

Delimitación de unidades de conservación genética para *Dysopsis hirsuta* (Müll. Arg.) Skottsb. (Euphorbiaceae), hierba endémica del Archipiélago Juan Fernández, Chile

Delimitation of genetic conservation units for *Dysopsis hirsuta* (Müll. Arg.) Skottsb. (Euphorbiaceae), an herb endemic to Juan Fernández Archipelago, Chile

Glenda Fuentes^{1,*}, Hellen Montoya⁴, Patricio López-Sepúlveda¹, Diego Alarcón², Patricio Peñailillo³

¹Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Casilla 160-C, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Chile.

³Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Av. Lircay s/n, Talca, Chile.

⁴SLEP Aysén, región de Aysén, Liceo Josefina Aguirre, Chile.

*Corresponding autor: glfuentes@udec.cl

RESUMEN

El Archipiélago de Juan Fernández, formado por tres islas: Robinson Crusoe, Santa Clara y Alejandro Selkirk, posee un elevado porcentaje de endemismo en relación con su superficie y ha sido declarado Parque Nacional de Chile, Reserva de la Biósfera y *hotspot* de biodiversidad mundial. La introducción de especies vegetales y animales exóticas e invasoras, así como la actividad humana, han generado pérdida de especies, poblaciones e individuos afectando la diversidad genética de sus especies endémicas. El objetivo del presente estudio ha sido delimitar unidades de conservación genética (UC), para la especie endémica *Dysopsis hirsuta*, dentro de su rango de distribución geográfico natural en la isla Robinson Crusoe. Para ello se analizaron parámetros de la diversidad y estructura genética obtenidos con marcadores moleculares AFLP (208 individuos) y SNPs (113 individuos) para 9 poblaciones. Los resultados permitieron delimitar tres unidades de conservación genética, compuestas por sus poblaciones en Mirador Selkirk-Plazoleta El Yunque, Salsipuedes y Rebaje la Piña, Vaquería y Puerto Inglés. Esta delimitación facilitará la elaboración de estrategias para la conservación genética de la especie ya que separa las singularidades genéticas que comparten distintos grupos de poblaciones. Se sugiere implementar conservación adicional en estas tres unidades, mediante herramientas como la conservación de sus semillas, adicionalmente se propone establecer planes de manejo para La Campana con el fin de incrementar los niveles de variación genética e implementar un monitoreo especial en la población de Salsipuedes, debido a los patrones singulares observados en ella.

Palabras claves: ESUs, genética de la conservación, islas oceánicas.

ABSTRACT

Juan Fernández Archipelago is made up of islands: Robinson Crusoe, Santa Clara and Alejandro Selkirk and it has high endemism in its small area, and it was declared as Chilean national park, a biosphere reserve and a global biodiversity hotspot. The past introduction of invasive plant and animal exogenous species together with the human activities resulted in species loss and populations damage, affecting the genetic diversity within its endemic species. The aim of this study was to mark out genetic conservation units, also known as ESUs, for the endemic herb *Dysopsis hirsuta*, within its whole distribution range in Robinson

Crusoe Island. Genetic diversity and structure parameters were obtained from AFLP and SNPS molecular markers from samples collected from 321 plants, making genotyping 113 individuals from 9 localities. Results led to marking out three genetic conservation units with populations in Mirador Selkirk-Plazoleta El Yunque, Salsipuedes and Rebaje la Piña, Vaquería y Puerto Inglés. The selection of these units may help in making better conservation strategies, since it separates the genetic singularities shared by populations within each unit. Additional conservation efforts in these three units are encouraged, using tools as seed banking, considering these units in conservation management plans including also La Campana locality, in order to increase the genetic variation levels and to carry out special monitoring to Salsipuedes population due to its singular genetic patterns revealed in the study.

KEYWORD: conservation genetics, ESUs, oceanic islands.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es la fuente primaria de variabilidad biológica en las poblaciones naturales (Campbell 2003). Esta favorece la aparición de variantes genéticas como alelos, genes o genotipos dentro y entre las poblaciones de una especie (Jiménez & Collada 2000), permitiendo a las especies y sus poblaciones responder a cambios ambientales y evolutivos a largo o corto plazo (Lande & Barrowclough 1987, Rossetto *et al.* 1995), determinando así la generación y mantención de la biodiversidad. La diversidad genética es considerada uno de los principales componentes de la biodiversidad y en los últimos años se ha prestado mayor atención hacia su conservación, entendiendo que las poblaciones con altos niveles de variabilidad genética están asociadas a la prevalencia de las poblaciones naturales, permitiendo a las especies responder ante eventuales cambios en su hábitat, tales como la fragmentación o la inestabilidad ambiental (Sgrò *et al.* 2011, Wernberg *et al.* 2018). La variación genética a nivel intraespecífico es un requisito previo para el cambio adaptativo o la evolución y tiene profundas implicaciones para la conservación de las especies (Schaal *et al.* 1991). Comprender la variación genética tanto dentro como entre poblaciones es esencial para el establecimiento de prácticas de conservación efectivas y eficientes, especialmente en especies raras (Shanshan *et al.* 2006, Hoban *et al.* 2022).

Las unidades de conservación (UC) se definen como poblaciones de organismos que poseen alguna característica distintiva que pueda utilizarse para ayudar a dirigir los esfuerzos de la gestión y conservación de especies (Allendorf & Luikart 2007, Nora *et al.* 2011, Funk *et al.* 2012). Por ello, la delimitación e identificación de las UC son una pieza clave en la planificación de estrategias de conservación de la variabilidad genética y ecológica de la biodiversidad (Nora *et al.* 2011). Existen varias formas para delimitar UC, siendo la más utilizada cuando se trabaja con marcadores genéticos,

la Unidad Evolutivamente Significativa (ESU, del inglés *Evolutionarily Significant Unit*) (Ryder 1986, Grady & Quattro 1999, Taylor & Dizon 1999). La que se define como una población que se considera distinta y, por ende, merecedora de medidas de protección diferenciada, con el fin de mantener sus características genéticas particulares evitando su pérdida en el tiempo y posterior extinción (Moritz 1994, Waples 1995). Un lugar donde se establecen regularmente ESUs son los archipiélagos, debido a sus características geográficas que limitan o anulan el flujo genético entre las poblaciones de cada isla o entre isla y continente, provocando que las poblaciones de las especies que allí habitan estén más propensas a la pérdida de variabilidad genética (Legge *et al.* 1996). La identificación de ESUs se realiza principalmente siguiendo los criterios descritos por Funk *et al.* (2012) donde el paso más básico para delimitarlas es utilizar todos los tipos de *loci*, es decir, tanto neutrales como los *loci* presumiblemente adaptativos (*outliers*) para determinar parámetros genéticos como flujo génico y deriva génica. Desde este punto de vista, la incorporación de datos genéticos tiene el potencial de revolucionar la delimitación de las unidades de conservación (UC), específicamente las ESUs, al permitir la detección de la variación genética neutral y adaptativa, mediante la utilización de *loci* neutrales y *outliers* obtenidos desde marcadores genéticos como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), los que brindan diferentes tipos de información que deben combinarse al momento de elaborar estrategias de conservación y planes de manejo en las especies de interés (Tremetsberger *et al.* 2003, Funk *et al.* 2012).

Un lugar relevante para la determinación de UC es la isla Robinson Crusoe la cual forma parte del Archipiélago de Juan Fernández, declarado Parque Nacional en 1935 (CONAF 2004), considerado Reserva Mundial de la Biosfera en 1977 (Vargas & Bannister 2003) y *hotspot* de

biodiversidad mundial (Arroyo *et al.* 2004). Este archipiélago se encuentra localizado a 33°40' S y 80°47' O, distante a 667 km de las costas de Chile Central y está conformado por las islas Robinson Crusoe (con una superficie de 48 km² y 915 m de altitud máxima), Alejandro Selkirk (50 km² y 1.650 m de altitud) y Santa Clara (2 km² y 375 m de altitud) (Stuessy & Ono 1998). El Archipiélago de Juan Fernández presenta un alto endemismo del 13% a nivel de género y un 64% a nivel de especie (Danton & Perrier 2006, Stuessy *et al.* 2018), en particular la isla Robinson Crusoe, presenta más plantas endémicas por área que cualquier otra isla del mundo con 93 especies en 4.794 hectáreas, es decir, 1,9 especies endémicas/km² (Stuessy *et al.* 2018). Sin embargo, y pese a sus estatus de conservación, su bosque endémico y nativo se encuentra fuertemente afectado por perturbaciones antrópicas, generando un impacto directo sobre el número y el tamaño de las poblaciones vegetales. En el pasado, por extracción de madera para el uso doméstico, construcción de casas, barcos, herramientas de cultivo y por la ganadería (Arana 2010) e incendios (Woodward 1969). Actualmente la principal perturbación de la vegetación nativa y endémica de la isla Robinson Crusoe es la originada a partir de las presiones ejercidas por plantas y animales introducidos e invasores (Stuessy *et al.* 2018). Estos efectos en conjunto han causado la fragmentación del bosque nativo ancestral de la isla (Alarcón *et al.* 2019).

Dentro de la flora de Robinson Crusoe, la especie endémica *Dysopsis hirsuta* (Müll. Arg.) Skottsb. (Euphorbiaceae) es una hierba perenne con una altura promedio de 8 cm y de hábito rastrero. Posee flores pequeñas y monoicas (Skottsberg 1952). Su fruto es un esquizocarpo con una dispersión de semillas mediante barocoría con un mecanismo balístico y su polinización es por viento (Anderson *et al.* 2001, Bernardello *et al.* 2006), también presenta reproducción asexual a través del enraizamiento de nudos de sus tallos (Ricci 2003). Esta hierba crece en parches densos de 1 a 3 m de extensión encontrándose muy asociada al árbol *Nothomyrcia fernandeziana* (Hook. & Arn.) Kausel, creciendo bajo su dosel y de helechos como *Arthropteris altescandens* (Colla) J.Sm., especies endémicas muy importantes y que hacen parte del bosque original de la vegetación de isla Robinson Crusoe.

Todas estas características y el hecho además de presentar un sistema de dispersión restringido en el tiempo y espacio pueden determinar una interrupción de la conectividad genética incluso en poblaciones continuas de *D. hirsuta* (Lowe *et al.* 2005), lo que hace a esta especie más susceptible a daños ambientales y la disminución de hábitat, convirtiéndola en un modelo ideal para establecer UC (o ESUs). *D. hirsuta* actualmente se encuentra con serios problemas de conservación, categorizada en peligro crítico de extinción

(MMA 2012, DS-33), debido a que en las últimas décadas ha estado sometida a graves efectos de la deforestación y la invasión de especies exóticas tales como *Rubus ulmifolius* Schott (Zarzamora), *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz (Maqui) y *Ugni molinae* Turcz. (Murtilla), ante la cual pocas especies endémicas logran sobrevivir (Alarcón *et al.* 2019). Esto principalmente por ocupación de los espacios para establecimiento de nuevos individuos y además por posibles deslizamientos de tierra (Ricci 2006), lo que ha provocado que las poblaciones se redujeran considerablemente.

Dado lo anterior, el objetivo de este trabajo fue delimitar UC a través del análisis de parámetros genéticos obtenidos con marcadores AFLP y SNPs, es decir, establecer unidades evolutivamente significativas para *D. hirsuta*. Para ello, se evaluaron los valores de los parámetros de diversidad y divergencia genética en 9 poblaciones que abarcan la distribución completa de la especie.

METODOLOGÍA

El área de estudio comprende la isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández (Fig. 1). Se recolectaron muestras de material vegetal de 321 individuos de *D. hirsuta* de nueve poblaciones (Tabla 1). Junto con el registro de cada población de muestreo mediante GPS GARMIN® GPSmap 62s, también fue georreferenciado cada individuo de cada población. Las muestras utilizadas en este trabajo fueron colectadas e inmediatamente procesadas en terrero, para ello se tomaron 3 hojas de cada individuo siendo una parte de ellas utilizadas para la extracción de ADN total. Las muestras de hojas restantes, fueron almacenadas en sílice gel y se conservan hasta la fecha en el departamento de Botánica de la Universidad de Concepción por los investigadores.

EXTRACCIÓN DE ADN

De cada muestra foliar fresca y seca, para un total de 20 a 30 individuos por población, se extrajo ADN total mediante kit DNeasyPlant Mini Kit (Qiagen), siguiendo las especificaciones del manual. La calidad del ADN se visualizó en geles de agarosa al 1%, teñido con RedGel, a 70 volts durante 30 min, empleando un transiluminador UV y corroborando la extracción de ADN total para proseguir a la amplificación de ADN mediante AFLP. Para garantizar la genotipificación mediante SNPs, se cuantificó la cantidad y calidad de ADN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000. Las muestras fueron procesadas y extraído el ADN total durante febrero de 2017, en la Isla Robinson Crusoe, las muestras de ADN total obtenido fueron almacenadas a -20 C° hasta su posterior análisis.

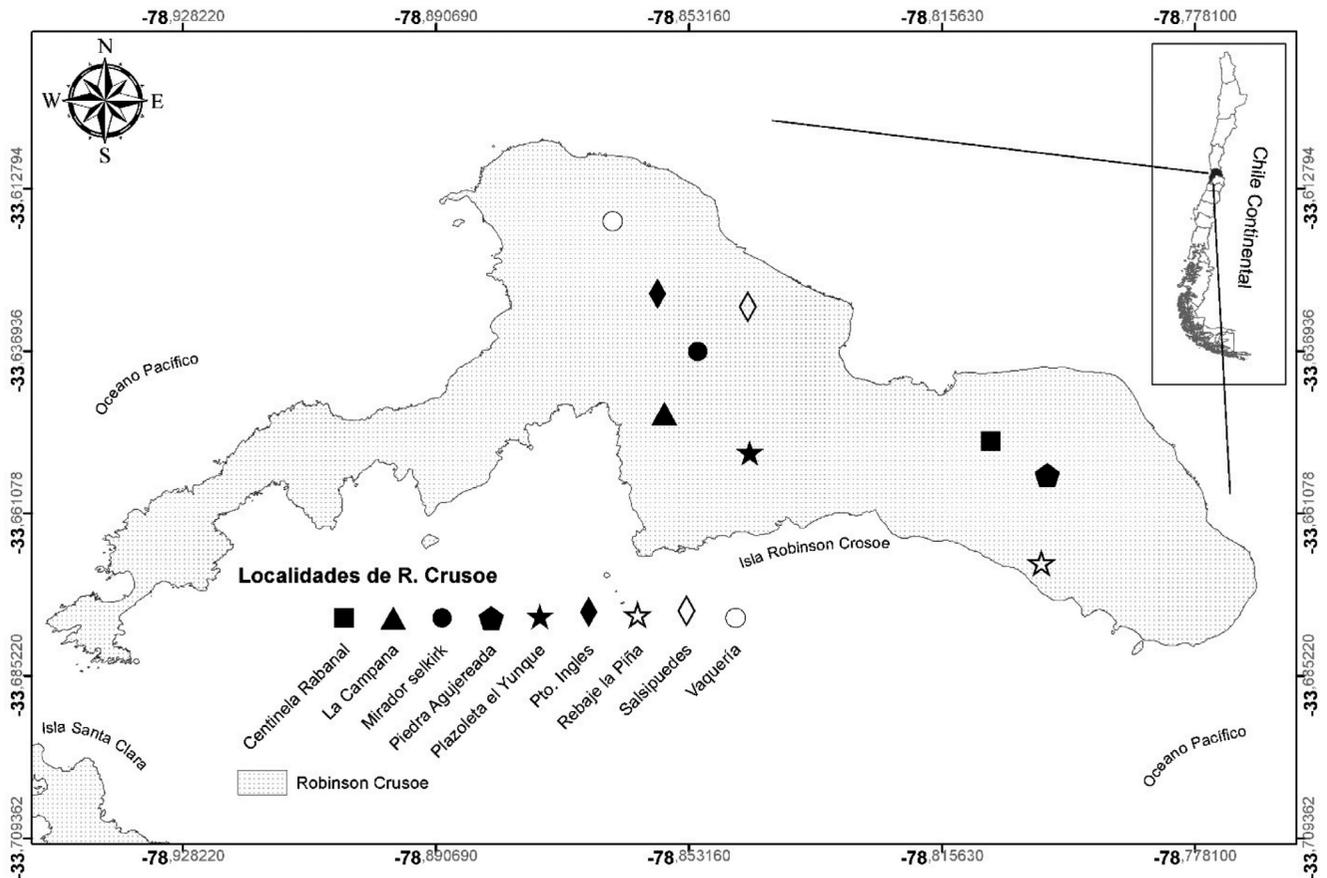


FIGURA 1. Mapa de distribución de las poblaciones muestreadas de *D. hirsuta* en isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández. / Distribution map of the sampled populations of *D. hirsuta* on Robinson Crusoe Island, Juan Fernández Archipelago.

Tabla 1. Resumen de las Localidades empleadas en marcadores SNP y AFLP con su respectiva ubicación geográfica. / Summary of the Localities used in SNP and AFLP markers with their respective geographic location.

Localidad	Código Localidad	Individuos AFLP	Individuos SNP	Latitud	Longitud
Mirador de Selkirk	5014	25	16	-33,63755	-78,85212
Plazoleta El Yunque	5019	25	16	-33,65254	-78,84441
Centinela-Rabanal	5022	26	16	-33,65787	-78,80811
Salsipuedes	5026	24	16	-33,63543	-78,84421
Rebaje La Piña	5033	25	7	-33,66812	-78,80142
Vaquería	5041	26	9	-33,61856	-78,86456
Puerto inglés	5044	7	5	-33,62825	-78,85854
Piedra Agujereada	5046	25	14	-33,65575	-78,80001
La Campana	5050	25	14	-33,64661	-78,85701

AFLP

Se utilizó la metodología propuesta por Vos *et al.* (1995) y modificada por Hasbún *et al.* (2013), utilizando seis combinaciones de partidores: *MseI*-ACC /*EcoRI*-ATA (FAM); *MseI*- CCT /*EcoRI*-ATA (FAM); *MseI*-CAC/*EcoRI*-ACA (VIC); *MseI*-CAC/*EcoRI*-ACG (VIC); *MseI*-ACC/*EcoRI*-ATC (NED) y *MseI*-ACT/*EcoRI*-ATC (NED). Los perfiles de amplificación AFLP variaron de 7 a 26 individuos amplificados por población (Tabla 1) con un total de 208 individuos amplificados para la especie. Los productos obtenidos de PCR selectiva fueron enviados a Macrogen Korea para su secuenciación mediante electroforesis. Posteriormente, los fragmentos de ADN obtenidos de la secuenciación fueron procesados en el software GeneMarker ver. 1,85 (Hulce *et al.* 2011.), en el cual cada uno de los fragmentos es considerado como un carácter y la presencia o ausencia de ellos son los estados de carácter (0,1), expresados en una matriz final.

GENOTIPIFICACIÓN DE SNPs

Se genotipificaron 113 individuos distribuidos en 9 poblaciones dentro del rango natural de *D. hirsuta* (Tabla 1). Se utilizó el servicio suministrado por el Museo de Historia Natural y Ambiental de Shizuoka (Japón) para la construcción de las bibliotecas de ADN genómico. La obtención de los SNPs se realizó mediante la técnica MigSequence (MIG-seq), propuesta por Suyama & Matsuki (2015), que permite obtener más de mil SNPs para cada individuo a partir de las muestras recolectadas. Se escogió esta técnica ya que posee la ventaja de no requerir ADN genómico de alta calidad, en comparación a otras técnicas de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) que utilizan enzimas de restricción, haciéndola óptima para utilizarla en especies en peligro de extinción, al requerir una pequeña cantidad de muestra. Obtenida la librería con los respectivos fragmentos, fueron posteriormente alineados y analizados en el programa Stack 2,5 (Catchen *et al.* 2013), obteniendo una matriz de datos codominantes completa.

OBTENCIÓN DE MATRICES NEUTRALES Y OUTLIERS PARA MARCADORES AFLP Y SNPs

Luego de obtener las matrices completas con todos los *loci* pesquisados, se identificaron los potenciales *loci* bajo selección (*outliers*), utilizando el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier *et al.* 2005), tanto para matrices binarias dominantes como codominantes. Se consideraron candidatos a potenciales *loci* bajo selección o también llamados *outliers*, a aquellos *loci* con valores $F_{ST} p < 0,05$, dentro de la dispersión de los datos neutrales. Los *loci outliers* fueron extraídos de la matriz completa, generando de esta manera una matriz neutral (sin valores *outliers*) y una matriz de datos *outliers* con

los potenciales *loci* bajo selección. Ambas matrices fueron analizadas para obtener los parámetros de diversidad y divergencia genética.

PARÁMETROS GENÉTICOS

La diversidad genética se estimó utilizando el programa GenAEx 6.51b2 (Peakall & Smouse 2006), mediante los valores calculados correspondientes al número total de fragmentos, índice de diversidad de Shannon (*I*), heterocigosidad (*He*) para AFLP y heterocigosidad observada (*Ho*) y heterocigosidad esperada (*He*) para SNPs. El número de bandas frecuentes (*NBF*), número de bandas privadas (*NBP*) y número de bandas poco comunes (*NBLC*) fueron obtenidas para AFLP. En tanto para SNPs, se determinó el número de alelos privados (*NAP*) y número de alelos poco comunes (*NALC*), además del índice de coeficiente de endogamia (*Fis*) mediante el programa Genepop 4.7.3 (Raymond & Rousset 1995). Para evaluar si existió correlación entre los valores en los distintos parámetros de diversidad genética, se realizaron pruebas estadísticas de Pearson con el programa R (R Core Team 2024).

Para determinar la estructura genética se utilizó la asignación individual, con el fin de determinar el número de poblaciones o *pool* génicos (*K*), implementado a través de inferencia Bayesiana con el uso del programa STRUCTURE v.2.3.2 (Pritchard *et al.* 2000) utilizando el criterio de Evanno *et al.* (2005). Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para cuantificar los componentes jerárquicos de la varianza genética (*PhiPT* y *Fst*) dentro y entre las poblaciones, utilizando el programa GenAEx 6.5.1b2. Por último, se determinó los valores de *PhiPT* (AFLP) y *Fst* (SNPs) entre pares de poblaciones empleando GenAEx 6.5.1b2 y Arlequin 3.5.2.2 para cada tipo de marcador respectivamente.

TAMAÑO EFECTIVO POBLACIONAL (*Ne*)

Se estimó el tamaño efectivo poblacional contemporáneo (*Ne*) para SNPs, para medir la tasa de pérdida de heterocigotos que se encuentra vinculada a la tasa de migración, infiriendo la deriva génica a través de los valores de *Fst* (Wright 1951). Para determinar *Ne*, se cuantificó el desequilibrio de ligamiento (*LD*), entre alelos neutrales en una población aislada con apareamiento al azar, lo que permite inferir deriva génica (Hill 1981, Waples & Do 2008), utilizando el programa LDNe (Waples & Gaggiotti 2006).

DELIMITACIÓN DE UNIDADES DE CONSERVACIÓN (UC) EN *D. HIRSUTA*

Para la delimitación de las UC se tomó como base los resultados sobre la distribución de la diversidad genética, así como también los patrones de estructuración genética y tamaño efectivo poblacional, que en conjunto permitieron

visualizar el estado genético de las poblaciones de *D. hirsuta* para marcadores AFLP y SNPs. Consecuentemente, se delimitaron las zonas con características relevantes para la conservación, mayor diversidad genética y diversidad alélica.

RESULTADOS

AFLP y SNPs

Para la selección de partidores AFLP, se realizó un ensayo con 45 combinaciones de partidores y cinco individuos de cada una de las nueve poblaciones de *D. hirsuta*, seleccionándose seis combinaciones de partidores (ver material Suplementario). El número de *loci* resultantes para cada combinación de partidores AFLP seleccionados fue 407 *loci* totales con 274 neutrales y 133 *outliers*, mientras que los resultados de los marcadores SNPs totalizaron 855 *loci*, trabajándose con 534 *loci* neutrales y 321 potenciales *loci* bajo selección.

DIVERSIDAD GENÉTICA NEUTRAL Y OUTLIER

Para los marcadores AFLP los valores encontrados en la matriz neutral y *outlier* permiten dar cuenta que la población Salsipuedes presentaría valores más altos de diversidad genética para ambas matrices, en comparación con el resto de las poblaciones con $He_{neu} = 0,247 / He_{out} = 0,220$ y $I_{neu} = 0,390 / I_{out} = 0,354$, además es la población que presenta el mayor número de bandas privadas en comparación con el resto de las poblaciones estudiadas con un total de 15 bandas. Por el contrario, los valores más bajos de diversidad se presentaron en la población Rebaje la Piña, para ambas matrices analizadas (Tabla 2). En tanto para los marcadores SNPs los valores de diversidad presentados en las matrices neutrales y *outlier* (Tabla 2) dan cuenta que los mayores valores de diversidad genética se presentan en las poblaciones de; Mirador Selkirk $He_{neu} = 0,142; Ho_{neu} = 0,114; I_{neu} = 0,221; NAP_{neu} = 0,061 / He_{out} = 0,146; Ho_{out} = 0,177; I_{out} = 0,222; NAP_{out} = 0,081$) y Plazoleta El Yunque ($He_{neu} = 0,135; Ho_{neu} = 0,112; I_{neu} = 0,211; NAP_{neu} = 0,051 / He_{out} = 0,145; Ho_{out} = 0,186; I_{out} = 0,221; NAP_{out} = 0,078$) (Tabla 2). Los valores más bajos de diversidad correspondieron a las poblaciones de Rebaje la Piña (matriz neutral) y Puerto Inglés (matriz *outlier*). Los valores del índice *Fis* para los *loci* neutrales muestran que existen ocho poblaciones con valores positivos, se encontrarían en equilibrio entre heterocigotos y homocigotos ya que los valores son cercanos a cero, siendo Salsipuedes la que presentaría una mayor panmixis. Por otro lado, Puerto Inglés es la única población que posee un valor negativo, este resultado indica una alta heterocigosidad entre los individuos a favor de la exogamia, cabe destacar que todos los valores de *loci outlier* son negativos.

ESTIMACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA NEUTRAL Y OUTLIER CON MARCADORES AFLP y SNP

La distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones, fue examinada mediante AMOVA para *D. hirsuta*, tanto neutral como *outlier* (Tabla 3). Se observa que el mayor porcentaje de variación en los marcadores AFLP es explicada por diferencias dentro de las poblaciones con un 69%, $\Phi_{PT} = 0,308$ ($p > 0,001$) en la matriz neutral y 61%, $\Phi_{PT} = 0,588$ ($p > 0,001$) en la matriz *outlier*. Por el contrario, en los marcadores de SNPs, la mayor varianza molecular se explica entre las poblaciones con un 59% $F_{st} = 0,308$ ($p > 0,001$) en la matriz neutral y un 51% $F_{st} = 0,393$ ($p > 0,001$) en la matriz *outlier*.

Los análisis de inferencia Bayesiana para estimar el número de *pool* génicos sugieren que existen varios valores de K para las distintas matrices examinadas. En el marcador AFLP para la matriz neutral, se observa que el valor óptimo es un $k=4$ (Fig. 2), donde existen dos grandes *pools* génicos que incluyen las poblaciones de Mirador Selkirk, Plazoleta El Yunque y Centinela Rabanal (Fig. 2a). El siguiente *pool* génico con mayor número de individuos es el Cluster 2, representado en los gráficos de barra por el color verde en la Fig. 2, este grupo se constituye por las poblaciones Rebaje la Piña, Vaquería, Piedra Agujereada y La Campana (Fig. 2a). Los otros dos *pool* génicos corresponden a los Clusters 3 y 4, en su mayoría a la población de Salsipuedes, diferenciándola como una identidad genética única. Sin embargo, también posee genotipos de los otros cuatro grupos genéticos (Fig. 2a). Contrario a la matriz de *loci* neutrales, la matriz de *loci outlier* presenta un valor de $k=2$, por lo que sólo existen dos grandes poblaciones genéticas, además se observa que la población de Puerto Inglés presentaría mayor concordancia con el Cluster 1 con un porcentaje de asignación a éste del 98,1% (Fig. 2b).

Los resultados de la matriz de *loci* neutrales con marcador SNP (Fig. 2c) muestran seis grupos genéticos ($k=6$), contrario a lo que muestra la matriz de *loci outlier* donde $k=3$. Es así como las poblaciones de Mirador Selkirk con Plazoleta El Yunque constituyen el Cluster 1, La Campana y Puerto Inglés el Cluster 2, y Rebaje la Piña y Vaquería el Cluster 3. Por otra parte, Piedra Agujereada, Centinela Rabanal y Salsipuedes constituyen por sí solos grupos genéticos particulares (Fig. 2d), destacándose que el grupo genético de La Campana comparte los genotipos con la mayoría de los *pool* génicos encontrados. Mientras que para la matriz *outlier* en SNPs, los *pool* génicos encontrados presentan un patrón concordante con el Cluster 1 de la matriz neutral, y el Cluster 3 agrupa la mayoría de las poblaciones que en la matriz neutral poseían el genotipo de La Campana.

TABLA 2. Estimación de la diversidad genética basada en análisis *loci* neutrales y *outlier* del marcador SNP para 9 poblaciones de *Dysopsis hirsuta*. He: Heterocigosidad, Ho: Heterocigosidad observada, Fis: Índice de fijación, I: índice de Shannon; NBF: Número de bandas frecuentes; NBP: Número de bandas privadas; NBLC: Número de bandas poco comunes; NAP: Número de alelos privados; NALC: Número de alelos poco comunes, ES: Error estándar. / Estimation of genetic diversity based on analysis of the neutral and outlier loci of the SNP marker for 9 populations of *Dysopsis hirsuta*. He: heterozygosity, Ho: observed heterozygosity, Fis: fixation index, I: Shannon index; NBF: Number of frequent bands; NBP: Number of private bands; NBLC: Number of rare bands; NALC: Number of private alleles; NAP: Number of rare alleles, ES: Standard error.

Especie	AFLP						SNP								
	He	I	No. Bandas	NBF >= 5%	NBP	NBLC (<=25%)	NALC (<=50%)	He	Ho	Fis	I	NAP	NALC (<=25%)	NALC (<=50%)	
<i>D. hirsuta</i> Neutral	Mirador Selkirk	0,132	0,207	181	162	1	2	18	0,142	0,114	0,220	0,221	0,067	0,184	0,410
	Plazoleta de Yunque	0,141	0,216	182	164	0	2	22	0,135	0,112	0,216	0,211	0,051	0,144	0,343
	Centinela Rabanal	0,194	0,3	193	173	3	5	24	0,101	0,095	0,101	0,154	0,045	0,109	0,258
	Salsipuedes	0,247	0,39	253	231	15	9	44	0,096	0,094	0,093	0,151	0,051	0,071	0,260
	Rebaje la Piña	0,123	0,193	167	142	2	1	15	0,054	0,044	0,156	0,084	0,017	0,039	0,125
	Vaquería	0,128	0,197	169	169	0	2	21	0,077	0,068	0,155	0,117	0,024	0,067	0,159
	Puerto Inglés	0,200	0,297	169	169	0	2	17	0,043	0,052	-0,156	0,063	0,017	0,013	0,066
	Piedra Agujereada	0,174	0,267	179	152	1	1	21	0,096	0,086	0,135	0,146	0,011	0,067	0,193
	La campana	0,160	0,253	207	165	0	8	31	0,060	0,061	0,035	0,092	0,022	0,024	0,109
	Promedio	0,167	0,258	189	170	2	4	24	0,089	0,081	0,140	0,138	0,034	0,080	0,214
ES	0,004	0,005	27,2	24,9	4,8	3	8,9	0,002	0,003	0,009	0,055	0,020	0,056	0,114	
<i>D.hirsuta</i> Adaptativo	Mirador Selkirk	0,146	0,233	93	82	0	2	5	0,146	0,177	-0,064	0,222	0,081	0,112	0,336
	Plazoleta de Yunque	0,174	0,275	100	89	0	1	6	0,145	0,186	-0,091	0,221	0,078	0,128	0,296
	Centinela Rabanal	0,19	0,304	108	93	0	1	7	0,112	0,169	-0,274	0,167	0,044	0,056	0,193
	Salsipuedes	0,22	0,354	119	111	1	1	7	0,127	0,183	-0,160	0,195	0,118	0,050	0,193
	Rebaje la Piña	0,146	0,237	106	89	0	1	8	0,094	0,131	-0,274	0,139	0,028	0,031	0,056
	Vaquería	0,175	0,274	102	102	0	1	7	0,108	0,156	-0,284	0,161	0,025	0,056	0,137
	Puerto Inglés	0,186	0,286	87	87	1	1	2	0,076	0,128	-0,611	0,108	0,009	0,003	0,031
	Piedra Agujereada	0,186	0,298	108	94	0	1	8	0,107	0,154	-0,238	0,162	0,053	0,037	0,097
	La campana	0,199	0,313	109	94	0	2	9	0,096	0,142	-0,335	0,141	0,006	0,028	0,065
	Promedio	0,180	0,286	103,6	93,4	0,2	1,2	6,6	0,112	0,158	-0,216	0,169	0,049	0,056	0,156
ES	0,005	0,007	9,44	8,61	0,441	0,441	2,06	0,003	0,006	0,012	0,038	0,037	0,040	0,108	

TABLA 3. Resumen de los análisis de varianza molecular (AMOVA) para la especie *D. hirsuta* con marcador AFLP y SNP para matrices neurales y *outlier* analizados mediante GENALEX 6.5. %: variancia total que contribuye entre /dentro de las poblaciones, df: grados de libertad y SS: suma de cuadrados. / Summary the analysis of molecular variance (AMOVA) for the species *D. hirsuta* with AFLP and SNP marker for neutral and *outlier* matrices analyzed using GENALEX 6.5. %: total variance contributing between / within populations, df: degrees of freedom and SS: sum of square.

Fuente de la variancia df		AFLP				SNP			
		df	SS	Componentes de la variancia	%	df	SS	Componentes de la variancia	%
Neutral	Entre poblaciones	8	2102,849	262,856	31%	8	25858,379	3232,297	59%
	Dentro de poblaciones	188	4633,689	24,647	69%	104	17996,081	173,039	41%
	Total	196	6736,538		100%	112	43854,460		100%
Outlier	Entre poblaciones	8	1780,532	222,567	39%	8	10965,252	1370,656	55%
	Dentro de poblaciones	188	2778,716	14,780	61%	104	8716,447	83,812	45%
	Total	196	4559,249		100%	112	19681,699		100%

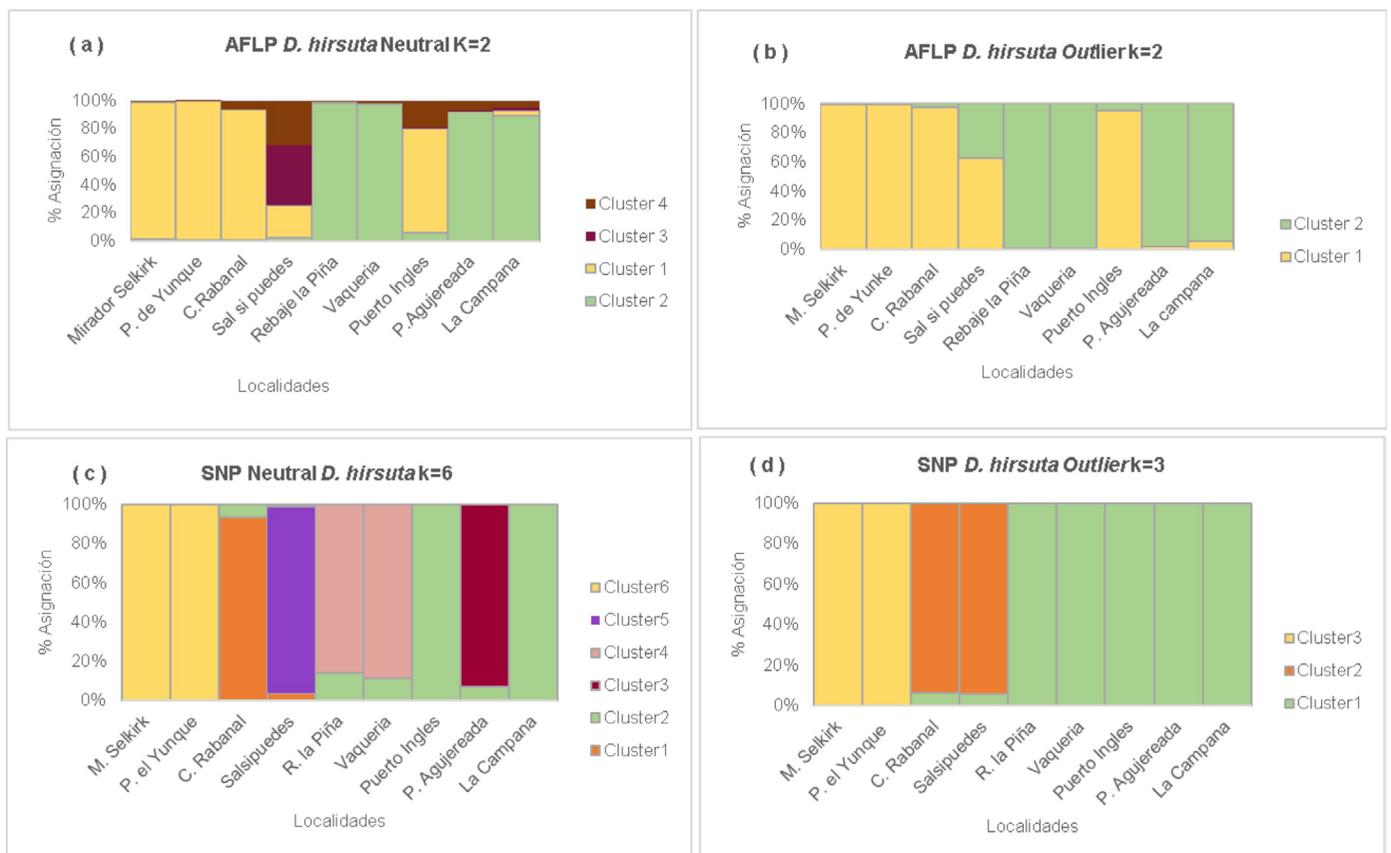


FIGURA 2. Porcentajes de asignación de grupos genéticos para loci neutrales y *outlier* en marcadores AFLP y SNP en la especie *D. hirsuta*. (a): Gráfico de barra loci neutral con marcador AFLP, (b): loci outlier con marcador AFLP, (c): loci neutral con marcador AFLP y (d): matriz outlier con marcador SNP. / Barplot Genetic group assignment for the neutral and outlier matrix in AFLP and SNP markers in *D. hirsuta* species. (a): Barplot Neutral loci with AFLP marker, (b): Barplot outlier loci with AFLP marker, (c): Barplot Neutral loci with AFLP marker and (d): Barplot outlier loci with marker SNP.

Los resultados de AFLP para los *loci* neutrales y *outlier* dan cuenta que los menores valores de divergencia son para Piedra Agujereada y Rebaje la Piña ($\Phi_{iPT} = 0,047$; $\Phi_{iPT} = 0,045$). Para los *loci* neutrales la mayor distancia genética se encontró entre la población de Plazoleta El Yunque y Vaquería con $F_{st} = 0,439$. En los *loci outlier* los mayores valores se presentan entre Mirador Selkirk; con Vaquería ($\Phi_{iPT} = 0,613$), y Rebaje la Piña ($\Phi_{iPT} = 0,612$) (Tabla 4).

En tanto, para los marcadores SNPs los menores valores de F_{st} entre pares de poblaciones tanto para la matriz outliers como neutral son para las poblaciones de Mirador Selkirk y Plazoleta El Yunque ($F_{st} = 0,202$; $F_{st} = 0,240$), mientras que los mayores valores se encuentran para Rebaje la Piña con las poblaciones de Puerto Inglés ($F_{st} = 0,829$) y La Campana ($F_{st} = 0,805$). La matriz *outlier* presenta el mismo patrón con los menores valores, sin embargo, los valores mayores se registran para Puerto Inglés con las poblaciones de Rebaje la Piña ($F_{st} = 0,626$) y Vaquería ($F_{st} = 0,607$) (Tabla 5).

TAMAÑO EFECTIVO POBLACIONAL (Ne)

Los valores de tamaño efectivo poblacional (Ne) y su respectivo intervalo de confianza (IC) sólo fueron calculados para los marcadores SNPs en la matriz neutral. Los valores en todas las poblaciones oscilaron entre los -140 y 360 con un valor promedio de 29,74. En general se aprecia que, las poblaciones de Vaquería y Puerto Inglés presentan valores negativos, con intervalo de confianza que se proyectan con

rangos muy amplios, presumiblemente estas poblaciones poseen una proporción de *loci* ligados, lo que explica que estas poblaciones podrían encontrarse en presencia de deriva génica (Tabla 6).

Basados en lo anterior proponemos las siguientes unidades de conservación para las poblaciones de la especie *D. hirsuta*:

- 1) Unidad de Conservación Mirador Selkirk-Plazoleta El Yunque (**UC1**) ambas poblaciones muestran altos valores de diversidad genética en todos los parámetros evaluados en ambas matrices (neutral y *outlier*) para ambos marcadores. Además, conforman un *cluster* genético permanente en todos los análisis de estructura genética realizados.
- 2) Unidad de Conservación Salsipuedes (**UC2**), población que presenta los mayores valores de diversidad genética en todos los parámetros evaluados, formando además un único grupo genético en la mayoría de los análisis.
- 3) Unidad de Conservación Rebaje la Piña, Vaquería y Puerto Inglés (**UC3**), poblaciones que muestran bajos valores de diversidad genética siendo incluso los menores registrados en términos de heterocigosidad. Presenta además los más altos valores de FST entre pares de poblaciones, lo cual puede dar cuenta de aislamiento y altos niveles de endogamia entre los individuos que forman parte de estas poblaciones.

TABLA 4. Valores de distancia genética (Φ_{iPT}) entre pares de poblaciones para AFLP con loci neutral y *outlier* para *D. hirsuta*. MS: Mirador Selkirk; PY: Plazoleta el Yunque; RB: Rebaje la Piña; CR: Centinela Rabanal; SS: Salsipuedes; VQ: Vaquería; PI: Puerto Inglés; PA: Piedra Agujereada; LC: La Campana; Loc. Localidad. / Genetic distance (Φ_{iPT}) values between pairs of populations for AFLPs with neutral and outlier loci for *D. hirsuta*. MS: Mirador Selkirk; PY: Plazoleta el Yunque; RB: Rebaje la Piña; CR: Centinela Rabanal; SS: Salsipuedes; VQ: Vaquería; PI: Puerto Inglés; PA: Piedra Agujereada; LC: La Campana; Loc. Locality.

	Loc.	MS	PY	CR	SS	RP	VQ	PI	PA	LC	Loc.	
AFLP Neutral	MS	0	0,048	0,096	0,288	0,612	0,613	0,209	0,576	0,549	MS	AFLP Outlier
	PY	0,115	0	0,061	0,256	0,579	0,575	0,151	0,547	0,514	PY	
	CR	0,103	0,076	0	0,207	0,551	0,544	0,060	0,509	0,484	CR	
	SS	0,346	0,329	0,269	0	0,373	0,363	0,137	0,327	0,305	SS	
	RP	0,401	0,417	0,375	0,402	0	0,076	0,505	0,045	0,123	RP	
	VQ	0,433	0,439	0,391	0,381	0,148	0	0,494	0,057	0,134	VQ	
	PI	0,136	0,121	0,056	0,188	0,349	0,366	0	0,449	0,429	PI	
	PA	0,367	0,387	0,338	0,350	0,047	0,109	0,297	0	0,138	PA	
	LC	0,375	0,380	0,356	0,343	0,162	0,235	0,288	0,158	0	LC	

TABLA 5. Valores de distancia genética (Fst) entre pares de poblaciones para SNP con loci neutral y outlier para *D. hirsuta*. MS: Mirador Selkirk; PY: Plazoleta el Yunque; RB: Rebaje la Piña; CR: Centinela Rabanal; SS: Salsipuedes; VQ: Vaquería; PI: Puerto Inglés; PA: Piedra Agujereada; LC: La Campana; Loc. Localidad. / Genetic distance (Fst) values between pairs of populations for SNPs with neutral and outlier loci for *D. hirsuta*. MS: Mirador Selkirk; PY: Plazoleta el Yunque; RB: Rebaje la Piña; CR: Centinela Rabanal; SS: Salsipuedes; VQ: Vaquería; PI: Puerto Inglés; PA: Piedra Agujereada; LC: La Campana; Loc. Locality.

	Loc.	MS	PY	CR	SS	RP	VQ	PI	PA	LC	Loc.
SNP Neutral	MS	0	0,202	0,261	0,271	0,463	0,390	0,477	0,407	0,486	MS
	PY	0,240	0	0,286	0,264	0,445	0,365	0,462	0,376	0,451	PY
	CR	0,343	0,365	0	0,302	0,505	0,420	0,538	0,420	0,496	CR
	SS	0,364	0,377	0,474	0	0,471	0,408	0,488	0,399	0,457	SS
	RP	0,591	0,577	0,661	0,680	0	0,555	0,626	0,514	0,574	RP
	VQ	0,431	0,423	0,542	0,558	0,683	0	0,605	0,484	0,561	VQ
	PI	0,637	0,636	0,746	0,734	0,829	0,778	0	0,553	0,631	PI
	PA	0,507	0,494	0,581	0,572	0,696	0,618	0,765	0	0,516	PA
	LC	0,636	0,631	0,714	0,709	0,805	0,736	0,790	0,722	0	LC

TABLA 6. Valores de Tamaño efectivo poblacional para marcador SNP en loci neutrales. Ne: tamaño efectivo poblacional, IC: intervalo de confianza y inf= infinito. / Population effective size values for SNP marker at neutral loci. Ne: effective population size, IC: confidence interval and inf= infinite.

Localidad	SNP neutral			
	Ne	IC		
Mirador Selkirk	11,8	10,6	-	13
Plazoleta de Yunque	11,7	10,1	-	13
Centinela Rabanal	6,4	5,4	-	7,5
Salsipuedes	6,2	5,3	-	7,2
Rebaje la Piña	360,6	21,9	-	inf
Vaquería	-140,7	74,1	-	inf
Puerto Inglés	-2,3	2,4	-	inf
Piedra Agujereada	7,4	6,2	-	9
La Campana	6,6	4,6	-	9

DISCUSIÓN

La diversidad genética desempeña un papel crucial en la determinación del fitness o adecuación biológica de las especies, ya que niveles reducidos de variabilidad genética se asocian con una disminución en la capacidad adaptativa y un incremento del riesgo de extinción (Reed & Frankham, 2003). En este contexto, los patrones de estructuración y diversidad genética obtenidos en el presente estudio permiten identificar tres unidades de conservación genéticamente diferenciadas para *D. hirsuta* en la isla Robinson Crusoe, lo cual proporciona una base sólida para el diseño de estrategias

de manejo orientadas a preservar la viabilidad evolutiva de la especie. Los resultados obtenidos permitieron identificar 407 loci AFLP y 855 SNPs, con una proporción considerable de loci potencialmente bajo selección (32,6% en AFLP y 37,5% en SNPs). Cabe destacar la importancia de identificar este último tipo de loci, ya que estos confieren la capacidad a estos marcadores (AFLP y SNPs) de captar señales de adaptación local y diferenciación genética impulsada por la selección natural (Yang *et al.* 2016). El análisis de los resultados obtenidos con marcadores AFLP muestra que los mayores valores de diversidad se observan en la población Salsipuedes. Por otro lado, el análisis de SNPs indica que los

mayores valores de diversidad se observan en las localidades de Mirador Selkirk y Plazoleta El Yunque. En los marcadores SNPs igual que en AFLP no se observa algún patrón que relacione los valores de diversidad y estructura genética. En ambos marcadores, las poblaciones con mayor diversidad genética se encuentran en sectores donde los bosques originales de Robinson Crusoe están mejor conservados, presentando una composición arbórea similar, con un dosel dominado por *Nothomyrcia fernandeziana* y la presencia de individuos emergentes de *Fagara mayu*, especies asociada a condiciones de mayor cobertura y humedad (Vargas 2003, Alarcón *et al.* 2019).

Los patrones de heterocigosidad observados también entregan importante información sobre las dinámicas reproductivas locales. El valor negativo del índice de *Fis* en la población Puerto Inglés implica una posible sobreabundancia de heterocigotos, lo cual podría estar asociado a eventos de flujo génico reciente o a un efecto de exogamia inducido por condiciones ecológicas particulares (Frankham *et al.* 2010). En contraste, Vaquería y Rebaje de la Piña, con baja diversidad genética y valores negativos de tamaño poblacional (*Ne*), podrían estar enfrentando cuellos de botella genéticos o efectos de deriva génica (Ellstrand & Elam 2003), lo cual constituye una señal de alerta para la conservación. La estructuración genética medida en términos de *Fst* entre pares de poblaciones mostró rangos de valores que varían entre 0,045 a 0,613 en AFLP y 0,202 a 0,829 en SNPs. Las diferencias podrían deberse a la cantidad de información entregada por cada marcador, en términos del número de *loci*. En los marcadores AFLP los menores valores registrados, tanto en *loci* neutrales como *outliers* se encontraron entre los pares de poblaciones de Piedra Agujereada-Rebaje de la Piña y Mirador Selkirk-Plazoleta El Yunque, lo que sugiere una mayor conectividad entre ellas. Mientras que los mayores valores de *Fst* se registraron en la matriz neutral para Rebaje de la Piña con las poblaciones de Puerto Inglés y La Campana, y en la matriz *outliers* para Puerto Inglés con Rebaje de la Piña y Vaquería. En contraste para SNPs, los mayores valores se registraron entre los pares de poblaciones de Plazoleta El Yunque-Vaquería (en *loci* neutrales) y Mirador Selkirk con Rebaje de la Piña y Vaquería (en *loci outliers*), en tanto los menores valores de *Fst* también se registraron entre Mirador Selkirk-Plazoleta El Yunque. En general los resultados sugieren la existencia de un flujo génico histórico entre Mirador Selkirk y Plazoleta El Yunque, mientras que Vaquería presenta altos niveles de endogamia en comparación con otras poblaciones. En ambos marcadores, las poblaciones con mayor diversidad genética se encuentran en sectores donde los bosques originales de Robinson Crusoe están mejor conservados, presentando una composición arbórea similar, con un dosel

dominado por *Nothomyrcia fernandeziana* y la presencia de individuos emergentes de *Fagara mayu*, especies asociada a condiciones de mayor cobertura y humedad (Vargas & Bannister 2003, Alarcón *et al.* 2019).

La comparación entre la varianza genética explicada por los componentes dentro y entre poblaciones revela un patrón diferenciado según el tipo de marcadores (Tabla 3). Mientras que los AFLP reflejan una mayor proporción de la variabilidad dentro de las poblaciones (69% en *loci* neutrales, 61% *outliers*), los SNPs muestran patrones opuestos con mayor variabilidad entre poblaciones (59% en *loci* neutrales, 55% *outliers*). Esta discrepancia se puede atribuir a las diferencias inherentes en la densidad de información y sensibilidad de los marcadores frente a procesos históricos y demográficos. Un de los factores que puede explicar esta distribución de varianza entre poblaciones es el hábito herbáceo de *D. hirsuta*, que implica tiempos generacionales más cortos en comparación con especies leñosas (Hamrick & Godt 1996), lo que aumenta las diferencias entre grupos de plantas en tiempos cronológicos similares. Patrones similares se han detectado en especies en el Archipiélago, como *Erigeron fernandeziana*, *E. turricula* y *E. stuessyi* (López- Sepúlveda *et al.* 2015). Además, se debe considerar que los SNPs al estar basados en secuencias codificantes, son particularmente sensibles a procesos selectivos, lo cual podría explicar la mayor diferenciación entre poblaciones.

El análisis de estructura genética revela diferentes patrones de agrupamiento según los marcadores utilizados, lo que es concordante con las diferencias en la distribución de la varianza detectada entre AFLP y SNPs. Sin embargo, se puede observar que las poblaciones Mirador Selkirk y Plazoleta aparecen unidas conformando una unidad en los análisis de las cuatro matrices analizadas (Figs. 3a-d), los valores de *Fst* indican un flujo génico histórico entre estas poblaciones. La separación del resto de las poblaciones en distintos grupos genéticos podría deberse a procesos de deriva génica y selección. En relación con las diferencias encontradas en los análisis de agrupamiento de estructura genética, esta se puede deber a el número de información que entrega cada marcador, esto es, el mayor número de *loci* detectados con marcadores SNPs, abarcando una mayor proporción del genoma de los individuos y por tanto mayor acceso a la variabilidad genética entre ellos (Luitkart *et al.* 2003, Helyar *et al.* 2011). La estructura genética intra-poblacional medida a través del coeficiente de endogamia (*Fis*) en la matriz neutral refleja poblaciones en equilibrio con una leve tendencia a una mayor presencia de heterocigotos (Tong *et al.* 2020). En contraste, los *loci outliers* presenta valores mayoritariamente negativos más alejados de cero, lo que sugiere un equilibrio con una leve influencia de selección

(Özdemir & Cassandro 2018). Por lo tanto, la identificación de loci *outliers* mediante SNPs en este trabajo, ha proporcionado una herramienta poderosa para detectar señales de selección local. La estructura observada en ambos tipos de loci (*outliers* y neutrales) es congruente, pero los valores de diferenciación son mayores en la matriz *outliers*, lo que sugiere que, además de los procesos de deriva y flujo génico, la selección natural está actuando diferencialmente entre poblaciones. Esta observación es particularmente relevante en el contexto de una especie endémica de isla, donde las presiones selectivas locales pueden generar adaptaciones altamente específicas (Jackson *et al.* 2024).

Los resultados de tamaño efectivo poblacional (N_e) muestran similitudes entre las poblaciones de Mirador de Selkirk y Plazoleta El Yunque, así como entre Centinela-Rabanal, Salsipuedes, Piedra Agujereada y La Campana. Un caso particular es Rebaje de la Piña, que presenta valores muy altos de N_e , lo que sugiere que posee un gran aporte de alelos. Sin embargo, los amplios rangos de intervalos de confianza indican que estos valores pueden no ser significativos, posiblemente debido a un tamaño de muestras insuficiente para reflejar el tamaño real de las poblaciones. Por otro lado, las poblaciones de Vaquería y Rebaje de la Piña presentan valores negativos de N_e , lo que podría deberse a eventos como efecto fundador, cuello de botella, crecimiento poblacional reciente, inmigración o hibridación pasada (Wang 2005, 2009).

La información obtenida en este trabajo no solo permite delimitar las tres UC propuestas, sino que además entregar información individualizada de cada población de *Dysopsis* en la isla. Las unidades de conservación genética delimitadas a partir de estos resultados representan un avance significativo respecto a enfoques tradicionales que no incorporan evidencia genómica. Al identificar las 3 UC, se facilita la elaboración de estrategias para la conservación genética de la especie, ya que separa las singularidades genéticas que comparten distintos grupos de poblaciones, haciendo más efectiva la planificación e implementación de planes de manejo diferenciados. Cada una de UC identificadas en este trabajo, debe ser tratada en forma individual en las estrategias de conservación que se implementen. Para ello se sugiere considerar herramientas que incluyan la conservación de semillas para cada UC identificada por separado fortaleciendo la conservación *in situ*. La UC1 que agrupa a Mirador Selkirk y Plazoleta El Yunque, se perfila como un núcleo de diversidad adaptativa; UC2 representada exclusivamente por Salsipuedes, destaca por su singularidad genética y valor evolutivo intrínseco, por la cual se sugiere no alterar la dinámica poblacional que allí ocurre, idealmente implementar planes de manejo que impidan el avance de la invasión de *Ugni molinae* que la rodea.

Por último, para la UC3 conformada por Rebaje de la Piña, Vaquería y Puerto Inglés, requiere intervenciones urgentes debido a su vulnerabilidad genética. Además, los resultados nos permiten visualizar el delicado estado genético de la población La Campana, por lo que recomendamos establecer planes de manejo para incrementar los niveles de variación genética de esta población, que incluya la incorporación de individuos procedentes de la UC3, con la que presenta mayores afinidades genéticas.

A pesar de la robustez del enfoque metodológico, existen limitaciones en el presente estudio, pese a que se identificaron loci potencialmente bajo selección, no se realizó una caracterización funcional de estos marcadores, por lo que no es posible inferir directamente los procesos adaptativos subyacentes. Además, la ausencia de datos ambientales impide correlacionar la estructura genética con variables ecológicas, lo que sería esencial para confirmar la existencia de adaptaciones locales. En conjunto, estos resultados amplían el conocimiento sobre la biología de la conservación de especies insulares y demuestran la utilidad de enfoques genómicos para delimitar unidades de conservación basadas en evidencias genéticas. Finalmente se debe destacar que los resultados reportados en este trabajo contribuyen a incrementar la base de datos de variables esenciales para la biodiversidad EBVs (de la sigla en inglés Essential Biodiversity Variables) a nivel global, específicamente los parámetros de diversidad genética: diferenciación genética, endogamia y tamaño poblacional efectivo (Hoban *et al.* 2022).

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto FONDECYT N°1160794, a la Corporación Nacional Forestal (CONAF) y en especial a Iván Leiva, Felipe Sáez, Ramón Schiller, Alfonso Andaur, Bernardo López, Guillermo Araya, Maximiliano Recabarren, Oscar Chamorro y Danilo Arredondo, del Parque Nacional Archipiélago de Juan Fernández, por las facilidades de acceso y apoyo en terreno.

REFERENCIAS

- Alarcón, D., López-Sepúlveda, P., Fuentes, G., Montoya, H., Peñailillo, P., Carrasco, P. 2019. Parches invadidos por *Ugni molinae* en isla Robinson Crusoe: ¿Hay plantas nativas y endémicas capaces de vivir en ellos? *Gayana Botánica* 76(1): 126-131.
- Allendorf, W.F., Luikart, G. 2007. Conservation and genetics of populations. *Nature Reviews Genetics* 11: 697-709.
- Anderson, G., Bernardello, G., Stuessy, T., Crawford, D. 2001.

- Breeding system and pollination of selected plants endemic to Juan Fernandez islands. *American Journal of Botany* 88(2): 220-233.
- Arana, P.M. 2010. La isla de Robinson Crusoe. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso. 393 pp.
- Arroyo, M.T.K., P.A. Marquet, C. Marticorena, J.A. Simonetti, L. Cavieres, F. Squeo, T.R. Rozzi. 2004. Chilean winter rainfall-Valdivian forests. In: Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J., da Fonseca, G.A.B. (Eds.) *Hotspots Revisited. Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions*, pp. 99-103. CEMEX, México D.F., México.
- Bernadello, G., Anderson, G.J., Stuessy, T.F., Crawford, D. 2006. The angiosperm flora of the Archipelago Juan Fernández (Chile): Origin and dispersal. *Canadian Journal of Botany* 48: 1266-1281.
- Campbell, A.K. 2003. Save those molecules! Molecular biodiversity and life. *Journal of Applied Ecology* 40: 193-203. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2003.00803.x>
- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham S., Amores A., Cresko, W.A. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*: 22(11):3124-3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- CONAF. 2004. Documento de Trabajo N° 357 Plan de Manejo, Parque Nacional Archipiélago Juan Fernández. Informe CONAF, Santiago, Chile.
- Danton, P., Perrier, C. 2006. Nouveau catalogue de la flore vasculaire de l'archipel Juan Fernández (Chili). *Acta Botanica Gallica* 153(4): 399-587. <https://doi.org/10.1080/12538078.2006.10515559>
- Ellstrand, N.C., Elam, D.R. 2003. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1): 217-242. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.001245>
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics* (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 644 pp.
- Funk W.C., McKay J., Hohenlohe P.A., Allendorf F.W. 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology and Evolution* 27 (9): 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.012>
- Grady, J.M., Quattro, J.M. 1999. Using character concordance to define taxonomic and conservation units. *Conservation Biology* 13(5):1004-1007.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise, J.C., Hamrick, J.L. (Eds.), *Conservation genetics: case studies from nature*, pp. 281-304. Chapman & Hall, New York, USA.
- Hasbún, R., Iturra, C., Moraga, P., Wachtendorff, P., Quiroga P., Valenzuela, S. 2013. An efficient and reproducible for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection. *Tree Genetics & Genome* 8(4): 925-931. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0463-6>
- Helyar, S.J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M.I., Ogden, R., Limborg, M.T., Nielsen, E.E. 2011. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources* 11 (Suppl 1): 123-136. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02943.x>
- Hill, W.G. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* 38(3): 209-216. <https://doi.org/10.1017/S0016672300020553>
- Hoban, S., Archer, F. I., Bertola, L.D., Bragg, J.G., Breed, M.F., Bruford, M.W., ... & Hunter, M.E. 2022. Global genetic diversity status and trends: towards a suite of Essential Biodiversity Variables (EBVs) for genetic composition. *Biological Reviews* 97(4): 1511-1538. <https://doi.org/10.1111/brv.12852>
- Hulce, D., Li, X., Snyder-Leiby, T., & Liu, C. J. 2011. GeneMarker® genotyping software: tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* 22(Suppl): S35-S36.
- Jackson, A.C., Carine, M.A., Chapman, M.A. 2024. Genomics of ecological adaptation in Canary Island *Descurainia* (Brassicaceae) and comparisons with other Brassicaceae. *Ecology and Evolution* 14(8): e70144. <https://doi.org/10.1002/ece3.70144>
- Jiménez, P., Collada, C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales: Fuera de Serie* 2: 237-248.
- Lande, R., Barrowclough, G.F. 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. 87-124 pp. In: Soule, M. (Ed.) *Viable populations for Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Legge, J.T., Roush, R., Desalle, R., Vogleran, A.P. 1996. Genetic criteria for establishing evolutionarily significant units in *Cryan's* Buckmoth. *Conservation Biology* 10(1): 85-98. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10010085.x>
- López-Sepúlveda, P., Takayama, K., Crawford, D.J., Greimler, J., Peñailillo, P., Baeza, M., Ruiz, E., Kohl, G., Tremetsberger, K., Gatica, A., Letelier, L., Novoa, P., Novak, J., Stuessy, T.F. 2015. Speciation and biogeography of *Erigeron* (Asteraceae) endemic to the Juan Fernández Archipelago,

- Chile, based on AFLPs and SSRs. *Systematic Botany* 40(3): 888-899. <https://doi.org/10.1600/036364415X689311>
- Lowe, A.J., Boshier, D., Ward, D., Bacles, C.F.E., Navarro, C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800725>
- Luikart, G., England, P., Tallmon, D., Jordan, S., Taberlet, P. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Review Genetics* 4: 981-994. <https://doi.org/10.1038/nrg1226>
- Decreto 33 de 2012 [con fuerza de ley]. Por medio del cual Aprueba y oficializa clasificación de especies según su estado de conservación, quinto proceso. 7 de septiembre de 2011. D.O. N° 40198.
- Moritz, C. 1994. Defining evolutionarily significant units for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9(10): 373-375. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90057-4).
- Nora, S., Albaladejo, R.G., González Martínez, S.C., Robledo-Arnuncio, J.J., Aparicio, A. 2011. Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas* 20(2): 35-45.
- Özdemir, D., Cassandro, M. 2018. Assessment of the population structure and genetic diversity of Denizli chicken subpopulations using SSR markers. *Italian Journal of Animal Science* 17(2): 312-320. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1384336>.
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- R Core Team. 2024. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (VERSION 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86(3): 248-249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573>
- Reed, D.H., Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17(1): 230-337. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x>
- Ricci, M. 2006. Conservation status and ex-situ cultivation efforts of endemic flora of the Juan Fernandez Archipelago. *Biodiversity and Conservation* 15: 3111-3130. <https://doi.org/10.1007/s10531-005-5404-y>
- Rossetto, O., Deloye, F., Poulain, B., Pellizzari, R., Schiavo, G., Montecucco, C. 1995. The metalloproteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins. *The Journal of Physiology (Paris)* 89(1): 43-50. [https://doi.org/10.1016/0928-4257\(96\)80550-X](https://doi.org/10.1016/0928-4257(96)80550-X)
- Ryder, O.A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Tree* 1(1): 9-10.
- Schaal, B.A., Leverich, W.J., Rogstad, S.H. 1991. Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: Falk, D.A., Holsinger K.E. (Eds.) *Genetics and conservation of rare plants*, pp. 123-134. Oxford University Press, New York, USA.
- Sgrò, C.M., Lowe, A.J., Hoffmann, A.A. 2011. Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary Applications* 4(2): 326-337. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00157.x>
- Shanshan, L., Tzen-Yuh, C., Xun, G. 2006. High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting. *Annals of Botany* 98(3): 583-589.
- Skottsberg, C. 1952. The vegetation of the Juan Fernández Islands. In: Skottsberg, C. (Ed.) *The Natural History of Juan Fernández and Easter Island*. Vol II. pp. 793-959. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB, Uppsala, Sweden.
- Stuessy, T.F., Ono, M. 1998. *Evolution and speciation of Island Plant*. Cambridge University Press, UK. 358 pp.
- Stuessy, T.F., Crawford, D.J., López-Sepúlveda, P., Baeza, C.M., Ruíz E. 2018. *Plants of Oceanic Island. Evolution Biogeography and Conservation of the flora of the Juan Fernández (Robinson Crusoe) Archipelago*. Cambridge University Press, Cambridge. 482 pp.
- Suyama, Y., Matsuki, Y. 2015. MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5: 16963. <https://doi.org/10.1038/srep16963>.
- Taylor, B.L., Dizon, A.E. 1999. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology* 8: S11-S16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00797.x>
- Tong, Y., Lewis, B., Zhou, W. M., Cheng, R.M., Wang, Y., Zhou, L., Yu, D.P., Li M.D., Lin, Q. 2020. Genetic diversity and population structure of natural *Pinus koraiensis* populations. *Forest* 11(39): 1-12. <https://doi.org/10.3390/f11010039>
- Tremetsberger, K., Stuessy, T.F., Guo, Y-P., Baeza, C.M., Weiss, H., Samuel, R.M. 2003. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. *Taxon* 52: 237-245. <https://doi.org/10.2307/3647392>
- Vargas, R., Bannister, J. 2003. Informe de práctica profesional en Isla Robinson Crusoe. Estructura de los Bosques prístinos de la isla Robinson Crusoe. CONAF V Región, Valparaíso, Chile. 37 pp.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Waples, R. 1995. Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the endangered species act. *American Fisheries Society Symposium* 17: 8-27.
- Waples, R.S., Gaggiotti, O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* 15(6): 1419-1439. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2001\)055\[0616:MHCAMI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2001)055[0616:MHCAMI]2.0.CO;2)
- Waples, R., Do, C. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8(4): 735-756.
- Wang, J.L. 2005. Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of Royal Society Botany* 360: 1395-1409. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1682>
- Wang, J.L. 2009. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology* 18(10): 2148-2164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04175.x>
- Wernberg, T., Coleman, M.A., Bennett, S., Thomsen, M.S., Tuya, F., Kelaher, B.P. 2018. Genetic diversity and kelp forest vulnerability to climatic stress. *Scientific Report* 8(1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20009-9>
- Woodward, R.L. 1969. *Robinson Crusoe's Island: A History of the Juan Fernandez Islands*. University of North Carolina Press, North Carolina, USA. 267 pp.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15(4): 323-354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
- Yang, A.H., Wei, N., Fritsch, P.W., Yao, X.H. 2016. AFLP genome scanning reveals divergent selection in natural populations of *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae) along a latitudinal transect. *Frontiers in Plant Science* 7: 698. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00698>
- Zhivotovsky, L.A. 2013. Relationships between Wright's F_{ST} and FIS statistics in a context of Wahlund effect. *Journal of Heredity* 106(3): 306-309. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv019>

Received: 06.03.2025

Accepted: 27.05.2025