



ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *ESCALLONIA ALPINA* Y *E. RUBRA* (ESCALLONIACEAE)

Santiago Morello, Liliana M. Giussani & Silvana M. Sede

Instituto de Botánica Darwinion (ANCEFN-CONICET), Labardén 200, Casilla de Correo 22, B1642HYD San Isidro, Buenos Aires, Argentina; santiagomorello@hotmail.com (autor corresponsal).

Abstract. Morello, S.; L. M. Giussani & S. M. Sede. 2013. Preliminary analysis of genetic variation of *Escallonia alpina* and *E. rubra* (Escalloniaceae). *Darwiniana*, nueva serie 1(2): 227-236.

Escallonia alpina and *E. rubra* (Escalloniaceae) are distributed in the same geographical region in the southern Andes; they are differentiated by few diagnostic morphological characters such as flower arrangement, and type and presence of glands. A morphological gap between both species is absent in some populations; in addition, intermediate forms have been recognized and described as hybrids. The aim of this work is to examine the genetic variation in populations of *Escallonia alpina* and *E. rubra*, and to analyze if there is a correspondence between genetic and morphological variability. We studied the morphology of 39 individuals belonging to five populations, which were also used to perform an AFLP analysis. We conducted ordination, clustering and Bayesian assignment analyses to investigate the relationship among individuals, we calculated genetic diversity indices and performed a Mantel test. As a result of the morphological analysis, two populations were assigned to each species, while the remaining population could not be assigned unequivocally to any of the two species, as the individuals exhibited an intermediate morphology. A strong correspondence between traditional morphological characters and the AFLP pattern was observed. Our preliminary morphological and molecular evidence support *Escallonia alpina* and *E. rubra* as two distinct species. The variability found in the intermediate population might be the result of inter-specific hybridization or incomplete lineage sorting.

Keywords. AFLP; *Escallonia*; Patagonia; southern South America.

Resumen. Morello, S.; L. M. Giussani & S. M. Sede. 2013. Análisis preliminar de la variabilidad genética de *Escallonia alpina* y *E. rubra* (Escalloniaceae). *Darwiniana*, nueva serie 1(2): 227-236.

Escallonia alpina y *E. rubra* (Escalloniaceae) comparten su área de distribución en el sur de los Andes y se diferencian por pocos caracteres morfológicos diagnósticos, tales como la disposición de las flores y la presencia y tipo de glándulas; sin embargo, en algunas poblaciones no es posible asignar los individuos a una u otra especie. Además, se han reconocido y descrito como híbridos varias formas de transición entre ambas. El objetivo de este trabajo es examinar la variabilidad genética poblacional de *Escallonia alpina* y *E. rubra*, y analizar si se corresponde con la variabilidad morfológica observada. Se estudió la morfología en 39 individuos de cinco poblaciones sobre los que también se realizó un análisis de AFLP. Se investigó la relación entre los individuos mediante análisis de ordenación, agrupamiento y de asignación bayesiana. Además se calcularon índices de diversidad y se realizó una prueba de Mantel. A partir del análisis morfológico, se asignaron dos poblaciones a cada especie, mientras que una población con individuos con morfología intermedia no se pudo asignar unívocamente a ninguna de las dos especies. Se observó una fuerte correspondencia entre las especies delimitadas mediante caracteres morfológicos diagnósticos tradicionales y el patrón de AFLP. La evidencia morfológica y molecular preliminar nos permitió reconocer a *Escallonia alpina* y *E. rubra* como dos especies distintas, y a una población con caracteres morfológicos y genéticos intermedios que podrían ser el resultado de flujo génico interespecífico o de una separación incompleta de linajes.

Palabras clave. AFLP; *Escallonia*; Patagonia; Sudamérica austral.

INTRODUCCIÓN

Escallonia Mutis ex L.f. es el género más diverso de la familia Escalloniaceae, con aproximadamente 39 especies distribuidas en regiones montañosas, húmedas, desde Costa Rica hasta Tierra del Fuego en Argentina y Chile; con una mayor concentración de especies en las zonas andinas de la Argentina, Chile y Perú. Las especies de *Escallonia* son árboles pequeños o arbustos, con hojas coriáceas, a menudo glanduloso-serradas, las flores son pentámeras y se presentan solitarias, en panículas o en racimos, el fruto es una cápsula con numerosas semillas pequeñas. *Escallonia alpina* Poepp. ex DC. y *E. rubra* (Ruiz & Pav.) Pers. comparten el área de distribución al sur de la Cordillera de los Andes, en Chile y Argentina, desde los 30° a 53° de latitud sur. Ambas especies se diferencian por pocos caracteres morfológicos diagnósticos como la disposición de las flores y la presencia y tipo de glándulas; sin embargo, en algunas poblaciones no es posible asignar los individuos a una u otra especie. Sleumer (1968), describió colecciones con caracteres morfológicos intermedios que identificó como híbridos interespecíficos, en particular para las especies del sur de Sudamérica. Los datos citológicos reportados (Zielinski, 1955; Sanders et al., 1983) indican un número cromosómico diploide $2n = 24$ y cariotipos uniformes con cromosomas muy pequeños para *Escallonia*. Entre las pocas especies analizadas, no se reportó la presencia de poliploides.

En los análisis filogenéticos publicados de *Escallonia*, realizados a partir de secuencias de ADN plastidial y nuclear, las topologías obtenidas evidenciaron una marcada estructura geográfica, y *Escallonia alpina* y *E. rubra* se agruparon junto al resto de las especies del sur de los Andes (Sede et al., 2013; Zapata, 2013).

En las últimas décadas, los análisis poblacionales, la combinación de distintas técnicas de análisis (morfométricas, moleculares, cariológicas), el análisis de los patrones de distribución y las características ecológicas del ambiente han contribuido a la delimitación de especies cercanamente relacionadas y a la comprensión de su historia evolutiva (Ruiz-Sanchez & Sosa, 2010; Slovák et al., 2012). Además, la utilización de marcadores moleculares como los AFLP (“Amplified Fragment Leng-

th Polymorphism”, Vos et al., 1995) ha permitido examinar taxones con niveles bajos de divergencia genética, identificar posibles híbridos y delimitar especies cercanamente relacionadas (Martínez-Ortega et al., 2004; Whittall et al., 2004; McKinnon et al., 2008).

Con el objetivo de examinar la diversidad morfológica y genética del género *Escallonia* en la Patagonia argentina, proponemos explorar la variabilidad genética de dos especies que se distinguen por escasos caracteres morfológicos y que se encuentran ampliamente distribuidas en el sur de los Andes: *Escallonia alpina* y *E. rubra*. Con este fin realizamos un muestreo preliminar a lo largo de la distribución geográfica de ambas especies, que permitirá inferir el grado de variabilidad morfológica y su correspondencia con los patrones genéticos encontrados con la técnica de AFLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis morfológico

Se coleccionó un total de 39 individuos de cinco poblaciones de *Escallonia rubra* y *E. alpina* en Argentina. (Tabla 1; Figs. 1 y 2). Los individuos se recolectaron al azar. Por cada individuo recolectado se conservó material herborizado para analizar su morfología, y láminas foliares en gel de sílice

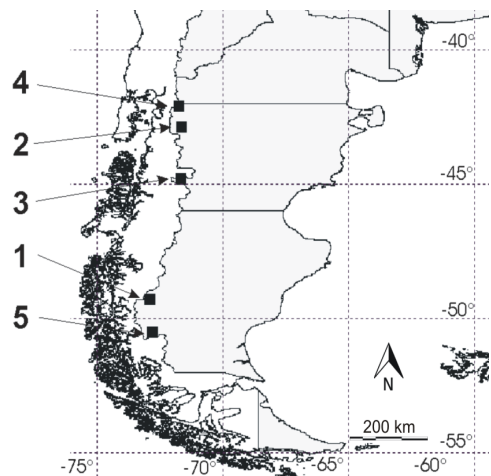


Fig. 1. Ubicación de las poblaciones estudiadas de *Escallonia* en la Patagonia argentina. Los números corresponden a las poblaciones de la Tabla 1.

Tabla 1. Ubicación geográfica y análisis de la diversidad de las cinco poblaciones de *Escallonia* estudiadas en Argentina. Los números de las poblaciones se corresponden con la Fig. 1. Abreviaturas: **N**, número de individuos estudiados por población; **Alt**, altitud en metros sobre el nivel del mar; **S**, latitud sur; **O**, longitud oeste; **PLP**, proporción de loci polimórficos expresado como porcentaje; **DW**, índice de rareza; **Dnei**, índice de diversidad de Nei.

Población	Especie	N	Provincia y localidad	Alt	Coordenadas geográficas	PLP	DW	Dnei	Voucher
1	<i>E. alpina</i>	7	Santa Cruz. Parque Nacional Los Glaciares, faldeo del Cerro Polo, chorrillo del Salto.	700	49°17'57"S 72°54'11"O	60,8	3,76	0,2	Sede & Calcagno 248 a-g (SI)
2	<i>E. alpina</i>	8	Chubut. Parque Nacional Los Alerces, Cerro Dedal.	1126	42°54'1"S 71°38'19"O	61,4	4,22	0,19	Sede & Calcagno 266 a-h (SI)
3	<i>E. rubra</i>	8	Chubut. Ruta provincial 17, de Trevelín a Corcovado, 25 km antes de Corcovado.	688	44°50'20"S 71°38'54"O	63,6	3,84	0,21	Sede & Calcagno 263 a-h (SI)
4	<i>E. rubra</i>	8	Chubut. Parque Nacional Lago Puelo, desembocadura del arroyo Los Hitos.	201	42°6'19"S 71°43'23"O	59,7	3,33	0,18	Sede & Calcagno 274 a-h (SI)
5	Morfología intermedia	8	Santa Cruz. Parque Nacional Los Glaciares, Cerro de los Cristales.	396	50°32'32"S 72°47'55"O	68,8	4,07	0,24	Sede & Calcagno 229 a-h (SI)

para la posterior extracción de ADN total. Los ejemplares se depositaron en el Instituto de Botánica Darwinion (SI; Thiers, 2013) y se estudiaron mediante las técnicas tradicionales de análisis morfológico. Se observaron al menos 10 hojas y 5 flores por individuo y se utilizaron los caracteres diagnósticos propuestos por Sleumer (1968) con el fin de caracterizar a las poblaciones, a los individuos que las componen y asignarlos a las dos especies de *Escallonia* analizadas. Las poblaciones se caracterizaron por la disposición de las flores (solitarias vs. inflorescencias), la presencia/ausencia de tricomas glandulares estipitados (glándulas estipitadas) en el cáliz y los tallos, la presencia/ausencia y densidad de tricomas glandulares multicelulares sésiles (glándulas sésiles) en la cara adaxial de las hojas, y la presencia/ausencia de pubescencia en la cara abaxial de las hojas, los tallos, el raquis de la inflorescencia y el cáliz.

Extracción de ADN y análisis de AFLP

La extracción de ADN genómico total se realizó a partir de 20 mg de hoja según el protocolo de Doyle & Doyle (1987) con algunas modificaciones.

La calidad del ADN se visualizó en un gel de agarosa 1%, teñido con Sybr Green (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil).

El protocolo de AFLP se realizó de acuerdo a Vos et al. (1995) con las modificaciones propuestas por Khan et al. (2000). Se realizó una doble digestión del ADN total con las enzimas de restricción EcoRI y MseI y se ligaron los adaptadores a los sitios de corte de cada fragmento. Se realizó una primera amplificación (PCR +1) utilizando "primers" con un nucleótido selectivo adicional (EcoRI + A / MseI + C). A continuación se llevó a cabo una prueba de amplificación preliminar con 6 combinaciones de "primers" con tres nucleótidos selectivos adicionales (PCR +3) en 5 individuos de distintas poblaciones. Se seleccionó la combinación de "primers" +3: EcoRI-ACT / MseI-CAC para realizar la amplificación selectiva, sobre la base de los polimorfismos y la reproducibilidad. Además se realizaron réplicas de un 8% de las muestras con el fin de identificar y excluir picos no reproducibles. El extremo 5' del "primer" EcoRI-ACT se marcó con carboxifluoresceína (6-FAM).

Los productos de amplificación se separaron en



Fig. 2. Hábitat y detalles de las flores de *Escallonia*. **A**, individuos de la población 5 (morfología intermedia) en su hábitat a orillas del Lago Argentino, provincia de Santa Cruz. **B**, inflorescencia de *E. rubra* (población 4). **C**, flores y frutos en formación de un individuo de la población 5 (morfología intermedia). **D**, flores de *E. alpina* (población 2). Figura en color en la versión online <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/555/568>.

un secuenciador automático (Applied Biosystems 3730xl / Genetic Analyzer) con un estándar interno (GeneScan -500LIZ, PE Applied Biosystems), en MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur). El perfil de AFLP obtenido para cada muestra se visualizó con el programa Peak Scanner (Applied Biosystems, disponible en <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4381867>) y se analizó con el programa RawGeno v2.0-1 (Arrigo et al., 2009, disponible en <http://sourceforge.net/projects/rawgeno/>), que funciona sobre el entorno R (R Development Core Team, 2012). Los caracteres se codificaron de manera semiautomática, se seleccionaron los picos con una intensidad de fluorescencia mayor a 120 RFU (unidades relativas de fluorescencia) y con tamaños entre 70 y 500 pares de bases (pb), luego

se eliminaron los picos no reproducibles y se realizó una última revisión manual. Para cada individuo se codificaron los datos de presencia y ausencia de cada carácter y se construyó una matriz binaria.

Análisis de datos

Para estudiar las relaciones genéticas entre los individuos se realizaron análisis de ordenación, agrupamiento y asignación bayesiana. A partir de la matriz binaria se construyó una matriz de distancia genética para todos los pares de individuos con el índice de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973), que luego se utilizó para realizar un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con el programa FAMD v1.108 (Schlüter & Harris, 2006). Este análisis permite visualizar la similitud entre los indi-

viduos en relación a la variabilidad genética a lo largo de los dos primeros ejes de coordenadas principales. Mediante la construcción de una red con el algoritmo Neighbor-Net (SplitsTree4 v4.12.8; Huson & Bryant, 2006) se agruparon los individuos de acuerdo a su menor distancia genética.

Para analizar la estructura genética de las poblaciones se realizó un análisis de asignación bayesiana con el programa STRUCTURE v2.2 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003, 2007; Hubisz et al., 2009), en donde se estimó la probabilidad posterior de la asignación del genoma de los individuos a K grupos genéticos. Se realizaron en paralelo dos simulaciones con distintos modelos de ancestralidad: la primera con el modelo "ADMIXTURE" (permite que más de un grupo genético contribuya al genoma de cada individuo) y la segunda con el modelo "NO ADMIXTURE" (asume que cada individuo proviene de un único grupo genético). Se utilizó un rango de $K = 1-5$. Para los restantes parámetros se utilizaron las opciones que el programa implementa por defecto. Por cada valor de K se realizaron 5 simulaciones independientes de 1.000.000 iteraciones, luego de un período de "burn-in" de 50.000 iteraciones. La convergencia de los parámetros se analizó con el programa Tracer v1.4 (Rambaut & Drummond, 2007). Los análisis de asignación bayesiana se realizaron a través del Bioportal de la Universidad de Oslo, Noruega, disponible en (<http://www.lifeportal.uio.no/>).

Con el objeto de poner a prueba una posible asociación entre la distancia genética entre las poblaciones (expresadas como F_{st}) y la distancia geográfica entre las localidades, se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967) con 10.000 permutaciones en el programa ARLEQUIN suite ver. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Para cada población se analizó la diversidad utilizando el índice de diversidad de Nei (D_{nei}) (Nei, 1987) y la proporción de loci polimórficos (PLP) y se estimó la divergencia entre las poblaciones con el índice de rareza DW (Schönswetter & Tribsch, 2005) implementado en el paquete AFLPDAT (Ehrlich, 2006; disponible en <http://www.nhm.uio.no/english/research/ncb/aflpdat/>). Además, se identificaron los fragmentos exclusivos de cada especie, es decir, los fragmentos presentes en una especie y ausentes en la otra, aunque no necesariamente en todos los individuos.

RESULTADOS

Análisis morfológico

Mediante la observación de caracteres morfológicos diagnósticos, se identificaron y caracterizaron los individuos de las cinco poblaciones. Se encontraron diferencias en la presencia de indumento en tallos, hojas (cara adaxial) y raquis de la inflorescencia y cáliz, de glándulas estipitadas en los tallos, de glándulas sésiles en la cara abaxial de las hojas, en la presencia y tipo de glándulas en el cáliz (sésiles o estipitadas), en el color de la corola y en la disposición de las flores (Tabla 2). Las poblaciones 1 y 2 se asignaron a *Escallonia alpina* mientras que las poblaciones 3 y 4 se identificaron como *E. rubra*; la población 5 no se pudo asignar unívocamente a ninguna de las dos especies, ya que presentó algunas características morfológicas intermedias entre ambas (Tabla 2).

Los individuos de *E. rubra* (poblaciones 3 y 4) tienen tallos pubescentes con glándulas estipitadas (excepto los individuos b, c y e de la población 3 que presentan tallos jóvenes pubescentes sin glándulas); las hojas con glándulas sésiles densamente distribuidas en la cara abaxial y pelos en la cara adaxial, junto al nervio medio; el raquis de la inflorescencia y el cáliz pubescentes, con numerosas glándulas estipitadas (en algunas flores cubren por completo la superficie del cáliz), las flores dispuestas en panículas laxas y la corola de color rojo (Tabla 2).

Los individuos de *E. alpina* (poblaciones 1 y 2) presentan tallos, hojas, raquis de la inflorescencia y cáliz glabros, no se observaron glándulas estipitadas en los tallos; en los individuos c, d y g de la población 1 y en los individuos c, e y h de la población 2 se observaron glándulas sésiles en los márgenes de los lóbulos del cáliz, las flores son solitarias y la corola es de color blanco a rosado (Tabla 2).

Los individuos de la población 5 presentan algunos caracteres similares a los de las poblaciones asignadas a *E. rubra*, tallos pubescentes, hojas con pocas glándulas sésiles (en menor cantidad que en *E. rubra*) y presencia de glándulas estipitadas en el cáliz; mientras que otros caracteres se asemejan a los encontrados en las poblaciones asignadas a *E. alpina*: flores solitarias, hojas glabras, ausencia de pelos en el cáliz y en los tallos floríferos.

Tabla 2. Caracteres morfológicos analizados en los individuos de las poblaciones asignadas a *Escallonia rubra*, *Escallonia alpina* y de la población 5 de morfología intermedia.

Caracteres	Poblaciones 1 y 2 <i>E. alpina</i>	Poblaciones 3 y 4 <i>E. rubra</i>	Población 5
Pubescencia en tallos	ausente	presente	ausente
Pubescencia en la cara adaxial de las hojas	ausente	presente	ausente
Pubescencia en el raquis de la inflorescencia o tallos floríferos y en el cáliz	ausente	presente	ausente
Glándulas estipitadas en tallos	ausente	presente	presente
Glándulas sésiles en la cara abaxial de las hojas	ausente	presente, muy densas	presente, poco densas
Glándulas en el cáliz	ausente o presente, marginales sésiles	presente, estipitadas	presente, estipitadas
Color de la corola	blanco-rosado	rojo	blanco, rosado o rojo
Disposición de las flores	solitarias; en la porción terminal de los tallos jóvenes, dispuestas en forma similar a racimos	panículas laxas	solitarias; en la porción terminal de los tallos jóvenes, dispuestas en forma similar a racimos

El color de la corola es variable entre los distintos individuos de la población 5: blanco, rosado o rojo (Tabla 2).

Análisis de AFLP

A partir de la amplificación selectiva se obtuvieron 330 fragmentos, de los cuales se seleccionaron 176 para construir la matriz binaria. La regresión entre el tamaño de los fragmentos y su frecuencia resultó no significativa [$R^2 = -0,153$ ($p = 0,07$)].

Del total de fragmentos amplificados, 26 son exclusivos de *E. alpina* y 21 de *E. rubra*. En la población 5 se hallaron 11 fragmentos exclusivos de *E. alpina* y 11 de *E. rubra*.

En el análisis de Coordenadas Principales, los individuos de las poblaciones 1 y 2 (*E. alpina*) y los de las poblaciones 3 y 4 (*E. rubra*) se separaron a lo largo del primer eje, mientras que los de la población 5 se ubicaron en una posición intermedia, solapándose parcialmente con los grupos correspondientes a las poblaciones de *E. rubra* y de *E. alpina* (Fig. 3).

En la red obtenida mediante el análisis con el algoritmo Neighbor-net, los individuos de las poblaciones 1 a 4 se agruparon de acuerdo a la determinación específica formando dos grupos, ubicados a cada extremo de la red, mientras que los individuos de la población 5 se ubicaron entre ambos (Fig. 4).

En el análisis de asignación bayesiana, se seleccionó un valor de $K=2$ con la mayor probabilidad posterior y la menor desviación estándar bajo ambos modelos de ancestralidad (Tabla 3); este valor permite además comparar la asignación previa de los individuos a dos especies distintas. Los resultados de la asignación a dos grupos genéticos ($K=2$) bajo el modelo de "ADMIXTURE" se muestran en la Fig. 5. El genoma de los individuos de las poblaciones 1 y 2 (*E. alpina*) se asignó principalmente a un grupo genético mientras que el de los individuos de las poblaciones 3 y 4 (*E. rubra*), se asignó a otro diferente (Fig. 5). Los individuos de la población 5 mostraron una contribución mixta de ambos grupos genéticos. En algunos individuos de *E. rubra*

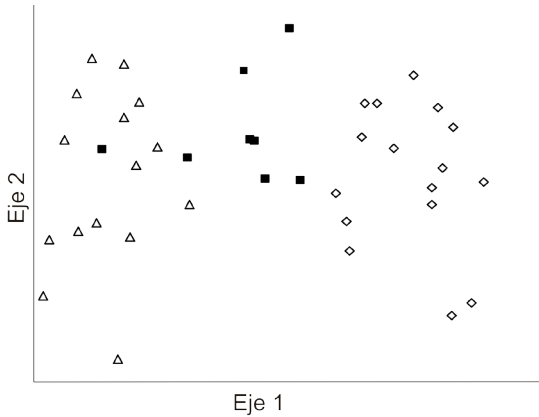


Fig. 3. Análisis de Coordenadas Principales. Los primeros dos ejes representan el 28% de la variación observada. Triángulo: poblaciones 1 y 2 de *Escallonia alpina*. Rombo: poblaciones 3 y 4 de *E. rubra*. Cuadrado: población 5 de morfología intermedia.

también se observó una pequeña proporción del genoma asignado a *E. alpina* (Fig. 5). En la asignación a dos grupos genéticos bajo el modelo “NO ADMIXTURE” se observó el mismo patrón (datos no mostrados) para las poblaciones de *E. alpina* y *E. rubra*, mientras que en la población 5 los individuos a y c se asignaron al grupo genético de *E. rubra* y los restantes se asignaron al grupo de *E. alpina*

La prueba de Mantel no detectó correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica ($r=-0,15$; $p=0,57$), es decir que no se observó un patrón de aislamiento por distancia. Los valores de

los distintos índices de diversidad calculados para cada población no se alejaron de manera significativa de los esperados para una distribución al azar de las frecuencias alélicas. En la población 5, se observó el valor más alto de Dnei y la mayor proporción de loci polimórficos (PLP), mientras que la población 2, asignada a *E. alpina*, presentó el valor más alto del índice de divergencia DW (Tabla 1).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La técnica de AFLP permitió detectar la variabilidad genética de las distintas poblaciones e individuos de *Escallonia alpina* y *E. rubra*. En este estudio se corroboró que la variabilidad morfológica es congruente con la variabilidad genética: existe una fuerte correspondencia entre los marcadores AFLP y las especies delimitadas mediante caracteres morfológicos diagnósticos tradicionales (Sleumer, 1968).

Los análisis de ordenación, de agrupamiento y de asignación bayesiana permitieron delimitar las especies; en todos los casos se encontraron dos grupos genéticos o linajes que se correspondieron con las especies delimitadas mediante caracteres morfológicos. En el Análisis de Coordenadas Principales los individuos asignados a *E. rubra* y a *E. alpina* se separaron claramente, mientras que los individuos de la población 5 se ubicaron en una posición intermedia. En el análisis de agrupamiento basado en el algoritmo de Neighbor-net los individuos también se agruparon por especie. En el análisis de asignación bayesiana, bajo los dos mo-

Tabla 3. Resultados de las simulaciones de asignación bayesiana utilizando los modelos de “ADMIXTURE” y “NO ADMIXTURE”. Se muestra el promedio de la probabilidad posterior obtenida [LnP(K)] con cinco repeticiones para cada valor de K y su desviación estándar.

K	Modelo "ADMIXTURE"		Modelo "NO ADMIXTURE"	
	LnP(K) promedio	Desviación estándar	LnP(K) promedio	Desviación estándar
1	-3679,56	9,44	-3679,14	7,53
2	-3304,50	0,31	-3379,90	1,78
3	-3345,88	12,40	-3380,48	9,37
4	-3514,82	24,95	-3550,96	31,19
5	-3621,94	148,20	-3657,13	31,32

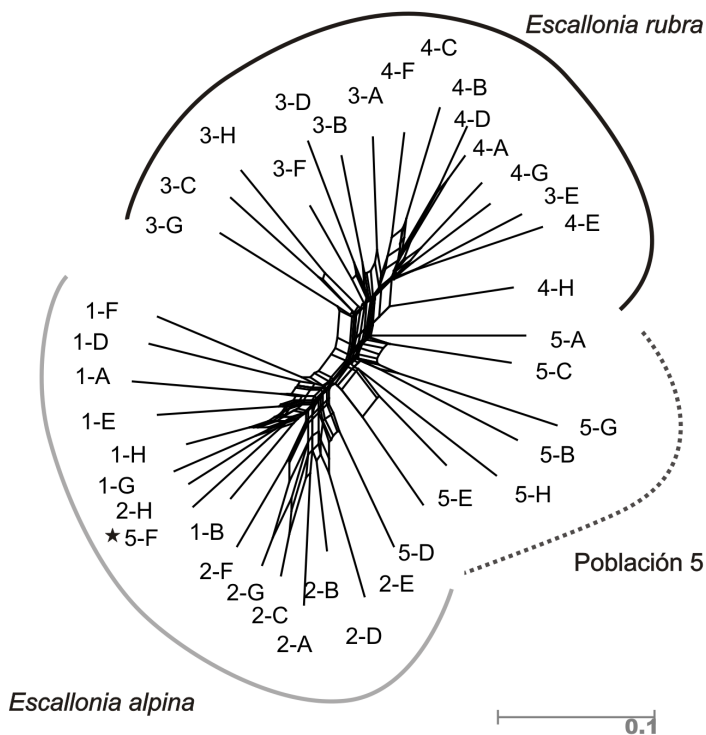


Fig. 4. Red de Neighbor-net construida a partir de la matriz de distancias de Jaccard. Los números corresponden a las poblaciones de la Tabla 1 y las letras designan a cada individuo. La estrella señala un individuo que se aleja de su población.

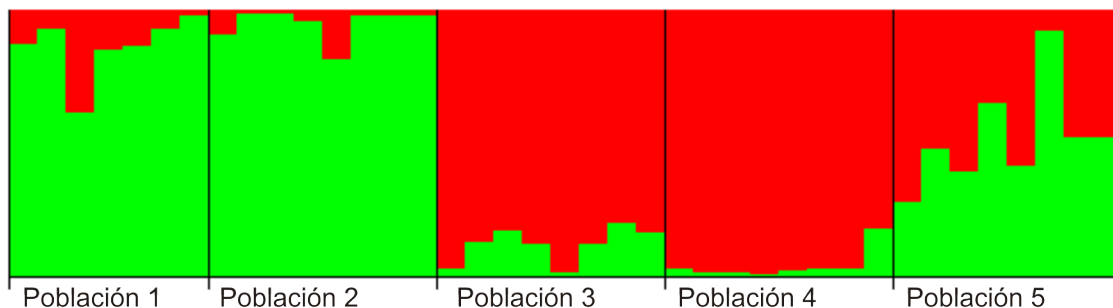


Fig. 5. Asignación bayesiana a dos grupos genéticos (K=2) bajo el modelo “ADMIXTURE”. Cada columna representa el genoma de un individuo y la proporción que es asignada a cada uno de los grupos genéticos representados por dos colores. Figura en color en la versión online <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/555/568>.

delos de ancestralidad utilizados, el genoma de los individuos fue asignado de manera homogénea de acuerdo a su especie, y se evidenció una contribución mixta en la población 5.

Las características morfológicas y genéticas de la población 5 indicarían la ocurrencia de flujo génico entre *E. rubra* y *E. alpina*. Estos individuos podrían representar híbridos interespecíficos, ya que se observaron caracteres morfológicos y genéticos intermedios entre ambas especies. Además, dado que no se observó exclusividad específica en las hipótesis filogenéticas del género (los individuos de la misma especie no se ubicaron juntos en el árbol) (Zapata 2013, Sede et al. 2013), es posible que exista flujo génico interespecífico, el que estaría favorecido también por los visitantes florales o potenciales polinizadores que son generalistas (Anderson et al., 2001; Valdivia & Niemeyer, 2006).

Sin embargo, dado que en la población 5 no se reconocieron individuos parentales con características morfológicas y genéticas asignables de manera unívoca a una u otra especie, existe la posibilidad de que la presencia de individuos con morfología intermedia se deba a una separación incompleta de linajes (Tajima, 1983; Hudson, 1992). De acuerdo con esta hipótesis, durante el proceso de separación de linajes y divergencia (especiación), las propiedades relativas a cada linaje no se adquieren al mismo tiempo, y por lo tanto durante esta etapa del proceso se encuentran diferencias poco marcadas entre ambos (de Queiroz, 2007).

La población 5 presentó alelos exclusivos de ambas especies y se encontraron valores altos del índice de diversidad (Dnei) y una alta proporción de loci polimórficos. Esta población se encuentra en el extremo austral de la distribución de las especies estudiadas, que de acuerdo a Sérsic et al. (2011), se corresponde con una zona de alta diversidad biológica. La ausencia de correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética permite descartar, aunque en forma preliminar, la posibilidad de que los resultados observados en la población 5 se deban a un patrón de aislamiento por distancia.

En este trabajo se aporta nueva evidencia que, de manera preliminar, apoya la hipótesis de que *E. rubra* y *E. alpina* son dos especies distintas. Sin

embargo, sería necesario ampliar el muestreo poblacional para conocer el patrón geográfico de la variabilidad genética y examinar la importancia de los procesos históricos en la configuración de esa variabilidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a J. A. Calcagno por la ayuda en los viajes de campo, a D. Tosto y a N. Zelener por su colaboración en la implementación del protocolo de AFLP, a J. Hurst por su ayuda en el laboratorio y al personal del herbario del Instituto de Botánica Darwinion. También agradecemos a la Administración de Parques Nacionales por permitirnos trabajar dentro de las áreas protegidas y a Marcos Ocampo por su ayuda e interés en el proyecto. Este estudio fue financiado mediante un subsidio PIP-CONICET N° 11220090100388.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, G. J.; G. Bernardello, T. F. Stuessy & D. J. Crawford. 2001. Breeding system and pollination of selected plants endemic to Juan Fernández Islands. *American Journal of Botany* 88: 220-233.
- Arrigo, N.; J. W. Tuszyński, D. Ehrlich, T. Gerdes & N. Álvarez. 2009. Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. *BMC Bioinformatics* 10: 33.
- de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879-886.
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ehrlich, D. 2006. AFLPDAT: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 6: 603-604.
- Excoffier, L. & H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Falush, D.; T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard & M. Stephens. 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299: 1582-1585.
- Falush, D.; M. Stephens & J. K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: domi-

- nant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574-578.
- Hubisz, M. J.; D. Falush, M. Stephens & J. K. Pritchard. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332.
- Hudson, R. R. 1992. Gene trees, species trees and the segregation of ancestral alleles. *Genetics* 131: 509-512.
- Huson, D. H. & D. Bryant. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- Khan, I. A.; J. D. Procnunier, D. G. Humphreys, G. Tranquilli, A. R. Schlatter, S. Marcucci Poltri, R. Froberg & J. Dubcovsky. 2000. Development of PCR-based markers for a high grain protein content gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicocoides* transferred to bread wheat. *Crop Science* 40: 518-524.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Martínez-Ortega, M. M.; L. Delgado, D. C. Albach, J. A. Elena-Rosselló & E. Rico. 2004. Species boundaries and phylogeographic patterns in cryptic taxa inferred from AFLP markers: *Veronica* subgen. *Pentasepalae* (Scrophulariaceae) in the western Mediterranean. *Systematic Botany* 29: 965-986.
- McKinnon, G. E.; R. Vaillancourt, D. Steane & B. Potts. 2008. An AFLP marker approach to lower-level systematics in *Eucalyptus* (Myrtaceae). *American Journal of Botany* 95: 368-380.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Pritchard, J. K.; M. Stephens & P. J. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- R Development Core Team. 2012. A language and environment for statistical computing. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing. Disponible en www.R-project.org.
- Rambaut, A. & A. J. Drummond. 2007. Tracer v1.4. Disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ruiz-Sanchez, E & V. Sosa. 2010. Delimiting species boundaries within the Neotropical bamboo *Oatea* (Poaceae: Bambusoideae) using molecular, morphological and ecological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 344-356.
- Sanders, R. W.; T. F. Stuessy & R. Rodríguez. 1983. Chromosome numbers from the flora of the Juan Fernández Islands. *American Journal of Botany* 70: 799-810.
- Schlüter, P. M. & S. A. Harris. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Notes on Ecology* 6: 569-572.
- Schönswetter, P. & A. Tribsch. 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon* 54: 725-732.
- Sede, S. M.; S. I. Dürnhöfer, S. Morello & F. Zapata. 2013. Phylogenetics of *Escallonia* (Escalloniaceae) based on plastid DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 173: 442-451.
- Sérsic, A. N.; A. Cosacov, A. A. Cocucci, L. A. Johnson, R. Pozner, L. J. Ávila, J. W. Sites & M. Morando. 2011. Emerging phylogeographic patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 475-494.
- Sleumer, H. 1968. Die gattung *Escallonia* (Saxifragaceae). Verhandelingen der Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Afd. Natuurkunde 58: 1-146.
- Slovák, M.; J. Kučera, K. Marhold & J. Zozomová-Lihová. 2012. The morphological and genetic variation in the polymorphic species *Picris hieracioides* (Compositae, Lactuceae) in Europe strongly contrasts with traditional taxonomical concepts. *Systematic Botany* 37: 258-278.
- Sneath, P. H. A. & R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: Freeman.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Thiers, B. [de actualización permanente, consulta 2013] *Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium, <http://sweetgum.nybg.org/ih>.
- Valdivia, C. E. & H. N. Niemeyer. 2006. Do floral syndromes predict specialisation in plant pollination systems? Assessment of diurnal and nocturnal pollination of *Escallonia myrtoidea*. *New Zealand Journal of Botany* 44: 135-141.
- Vos, P.; R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman & M. Kuiper. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Whittall, J. B.; C. B. Hellquis, E. L. Schneider & S. A. Hodges. 2004. Cryptic species in an endangered pondweed community (*Potamogeton*, Potamogetonaceae) revealed by AFLP markers. *American Journal of Botany* 91: 2022-2029.
- Zapata, F. 2013. A multilocus phylogenetic analysis of *Escallonia* (Escalloniaceae): diversification in montane South America. *American Journal of Botany* 100: 526-545.
- Zielinski, Q. B. 1955. *Escallonia*: the genus and its chromosomes. *The Botanical Gazette* 117: 166-172.