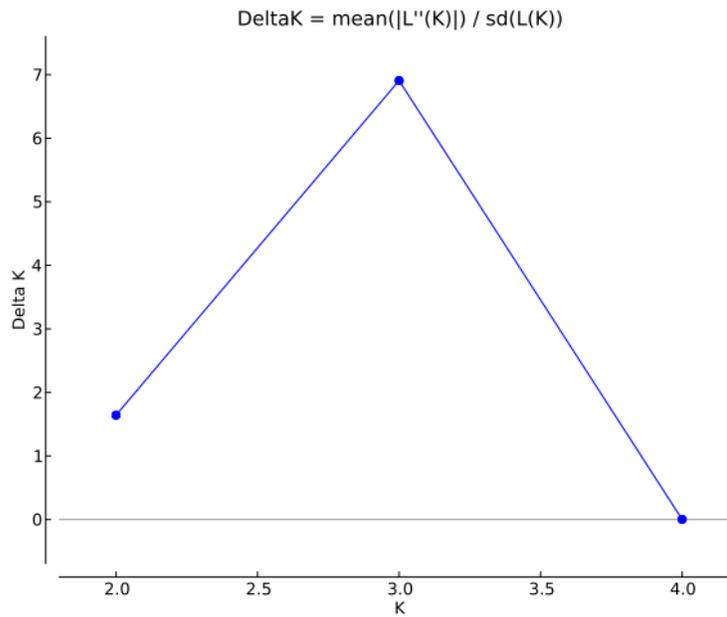


Figura A2. Aproximación visual sobre probabilidad de cada número de agrupaciones. Diferencia en probabilidad con el resto de los escenarios es indicador de potencia de la estimación (Evanno et al., 2005).



Figura A3. Microhábitat ocupado por *E. chilensis* y *E. subgibbosa*. A) Individuo de *E. chilensis* creciendo entre rocas, B) Individuos de *E. subgibbosa* creciendo entre rocas y C) Grupo de individuos de *E. chilensis* en roqueríos. Fotografías de A) Juan Acosta, B) Herman Olivares y C) Francisca Esperanza.



Figura A4. Microhábitat ocupado por *E. chilensis* var. *albidiflora* y *E. curvispina* var. *mutabilis*. A) Grupo de individuos de *E. chilensis* creciendo en roqueríos, B) y C) Individuo de *E. curvispina* var. *mutabilis* creciendo a ras de suelo. Fotografías de A) Juan Acosta, B) y C) Patricio Novoa.

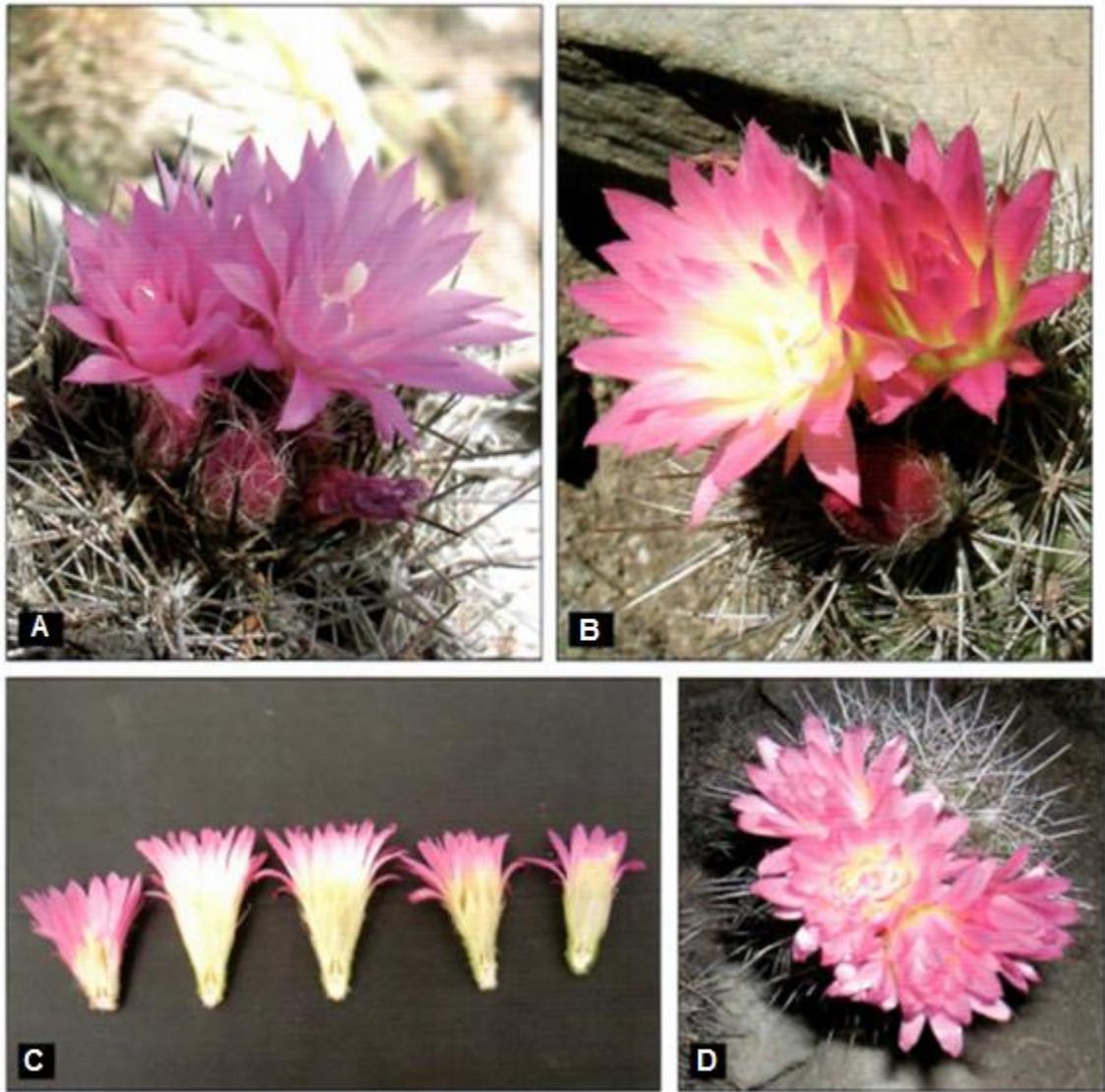


Figura A5. Variaciones morfológicas y fisiológicas en *E. chilensis*. A) Flores de un único individuo de *E. chilensis* que presentan distinto grado de apertura de perianto, B) Flores bicolors de un único individuo de *E. chilensis* con distinto grado de apertura de perianto, C) Gradiente morfológico de forma de flor de cuatro individuos de *E. chilensis* y un individuo de *E. subgibbosa*, donde se muestra variabilidad en grado de apertura de perianto y coloración, y D) Flores de un único individuo de *E. chilensis* que presentan distinto grado de estoconasticidad (movimiento de cierre al anochecer). Imágenes de Walter (2008).