



Determinación de la filogenia del género *Scalesia*, endémico de las islas Galápagos, mediante el genoma del cloroplasto para el estudio de la hibridación entre sus especies

Enríquez-Moncayo, Cristian Pavel

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier, PhD.

19 de agosto de 2022

Hoja de resultados de la herramienta CopyLeaks



PavelEnriquez Tesis ESPE.txt

Scanned on: 13:44 August 8, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	17
Words with Minor Changes	33
Paraphrased Words	18
Omitted Words	0





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: "**Determinación de la filogenia del género *Scalesia*, endémico de las islas Galápagos, mediante el genoma del cloroplasto para el estudio de la hibridación entre sus especies**" fue realizado por el señor **Enriquez Moncayo, Cristian Pavel**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de agosto de 2022



.....
Flores Flor, Francisco, PhD.

C. C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Enriquez Moncayo, Cristian Pavel**, con cédula de ciudadanía n°1718193004, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Determinación de la filogenia del género *Scalesia*, endémico de las Islas Galápagos, mediante el genoma del cloroplasto para el estudio de la hibridación entre sus especies"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 19 de agosto de 2022

Enriquez Moncayo, Cristian Pavel

C.C.: 1718193004



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo **Enriquez Moncayo, Cristian Pavel**, con cédula de ciudadanía n° 1718193004, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Determinación de la filogenia del género *Scalesia*, endémico de las islas Galápagos, mediante el genoma del cloroplasto para el estudio de la hibridación entre sus especies"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de agosto de 2022

Enriquez Moncayo, Cristian Pavel

C.C.: 1718193004

Dedicatoria

A mi hijo amado Luka, por ser la motivación de mi vida. A mi madre Cristina, por apoyarme de forma incondicional; y a mi hermana Amanda, por confiar en mí.

Pavel Enríquez-Moncayo

Agradecimiento

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento y gratitud a Patricia Jaramillo Díaz por confiar en mí, permitirme ser parte de esta investigación e integrarme al Programa Galápagos Verde 2050 de la Fundación Charles Darwin, primero como voluntario y luego como *staff*, para ser parte de las acciones a favor de la conservación y restauración ecológica de mi hogar, Galápagos. También a José Cerca, por darme la oportunidad de colaborar con el University Museum de la Norwegian University of Science and Technology (NTNU) en esta investigación y brindarme siempre su apoyo y predisposición a despejar cualquier duda, sin importar en qué lugar del mundo se encuentre. A mi profesor Francisco Flores por brindarme la oportunidad de desarrollar esta investigación bajo su dirección y ser un guía en todo momento.

A mis compañeros de equipo Annita y Paul por siempre mostrar camaradería y apoyarnos mutuamente para que las cosas salgan siempre excelentes en el trabajo que realizamos como GV2050. A Lili, por haberme escuchado y aconsejado siempre; me hiciste mucho bien y te seguimos extrañando en la oficina. Creo que ahora más que compañeros, somos amigos y eso es gratificante.

A mis amigos de la universidad Pipe, Mateo, Ronny, Aleja, Stephy por siempre apoyarme en las actividades académicas y extracurriculares. Les deseo lo mejor del mundo porque lo merecen. Pipe, Mateillo, ustedes estuvieron cuando todo esto empezó, que dicha haberlos conocido.

A mi amado hijo Luka, por haberme puesto los pies en la tierra, haber encaminado mi vida y ser mi motivación para ser mi mejor versión siempre. Te amo con el alma, y mientras esté aquí estaré para ti.

A mi madre Cristina. Sólo tú sabes por todo lo que hemos pasado, ¡gracias por tanto!
Eres mi ángel guardián, mi mayor ejemplo y guía. Este y todos mis logros son y serán siempre tuyos (y de mi Luka).

A mi hermana Amanda, por motivarme, ser un ejemplo a seguir y haberme brindado siempre su apoyo incondicional. Te extraño.

A mi padre Jorge, porque a su manera intentó ayudarme. Sigue manteniéndote en forma viejito que tenemos partidos de fútbol pendientes con el Luka.

Índice de contenidos

Hoja de resultados de la herramienta CopyLeaks	2
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento	7
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción	17
Formulación del problema	17
Justificación del problema	18
Objetivos	20
<i>Objetivo general</i>	20
<i>Objetivos específicos</i>	21
Hipótesis	21
Capitulo II: Marco teórico	22
Género <i>Scalesia</i>	22
Biogeografía	24
Bioinformática.....	25
Genómica en plantas y conservación	26
Filogenia.....	27
Filogenómica.....	29
Genoma del cloroplasto.....	30

Hibridación	30
Ensamblaje de genomas	31
<i>Novoplasty y el ensamblaje de genomas de cloroplastos</i>	31
Alineamiento de secuencias genómicas	32
<i>MAFFT y alineamiento de genomas</i>	32
Capítulo III: Materiales y métodos	33
Secuencias de <i>Scalesia</i>	33
Ensamblaje de genomas	34
<i>Ensamblaje de novo utilizando Novoplasty</i>	34
<i>Alineamiento de genomas</i>	35
Análisis filogenético	35
<i>Árbol filogenético</i>	35
<i>Red de haplotipos</i>	36
Distancias genéticas.....	36
Análisis de los eventos de hibridación dentro del género <i>Scalesia</i>	36
Capítulo IV: Resultados	37
Ensamblajes genómicos <i>de novo</i>	37
Alineamiento de genomas	37
Filogenia del genoma del cloroplasto del género <i>Scalesia</i>	38
Red de haplotipos	64
Distancias genéticas.....	74

Análisis de los eventos de hibridación del genoma del cloroplasto del género <i>Scalesia</i>	76
Capítulo V: Discusión.....	81
Conclusiones	92
Recomendaciones	95
Bibliografía.....	96
Apéndices	114

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Especies del género Scalesia, con su distribución a lo largo del Archipiélago de Galápagos, zona de vegetación y hábito.....</i>	22
Tabla 2 <i>Distribución de las especies del género Scalesia de acuerdo a los clados del árbol filogenético.....</i>	40
Tabla 3 <i>Distancias genéticas intraespecíficas del genoma del cloroplasto de Scalesia</i>	75

Índice de figuras

Figura 1 <i>Mapa de distribución geográfica de las poblaciones de Scalesia colectadas por científicos de la Universidad de Copenhague</i>	34
Figura 2 <i>Representación gráfica del número de pares de bases de las 335 secuencias genómicas ensambladas</i>	37
Figura 3 <i>Visualización con AliView v1.28 del alineamiento de las 335 secuencias genómicas de cloroplasto obtenidas con el programa MAFFT v7.490</i>	38
Figura 4 <i>Árbol filogenético del género Scalesia.....</i>	39
Figura 5 <i>Primer clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4.....</i>	43
Figura 6 <i>Segundo clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4.....</i>	45
Figura 7 <i>Tercer clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4.....</i>	46
Figura 8 <i>Cuarto clado del árbol filogenético presentado en la Figura 4</i>	47
Figura 9 <i>Análisis del subclado A, del cuarto clado del árbol filogenético</i>	48
Figura 10 <i>Análisis del subclado B, del cuarto clado del árbol filogenético</i>	49
Figura 11 <i>Quinto clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4.....</i>	50
Figura 12 <i>Análisis de la sección A del quinto clado del árbol filogenético.....</i>	51
Figura 13 <i>Análisis de la sección B del quinto clado del árbol filogenético.....</i>	52
Figura 14 <i>Análisis de la sección C del quinto clado del árbol filogenético.....</i>	54
Figura 15 <i>Sexto clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4.....</i>	55
Figura 16 <i>Séptimo clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4.....</i>	57
Figura 17 <i>Octavo clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4.....</i>	58
Figura 18 <i>Análisis de la sección A del octavo clado del árbol filogenético.....</i>	59
Figura 19 <i>Análisis de la sección B del octavo clado del árbol filogenético.....</i>	60
Figura 20 <i>Noveno clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4.....</i>	61
Figura 21 <i>Análisis de la sección A del noveno clado del árbol filogenético.....</i>	62

Figura 22 <i>Análisis de la sección A del noveno clado del árbol filogenético</i>	63
Figura 23 <i>Análisis de la red de haplotipos</i>	64
Figura 24 <i>Análisis de la primera sección de la red de haplotipos</i>	65
Figura 25 <i>Análisis de la segunda sección de la red de haplotipos</i>	66
Figura 26 <i>Análisis de la tercera sección de la red de haplotipos</i>	667
Figura 27 <i>Análisis de la cuarta sección de la red de haplotipos</i>	68
Figura 28 <i>Análisis de la quinta sección de la red de haplotipos</i>	69
Figura 29 <i>Análisis de la sexta sección de la red de haplotipos</i>	70
Figura 30 <i>Análisis de la séptima sección de la red de haplotipos</i>	72
Figura 31 <i>Análisis de la octava sección de la red de haplotipos</i>	73
Figura 32 <i>Análisis de la novena sección de la red de haplotipos</i>	74
Figura 33 <i>Árbol filogenético del género Scalesia construido a partir del genoma nuclear</i>	77
Figura 34 <i>Árbol filogenético del género Scalesia construido a partir del genoma del cloroplasto</i>	78

Resumen

El género *Scalesia* es endémico de las islas Galápagos y está conformado por 15 especies distribuidas en once islas del archipiélago. El proceso de radiación evolutiva ha sido poco estudiado a un nivel genómico, ya que Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) fueron los primeros en presentar la filogenia del genoma nuclear de *Scalesia*, para comprender la evolución del género. Varios autores han resaltado la hibridación interespecífica en *Scalesia* a nivel del ADN nuclear, entendiendo a estos eventos como determinantes dentro del proceso de especiación. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la filogenia del genoma del cloroplasto del género *Scalesia* para estudiar la hibridación entre sus especies, siendo el primer estudio que involucra el genoma del cloroplasto de *Scalesia*. En primer lugar, se ensamblaron un total de 335 secuencias genómicas utilizando el software *Novoplasty v4.2* promediando un tamaño de 130.891 pb. Luego, se diagramó la filogenia utilizando el programa IQ-TREE v2.1.3 y se construyó la red de haplotipos del genoma del cloroplasto. La topología obtenida se comparó con la filogenia del ADN nuclear para analizar los eventos de hibridación dentro del género y se encontraron marcadas incongruencias entre ambas topologías, por lo tanto, se pudo inferir en que las especies *S. affinis*, *S. baurii*, *S. crockeri*, *S. divisa*, *S. pedunculata*, y *S. retroflexa*, que mostraron un comportamiento polifilético, evidenciaron eventos de hibridación en el genoma del cloroplasto. Sin embargo, se deben realizar estudios más profundos para comprobar que las incongruencias encontradas, son en efecto hibridación y no clasificación de linaje incompleto (ILS).

Palabras clave: género *Scalesia*, evolución, hibridación, filogenia, genoma del cloroplasto.

Abstract

The *Scalesia* genus is endemic to the Galapagos Islands and includes 15 species distributed on eleven archipelago islands. The evolutionary radiation process has been shortly studied at a genomic level since Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) were the first to present the phylogeny of the *Scalesia* nuclear genome, to understand the evolution of the genus. Several authors have highlighted interspecific hybridization in *Scalesia* at the nuclear DNA level, understanding these events as determinants within the speciation process. This research aimed to determine the phylogeny of the *Scalesia* genus chloroplast genome to study hybridization between its species, being the first study involving the *Scalesia* chloroplast genome. First, we assembled 335 genomic sequences using Novoplasty v4.2 software, averaging 130,891 bp in size. Then, we diagrammed the phylogeny using the IQ-TREE v2.1.3 program and constructed the chloroplast genome's haplotype network. Finally, we compared the topology obtained with the nuclear DNA phylogeny to analyze the hybridization events within the genus, and we found significant inconsistencies between both topologies. Therefore, we could infer that the species *S. affinis*, *S. baurii*, *S. crockeri*, *S. divisa*, *S. pedunculata*, and *S. retroflexa*, which showed a polyphyletic behavior, evidenced hybridization events in the chloroplast genome. However, further studies must be conducted to verify that the inconsistencies found are hybridization and not incomplete lineage sorting (ILS).

Key words: *Scalesia* genus, evolution, hybridization, phylogeny, chloroplast genome.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La importancia de la hibridación en la especiación y evolución de las plantas se ha debatido durante décadas, con visiones opuestas de la hibridación como una fuerza evolutiva creativa o como un ruido evolutivo (Soltis & Soltis, 2009). En islas oceánicas, las radiaciones evolutivas pueden proporcionar información clave para comprender la rápida especiación (Kelager & Philipp, 2008). Según Feng *et al.* (2020), el estudio filogenético de todo el genoma es un procedimiento útil para reconstruir las complejas historias evolutivas de muchos grupos de especies que se diversifican rápidamente y se hibridan naturalmente.

Los procesos de hibridación complican la inferencia filogenética. Una forma de detectar hibridación es enfocarse en loci sin recombinación (e.g. genomas de cloroplastos o de mitocondrias) y compararlo con el ADN nuclear (que tiene recombinación). El enfoque en genomas citoplasmáticos ayuda a la resolución de las relaciones filogenéticas pues la comparación con la filogenia del genoma nuclear permite detectar conflictos que resultan de la hibridación (Hodel *et al.*, 2021). Además, con el desarrollo de métodos de secuenciación de próxima generación (NGS), secuenciar el genoma del cloroplasto resulta más rápido y barato que secuenciar el genoma nuclear (Daniell *et al.*, 2016).

Se conoce que en islas se da la hibridación de numerosos géneros producto de radiaciones adaptativas, siendo crucial para la especiación (Nielsen *et al.*, 2003). En el Archipiélago de Galápagos, solo el 3 % de las plantas nativas son dioicas y el resto son hermafroditas, es decir, no poseen barreras morfológicas para la autopolinización; por lo tanto, la autocompatibilidad puede ser la estrategia reproductiva más común (Lindhardt, 2006; McMullen, 1990). Esta característica puede conducir hacia una compatibilidad entre especies estrechamente relacionadas que desencadena eventos de hibridación (Barrett, 1996). Se

calcula que al menos diez de las 51 especies hermafroditas en Galápagos pueden hibridarse interespecíficamente (McMullen, 1987). Es así que, Weeks & Tye (2009), relatan la posibilidad de hibridación en *Bursera* sp. (Palo Santo de Galápagos) debido al intercambio de alelos detectados en especies de diferentes islas. Asimismo, se ha reportado una introgresión sustancial entre *Gossypium darwinii* (algodón endémico de Galápagos) y su especie hermana introducida *Gossypium hirsutum* (Ellstrand *et al.*, 1999; Wendel & Percy, 1990), lo cual resalta que las plantas introducidas pueden encontrar en Galápagos un hábitat idóneo para proliferar y convertirse en especies invasoras, como es el caso de *Lantana camara*, que ha demostrado tener ventajas reproductivas frente a *Lantana peduncularis* (endémica de Galápagos), al competir y ser más atractiva para los polinizadores del archipiélago (Carrión-Tacuri *et al.*, 2012, 2014) .

En el género *Scalesia*, la hibridación podría significar un importante proceso evolutivo (Nielsen *et al.*, 2003), ya que se han encontrado evidencias de este fenómeno al momento de estudiar la radiación del género en las islas (Fernández-Mazuecos *et al.*, 2020). Es así que, se han demostrado eventos de hibridación entre *S. divisa* y *S. incisa* (Nielsen *et al.*, 2003); *S. affinis* y *S. pedunculata* (Kelager & Philipp, 2008); además, se ha sugerido la posibilidad de hibridación entre varias especies de *Scalesia* como *S. stewartii* y *S. atractyloides*, *S. pedunculata* y *S. aspera*, *S. affinis* y *S. helleri* (generando *S. retroflexa*, la cual tiene una distribución muy reducida en la isla Santa Cruz), aunque hacen falta estudios a fondo (Aldáz, 2004; Kelager & Philipp, 2008), ya que según Itow (1995), raramente se han encontrado especímenes híbridos dentro de parches poblacionales separados por barreras geográficas.

Justificación del problema

El estudio filogenético es crucial para determinar la historia evolutiva de un grupo, es decir, para conocer los procesos de especiación y adaptación de los organismos, y su

conservación. Por lo tanto, se requieren estudios que puedan diferenciar incluso especies hermanas y revelar especies en diferentes niveles de divergencia (Crawford & Archibald, 2017). La hibridación puede conducir a una discordancia filogenética entre el DNA del cloroplasto y el DNA nuclear de taxones previamente definidos (Toews & Brelsford, 2012). En otras palabras, detectar esta discordancia filogenética nos puede ayudar a encontrar hibridación en el género (Hodel *et al.*, 2021).

En las islas Galápagos existen 15 especies del género endémico *Scalesia* distribuidas en 11 islas (Lindhardt, 2006). La radiación adaptativa de este género ha sido poco estudiada, aun cuando es un grupo de especies icónico, comparable con los pinzones de Darwin, en términos de divergencia y adaptación (Stöcklin, 2009). *Scalesia*, al igual que los pinzones de Darwin, han logrado establecerse en entornos muy diversos del archipiélago (Grant, 1996). Por lo tanto, estudiar la hibridación de esta planta con un enfoque filogenético mediante la comparación del genoma del cloroplasto respecto al genoma nuclear, puede arrojar una mejor perspectiva de los procesos de adaptación y especiación producto de la radiación adaptativa típica de islas oceánicas, sobre todo conociendo que bajo ciertas condiciones ecológicas, en efecto, es probable que la hibridación haya contribuido para el nacimiento de nuevas especies (Lindhardt *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2019).

Las distintas especies del género *Scalesia*, han desarrollado adaptaciones propias para el entorno en el que se desarrollan (Tabla 1) (Lindhardt, 2006). El común denominador para las especies que habitan la zona árida, litoral o de bosque seco (*S. affinis*, *S. aspera*, *S. atractyloides*, *S. baurii*, *S. crockeri*, *S. divisa*, *S. gordilloi*, *S. helleri*, *S. incisa*, *S. retroflexa*, *S. stewartii*, *S. villosa*), es el ser arbustos; mientras que las especies que habitan las zonas de bosque húmedo (*S. cordata*, *S. microcephala*, *S. pedunculata*), son árboles (Blaschke & Sanders, 2009). Ciertas especies, como *S. helleri*, *S. affinis* y *S. retroflexa*; o *S. incisa* y *S.*

divisa, que habitan en entornos cercanos o que sus poblaciones se solapan, podrían originar eventos de hibridación, lo cual propiciaría la eventual pérdida de linajes puros, y en términos de conservación, la pérdida de la especie que sea más propensa a hibridarse (Lindhardt *et al.*, 2009).

El Archipiélago de Galápagos enfrenta un serio problema en cuanto a la conservación y a la restauración ecológica debido a que se han registrado más de 600 especies introducidas que tienen potencial de convertirse en especies invasoras (Tye *et al.*, 1999). Las principales plantas invasoras en Galápagos son *Rubus niveus*, *Lantana camara*, *Passiflora edulis*, *Psidium guajava*, y *Cedrela odorata*, las cuales pueden generar el desplazamiento de la flora nativa o llevarla a su extinción (Huxel, 1999; Mauchamp *et al.*, 1997; Tye *et al.*, 1999), ya que por lo general presentan plasticidad genética y fenotípica que las hace más propensas a establecerse y esparcirse en un entorno nuevo, que muchas veces es compartido con *Scalesia* (Jäger, 2018; Henderson *et al.*, 2006). En *Scalesia*, el desplazamiento podría conducir a que distintas especies sean arrinconadas a un entorno común, en el cual se pueda producir fenómenos de hibridación, debido a la dispersión en áreas nuevas y atípicas (Schenk, 2021). Por ello, estudiar la hibridación del género *Scalesia* podría trazar una ruta de acción frente a la eventual pérdida de linajes puros y proporcionar una comprensión más completa de la dinámica espacial y temporal de la mezcla en sistemas evolutivamente complejos (Supple & Shapiro, 2018).

Objetivos

Objetivo general

Determinar la filogenia del genoma del cloroplasto del género *Scalesia* para el estudio de la hibridación entre sus especies.

Objetivos específicos

- Ensamblar el genoma del cloroplasto de 328 individuos representativos 15 especies de *Scalesia* cuya distribución abarca 11 islas del Archipiélago de Galápagos.
- Diagramar una filogenia del cloroplasto con los 328 especímenes de *Scalesia*.
- Analizar los eventos de hibridación dentro del género *Scalesia* mediante la comparación con el árbol filogenético del ADN nuclear.

Hipótesis

La filogenia obtenida mediante el genoma del cloroplasto del género *Scalesia* endémico de las islas Galápagos, permite establecer la presencia de hibridación entre sus especies.

Capítulo II: Marco teórico

Género *Scalesia*

Scalesia, *Lecocarpus*, *Darwiniothamnus*, y *Macraea*, son los cuatro géneros endémicos de la familia Asteraceae que se encuentran en las islas Galápagos (Hamann, 1979; Jaramillo-Díaz *et al.*, 2018). El género *Scalesia* es el más diverso al contar con 15 especies comprendidas en 21 taxones (Hamann & Wium-Andersen, 1986; Jaramillo-Díaz *et al.*, 2018), por lo cual muestra una notable diversidad fenotípica en los rasgos vegetativo y reproductivos (Fernández-Mazuecos *et al.*, 2020). Se cree que estas variaciones son producto de la adaptación a una amplia gama de hábitats, ya que han colonizado bosques húmedos, litorales, áridos, bosques secos, suelo volcánico, grava de lava y ambientes fisurados en elevaciones variadas, caracterizándose por presentar una distribución alopátrica (Tabla 1) (Cerca *et al.*, 2022; Itow, 1995).

Tabla 1

Especies del género Scalesia, con su distribución a lo largo del Archipiélago de Galápagos, zona de vegetación y hábito

Especies	Distribución en islas	Zona de vegetación	Hábito
<i>S. affinis</i>	Fernandina, Floreana, Isabela, Santa Cruz	Árida, litoral, bosque seco y bosque húmedo	Arbusto
<i>S. aspera</i>	Santa Cruz	Árida, litoral y bosque seco	Arbusto
<i>S. atractyloides</i>	Santiago	Árida y litoral	Arbusto

Especies	Distribución en islas	Zona de vegetación	Hábito
<i>S. baurii</i>	Pinta, Pinzón	Árida y bosque seco	Arbusto arborescente
<i>S. cordata</i>	Isabela	Bosque húmedo	Árbol
<i>S. crockeri</i>	Baltra, Santa Cruz	Litoral	Arbusto
<i>S. divisa</i>	San Cristóbal	Árida y bosque seco	Arbusto
<i>S. gordilloi</i>	San Cristóbal	Árida, litoral y bosque seco	Arbusto
<i>S. helleri</i>	Santa Cruz, Santa Fe	Árida y litoral	Arbusto
<i>S. incisa</i>	San Cristóbal	Árida y litoral	Arbusto
<i>S. microcephala</i>	Fernandina, Isabela	Bosque húmedo	Árbol
<i>S. pedunculata</i>	Floreana, San Cristóbal, Santiago, Santa Cruz	Bosque húmedo	Árbol
<i>S. retroflexa</i>	Santa Cruz	Litoral	Arbusto arborescente
<i>S. stewartii</i>	Santiago	Árida y litoral	Arbusto
<i>S. villosa</i>	Floreana	Árida y litoral	Arbusto

Nota. Adaptado de *Preliminary insights into the phylogeny and speciation of Scalesia (Asteraceae), Galápagos Islands*, por Blaschke & Sanders (2009), *Scalesia gordilloi sp. nov. (Asteraceae) from the Galápagos Islands, Ecuador*, por Hamann & Wium-Andersen (1986),

Hybridization in Scalesia (Asteraceae): Adding complexity to a problematic genus, por Kelager & Philipp (2008), *Reproductive biology and putative interspecific hybridisation between selected species of Scalesia on Santa Cruz, Galápagos: A study of Scalesia crockeri, S. pedunculata and S. aspera*, por Lindhardt (2006), y *Morphometric, AFLP and plastid microsatellite variation in populations of Scalesia divisa and S. incisa (Asteraceae) from the Galápagos Islands*, por Nielsen *et al.* (2003).

Según Schilling *et al.* (1994), las consideraciones biogeográficas sugieren que *Scalesia* pudo parir de un grupo hermano (el género *Pappobolus*) de la región Andina de Sudamérica, porque esta región es la fuente probable de más de la mitad de las plantas endémicas de las islas Galápagos. Además, se establece una relación de hermanas entre *Scalesia* y un clado de tres géneros del norte de los Andes (*Syncretocarpus*, *Heiseria* y *Pappobolus*) (Fernández-Mazuecos *et al.*, 2020).

Biogeografía

La biogeografía intenta determinar cómo la especiación, la adaptación, la extinción y los procesos ecológicos interactúan entre sí, para reconstruir las secuencias de origen, dispersión y extinción de los taxones, y explicar cómo los eventos geológicos han dado forma a los patrones de distribución biótica actuales; ya que los patrones de distribución de organismos sobre la superficie del globo no son aleatorios (Crovello, 1981; Myers & Giller, 1988).

Los entornos insulares permiten inferir respecto a los problemas en la estructura y función de la comunidad, como la distribución de individuos en especies o las relaciones tróficas entre poblaciones, ya que cualquier organismo que se encuentre en dicho entorno aislado es seguramente miembro de la comunidad biótica (Simberloff, 2003). Según DaCosta *et al.* (2019), el aislamiento geográfico permite la acumulación de linajes endémicos junto con el flujo y la dispersión de genes tanto dentro del archipiélago como entre las islas y el continente.

Sin embargo, los patrones de la biogeografía no se limitan solo a cuántos, sino a qué especies habitan las islas, estableciendo que la especies raras y restringidas geográficamente no se pueden equiparar con las más comunes y de mayor distribución, y que, por ende, pueden tender a la extinción debido a sus requisitos de recursos relativamente altos, capacidades de dispersión limitadas y alta sensibilidad a la perturbación (Lomolino, 2000). Por lo tanto, Simberloff & Abele (1976) establecen que las estrategias de conservación deben ser definidas en función de los requerimientos particulares de las especies amenazadas y no se debería tratar a todas las especies por igual.

La biogeografía ha puesto en evidencia el aislamiento de las islas frente a otras masas terrestres, los datos de población de islas han contribuido en gran medida a la comprensión de que la mayor parte de la especiación es alopátrica (Simberloff, 2003).

Bioinformática

Según el National Human Genome Research Institute, la bioinformática es una subdisciplina de la biología y la informática que se ocupa de la adquisición, el almacenamiento, el análisis y la difusión de datos biológicos. En otras palabras, es la aplicación de herramientas de computación y análisis a la recopilación e interpretación de datos biológicos (Bayat, 2002). La bioinformática es un campo de investigación interdisciplinario, cuyo eje central es la biología molecular moderna, donde se desarrollan y utilizan métodos computacionales para transformar datos biológicos en conocimiento y traducirlos para usarlos en áreas muy variadas como la biomedicina o la conservación de especies en peligro de extinción (Larrañaga *et al.*, 2006), por citar dos ejemplos.

Las bases de la bioinformática se establecieron a principios de la década de 1960 con la aplicación de métodos computacionales al análisis de secuencias de proteínas. Luego, el análisis de ADN también surgió producto a avances paralelos en métodos de biología

molecular (que permitieron una manipulación más fácil del ADN), así como su secuenciación, y la informática (que vio el surgimiento de computadoras cada vez más pequeñas y potentes) con software que permiten un manejo de datos y tareas bioinformáticas de manera más adecuada y óptima (Gauthier *et al.*, 2019).

Genómica en plantas y conservación

Según el National Human Genome Research Institute, la genómica se puede entender como el estudio de todos los genes y demás elementos que conforman la totalidad del ADN de un organismo (el genoma), incluyendo las interacciones de los genes entre sí y con el entorno, utilizando herramientas computacionales (bioinformática). Durante los últimos 10 años, la genómica ha transformado la biología al permitir la secuenciación y el ensamblaje de genomas completos, la identificación de genes asociados con la adaptación y la especiación, y el descubrimiento de nodos filogenéticos no resueltos durante mucho tiempo en el árbol de la vida. Además, la genómica puede revelar el potencial genético y metabólico de los organismos en comunidad y establecer cómo se dividen en y entre poblaciones, así como, evidenciar cómo se crea y se mantiene la diversidad genética, identificando los principales impulsores de la evolución y la especiación del genoma (Allen & Banfield, 2005).

Por lo tanto, la secuenciación del genoma completo permite representar todo el código genético de un organismo y otorgar información sobre la estructura de los genes, la organización genómica y la evolución (Rounsley *et al.*, 1998). La investigación genómica ha revelado una alta frecuencia de mezcla en los sistemas naturales (De Manuel *et al.*, 2016), a la par de inferir sobre la ascendencia de regiones específicas del genoma y estimar el momento de los eventos de mezcla (Schaefer *et al.*, 2017).

Según Supple & Shapiro (2018), comprender las historias de mezcla de las poblaciones naturales es importante para delinear las unidades para la conservación, ya que la mezcla

erosiona la distinción genética en la que se basan estas unidades. Debido a ello, la mezcla interespecífica se ha visto en la conservación como una amenaza para la integridad, sobre todo, de las especies en peligro de extinción (Jackiw *et al.*, 2015).

En la actualidad, se puede emplear el poder de herramientas genómicas para responder preguntas en conservación que no podrían responderse utilizando enfoques genéticos tradicionales (Allendorf *et al.*, 2010). Por lo tanto, Benestan *et al.* (2016), establece que es esencial que los investigadores se mantengan al día con los métodos que cambian rápidamente en el diseño de estudios apropiados, la evaluación de la calidad de los datos y la selección de análisis pertinentes para obtener resultados precisos para las decisiones de conservación y manejo. En síntesis, la genómica se refiere al análisis de datos genéticos utilizando herramientas computacionales (bioinformática).

Filogenia

Los árboles filogenéticos se utilizan cada vez más en varios estudios biológicos para visualizar datos asociados en un contexto evolutivo (Yu *et al.*, 2018). Es así que, la variación en el ADN se ha posicionado como la base para la reconstrucción filogenética, ya que se argumenta que los datos moleculares son preferibles a los datos morfológicos para la inferencia filogenética, debido a la relativa fácil disponibilidad de un gran número de caracteres moleculares independientes, los niveles generalmente bajos de variación molecular no heredable y la aparente neutralidad selectiva de muchos caracteres moleculares (Rieseberg & Soltis, 1991).

Sin embargo, los rasgos morfológicos, aún desempeñan un papel importante a la hora de construir árboles filogenéticos, pues se mantiene como una poderosa fuente independiente de evidencia para probar clados moleculares, y a través de fenotipos fósiles, el medio principal para establecer filogenias de escala temporal (Lee & Palci, 2015), lo cual, permite comprender

la forma y función, la ecología y evolución, y demás aspectos que otorgan una comprensión integral de la evolución mediante la integración de información tanto genética como fenotípica, y taxones fósiles y vivos (Giribet, 2015; Lee & Palci, 2015).

Por otro lado, según Scotland *et al.* (2003), los estudios anatómicos rigurosos y críticos de menos caracteres morfológicos en el contexto de una filogenia molecular es la forma en la que deberían desarrollarse los estudios integrados; los cuales pueden ser corroborados mediante métodos comparativos filogenéticos, ya que se utilizan para controlar la falta de independencia estadística entre especies. Sin embargo, se debe tomar muy en cuenta el modelo de evolución a emplear, debido a que, si se aplica un modelo erróneo de evolución a los datos comparativos, los resultados de los análisis filogenéticos pueden ser engañosos (Freckleton *et al.*, 2015).

Se sugiere usar datos genómicos completos para aumentar la resolución filogenética de los taxones de estudio (Dong *et al.*, 2018); aunque se debe mencionar que construir una historia evolutiva integral para grandes grupos taxonómicos, a pesar de los métodos genómicos, representa un desafío a considerar (Debray *et al.*, 2021) debido al flujo de genes interespecíficos de linajes incompletos y la persistencia de polimorfismos antiguos producto de múltiples eventos de especiación (Wang *et al.*, 2020). Por ello, el número de genes utilizados para una precisa reconstrucción de la filogenia de un organismo, se considera un factor más importante que el número de taxones (Arbizu *et al.*, 2014; Rokas & Carroll, 2005).

La inferencia filogenética y la delimitación de especies son de fundamental importancia para la conservación de la biodiversidad, ya que la gestión de la conservación se basa en la clasificación de la diversidad en unidades de especies, para asignar estrategias al nivel apropiado de integridad biológica (Hosegood *et al.*, 2020).

Filogenómica

El estudio de la biología del genoma con enfoque hacia los aspectos funcionales y evolutivos de un organismo mediante el análisis filogenético del genoma completo se conoce como filogenómica (Dagan, 2011). En otras palabras, es el uso de datos genómicos para inferir relaciones evolutivas, mediante la extensión de los métodos filogenéticos estándar (los cuales se centran en la manipulación de conjuntos de datos de un solo gen), extrapolando a la totalidad de los genes de un organismo (Philippe *et al.*, 2011).

La construcción de filogenias de genes de muchos genomas permite la reconstrucción más precisa de los eventos evolutivos en una especie (Dagan & Martin, 2007). Para ello, es necesario explorar a fondo los conjuntos de datos utilizando técnicas de alineación múltiple, métodos de inferencia filogenética y estrategias de análisis de conflictos (Hodel *et al.*, 2021), ya que, aun cuando la filogenómica se presenta como un campo nuevo con muchas aplicaciones inexploradas, al mismo tiempo se pueden encontrar limitaciones potenciales (Arbizu *et al.*, 2014). Según Philippe *et al.* (2011), cuando la señal filogenética genuina es abundante, la filogenómica es relativamente robusta frente a la eventual inclusión de secuencias no ortólogas, estableciendo como factores de discordancia a la recombinación, hibridación e introgresión, y la selección de linajes incompleta (Arbizu *et al.*, 2014).

La filogenómica enfocada en los genomas de los cloroplastos permite dar soluciones para la reconstrucción filogenética de algunos grupos de plantas taxonómicamente difíciles (Zhang & Li, 2010), en los cuales muchas generaciones de retrocruzamiento dificultan la detección de eventos de hibridación antiguos que son determinantes para reconstruir la historia evolutiva de una especie o incluso un género entero de plantas (Hibbins & Hahn, 2022).

Genoma del cloroplasto

Los cloroplastos son organelos fotosintéticos multifuncionales esenciales en las células vegetales y con material genético independiente (Wang *et al.*, 2021). El genoma del cloroplasto es en general, herencia maternal (Xiong *et al.*, 2009), y está típicamente conformado por una doble cadena de ADN circular de 120 a 220 kb (Rogalski *et al.*, 2015). Este genoma tiene una mayor conservación en términos de estructura, número de genes y composición genética, respecto al genoma mitocondrial o nuclear (Wang *et al.*, 2021).

El genoma del cloroplasto posee una tasa de evolución relativamente moderada, producto de la falta de recombinación, el pequeño tamaño de su genoma y el alto número de copias por célula (Dong *et al.*, 2012).

Debido a la alta conservación del genoma del cloroplasto, frente al genoma nuclear o mitocondrial, secuencias parciales de este genoma han sido usadas con frecuencia para estudios filogenéticos e identificación de especies (Rønsted *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando se utilizan secuencias parciales, la información es insuficiente para proveer una alta resolución que permita diferenciar taxones cercanamente relacionados, o más allá del nivel de especie con relaciones taxonómicas poco claras (Bi *et al.*, 2018).

Hibridación

Según Jørgensen & Mauricio (2005), la hibridación se reconoce cada vez más como una fuerza creativa significativa en la evolución; la cual se define como el entrecruzamiento de individuos de poblaciones genéticamente distintas, que puede ocurrir de manera natural o por actividades antropogénicas (Allendorf *et al.*, 2001). Los especímenes híbridos, a menudo, son difícilmente distinguibles por su morfología y pueden ser complicados de distinguir mediante técnicas genéticas (Jackiw *et al.*, 2015).

Los resultados genéticos producto de eventos de hibridación son los siguientes: un híbrido de primera generación (F1) es el resultado del cruce entre dos especies parentales puras; un híbrido de segunda generación (F2) es el resultado del cruce de dos híbridos F1; y así sucesivamente. Por otro lado, un retrocruzamiento es el resultado del cruce de un híbrido F1 con una de las especies parentales puras (Jackiw *et al.*, 2015).

La hibridación natural se puede identificar de diferentes formas: taxón híbrido natural, introgresión y zona híbrida natural; y en los tres casos conforman el legado de evolución del taxón (Allendorf *et al.*, 2001). Por lo tanto, se puede inferir que cuando la hibridación ocurre de manera natural puede dar paso a la especiación (Allendorf *et al.*, 2010).

Ensamblaje de genomas

Novoplasty y el ensamblaje de genomas de cloroplastos

NOVOplasty es un ensamblador *de novo* basado en la incorporación inicial de una semilla, la cual puede ser una secuencia de lectura, un gen conservado o incluso un genoma completo de un organelo de una especie distante (Dierckxsens *et al.*, 2017, 2020). Esta secuencia semilla es la que permite recuperar una secuencia de lectura del genoma objetivo de datos NGS, mas no es la que inicia el ensamblaje lo cual evita que se sufran desajustes aun cuando se implemente entradas de semilla variadas. El proceso inicia al almacenar las secuencias de interés en una tabla *hash*; luego, la semilla inicia el ensamblaje de manera iterativa en ambas direcciones de las secuencias de la tabla. Las lecturas superpuestas que se identifican en la tabla *hash* se almacenan por separado y se verifica la correcta disposición de las lecturas emparejadas, las cuales, si son similares, van a agruparse para que cada extensión de base se resuelva por consenso entre las lecturas superpuestas. Esto determinará la existencia de un *contig*; sin embargo, si durante el ensamblaje se obtiene más de una

extensión de consenso, el ensamblaje se divide y se crean nuevos contigs (Dierckxsens *et al.*, 2017, 2020).

Dierckxsens *et al.* (2017) sugiere utilizar regiones cortas específicas del genoma de cloroplasto como semilla para el ensamblaje de genomas de cloroplasto con NOVOplasty, debido a la transferencia intergenómica entre los genomas de cloroplasto y mitocondrial (Havey *et al.*, 1998), al ser comunes las secuencias derivadas de cloroplastos en los genomas mitocondriales de plantas (Alverson *et al.*, 2010); de lo contrario se pueden dar inicio al ensamblaje del genoma mitocondrial.

Alineamiento de secuencias genómicas

Para trazar la historia evolutiva de un taxón, las alineaciones de secuencias del genoma del cloroplasto son un recurso fundamental al permitir encontrar elementos funcionales tales como: secuencias de codificación de proteínas, estructuras de ARN, sitios objetivo de miARN, entre otros (Frith *et al.*, 2010; Janečka *et al.*, 2007).

MAFFT y alineamiento de genomas

MAFFT es un programa de alineamiento de secuencias múltiples (MSA, por sus siglas en inglés) que puede operar secuencias de nucleótidos o aminoácidos (Katoh *et al.*, 2002), asumiendo que estas son homólogas, es decir, comparten una secuencia ancestral común (Katoh & Standley, 2014). En el caso de alineaciones genómicas, las herramientas de alineación detectan piezas homólogas cuyos nucleótidos son alineados (en lugar de realizar una alineación global de toda la entrada), y aceptados como máximo en una alineación, lo cual permite un mapeo uno a uno entre las bases del escrutinio (Katoh *et al.*, 2009).

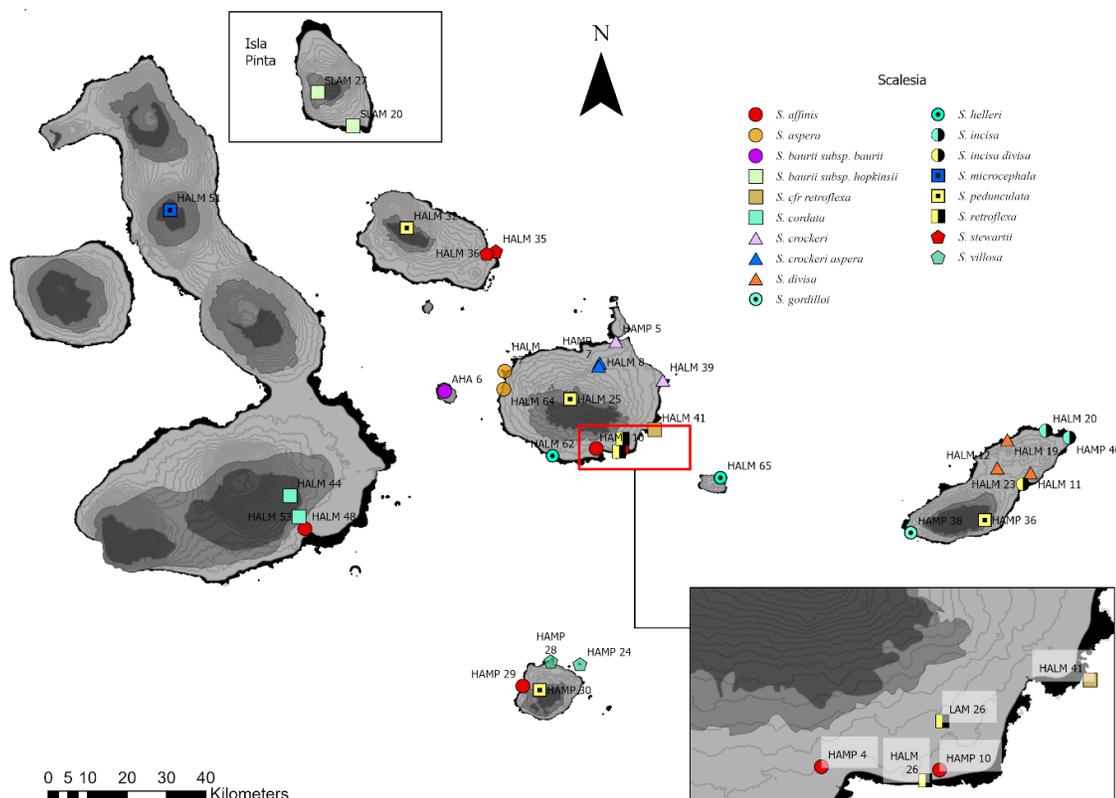
Capítulo III: Materiales y métodos

Secuencias de *Scalesia*

Se tomaron 328 muestras de tejido de hoja de *Scalesia* de varias poblaciones de las 15 especies que abarcan todo el archipiélago durante campañas de campo dirigidas por la Universidad de Copenhague (UCPH) durante 1998-2004 (Figura 1). En el marco del proyecto científico PC-001/98 PNG del Instituto Ecuatoriano Forestal, Áreas Naturales y Vida Silvestre, las muestras de tejido fresco se secaron en gel de sílice y se almacenaron a temperatura ambiente para su uso posterior. Las especies y poblaciones muestreadas fueron identificadas en el campo por botánicos expertos y, en muchos casos, se recopilaron y archivaron en el Herbario de la Universidad de Copenhague. En virtud del permiso otorgado por el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos del Proyecto de Investigación Científica Denominado “DarwinPlants” (MAAE-DBI-CM-2021-0213)., suscrito entre el Ministerio de Medio Ambiente, Agua y Transición Ecológica, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural; y la Fundación Charles Darwin. El ADN se extrajo con un kit Qiagen DNeasy Plant 96, y el ADN se proporcionó a Novogene UK para la creación y secuenciación de bibliotecas de Illumina en un instrumento Illumina NovaSeq. Los datos de secuenciación sin procesar se recortaron y procesaron utilizando herramientas de software de limpieza de datos como AdapterRemoval y Trimmomatic. Se obtuvo una cobertura de 6X y un promedio de 21 GB de datos (lectura) por individuo utilizando una librería *paired end*. Se accedió a las secuencias genómicas para el ensamblaje *de novo* a través de una conexión remota desde el Museo Universitario de la Universidad Noruega de Ciencia y Tecnología (Erling Skakkes gate 47B, 7012 Trondheim, Noruega) a la infraestructura de supercomputación de Saga.

Figura 1

Mapa de distribución geográfica de las poblaciones de *Scalesia* colectadas por científicos de la Universidad de Copenhague. Elaborado por: Cárdenas, David (2022)



Ensamblaje de genomas

Ensamblaje de novo utilizando Novoplasty

Se ensamblaron de *novo* 328 genomas de las 15 especies de *Scalesia* endémicas de las islas Galápagos mediante el programa Novoplasty v4.2 utilizando un genoma de cloroplasto de *S. gordilloi* y *S. incisa* como semilla. Se estableció un rango para el genoma entre 120.000 y 180.000 pares de bases, con una cadena de 33 nucleótidos para la estimación precisa de la superposición entre lecturas de la semilla (k-mer=33) (Plaza Onate *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2014), y un máximo de 200 GB de memoria por CPU utilizando la partición *bigmem*

(Dierckxsens *et al.*, 2017). Los datos de entrada fueron en formato *FASTQ* y los de salida en *FASTA*.

Se utilizó como grupo externo los genomas de cloroplasto de las siguientes especies: *Syncretocarpus sericeus*, *Pappobolus ecuadoriensis*, *Pappobolus juncosae*, *Pappobolus nigrescens*, *Pappobolus hypargyreus* (dos genomas), y *Pappobolus lehmanii*, dando un total de 335 secuencias genómicas ensambladas, para asegurar la monofilia del grupo interno y generar una topología estable (Nixon & Carpenter, 1993; Wilberg, 2015).

Alineamiento de genomas

Se condujo un alineamiento de 335 secuencias genómicas de 133.581 sitios de nucleótidos utilizando el programa MAFFT v7.490 (Kato *et al.*, 2002; Kato & Standley, 2014), se asignó 10 Gb de memoria por CPU y se trabajó con 20 ordenadores por un lapso de dos días. Los resultados del alineamiento se visualizaron con el programa AliView v1.28 (Larsson, 2014). Además, se programó en el terminal de Linux utilizando GNU nano 2.3.2, un script para renombrar todas las muestras que hasta el momento habían permanecido con una codificación que no permitía conocer a qué especie y población de *Scalesia* pertenecían.

Análisis filogenético

Árbol filogenético

El modelo de mejor ajuste de la sustitución de nucleótidos (es decir, K3Pu+F+R7) se determinó utilizando el criterio de información de Akaike en el programa ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) implementado en IQ-TREE v2.1.3 (Minh *et al.*, 2020). Luego se dedujeron las relaciones filogenéticas usando el método de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981) disponible en IQ-TREE v2.1.3 (Minh *et al.*, 2020), y 1000 réplicas de *bootstrap* ultrarrápido (UFBoot) con cinco ordenadores procesando los datos para evaluar los valores de

soporte de nodos (Hoang *et al.*, 2018). La representación gráfica y la manipulación de los clados se efectuó en el programa FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Red de haplotipos

La red de haplotipos se la construyó con cada uno de los 328 especímenes usando el programa TCS (Clement *et al.*, 2000), con una conexión límite del 95%, sin considerar los gaps del alineamiento en formato *NEXUS* y eliminando el grupo externo. La representación gráfica se realizó en tcsBU (dos Santos *et al.*, 2016).

Distancias genéticas

Las estimaciones de la divergencia evolutiva de las 335 secuencias genómicas se calcularon ingresando el alineamiento en formato *FASTA*, en el programa MEGA11 v11.0.11 (Tamura *et al.*, 2004), utilizando el modelo de Máxima Verosimilitud Compuesta (Tamura *et al.*, 2021). La matriz de distancias genéticas se exportó como archivo Excel para un mejor análisis.

Análisis de los eventos de hibridación dentro del género *Scalesia*

Se realizó la comparación entre la filogenia del genoma nuclear obtenida por Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) y la filogenia del genoma del cloroplasto del género *Scalesia* obtenida en el presente estudio. Se consideró la distribución de las especies a lo largo de ambas topologías y las discordancias fueron catalogadas como posibles eventos de hibridación bajo el criterio de Rieseberg & Brouillet (1994) que establecen que las especies híbridas pueden mostrar un comportamiento polifilético. Es decir, las especies que evidenciaron comportamiento polifilético y que se agruparon en clados con individuos de más de una especie y no siguieron la distribución de la filogenia del genoma nuclear, fueron resaltados como posibles individuos con un genoma del cloroplasto híbrido.

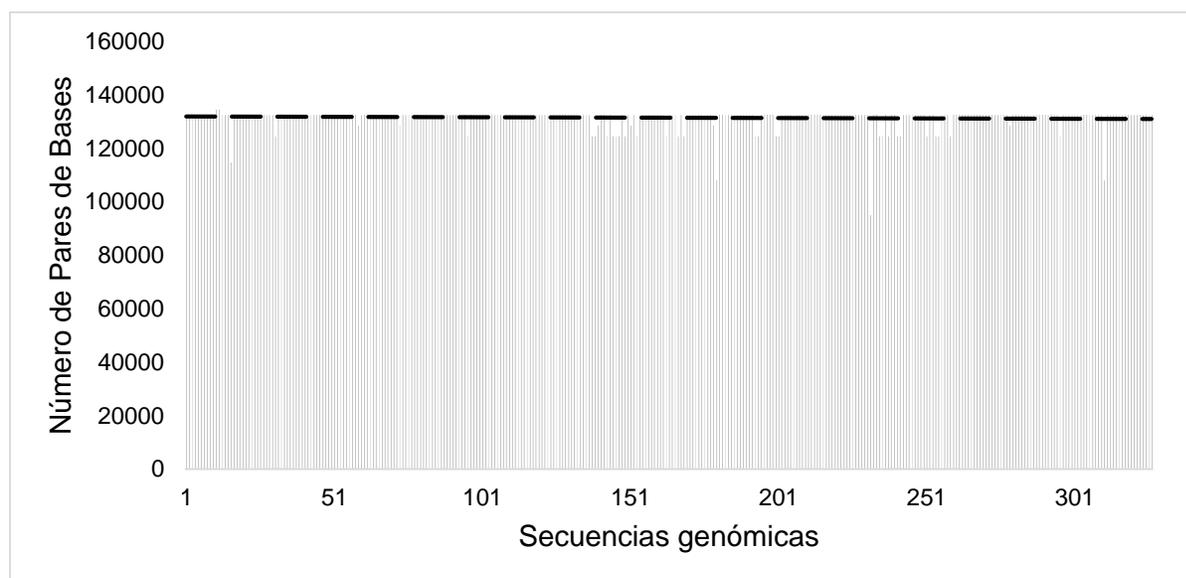
Capítulo IV: Resultados

Ensamblajes genómicos *de novo*

La característica general de las 335 secuencias genómicas ensambladas considerando grupos interno y externo fue que cada secuencia pudo expresarse en un solo *contig* (Tabla 4, en anexos). El promedio de pares de bases (bp) por genoma de *Scalesia* fue de aproximadamente 130.891 pb con una desviación estándar de 7.236 pb (Figura 2).

Figura 2

Representación gráfica del número de pares de bases de las 335 secuencias genómicas ensambladas



Nota. La línea punteada representa el promedio de pares de base de todas las muestras del estudio.

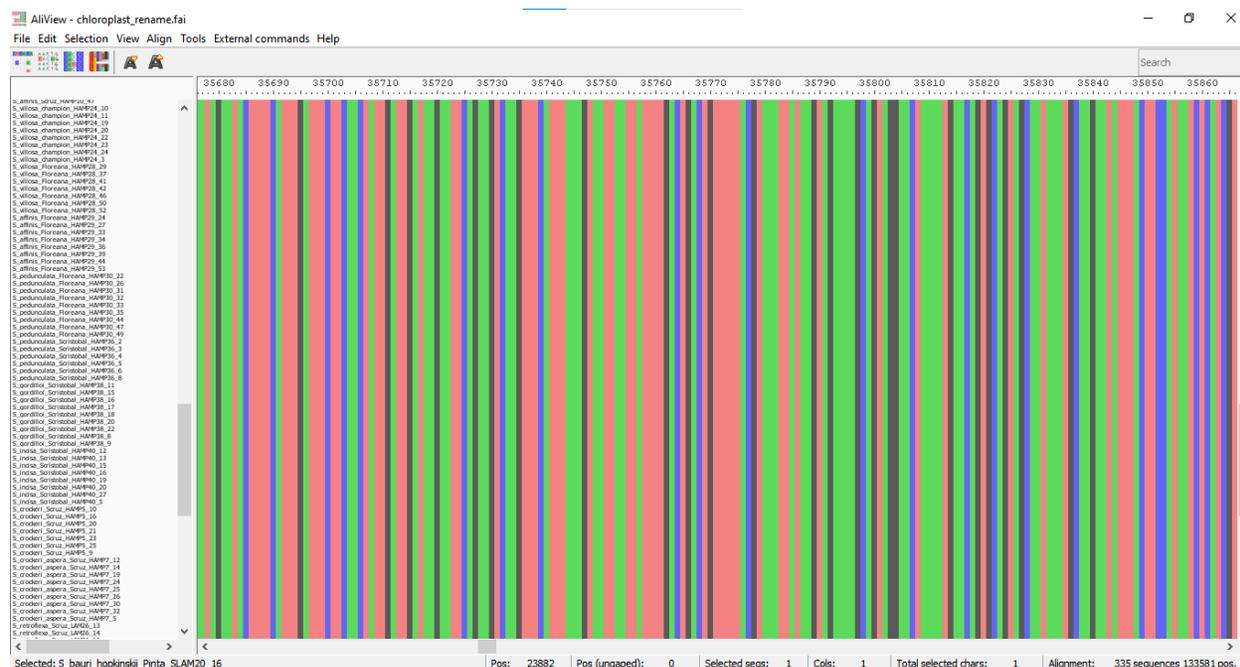
Alineamiento de genomas

Las 335 secuencias genómicas del cloroplasto ensambladas *de novo* se alinearon para diagramar la filogenia del género *Scalesia* (Figura 3). Las muestras AHA 7_1 y AHA 7_2 fueron removidas del alineamiento debido a que mediante una búsqueda en BLAST (Basic Local

Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se comprobó que estas especies no pertenecían al género *Scalesia* o a sus antepasados del género *Pappobolus*.

Figura 3

Visualización con AliView v1.28 del alineamiento de las 335 secuencias genómicas de cloroplasto obtenidas con el programa MAFFT v7.490



Filogenia del genoma del cloroplasto del género *Scalesia*

El árbol filogenético diagramado a partir de los genomas del cloroplasto de 328 especímenes de *Scalesia*, fue clasificado en nueve clados para un mejor análisis de la distribución de los individuos en la topología (Figura 4). Se pudo evidenciar que *S. villosa* y *S. affinis* fueron las únicas especies que conformaron clados independientes. Sin embargo, *S. affinis* también se agrupó dos clados adicionales, evidenciando un comportamiento polifilético. Este hecho fue recurrente a lo largo de la topología y también se evidenció entre poblaciones

específicas. En ciertos casos, como en el de la población HALM12 de *S. divisa*, algunos individuos se distribuyeron en más de un clado (Tabla 2).

Figura 4

Árbol filogenético del género *Scalesia* separado en nueve clados principales (de arriba hacia abajo), con el grupo externo iniciando el árbol (sin color), y con valores de Bootstrap superiores a 85

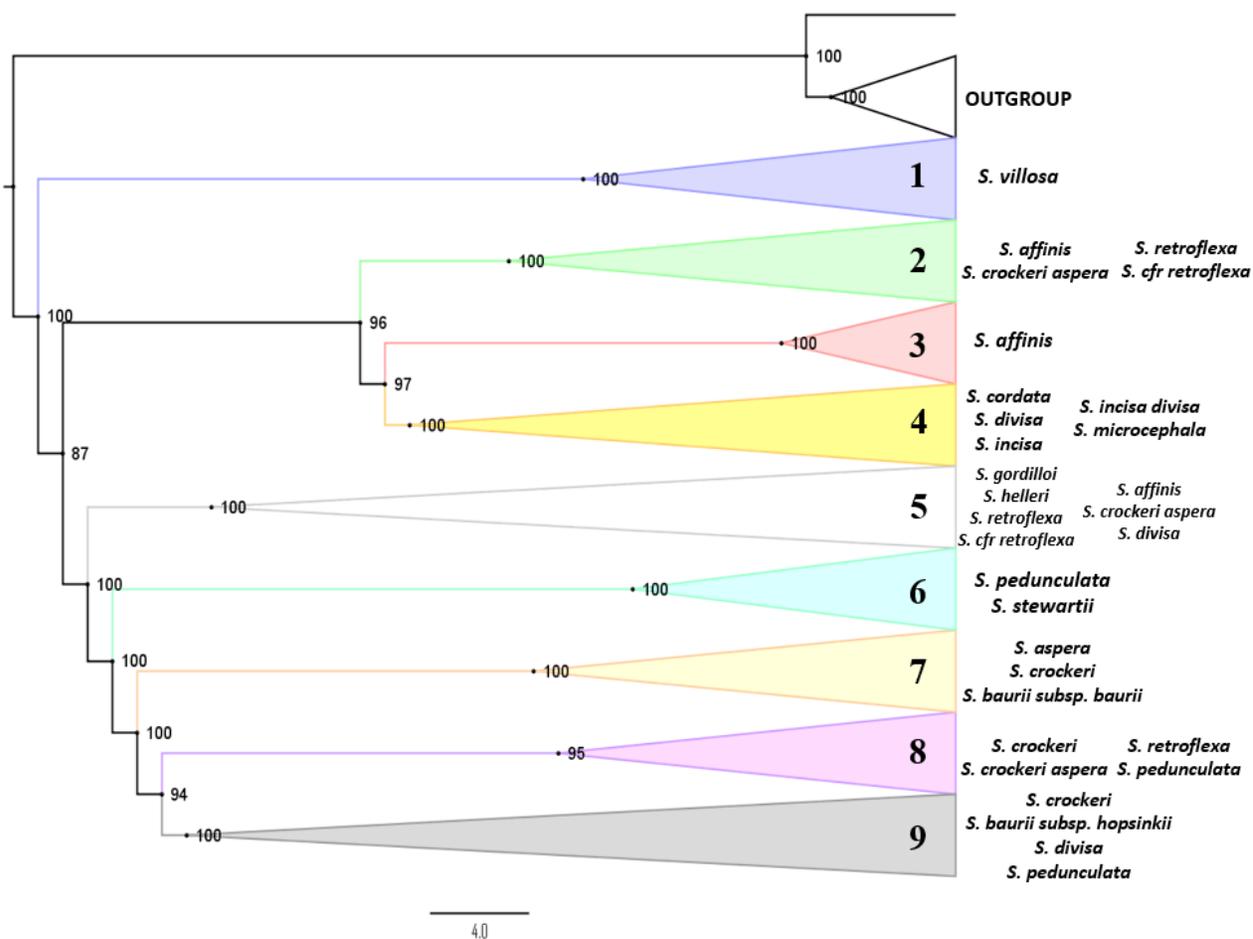


Tabla 2

Distribución de las especies del género Scalesia de acuerdo a los clados del árbol filogenético

Clado	Especie	Localidad	N° especímenes	Población
1	<i>S. villosa</i>	Champion	9	HAMP24
1	<i>S. villosa</i>	Floreana	9	HAMP28
2	<i>S. affinis</i>	Santa Cruz	4	HAMP10, HAMP4
2	<i>S. affinis</i>	Floreana	8	HAMP 29
2	<i>S. cfr retroflexa</i>	Santa Cruz	1	HALM41
2	<i>S. crockeri aspera</i>	Santa Cruz	14	HALM8, HAMP7
2	<i>S. retroflexa</i>	Santa Cruz	2	LAM26
3	<i>S. affinis</i>	Isabela Sur	9	HALM48
4	<i>S. cordata</i>	Isabela Sur	20	HALM53, HALM44
4	<i>S. divisa</i>	San Cristóbal	5	HALM12
4	<i>S. incida divisa</i>	San Cristóbal	9	HALM23
4	<i>S. incisa</i>	San Cristóbal	18	HAMP40, HALM20
4	<i>S. microcephala</i>	Isabela	9	HALM51
5	<i>S. affinis</i>	Floreana	1	HAMP29
5	<i>S. affinis</i>	Santa Cruz	1	HAMP10
5	<i>S. cfr retroflexa</i>	Santa Cruz	8	HALM41
5	<i>S. crockeri aspera</i>	Santa Cruz	4	HALM8
5	<i>S. divisa</i>	San Cristóbal	10	HALM19
5	<i>S. gordilloi</i>	San Cristóbal	10	HAMP38
5	<i>S. helleri</i>	Santa Cruz	10	HALM62
5	<i>S. helleri</i>	Santa Fe	10	HALM65

Clado	Especie	Localidad	N° especímenes	Población
5	<i>S. retroflexa</i>	Santa Cruz	10	HALM26
6	<i>S. pedunculata</i>	Santiago	10	HALM32
6	<i>S. stewartii</i>	Bartolomé	8	HALM35
6	<i>S. stewartii</i>	Santiago	10	HALM36
7	<i>S. aspera</i>	Edén	10	HALM37
7	<i>S. aspera</i>	Santa Cruz	10	HALM64
7	<i>S. baurii</i> subsp. <i>baurii</i>	Pinzón	10	AHA6
7	<i>S. crockeri</i>	Santa Cruz	1	HALM39
8	<i>S. crockeri</i>	Santa Cruz	16	HALM39, HAMP5
8	<i>S. crockeri aspera</i>	Santa Cruz	2	HALM8
8	<i>S. pedunculata</i>	Santa Cruz	9	HALM25
8	<i>S. retroflexa</i>	Santa Cruz	8	LAM26
9	<i>S. baurii</i> subsp. <i>hopkinsii</i>	Pinta	20	SLAM27, SLAM20
9	<i>S. crockeri</i>	Santa Cruz	1	HALM39
9	<i>S. divisa</i>	San Cristóbal	14	HALM11, HALM12
9	<i>S. pedunculata</i>	Santa Cruz	1	HALM25
9	<i>S. pedunculata</i>	San Cristóbal	7	HAMP36
9	<i>S. pedunculata</i>	Floreana	10	HAMP30

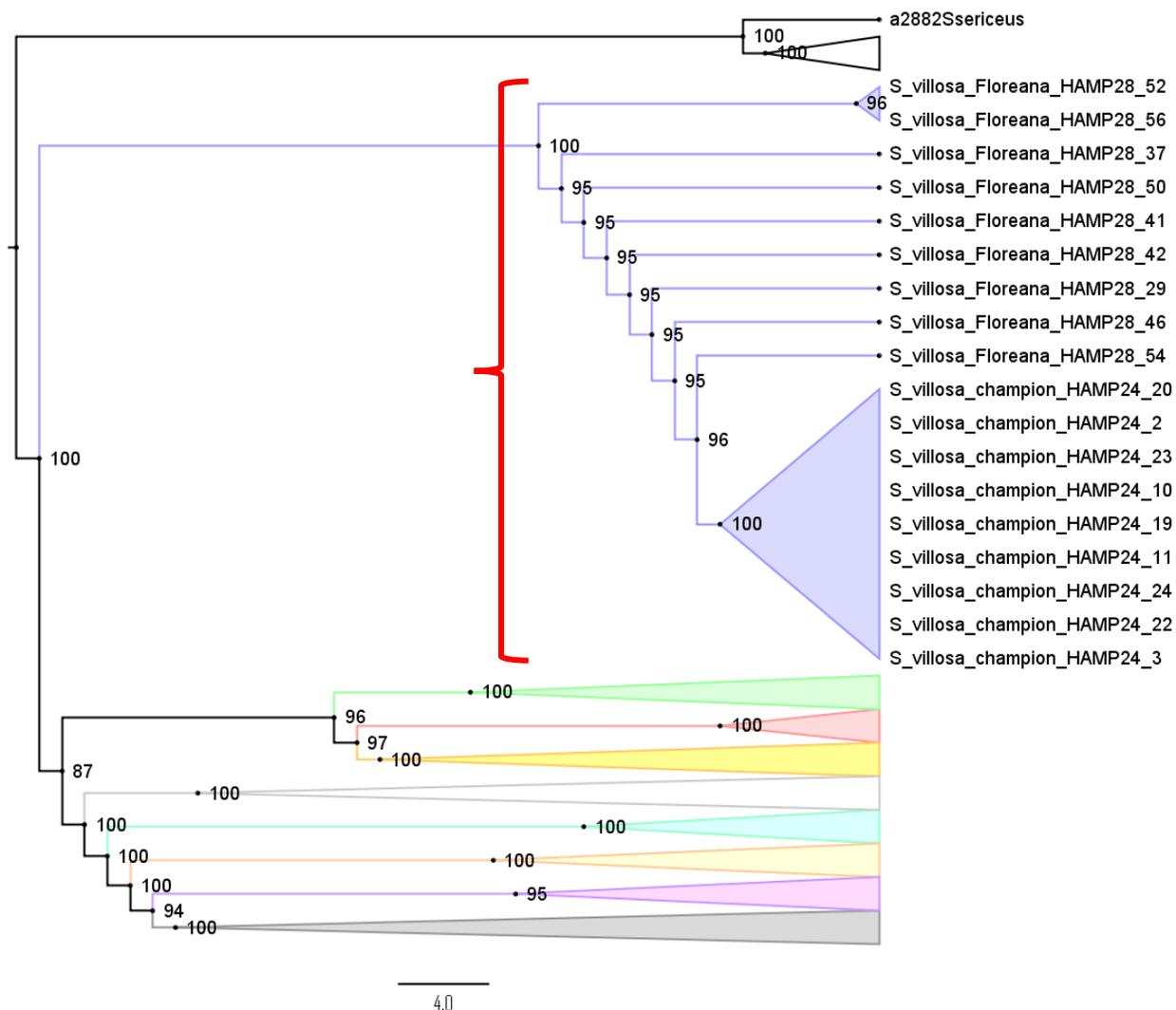
Para una mejor interpretación de la distribución de las poblaciones de *Scalesia* en la filogenia del genoma del cloroplasto, se realizó el análisis de cada uno de los clados de forma independiente. Es así que, el primer clado se conformó por individuos pertenecientes a la especie de *S. villosa* y se diferenció del resto con un valor de soporte del nodo de 100% *Bootstrap* (Figura 5). Sin embargo, se evidenció una divergencia genética entre la población del

islote Champion aldaño a Floreana, frente a la población propia de la isla, lo cual sugiere que se dieron una serie de polimorfismos durante el establecimiento de *S. villosa* en el islote Champion, hasta llegar a ser lo suficiente diferenciables como para ser agrupados en el subclado que se puede interpretar como el más actual en términos evolutivos.

El análisis de las distancias genéticas intraespecíficas entre los individuos HAMP 28_52 y HAMP 28_56 que conformaron el primer subclado es de 0,00%, entendiéndose que se trata de individuos genéticamente idénticos en el genoma del cloroplasto. Al comparar la distancia genética del individuo HAMP 28_52 con el resto, se observó que los individuos de Floreana poseen una distancia genética menor a la de los individuos de Champion. Los individuos de Champion distan de HAMP 28_52 en valores muy similares ($\sim 0,0000604\%$), y la distancia entre todos los que conforman el subclado del islote es de 0,00% por lo cual, se los puede definir como individuos idénticos genéticamente. Cabe recalcar que, en general, las distancias genéticas son muy pequeñas entre sí.

Figura 5

Primer clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4



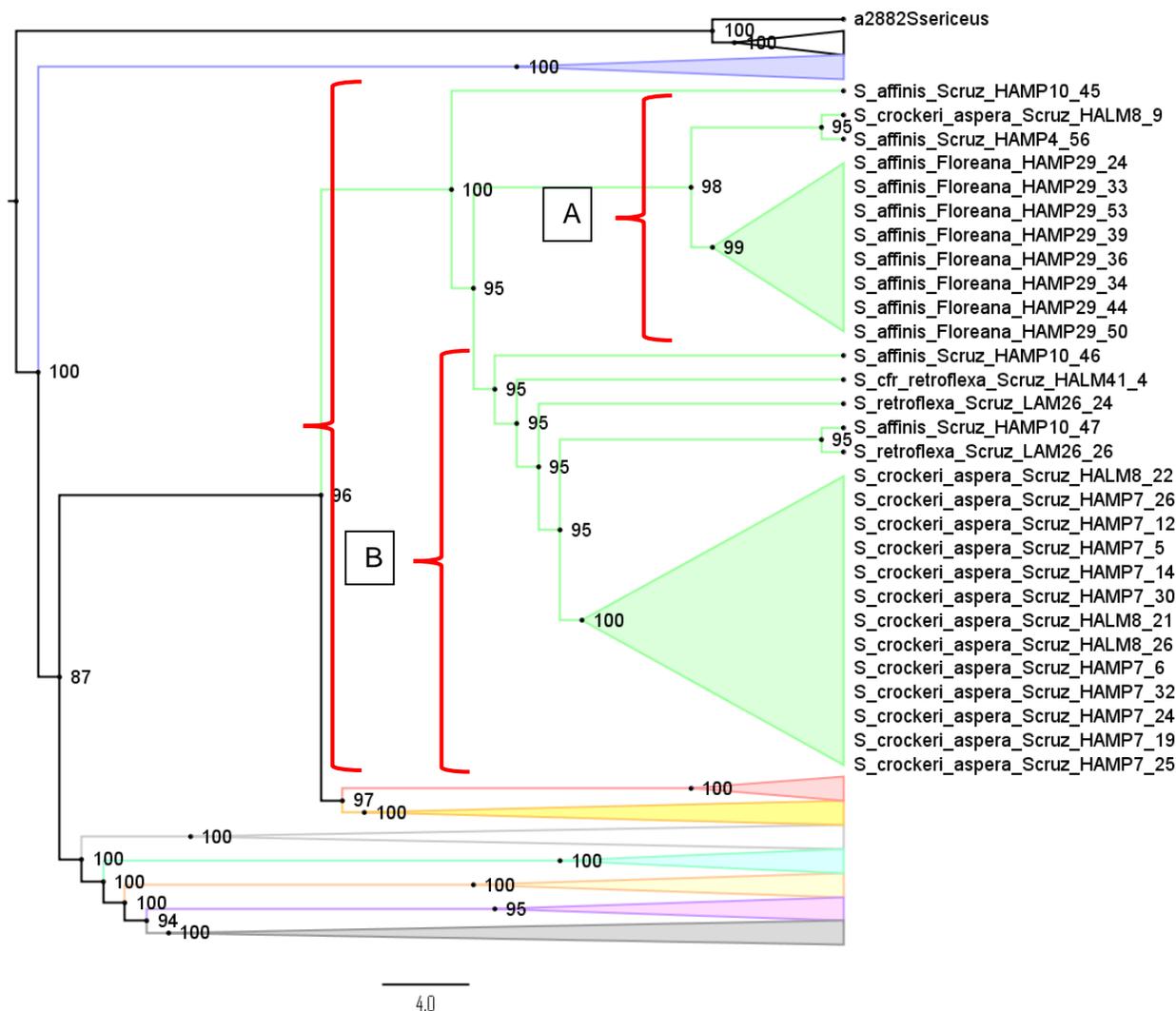
Luego, el segundo clado surgió como un subclado del árbol filogenético general con un valor de soporte de 96% *Bootstrap* (Figura 6). El valor de soporte del nodo con individuos de *S. affinis*, *S. crockeri aspera* (posible híbrido entre *S. crockeri* y *S. aspera* de acuerdo a los botánicos de la UCPH), *S. cfr retroflexa* (cfr se refiere a que la muestra se identificó como *S. retroflexa* en el campo, pero no se pudo comprobar con base a morfología), y *S. retroflexa* de las localidades de Santa Cruz y Floreana tiene *Bootstrap* de 100%. Se pudo evidenciar que el

clado empieza diferenciándose entre el individuo HAMP 10_45 (*S. affinis*, Santa Cruz), del resto (28 individuos), con un valor de soporte Bootstrap de 100%. Luego, se conformó un subclado (A) que incluyó dos agrupamientos, uno compuesto por *S. crockeri aspera* y *S. affinis* de Santa Cruz y otro de *S. affinis* de Floreana. La diferenciación de estos dos grupos dentro del subclado tuvo un valor de soporte Bootstrap de 98%. Sin embargo, las distancias genéticas del subclado frente al individuo de referencia HAMP 10_45 no se mostraron muy pronunciadas al comparar los especímenes pertenecientes a Santa Cruz, con los pertenecientes a Floreana, pese a que se trató de especies de localidades diferentes o de especies diferentes (para el caso de HALM 8_9). Únicamente el individuo HAMP 29_50 presentó una distancia genética más pronunciada (~0,0001964958%), de los seleccionados al azar para un mejor análisis.

En el subclado B se observó que el individuo HAMP 10_46 (*S. affinis*, Santa Cruz), se muestra como el individuo origen, del cual se diferenciaron el resto de especímenes. Además, se tuvo a HALM 41_4 (*S. cfr retroflexa*, Santa Cruz) y LAM 26_24 (*S. retroflexa*, Santa Cruz) como dos especímenes intermedios previo a la diferenciación del subclado compuesto por *S. crockeri aspera* de Santa Cruz, el cual comparte posición con el subclado conformado por el individuo HAMP 10_47 (*S. affinis*, Santa Cruz) y el individuo LAM 26_26 (*S. retroflexa*, Santa Cruz). Se evidenció que los individuos de *S. affinis* de Santa Cruz, tuvieron un comportamiento polifilético, al aparecer en tres puntos diferentes del segundo clado.

Figura 6

Segundo clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4. Se encuentra dividido en subclado A y subclado B

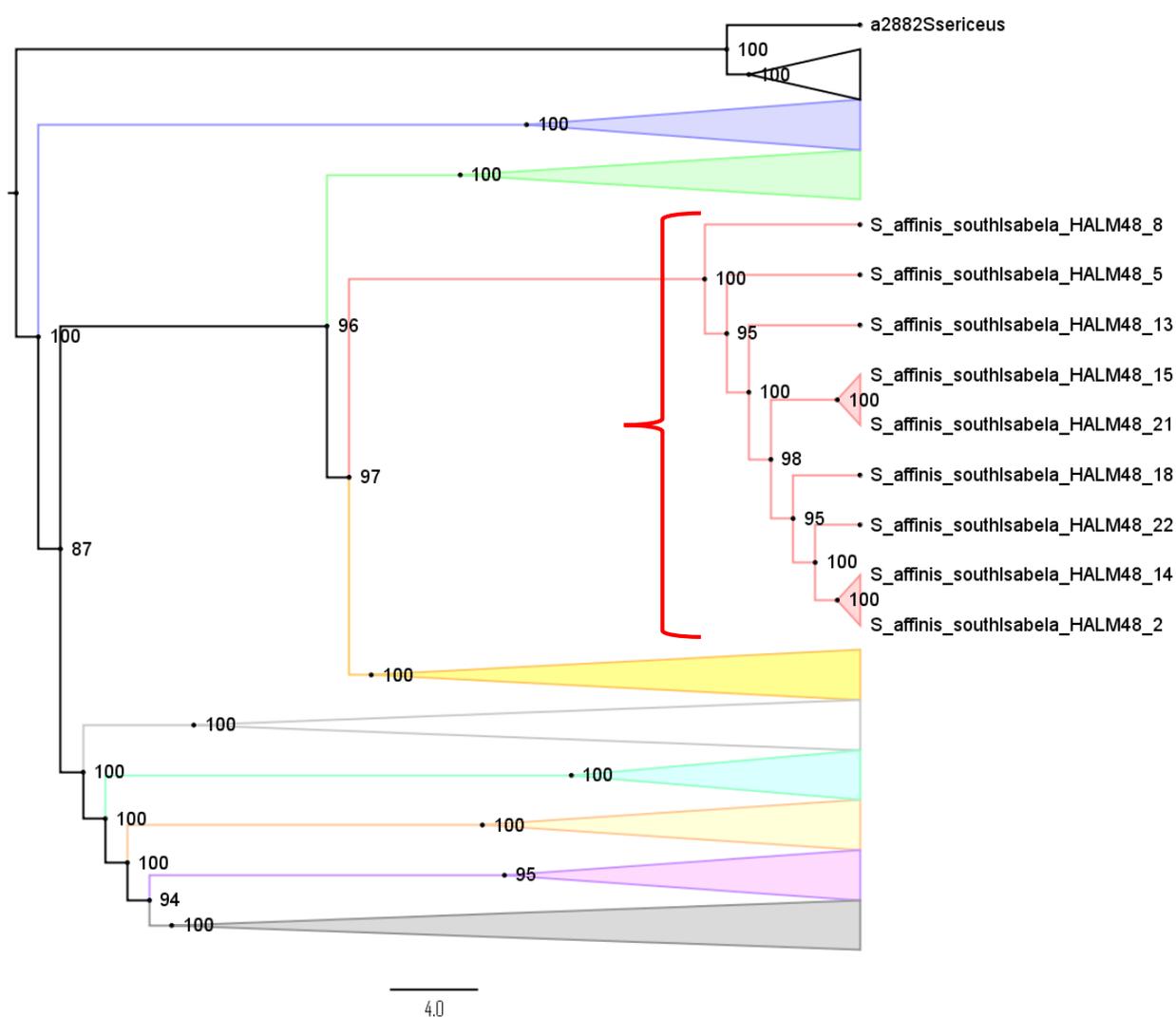


El tercer clado, al igual que el primero, se agrupó en su totalidad por únicamente una sola especie, en este caso, *S. affinis* del sur la isla Isabela (Figura 7). El valor de soporte del nodo que inicia el clado es del 100% *Bootstrap*. Los individuos se dispusieron en forma de racimo (dentro del clado), lo cual sugiere que se presentaron polimorfismos dentro de su estructura genética (ADN de cloroplasto). La distancia genética entre los individuos HALM

48_15 y HALM 48_21 fue de 0,00%; siendo este valor el mismo para los individuos HALM 48_14 y HALM 48_2, lo cual sugiere que son individuos con un genoma del cloroplasto casi idéntico.

Figura 7

Tercer clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4

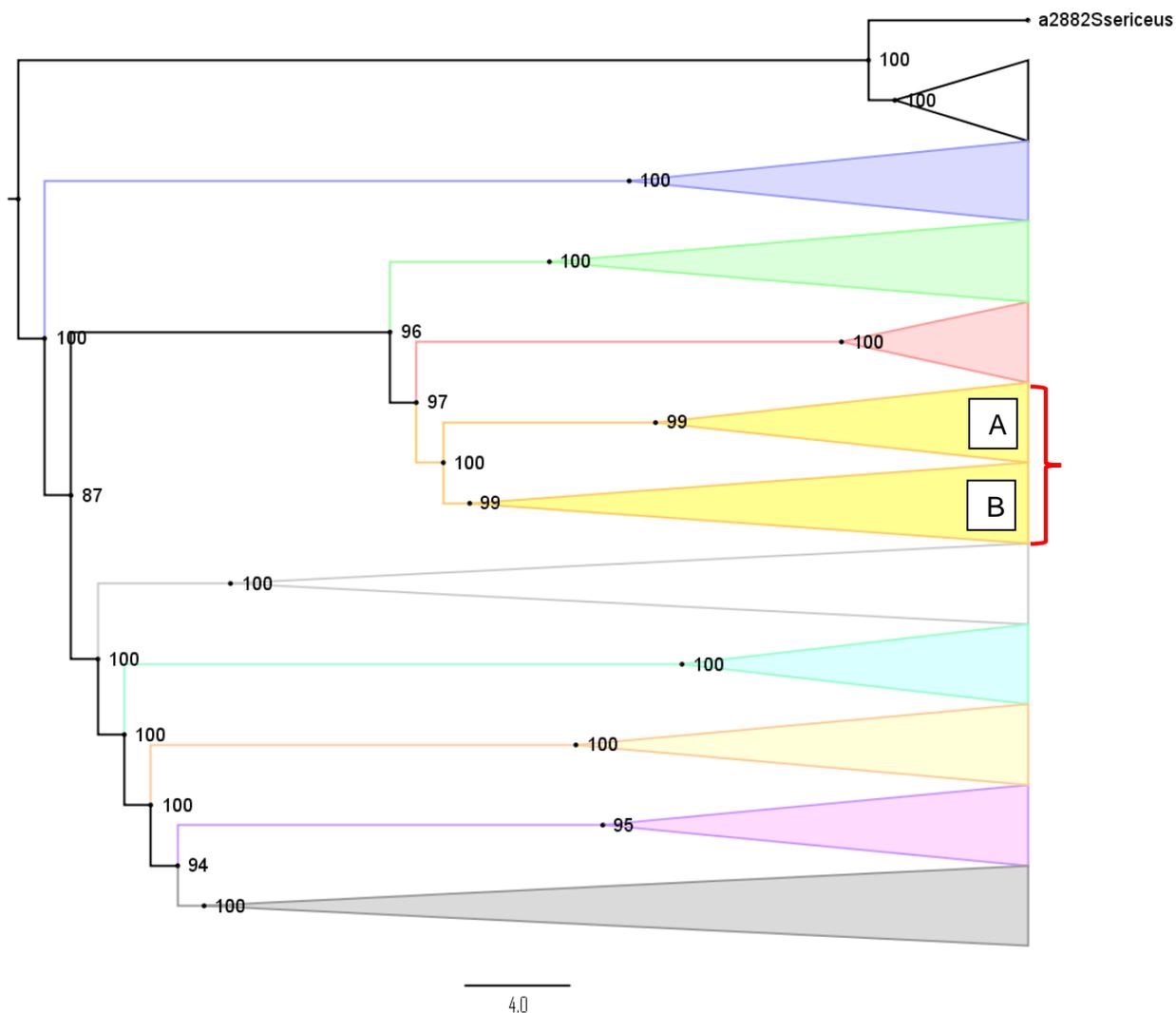


El cuarto clado tuvo un valor de soporte de 100% *Bootstrap* y se lo dividió en A y B para un mejor análisis (Figura 8). El clado A contiene a las especies *S. cordata* y *S. microcephala* de

la isla Isabela (Figura 9), mientras que el B contiene a las especies *S. divisa*, *S. incisa* y a los especímenes híbridos *S. incisa divisa* de la isla San Cristóbal (Figura 10).

Figura 8

Cuarto clado del árbol filogenético presentado en la Figura 4. Se encuentra dividido en dos subclados, A y B, para un mejor análisis

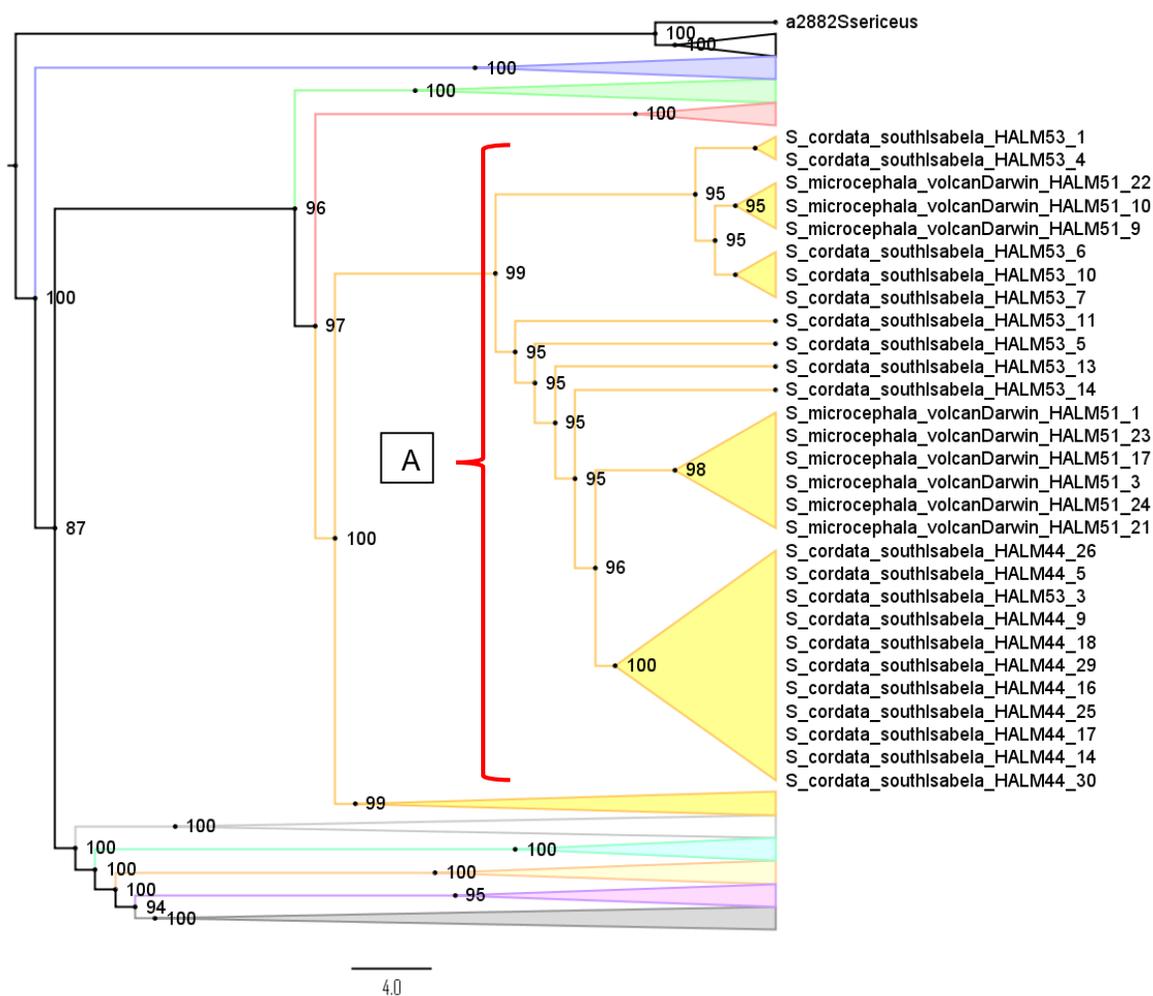


La primera diferenciación dentro del subclado A presentó un valor de soporte de 99% *Bootstrap*, obteniendo dos ramas principales del árbol filogenético (Figura 9). La primera rama

del árbol se subdividió en tres clados en los cuales se agruparon *S. cordata*, *S. microcephala* y *S. cordata* nuevamente (en ese orden). Luego, en la segunda rama del árbol se evidenciaron cuatro eventos de diferenciación con un valor de soporte del 95% *Bootstrap* de cuatro individuos de *S. cordata*, que dieron paso a una nueva ramificación importante (96% *Bootstrap*) con dos nuevos clados: 1) *S. microcephala* del volcán Darwin (98% *Bootstrap*), y 2) *S. cordata* del sur de Isabela (100% *Bootstrap*). Por lo cual se apreció que tanto *S. cordata* como *S. microcephala* se comportaron como especies polifiléticas dentro del subclado A.

Figura 9

Análisis del subclado A, del cuarto clado del árbol filogenético

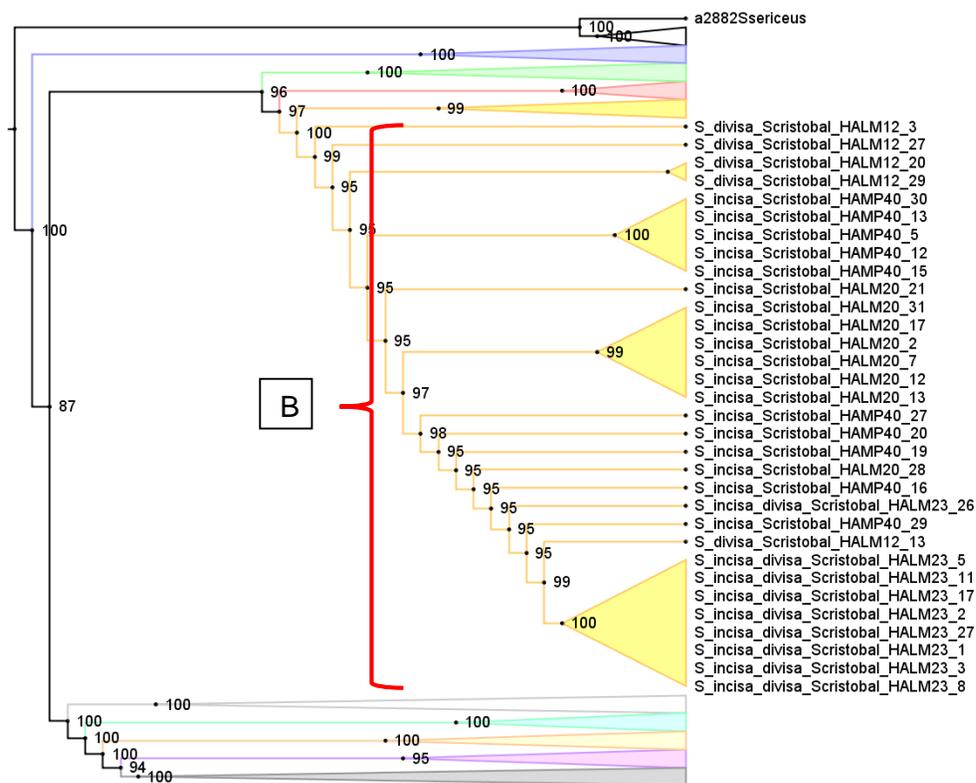


El segundo subclado se conformó por *S. divisa*, *S. incisa* y *S. incisa divisa* de la isla San Cristóbal (Figura 10). La primera diferenciación se dio entre el individuo HALM 12_3 (*S. divisa*, San Cristóbal) con un valor de soporte *Bootstrap* de 99% y los otros 32 especímenes que conformaron el subclado, obteniendo de este modo dos ramas en el árbol filogenético.

En el cuarto clado se apreció que el primer subclado estuvo conformado por individuos de la isla Isabela y el segundo subclado fue integrado por individuos de San Cristóbal. En ambos casos los especímenes presentaron comportamiento de especies polifiléticas, al encontrarse distribuidos en más de una rama del árbol filogenético. De igual manera con *S. divisa* del segundo subclado, ya que apareció en más de una ubicación a lo largo del clado.

Figura 10

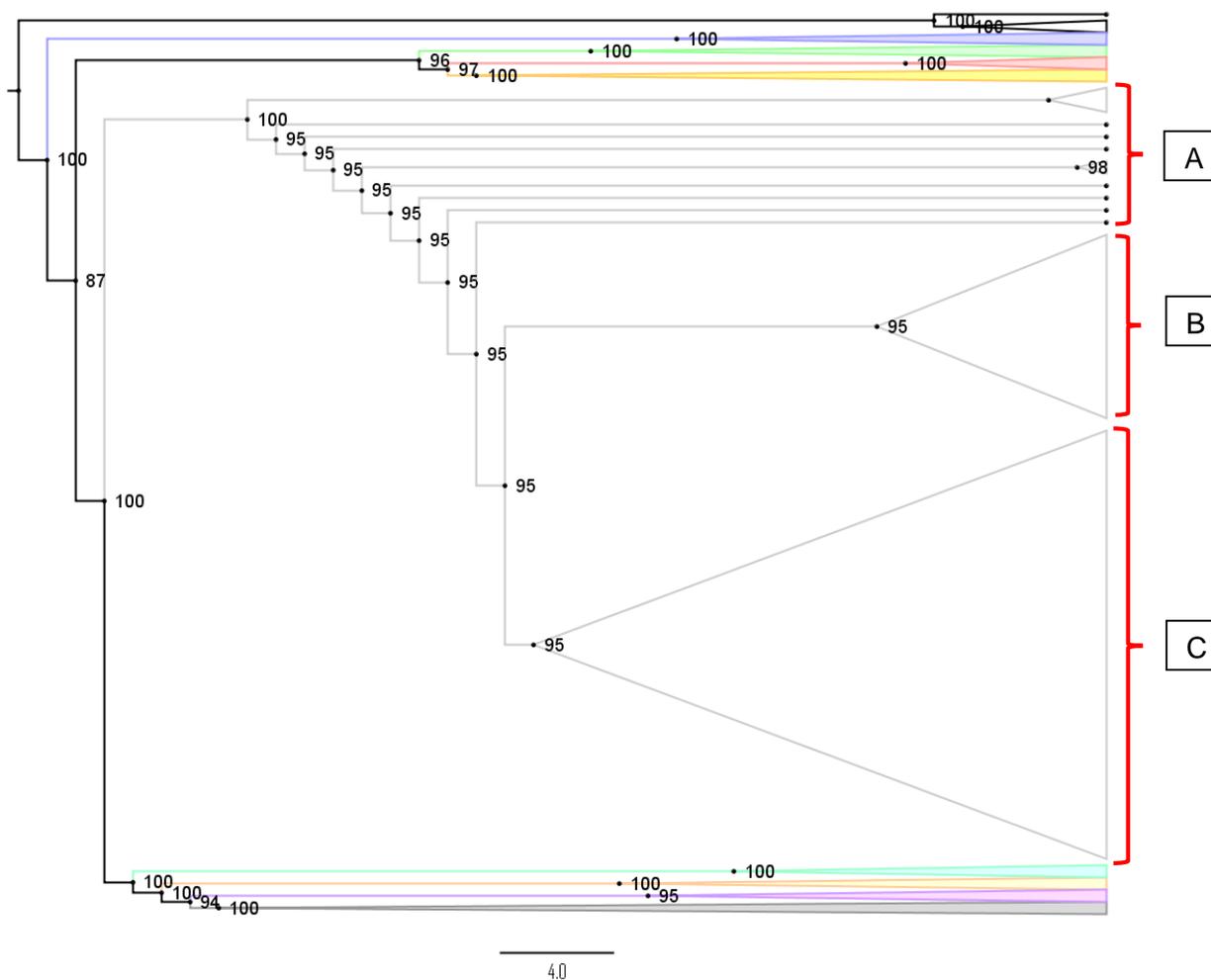
Análisis del subclado B, del cuarto clado del árbol filogenético



El quinto clado, albergó 64 especímenes de *S. affinis*, *S. helleri*, *S. retroflexa*, *S. crf retroflexa*, *S. divisa*, *S. crockeri aspera*, y *S. gordilloi* de las islas Floreana, Santa Cruz, Santa Fe, y San Cristóbal (Figura 11). Para un mejor análisis, se dividió el clado en tres secciones (A, B y C). Es así que, los clados B y C se diferenciaron al cabo de nueve nodos de la sección A, todos con un valor de soporte de 95% Bootstrap, exceptuando el primero de 100%.

Figura 11

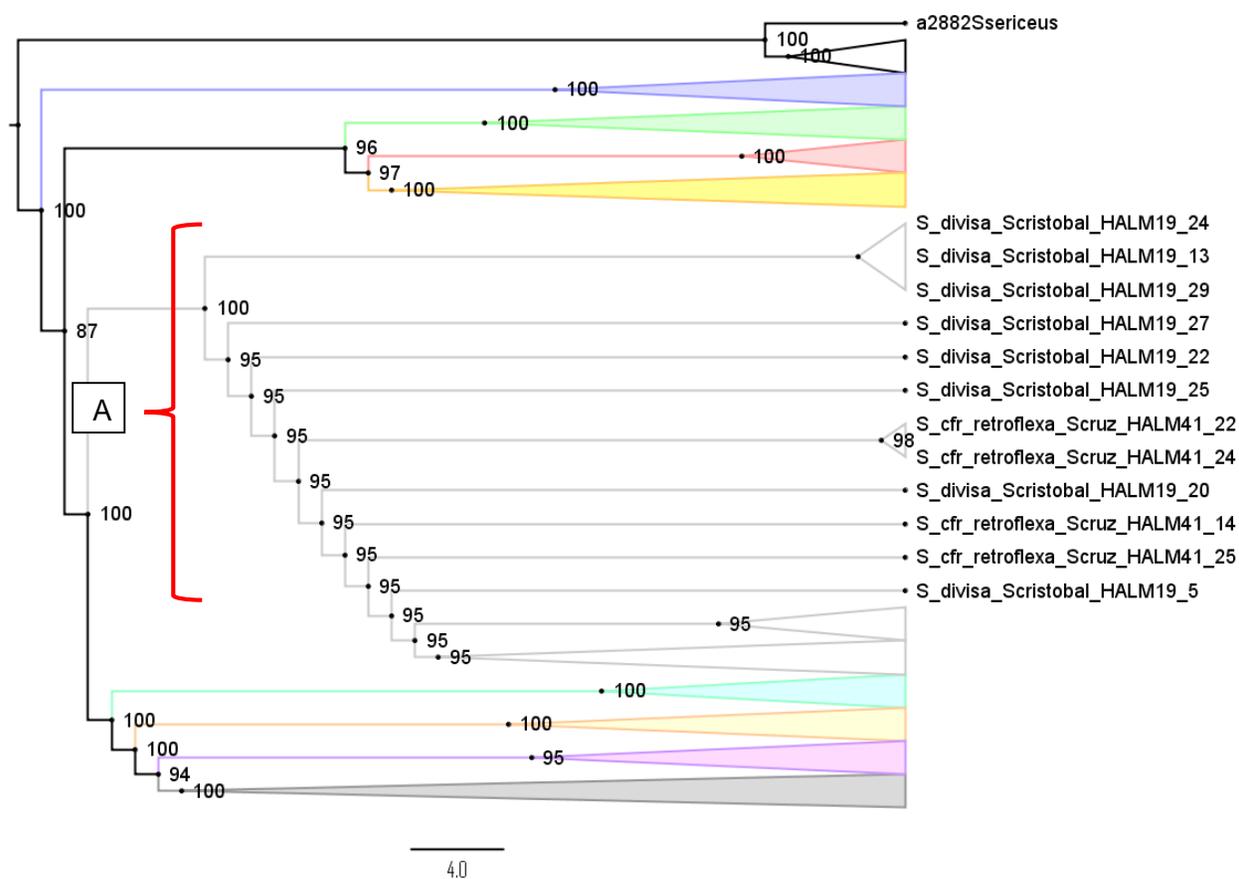
Quinto clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4. Se encuentra dividido en tres secciones: A, B, y C, para un mejor análisis. Las secciones B y C, representan a dos subclados



La sección A del quinto clado evidenció un comportamiento polifilético, ya que las especies que lo integraron, es decir, *S. divisa* y *S. cfr retroflexa* (Figura 12). Estas dos especies se repitieron de manera alternada en los clados B y C.

Figura 12

Análisis de la sección A del quinto clado del árbol filogenético



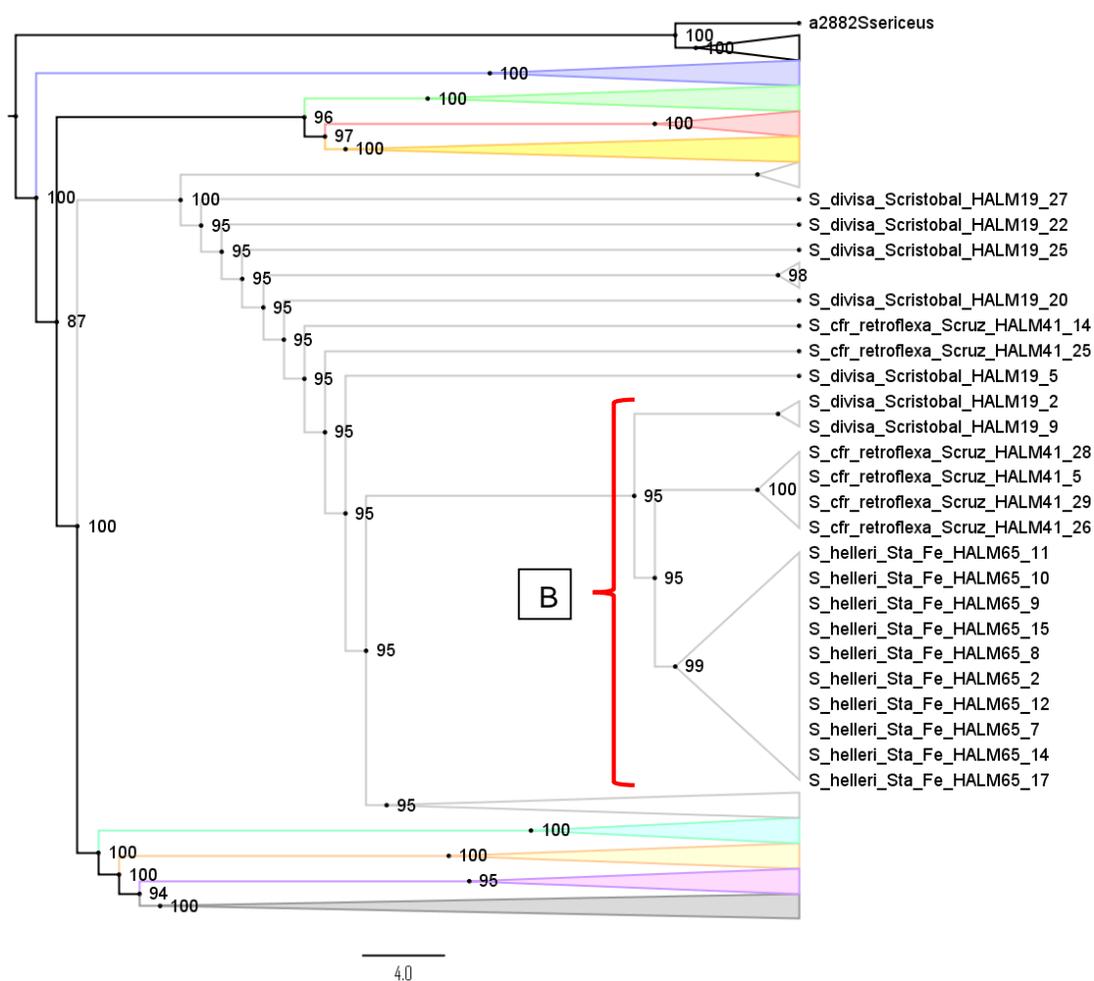
En la sección B del quinto clado del árbol filogenético se observaron tres subclados bien definidos, es decir, integrados por individuos de una misma especie, que inicia su diferenciación con un valor de soporte de 95% *Bootstrap* (Figura 13). Se obtuvieron dos ramas iniciales. De la primera rama se obtuvo el primer subclado conformado por individuos de *S. divisa* de la isla San Cristóbal. Luego, en la segunda rama se dio un nuevo evento de

diferenciación con un valor de soporte de 95% *Bootstrap*, del cual se originaron los dos subclados restantes. Estos se conformaron por individuos de *S. cfr retroflexa* de la isla Santa Cruz y *S. helleri* de la isla Santa Fe, con un valor de soporte de 100% y 99% *Bootstrap*, respectivamente.

Se apreció que *S. divisa* y *S. cfr retroflexa* estuvieron presentes tanto en la sección A, como en la B, del quinto clado del árbol filogenético, por lo cual se pudo evidenciar un comportamiento polifilético.

Figura 13

Análisis de la sección B del quinto clado del árbol filogenético



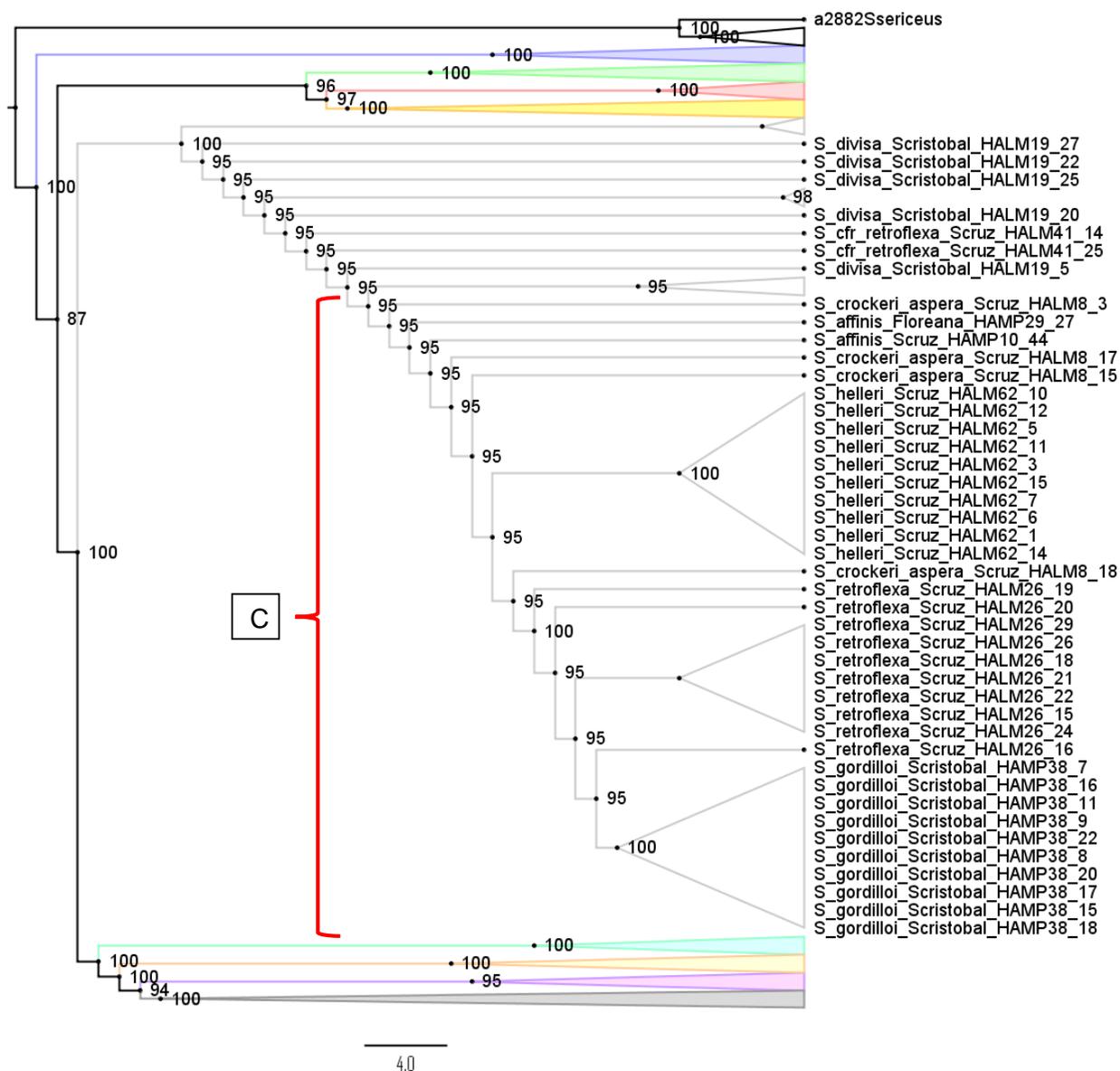
La sección C del quinto clado se constituyó como subclado con un valor de soporte de 95% *Bootstrap*, en el cual se encontraron la mayor cantidad de individuos (36) (Figura 14). Se evidenciaron especímenes de *S. crockeri aspera*, *S. affinis*, *S. helleri*, *S. retroflexa*, y *S. gordilloi*. El clado inició con una diferenciación que separó al individuo HALM 8_3 (*S. crockeri aspera*, Santa Cruz), del resto de grupo. Luego se dieron dos eventos consecutivos con un valor de soporte de 95% *Bootstrap*, cada uno, que colocó tanto a HAMP 29_27 (*S. affinis*, Floreana) y a HAMP 10_44 (*S. affinis*, Santa Cruz), en dos nuevas ramas. Luego, de la rama homóloga de HAMP 10_44 se obtuvieron en dos nuevos nodos a dos individuos de *S. crockeri aspera*, de manera independiente. Del segundo nodo, se obtuvo dos nuevas ramas con valor de soporte de 95% *Bootstrap*. La primera agrupó en un gran clado a los individuos de *S. helleri* de la isla Santa Cruz, mientras que la segunda se continuó subdividiendo.

Las subdivisiones de la última rama de la sección C, empezaron con *S. crockeri aspera*, nuevamente, seguidas por dos subdivisiones de *S. retroflexa* con 95% y 100% de valor de soporte *Bootstrap*, para conformar dos nuevas ramas del árbol (95% *Bootstrap*). La primera rama agrupó a siete individuos de *S. retroflexa* de Santa Cruz, mientras que la segunda se subdividió en un individuo de *S. retroflexa* de Santa Cruz (HALM 26_16, 95% *Bootstrap*) y un gran subclado conformado únicamente por individuos de *S. gordilloi* con un valor de soporte de 100%.

Cabe mencionar que, *S. gordilloi* fue la última especie en diferenciarse o especiarse dentro del quinto clado, partiendo de *S. retroflexa* de Santa Cruz. Todas las especies del clado tuvieron como ancestro común *S. divisa* de San Cristóbal y *S. cfr retroflexa* de Santa Cruz, por lo cual se evidenció un flujo de genes entre islas para los procesos de especiación.

Figura 14

Análisis de la sección C del quinto clado del árbol filogenético

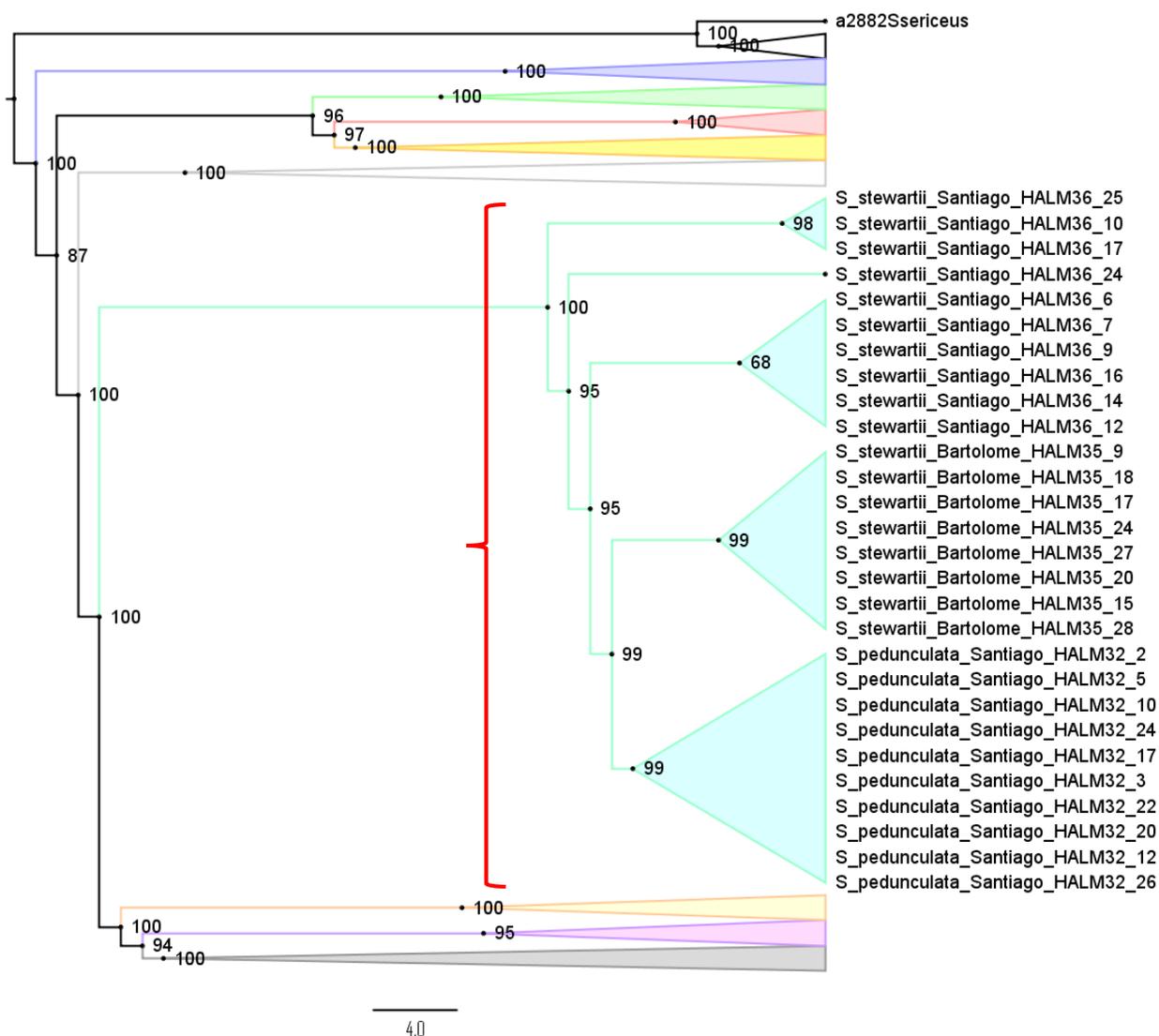


El sexto clado presentó un valor de soporte del nodo de 100% *Bootstrap* (Figura 15). Se conformó por *S. stewartii* de las islas Santiago y Bartolomé, y *S. pedunculata* de la isla Santiago. Al analizar la filogenia del sexto clado se observó que el primer nodo separó a parte

de los individuos de *S. stewartii* de Santiago de los demás individuos de *S. stewartii* de Santiago y Bartolomé, por lo cual se evidenció un comportamiento polifilético.

Figura 15

Sexto clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4



En el séptimo clado se agruparon tres especies del género *Scalesia* (*S. baurii*, *S. crockeri*, y *S. aspera*), de las localidades Pinzón, Edén, y Santa Cruz, con un valor de soporte de

100% *Bootstrap* (Figura 16). Se obtuvieron tres subclados importantes de individuos que sugieren que *S. aspera* podría haber evolucionado en especie a partir de *S. baurii* de Pinzón.

El subclado A correspondió a *S. baurii* subsp. *baurii* de la isla Pinzón con un valor de soporte de 100% *Bootstrap*. Al analizar las distancias genéticas entre los individuos de la especie, tomando como referencia al individuo AHA 6_27, se encontró que los valores distan entre el cero absoluto y 0,000007552%, lo cual sugiere que entre algunos ejemplares se puede distinguir pequeñas diferencias en cuanto a su código genético, evidenciando polimorfismos normales dentro de una misma especie.

Luego, se encontró al individuo HALM 39_16 de *S. crockeri* de Santa Cruz en solitario. Se evidenció que este individuo es el que da origen a los dos clados siguientes conformados por *S. aspera* de islote Edén y la isla Santa Cruz con un valor de soporte de 95% *Bootstrap*.

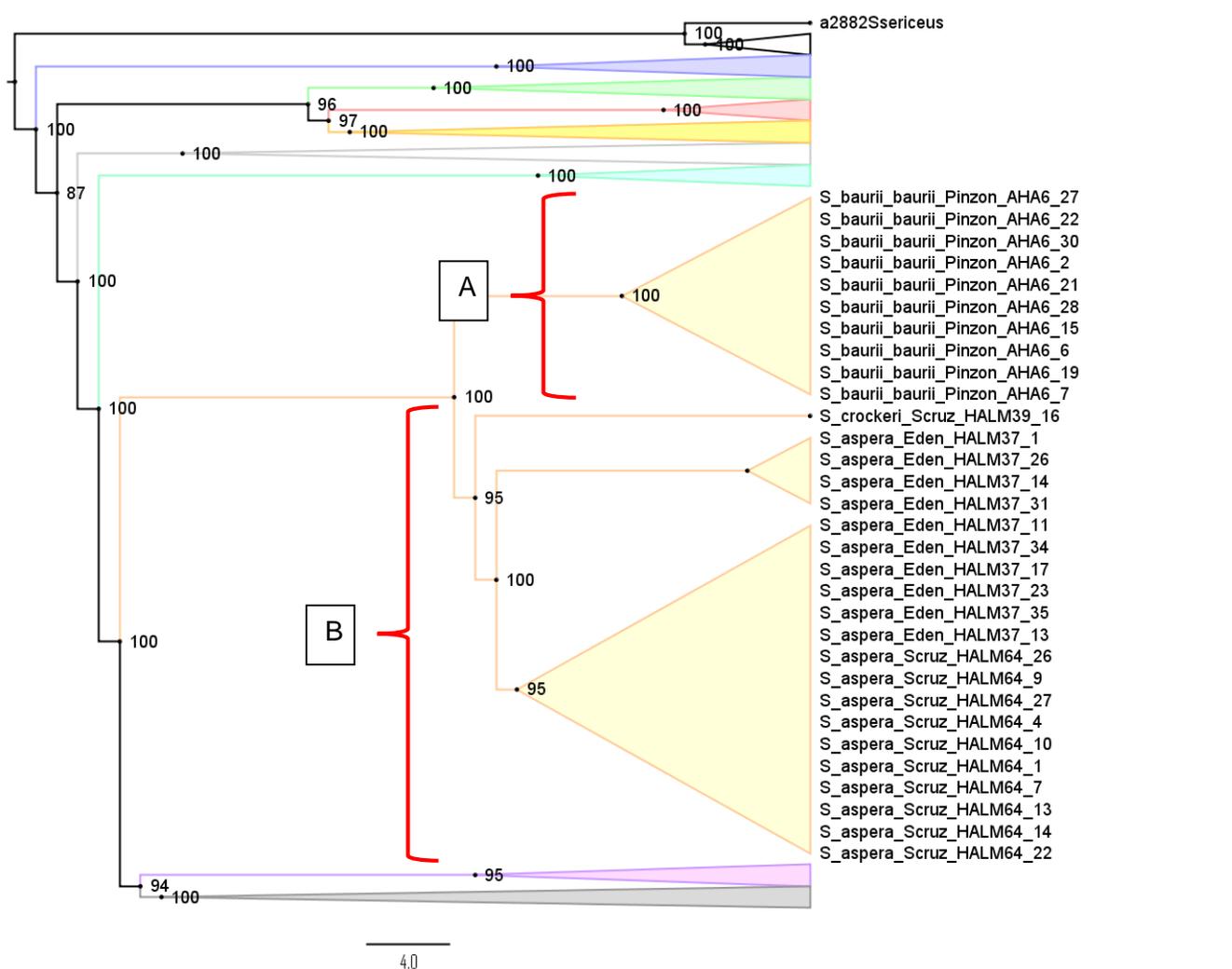
La sección B contó con dos subclados que partieron del individuo HALM 39_16 y se encontraron conformados por individuos de *S. aspera*. Estos dos subclados presentaron un valor de soporte *Bootstrap* para diferenciarse de 100%. El primer subclado de *S. aspera* incluyó cuatro individuos pertenecientes al islote Edén (aledaño a la isla Santa Cruz); mientras que el segundo subclado se vio conformado de individuos pertenecientes al islote Edén y a la isla Santa Cruz. Al analizar las distancias genéticas entre todos los individuos de *S. aspera* de ambos subclados tomando como referencia al individuo HALM 37_1 (*S. aspera*, Edén), se puede evidenciar que entre todos los individuos pertenecientes al islote Edén (sin distinción del subclado) las distancias genéticas fueron de cero absoluto (0,00%), mientras que las distancias respecto a todos los individuos de Santa Cruz fueron de aproximadamente 0,000007551%. Esto sugiere que hay diferencias mínimas respecto a la composición genética de los individuos de la especie. Los individuos del *S. aspera* de Edén se muestran

genéticamente idénticos, por lo tanto, se puede inferir que la población esté perdiendo variabilidad genética y con ello llegando a un cuello de botella.

El hecho que seis individuos de *S. aspera* de Edén se encuentren en el subclado conformado mayoritariamente por individuos de Santa Cruz puede evidenciar que se ha dado un flujo de genes entre las dos poblaciones, que no se percibe en las distancias genéticas del genoma del cloroplasto, pero que podría evidenciarse en estudios más a fondo.

Figura 16

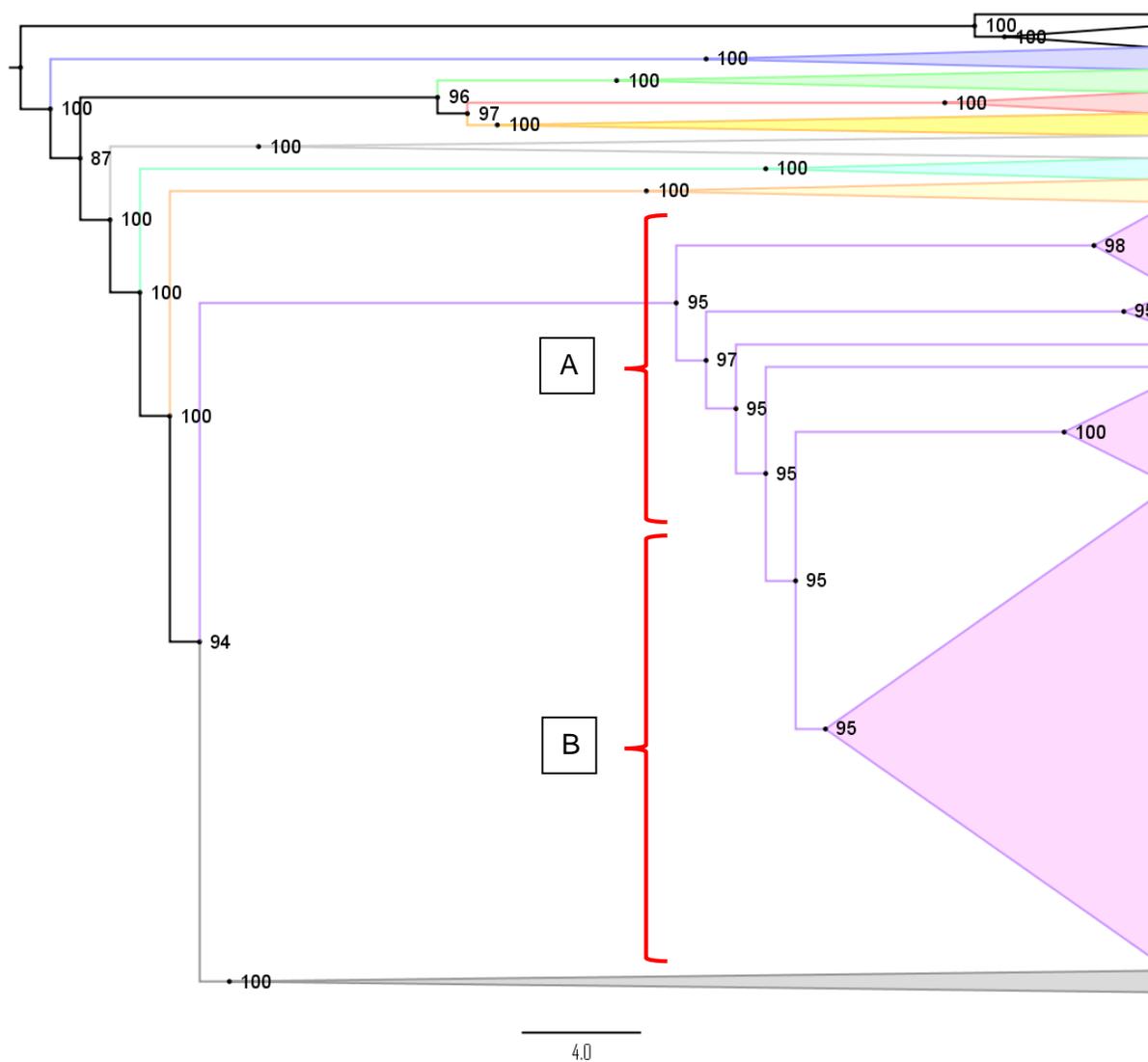
Séptimo clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4



El octavo clado surgió de la ramificación del último nodo del árbol filogenético general, y presentó un valor de soporte de 94% *Bootstrap* (Figura 17). Los 35 individuos agrupados dentro del clado fueron especímenes de *S. crockeri*, *S. aspera*, *S. retroflexa* y *S. pedunculata*, todos de la isla Santa Cruz. Para un mejor análisis se dividió el clado en dos secciones (A y B).

Figura 17

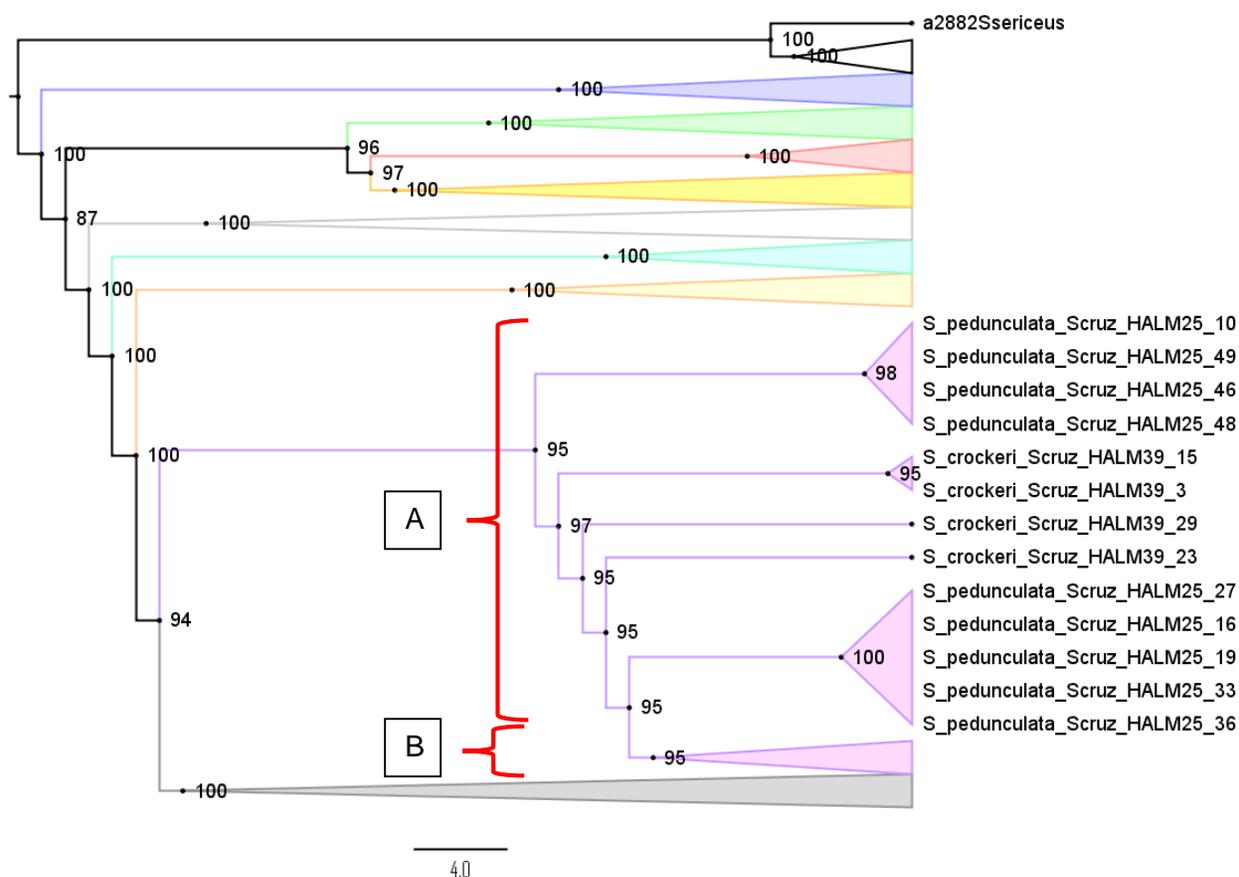
Octavo clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4



La sección A del árbol filogenético obtuvo un valor de soporte de 95% *Bootstrap* y albergó a las especies *S. pedunculata* y *S. crockeri* de la isla Santa Cruz (Figura 18), las cuales evidenciaron un comportamiento filogenético tanto en la sección A como en la sección B.

Figura 18

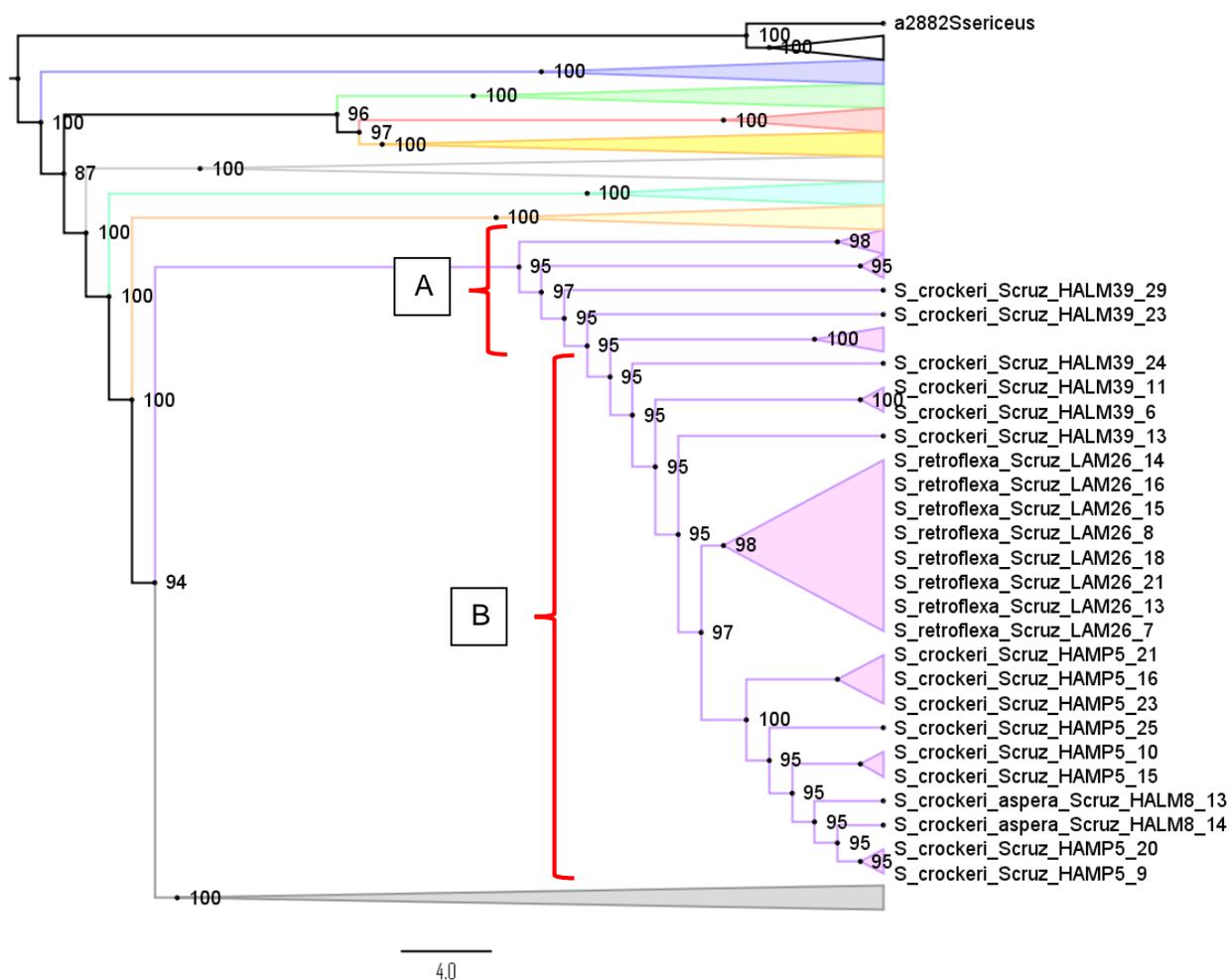
Análisis de la sección A del octavo clado del árbol filogenético



La sección B agrupó a 22 individuos en total e incluyó, además de las especies descritas en la sección A, a *S. retroflexa* y *S. crockeri aspera* (Figura 19). El comportamiento polifilético, se evidenció principalmente en la especie *S. crockeri*, ya que apareció tanto en la sección A, como en la B y se mezcló entre los clados de *S. pedunculata*, y entre los individuos de *S. retroflexa* y *S. crockeri aspera*.

Figura 19

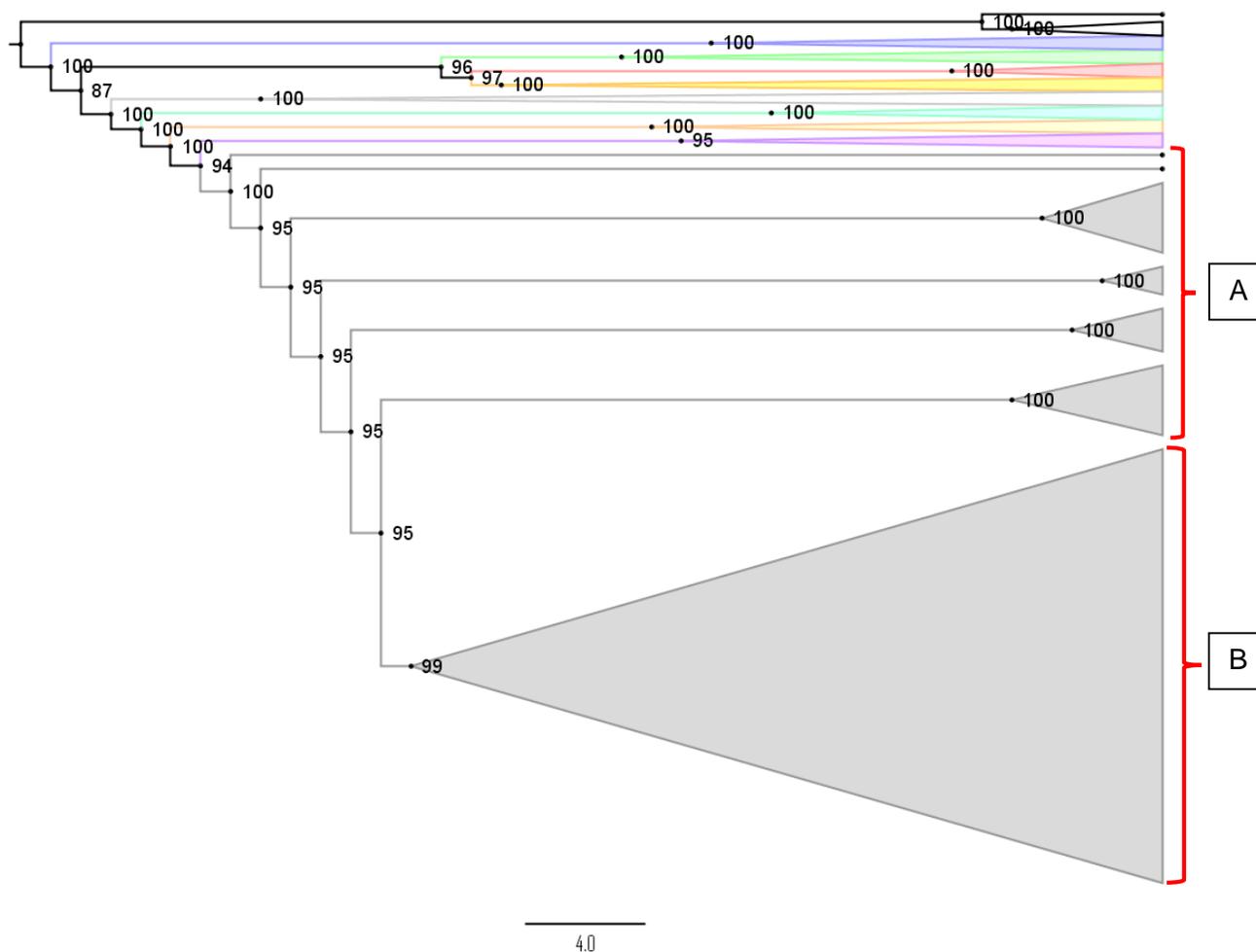
Análisis de la sección B del octavo clado del árbol filogenético



El noveno clado, con un valor de soporte de 94% *Bootstrap*, fue el último del árbol filogenético construido a partir de secuencias genómicas del cloroplasto del género *Scalesia* (Figura 20). Agrupó 53 especímenes de *S. divisa*, *S. pedunculata*, *S. baurii* subsp. *hopkinsii*, y *S. crockeri* de las islas Floreana, Santa Cruz, San Cristóbal y Pinta, con valor de soporte de 100% *Bootstrap*. El clado se dividió en dos secciones (A y B) para un mejor análisis.

Figura 20

Noveno clado sin colapsar del árbol filogenético presentado en la Figura 4

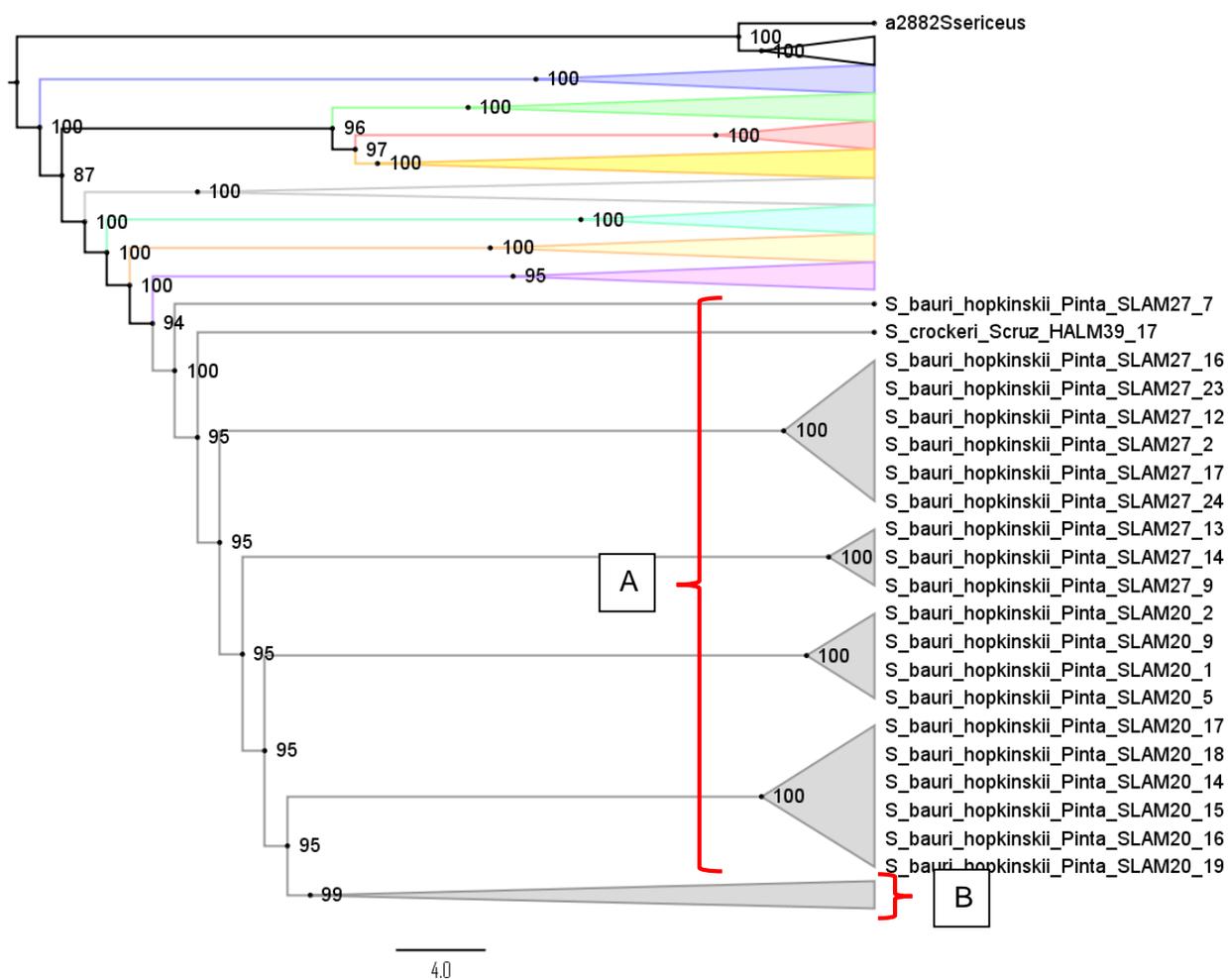


La sección A, albergó a las especies *S. baurii* subsp. *hopkinsii* de la isla Pinta y a *S. crockeri* de la isla Santa Cruz. *S. baurii* subsp. *hopkinsii* evidenció un comportamiento parafilético dentro de la sección, sin embargo, no integró ningún otro clado (Figura 21). Por el contrario, *S. crockeri* se presentó en el séptimo, octavo y noveno clado del árbol filogenético del genoma del cloroplasto, demostrando que, en efecto, es una especie polifilética.

La sección A, albergó a las especies *S. baurii* subsp. *hopkinsii* de la isla Pinta y a *S. crockeri* de la isla Santa Cruz. *S. baurii* subsp. *hopkinsii* de evidenció un comportamiento parafilético dentro de la sección, sin embargo, no integró ningún otro clado. Por el contrario, *S. crockeri* se presentó en el séptimo, octavo y noveno clado del árbol filogenético del genoma del cloroplasto, demostrando que, en efecto, es una especie polifilética.

Figura 21

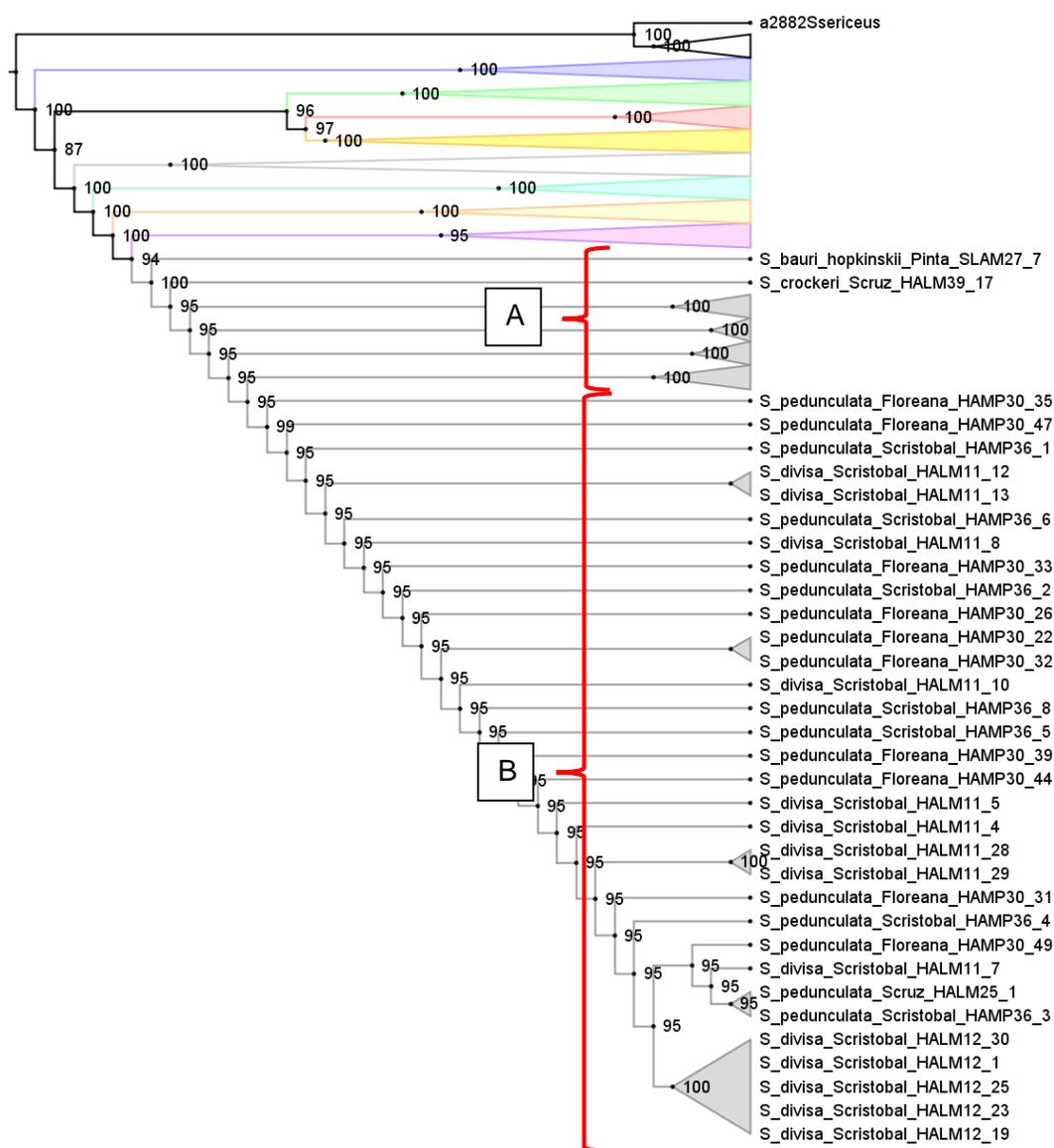
Análisis de la sección A del noveno clado del árbol filogenético



El valor de soporte del clado general de la sección B fue de 99% *Bootstrap*, e involucró a 32 especímenes de *Scalesia*, los cuales tuvieron un comportamiento polifilético. Fueron en total 18 individuos de *S. pedunculata* (10 de Floreana, 7 de San Cristóbal, y uno de Santa Cruz), y 14 de *S. divisa* de San Cristóbal (Figura 22).

Figura 22

Análisis de la sección A del noveno clado del árbol filogenético

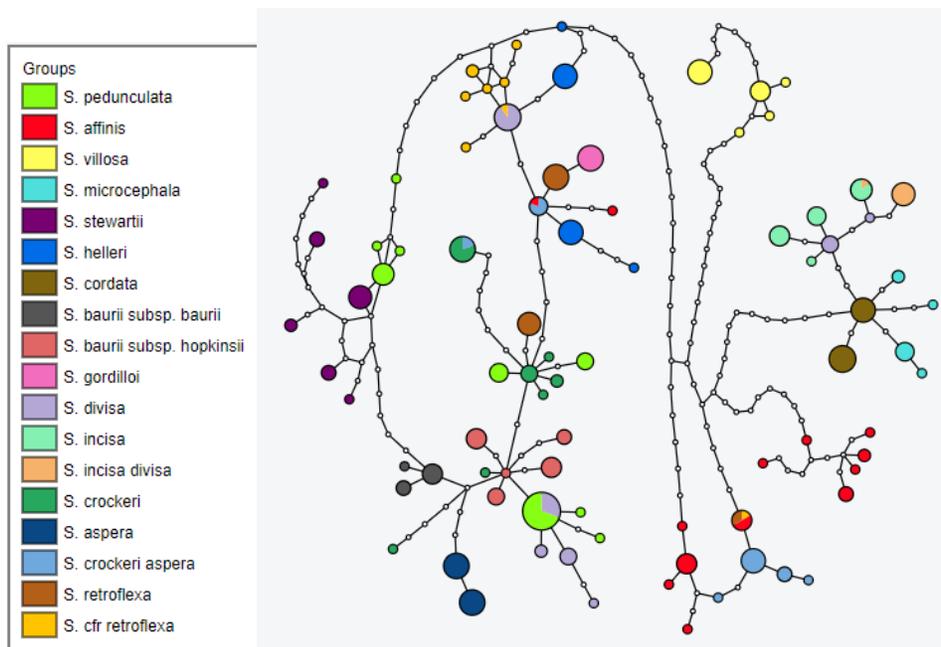


Red de haplotipos

Al analizar las 328 secuencias genómicas del género *Scalesia* de 36 localidades, se detectaron un total de 84 haplotipos (Figura 23). Se evidenció que existen haplotipos que se comparten entre especies, como es el caso de *S. pedunculata* con *S. divisa*; *S. crockeri aspera* con *S. affinis*; *S. divisa* con *S. cfr retroflexa*, *S. incisa* con *S. incisa divisa*; *S. affinis* con *S. retroflexa* y *S. cfr retroflexa*; y *S. crockeri* con *S. crockeri aspera*. Además, se observó que todas las especies presentaron más de un haplotipo, y que incluso algunas presentaron haplotipos en más de una región de la red, como fue el caso de *S. pedunculata*, *S. divisa*, *S. affinis*, *S. cfr retroflexa*, *S. helleri*, y *S. crockeri*. Para un mejor análisis de la red de haplotipos, se la dividió en nueve secciones.

Figura 23

Análisis de la red de haplotipos construida en base al alineamiento de los genomas de 328 especímenes de Scalesia de 36 localidades

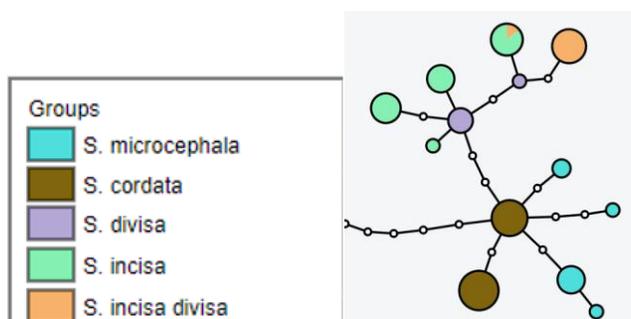


En la primera sección se evidenció dos haplotipos de *S. cordata* del sur de Isabela, los cuales se distanciaron entre sí en dos sustituciones. Luego, se encontró cuatro haplotipos de *S. microcephala* del volcán Darwin que se distanciaron hasta en tres sustituciones del haplotipo de *S. cordata* y, hasta en siete sustituciones respecto a haplotipos de la misma especie (Figura 24).

A la tercera sustitución del haplotipo central (*S. cordata*), se ubicó el primer haplotipo de *S. divisa* de la isla San Cristóbal, el cual se distanció en dos sustituciones de su homólogo de la misma especie. Los tres haplotipos de *S. incisa* surgieron del primer haplotipo de *S. divisa*, y se distanciaron en una o dos sustituciones. De igual manera, el haplotipo compartido entre *S. incisa* y *S. incisa divisa*, partió de *S. divisa*, y se diferenció en una sustitución; mientras que se diferenció en tres sustituciones del haplotipo de *S. incisa* no compartido. Se apreció que los haplotipos de *S. incisa* y *S. incisa divisa*, aparecieron en los extremos de la sección, lo cual pudo significar que son los más recientes y menos conservados. Además, se evidenció que el haplotipo de *S. cordata*, fue el más conservado (Figura 24).

Figura 24

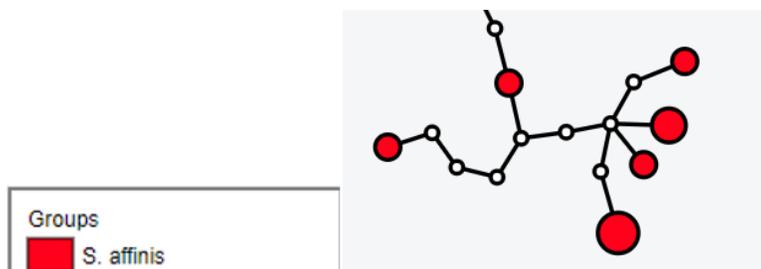
Análisis de la primera sección de la red de haplotipos. Haplotipos de S. cordata, S. divisa, S. incisa, S. incisa divisa, y S. microcephala



Al cabo de 20 sustituciones desde el haplotipo de *S. cordata*, surgieron los haplotipos de *S. affinis* del sur de Isabela, que comprenden la segunda sección de la red (Figura 25). Se evidenciaron seis haplotipos dispersos, es decir sin uno central predominante (como sí sucedió con *S. cordata*), con hasta ocho sustituciones entre sí. Al encontrarse en un extremo de la red de haplotipos y presentarse de manera dispersa, se dedujo que las mutaciones que se suscitaron para conformar la sección fueron más recientes evolutivamente.

Figura 25

Análisis de la segunda sección de la red de haplotipos. Haplotipos de S. affinis



La tercera sección surgió luego de 17 sustituciones desde *S. cordata* (de la primera sección) y 15 desde *S. affinis* (de la segunda sección). Consistió en un haplotipo compartido por *S. affinis* (predominante), *S. retroflexa* y *S. cfr retroflexa*, todos de la isla Santa Cruz (Figura 26). Se pudo apreciar que la sección tiene una forma de lazo por lo cual el primer y el último haplotipo (pertenecientes a *S. affinis*), están separados por seis o 13 sustituciones, dependiendo el sentido que sentido en el que se los cuente. Se evidenciaron nueve haplotipos. Entre el primer haplotipo descrito y los pertenecientes únicamente a *S. affinis*, se ubicaron cuatro haplotipos de *S. crockeri aspera* de la isla Santa Cruz, los cuales difirieron entre una y cuatro sustituciones entre sí. Luego, los haplotipos de *S. affinis* se encontraron a 15 y 19 sustituciones, del grupo de haplotipos de *S. affinis* de la segunda sección. En esta red, ya se pudo apreciar un haplotipo de *S. affinis* central, perteneciente a la isla Floreana, con tres

haplotipos satélite. El primer haplotipo satélite fue el más distante, con tres sustituciones, y perteneció a la isla Santa Cruz; este haplotipo se encontró, de igual manera, a tres sustituciones del haplotipo más distante de *S. crockeri aspera* de esta sección. El segundo y el tercero se encontraron a una sustitución del haplotipo central de *S. affinis* y fueron ambos de Floreana. Se tomó al tercer haplotipo de *S. affinis* como el final de la sección, y se lo usó para referenciar la distancia de la cuarta sección.

Figura 26

Análisis de la tercera sección de la red de haplotipos. Haplotipos de S. affinis, S. crockeri aspera, y S. cfr retroflexa



La cuarta sección se constituyó de cinco haplotipos de *S. villosa*. Surgió de la base del lazo de la tercera sección y dista 22 sustituciones ya sea del último haplotipo de *S. affinis* o del haplotipo compartido por *S. affinis* (predominante), *S. retroflexa*, y *S. cfr retroflexa* (Figura 27). Se pudo evidenciar que hay un grupo de cuatro haplotipos que tienen entre una y cuatro sustituciones entre sí, los cuales pertenecen a la isla Floreana. Por otro lado, el haplotipo de la localidad del islote Champion se diferenció frente a sus homólogos de Floreana en hasta 10 sustituciones (contando desde el primer haplotipo que inicia la sección).

Figura 27

Análisis de la cuarta sección de la red de haplotipos. Haplotipos de S. villosa

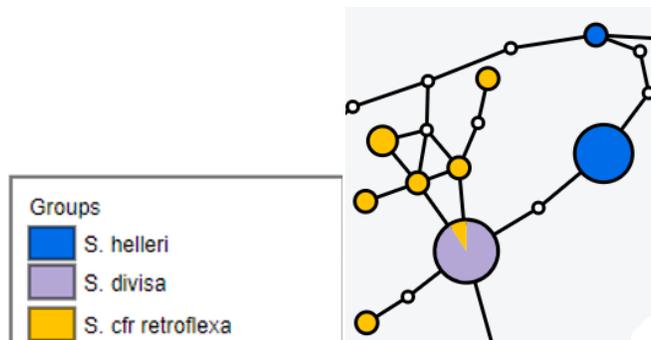


La quinta sección se ubicó a 21 sustituciones de último haplotipo de la especie *S. affinis* de la isla Floreana, y contó con nueve haplotipos, dos de *S. helleri* de Santa Fé, seis de *S. cfr retroflexa* de la isla Santa Cruz, y uno compartido con *S. divisa* de San Cristóbal (predominante), y *S. cfr retroflexa* (Figura 28). El haplotipo de *S. helleri* que inició la sección fue el de menor frecuencia dentro de la población de la isla Santa Fe, ya que fue de menor tamaño respecto al segundo haplotipo, el cual se ubicó más al centro, evidenciando ser más antiguo. Luego, a dos sustituciones del haplotipo más conservado de *S. helleri*, se ubicó el haplotipo compartido (*S. divisa* y *S. cfr retroflexa*). Este fue el de mayor tamaño de la sección y el que más conexiones presentó, por lo cual se lo interpretó como el más antiguo. Cabe destacar que, en la primera sección de la red de haplotipos, ya se identificaron dos haplotipos de *S. divisa*, por lo cual, se evidenció que también comparte haplotipo con *S. cfr retroflexa*, y que está relacionado con *S. cordata* (primera sección) y *S. helleri* (quinta sección).

Los 6 haplotipos restantes se diferenciaron del haplotipo en el que predominó *S. divisa*, y pertenecieron en su totalidad a *S. cfr retroflexa*. Se evidenciaron de una a cinco sustituciones entre estos haplotipos.

Figura 28

Análisis de la quinta sección de la red de haplotipos. Haplotipos de S. divisa, S. helleri, y S. cfr retroflexa



La sexta sección se ubicó a dos sustituciones del haplotipo compartido entre *S. divisa* y *S. cfr retroflexa*, de la quinta sección. Se conformó por cinco haplotipos. El haplotipo central y, en teoría, el mejor conservado, estuvo conformado por especímenes de *S. crockeri aspera* (predominante) y *S. affinis* de Floreana. Luego, un haplotipo de *S. affinis* de Santa Cruz presentó tres sustituciones frente al haplotipo central; mientras que, se presentaron 28 sustituciones entre el haplotipo más cercano de *S. affinis* de la tercera sección y 35 entre el haplotipo más cercano de *S. affinis* de la segunda sección. Se constató que *S. affinis* de Santa Cruz compartió haplotipo con *S. retroflexa*, *S. cfr retroflexa*, también de Santa Cruz, mientras que, *S. affinis* de Floreana compartió haplotipo con y *S. crockeri aspera* de Santa Cruz. *S. affinis* de Isabela no compartió haplotipo con ninguna otra especie de *Scalesia* (Figura 29).

Por otro lado, se evidenciaron dos haplotipos de *S. helleri* de la isla Santa Cruz, el primero y mejor conservado, se ubicó a una sustitución del haplotipo central de la sección; el segundo, se ubicó a tres sustituciones del haplotipo principal de *S. helleri*, siendo más pequeño y externo, por ende, más reciente y menos frecuente. El haplotipo mejor conservado de *S.*

helleri de Santa Cruz, se encontró a cinco sustituciones del haplotipo mejor conservado de *S. helleri* de Santa Fe.

A una sustitución del haplotipo central, también se ubicó un haplotipo bastante conservado de *S. retroflexa* de la isla Santa Cruz. Este haplotipo distó en 32 sustituciones del haplotipo compartido por *S. retroflexa*, *S. affinis* y *S. cfr retroflexa* de la tercera sección. Además, fue el punto de partida (una sustitución) del único haplotipo de *S. gordilloi* de la isla San Cristóbal en toda la red, el cual presentó el mismo tamaño. Cabe destacar que, al ser único haplotipo de *S. gordilloi*, se encontró muy conservado, aunque al estar en un extremo se lo podría catalogar como reciente (Figura 29).

Figura 29

Análisis de la sexta sección de la red de haplotipos. Haplotipos de S. affinis, S. gordilloi, S. helleri, S. crockeri aspera y S. retroflexa



La séptima sección fue la que más haplotipos agrupó, con un total de 20. Inició a cinco sustituciones del haplotipo central de la sexta sección (haplotipo compartido entre *S. affinis* y *S. crockeri aspera*), con un haplotipo central de *S. crockeri* de la isla Santa Cruz, del cual se diferenciaron tres nuevos haplotipos de *S. crockeri* a una sustitución de distancia cada uno, y un haplotipo compartido entre *S. crockeri* y *S. crockeri aspera* a siete sustituciones, siendo el más lejano de la sección, pero de un tamaño mayor al haplotipo central (Figura 30).

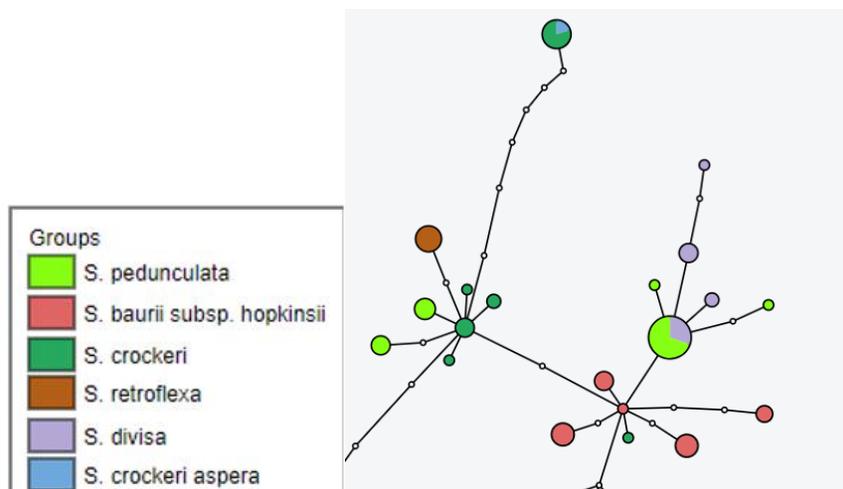
Dos haplotipos de *S. pedunculata* de la isla Santa Cruz, también partieron del haplotipo central de *S. crockeri*, el primero a una sustitución de distancia, y el segundo a dos. Luego, el último haplotipo satélite que partió del central fue un nuevo haplotipo de *S. retroflexa* a dos sustituciones de distancia; y a ocho sustituciones del último haplotipo de *S. retroflexa* de la sexta sección (Figura 30).

A dos sustituciones del haplotipo que inició la séptima sección, se encontró un nuevo haplotipo central de *S. baurii* subsp. *hopkinsii* de la isla Pinta, del cual partieron cuatro haplotipos de la misma especie, diferenciándose en un rango de una a tres sustituciones, y siendo todos de mayor tamaño que el haplotipo central. Luego, a una sustitución de este nuevo haplotipo central, se ubicó otro haplotipo de *S. crockeri*, encontrándose a tres sustituciones del haplotipo principal de *S. crockeri* de la sección (Figura 30).

Por otro lado, un gran haplotipo compartido entre *S. pedunculata* de las islas Floreana, Santa Cruz y San Cristóbal (predominante) y *S. divisa*, se ubicó a una sustitución del haplotipo central de *S. baurii* subsp. *hopkinsii*. Este haplotipo, contó con dos haplotipos satélite de *S. pedunculata* a una y dos sustituciones, respectivamente. Además, también se evidenciaron tres haplotipos satélites de *S. divisa*; el primero y segundo a una sustitución de distancia; el tercero partió de uno de los haplotipos satélites y se encontró a tres sustituciones del haplotipo compartido descrito al inicio del párrafo.

Figura 30

Análisis de la séptima sección de la red de haplotipos. Haplotipos de *S. baurii*. Subsp. *baurii*, *S. crockeri*, *S. divisa*, *S. retroflexa*, *S. crockeri aspera*, y *S. pedunculata*



La octava sección se conformó por seis haplotipos de tres especies de *Scalesia* (*S. crockeri*, *S. baurii* subsp. *baurii*, y *S. aspera*) que se mantuvieron separados y agrupados por especies (Figura 31). Es así que, el primer haplotipo de *S. baurii* subsp. *baurii* de la isla Pinzón, se encontró a dos sustituciones del haplotipo de *S. baurii* subsp. *hopkinsii* de la séptima sección; y contó con dos haplotipos aledaños, a una sustitución de distancia, cada uno.

Luego, el haplotipo de *S. aspera* del islote Edén, se encontró a cuatro sustituciones del haplotipo central de *S. baurii* subsp. *hopkinsii* de la séptima sección, y al mismo número de *S. baurii* subsp. *baurii* de la octava sección. Del haplotipo del islote Edén, surgió el haplotipo de *S. aspera* de la isla Santa Cruz, al cabo de una sustitución. Cabe destacar que, tanto el haplotipo *S. aspera* de Edén, como el de Santa Cruz, tienen el mismo tamaño y cuentan con el mismo número de individuos (nueve para cada caso); sin embargo, el haplotipo de la isla Santa Cruz, al encontrarse en el extremo, se deduce que podría ser más reciente evolutivamente (Figura 31).

Por último, el haplotipo de *S. crockeri* de la isla Santa Cruz, surgió al cabo de cinco sustituciones de haplotipo central de *S. baurii* subsp. *baurii*. Este haplotipo se distanció en seis sustituciones del último haplotipo de *S. crockeri* de la séptima sección.

Figura 31

Análisis de la octava sección de la red de haplotipos. Haplotipos de S. crockeri, S. baurii subsp. baurii, y S. aspera



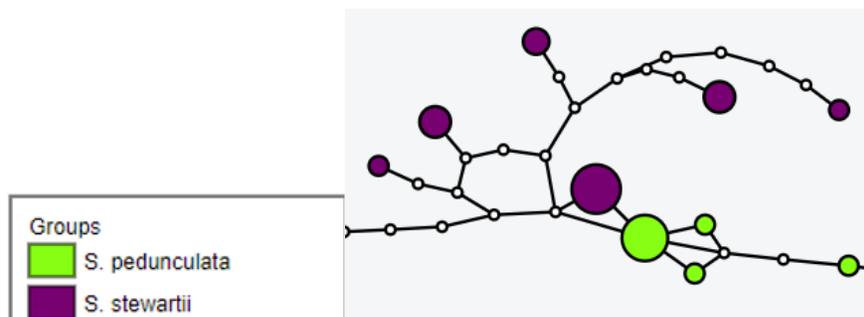
La novena y última sección se conformó por diez haplotipos de dos especies de *Scalesia* (*S. stewartii* y *S. pedunculata*) (Figura 32). El haplotipo más cercano a la octava sección, correspondió a *S. stewartii* de la isla Bartolomé, el cual se encontró a ocho sustituciones del haplotipo de *S. baurii* subsp. *baurii* (octava sección). Este haplotipo evidenció estar muy conservado, ya que no se tuvieron más haplotipos de *S. stewartii* de dicha localidad. Sin embargo, *S. stewartii* de la isla Santiago originó una red conformada por cinco haplotipos, los cuales evidenciaron un tamaño menor al del haplotipo de Bartolomé, y se encontraron a cinco, siete o nueve sustituciones del mismo, y a nueve sustituciones del haplotipo de *S. baurii* subsp. *baurii* de la octava sección.

Por otro lado, a una sustitución de distancia del haplotipo de Bartolomé, se encontró el haplotipo central de *S. pedunculata* de la isla Santiago, del cual se generaron tres haplotipos. Los dos primeros se ubicaron a una sustitución del haplotipo central y se conectaron entre sí

luego de una nueva sustitución. El tercero, se distanció en tres sustituciones respecto a los otros tres haplotipos de *S. pedunculata* de Santiago, antes descritos; y se conectó, ya sea con el haplotipo de *S. helleri* de Santa Fe o el haplotipo de *S. cfr retroflexa* de Santa Cruz, de la quinta sección, al cabo de 8 sustituciones, para cada caso (Figura 32). De esta manera se cerró el circuito que conformó la red de haplotipos. Además, el haplotipo central de *S. pedunculata* de la isla Santiago, se conformó luego de once sustituciones, respecto al haplotipo compartido por *S. pedunculata* de las islas Floreana, Santa Cruz y San Cristóbal, y *S. divisa*, de la séptima sección.

Figura 32

Análisis de la novena sección de la red de haplotipos. Haplotipos de S. stewartii y S. pedunculata



Distancias genéticas

Se obtuvo una matriz con las estimaciones de divergencia evolutiva entre las 335 secuencias, en la cual se mostró el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias. La media general de distancias genéticas considerando el grupo externo, fue del 0,000279%. Al analizar las distancias genéticas entre poblaciones de especies de *Scalesia*, se encontró que oscilaron entre cero y 0,0002%, siendo *S. gordilloi* la única especie que no presentó variaciones de distancias genéticas al mantenerse en cero (Tabla 3).

Tabla 3*Distancias genéticas intraespecíficas del genoma del cloroplasto de Scalesia*

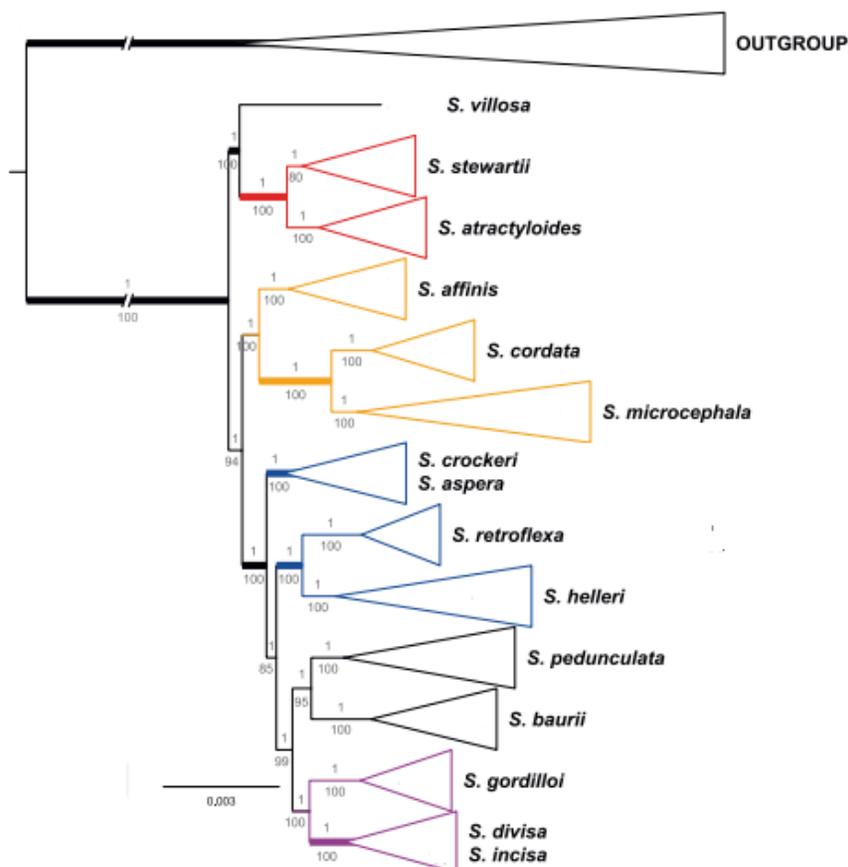
Especie	Poblaciones	Rango de distancia genética (%)
<i>S. affinis</i>	HALM 48, HAMP 4, HAMP 10, HAMP 29	0 - 0,0002
<i>S. aspera</i>	HALM 37, HALM 64	0 - 0,000008
<i>S. baurii</i>	AHA 6, SLAM 20, SLAM 27	0 - 0,00004
<i>S. cordata</i>	HALM 44, HALM 53	0 - 0,00001
<i>S. divisa</i>	HALM 11, HALM 12, HALM 19	0 - 0,0002
<i>S. gordilloi</i>	HAMP 38	0
<i>S. crockeri</i>	HALM 39, HAMP 5	0 - 0,00009
<i>S. crockeri aspera</i>	HALM 8, HAMP 7	0 - 0,0002
<i>S. helleri</i>	HALM 62, HALM 65	0,00003 - 0,0001
<i>S. incisa</i>	HALM 20, HAMP 40	0 - 0,00003
<i>S. incisa divisa</i>	HALM 23	0 - 0,00002
<i>S. microcephala</i>	HALM 51	0 - 0,00004
<i>S. pedunculata</i>	HALM 25, HALM 32, HAMP 30, HAMP 36	0 - 0,0001
<i>S. retroflexa</i>	HALM 26, LAM 26	0,00006 - 0,0001
<i>S. cfr retroflexa</i>	HALM 41	0,000007 - 0,0002
<i>S. stewartii</i>	HALM 35, HALM 36	0 - 0,00008
<i>S. villosa</i>	HAMP 24, HAMP 28	0 - 0,00006

Análisis de los eventos de hibridación del genoma del cloroplasto del género *Scalesia*

Al realizar la comparación entre la filogenia del genoma nuclear (Fernández-Mazuecos *et al.*, 2020) (Figura 33) y la filogenia del genoma del cloroplasto (Figura 34) del género *Scalesia*, se evidenció que las especies se distribuyeron de manera diferente en ambas topologías. Es así que el árbol de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) inició con una división entre dos clados grandes. El primero (en rojo) contuvo a tres especies: *S. villosa*, *S. stewartii* y *S. atractyloides*. *S. stewartii* y *S. atractyloides* fueron especies hermanas, mientras que *S. villosa* fue hermana al grupo que las contiene. En la filogenia del cloroplasto, se encontró que también inicia con una división entre dos clados grandes; sin embargo, en el primer clado se ubicó únicamente *S. villosa*, mientras que *S. stewartii* se encontró en sexto subclado contenido dentro del segundo clado grande de la topología del genoma del cloroplasto. Se observó que tanto la filogenia del genoma del cloroplasto y el genoma nuclear concordaron con *S. villosa* como la primera especie del árbol filogenético, es decir, fue la primera división del género *Scalesia*. Nuestro estudio no contó con el genoma del cloroplasto de *S. atractyloides* para hacer la comparación con el genoma nuclear. Según la topología del genoma del cloroplasto, *S. stewartii* de Santiago y Bartolomé, a diferencia de la filogenia nuclear, compartió el clado con *S. pedunculata* de Santiago, por lo tanto, pudo haberse generado la hibridación desde *S. pedunculata* hacia *S. stewartii* y por tal motivo el genoma del cloroplasto de *S. stewartii* se encontró muy cercano a *S. pedunculata* en lugar de ser cercano a *S. villosa*.

Figura 33

Árbol filogenético del género *Scalesia* construido a partir del genoma nuclear. Adaptado de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020)

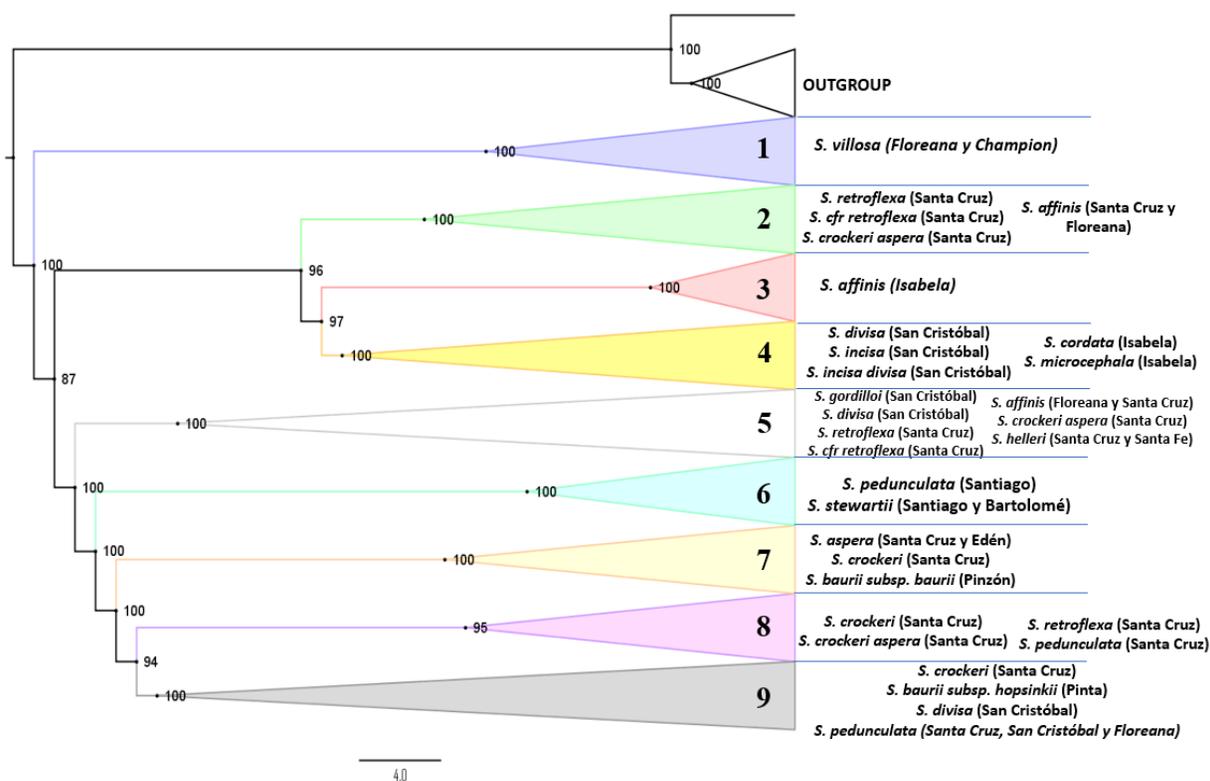


El segundo clado de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) se dividió en cuatro grupos de subclados (amarillo, azul, negro y morado). Al grupo de subclados amarillo lo integraron las especies *S. affinis*, *S. cordata* y *S. microcephala* pertenecientes a Isabela. *S. microcephala* y *S. cordata* fueron especies hermanas, mientras que *S. affinis* fue hermana al grupo que las contiene. En la filogenia del cloroplasto se tuvo que las especies de Isabela, es decir, *S. microcephala* y *S. cordata*, son hermanas de las especies de San Cristóbal *S. divisa* y *S. incisa*. *S. divisa* también aparece en el quinto y noveno clado del árbol filogenético del genoma del

cloroplasto, por lo cual se podría inferir un evento de hibridación entre ambas especies de San Cristóbal tanto con *S. microcephala*, como con *S. cordata*.

Figura 34

Árbol filogenético del género *Scalesia* construido a partir del genoma del cloroplasto



Se pudo evidenciar que *S. affinis* de Isabela en ambas filogenias se agrupó en un clado independiente; sin embargo, *S. affinis* de otras localidades como Floreana y Santa Cruz, no se agruparon en el mismo clado que *S. affinis* de Isabela, por lo cual se puede evidenciar un comportamiento polifilético por parte de esta especie, y una posible hibridación con las especies que integran los clados que las contuvieron, es decir, el segundo y el quinto clado del árbol filogenético del genoma del cloroplasto (Figura 37).

En el grupo de clados azul de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020), se apreció que *S. crockeri* y *S. aspera* estuvieron en un solo clado de la isla Santa Cruz; mientras que en la filogenia del cloroplasto *S. crockeri* se encontraron en el séptimo, octavo y noveno clado, siendo todos los especímenes de Santa Cruz, por lo cual se plantearon tres posibilidades: algunos especímenes de *S. crockeri* fueron mal identificados como miembros de la especie, es decir, son diferentes especies; existieron polimorfismos ancestrales dando como resultado una clasificación de linajes incompletos (ILS); y que *S. crockeri* se haya hibridando con *S. aspera* de Santa Cruz, y con las otras especies con las que compartió clados.

S. retroflexa conformó un clado independiente en la topología de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020), mientras que en la filogenia del genoma del cloroplasto se encontró en el segundo, quinto y octavo clado, evidenciando un comportamiento polifilético, en el cual además, compartió clado con varias especies de cada uno de los clados donde se agrupó, por lo cual se puede inferir hibridación. *S. helleri*, también presente en el grupo de los clados azules, conformó un clado en solitario. En la filogenia del genoma del cloroplasto, *S. helleri* de Santa Cruz y Santa Fe, aparecieron agrupadas en el quinto clado compartiéndolo con varias especies de *Scalesia*, por lo cual no se evidenció un comportamiento polifilético y fue complicado inferir en un evento de hibridación.

El grupo de clados negro de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) evidenció que *S. pedunculata* y *S. baurii* son especies hermanas; sin embargo, en la filogenia del genoma del cloroplasto *S. pedunculata* se encontró en el quinto, octavo y noveno clado, mostrando un comportamiento polifilético que podría explicarse de la misma forma que *S. crockeri* (descrita anteriormente). *S. baurii* también apareció en dos clados distintos en la filogenia del genoma del cloroplasto compartiendo clados con varias especies de distintas islas, lo cual puede interpretarse como posibles eventos de hibridación.

En la filogenia de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) *S. gordilloi* se presentó como especie hermana de *S. incisa* y *S. divisa* (las dos compartieron clado). En la filogenia del genoma del cloroplasto, *S. gordilloi* aparece únicamente en el quinto clado agrupado con más especies, por lo cual no mostró un comportamiento polifilético. *S. incisa* y *S. divisa* compartieron el cuarto clado de la topología del genoma del cloroplasto, sin embargo *S. divisa* apareció en más clados a lo largo del árbol filogenético.

Se pudo evidenciar que a partir del quinto clado de árbol filogenético del genoma del cloroplasto, las especies se encuentran distribuidas prácticamente de manera aleatoria a lo largo del árbol, evidenciando un comportamiento polifilético que podría indicar que los clados 5, 6, 7, 8, y 9 presentan eventos de hibridación si se los compara con la filogenia nuclear de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020), en la cual los especímenes aparecen bien diferenciados en clados independientes exceptuando *S. crockeri* y *S. aspera*, y *S. divisa* y *S. incisa* que compartieron clado tanto en la filogenia del genoma nuclear, como en la filogenia del genoma del cloroplasto.

Capítulo V: Discusión

En el presente estudio, se analizó las relaciones filogenómicas de 14 especies y tres especies híbridas del género *Scalesia*, mediante el ensamblaje, el alineamiento, y la construcción de un árbol filogenético, del genoma del cloroplasto. Los cloroplastos, por lo general son heredados de forma uniparental como un cromosoma circular no recombinante (Birky, 1995), lo cual reduce las oportunidades de recombinación entre diferentes linajes de cloroplastos (Birky, 2001). Esto sugiere que el genoma del cloroplasto en el género *Scalesia*, debería mantenerse conservado, permitiendo determinar la génesis del género y cómo se dio el proceso de especiación a lo largo del Archipiélago de Galápagos. Cabe recalcar que, hasta el momento, la filogenia del genoma nuclear de *Scalesia* ha sido analizada únicamente por Fernández-Mazuecos *et al.* (2020), y sirvió para contrastar la topología obtenida en el actual estudio.

Es así que, Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) establecieron un comportamiento monofilético del genoma nuclear del género *Scalesia*, el cual inicia con *S. villosa*, *S. attractyloides*, *S. stewartii*, *S. affinis*, *S. cordata*, y *S. microcephala*, como las especies que divergieron relativamente temprano; ubicando a las tres primeras como especies hermanas, corroborando la filogenia de caracteres morfológicos de Blaschke & Sanders (2009) (respecto a estas especies). Mientras que, *S. crockeri*, *S. aspera*, *S. retroflexa*, y *S. helleri*, se situaron como especies divergentes intermedias, y *S. pedunculata*, *S. baurii*, *S. gordilloi*, *S. divisa* y *S. incisa*, se establecieron como especies divergentes tardías. La topología del genoma del cloroplasto coincidió con la nuclear en que *S. villosa*, *S. cordata* y *S. microcephala* son especies divergentes tempranas; y difirió en que, *S. pedunculata*, *S. baurii*, *S. divisa*, y *S. stewartii*, fueron las especies que divergieron más tarde, sin embargo, se evidenció un comportamiento polifilético en seis especies (*S. pedunculata*, *S. affinis*, *S. baurii*, *S. crockeri*, *S. divisa*, y *S. retroflexa*). El hecho de que en ambas topologías *S. villosa* se presente en un clado

independiente puede tener su explicación en que esta especie posee una distribución restringida únicamente para la isla Floreana, y se encuentra completamente separada de *S. pedunculata* y presenta especiación simpátrica frente a *S. affinis* que también habitan la isla, por lo cual es posible que conserve su linaje puro (Blaschke & Sanders, 2009; Itow, 1995). Cabe recalcar que la divergencia se refiere al patrón evolutivo en el que las especies que comparten un ancestro en común se van diferenciando gradualmente, es decir, entrando en un proceso de especiación durante un período de tiempo evolutivo (Gautam, 2020).

Según Sousa *et al.* (2020), la incongruencia entre las topologías de árboles filogenéticos se puede atribuir a procesos biológicos, como la clasificación de linajes incompletos (ILS), la hibridación, y cuestiones metodológicas, como la elección inadecuada de modelos de sustitución, fallas en la identificación fenotípica de las muestras, mal etiquetado de las secuencias, entre otros. Tomando en cuenta que el programa utilizado para la construcción del árbol filogenético fue IQ-TREE v2.1.3, y que este se encarga de analizar los alineamientos ingresados y elegir el mejor modelo de sustitución de forma independiente, teniendo un mejor rendimiento en términos de tiempo de cálculo y de maximización de probabilidad que otros software como RAxML (Minh *et al.*, 2020), podemos afirmar que el modelo de sustitución en nuestro estudio fue el adecuado.

Por lo tanto, las diferencias entre la topología nuclear y de cloroplasto, pueden entrar en el terreno de los ILS o la hibridación. Los ILS perpetúan los polimorfismos genéticos ancestrales en los eventos de especiación rápida (Feng *et al.*, 2022), como es el caso de *Scalesia*, generando incongruencias entre la filogenia de genes frente a la de especies (Maddison & Knowles, 2006). En la actualidad, las herramientas para distinguir entre ILS e hibridación con métodos probabilísticos son limitadas, por lo cual se puede probar la hibridación indirectamente examinando las distribuciones de los árboles genéticos esperados solo con ILS

(Folk *et al.*, 2017). En este estudio, no se profundizó en el análisis y distinción de los ILS frente a los eventos de hibridación, sin embargo, se pudo inferir en que los especímenes que se agruparon en un mismo clado con más de una especie de *Scalesia*, que no presentaron indicios de polifilia y que su procedencia geográfica fue de diferente isla que el resto de especies del clado, podrían significar señales de ILS, ya que cuanto mayor sea la diversidad en la población ancestral y menor sea el tiempo entre dos eventos de especiación, es más probable que se tenga genealogías con ILS entre las especies que conforman un clado (Pollard *et al.*, 2006). Esto se evidenció con *S. cordata* y *S. microcephala* de la isla Isabela y *S. divisa* y *S. incisa* de San Cristóbal en el cuarto clado de la filogenia del genoma del cloroplasto, por citar un ejemplo.

Rieseberg & Brouillet (1994), mencionan que las especies híbridas diploides y las aloploidoides, son ejemplos clásicos de especies polifiléticas en el sentido de que combinan los genomas de dos especies diferenciadas. Además, se han demostrado eventos de hibridación en organelos citoplasmáticos haploides como el cloroplasto, al evidenciar el comportamiento polifilético de las especie que conforman una filogenia (Kaur *et al.*, 2014). Por lo cual, se podría corroborar la existencia de eventos de hibridación en el genoma del cloroplasto del género *Scalesia*, ya que fue evidente la polifilia de *S. pedunculata*, *S. affinis*, *S. baurii*, *S. crockeri*, *S. divisa*, y *S. retroflexa*, al no surgir de un ancestro común y presentarse en ramas separadas que pueden estar muy alejadas entre sí (Hörandl & Stuessy, 2010; Rieseberg & Brouillet, 1994). Sin embargo, se debe estudiar la diversidad intraespecífica del genoma de cada especie, ya que, si esta excede a la diversidad interespecífica, se pueden reflejar ecologías dinámicas que afectarían seriamente las conclusiones filogenéticas (Nevo, 2001).

Existe la posibilidad de que se hayan presentado eventos de hibridación entre los genomas del cloroplasto, aun cuando en teoría, el genoma del cloroplasto se puede utilizar

como código de barras para identificar especies de plantas debido a que poseen regiones muy conservadas que se mantienen entre poblaciones de especies (Xu *et al.*, 2020), ya que los eventos de hibridación en el género *Scalesia* se han reportado por diversos autores. Por ejemplo, Kelager & Philipp (2008) detallan los fenómenos de hibridación entre tres especies simpátricas de *Scalesia* (*S. retroflexa*, *S. affinis* y *S. pedunculata*); Lindhardt *et al.* (2009) sugieren poblaciones de híbridos interespecíficos entre *S. aspera*, *S. crockeri* y *S. pedunculata*; Nielsen *et al.* (2003) establecen patrones de variación genética entre *S. divisa* y *S. incisa* producto de la hibridación entre ambas especies; y Hamann & Wium-Andersen (1986) mencionan que *S. gordilloi* está relacionada a *S. divisa* y *S. incisa*. Todos basándose en caracteres morfológicos y moleculares del ADN nuclear. Sin embargo, en nuestro estudio, se hace evidente que los fenómenos de hibridación encontrados por los autores antes mencionados (Hamann & Wium-Andersen, 1986; Kelager & Philipp, 2008; Lindhardt *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2003), también podrían estar presentes a nivel del genoma del cloroplasto.

Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) realizaron pruebas de hibridación ABBA-BABA las cuales evidenciaron hibridación durante la radiación de *Scalesia*, pero no se encontraron indicios de intercambio generalizado de alelos derivados de especies que muestran rasgos vegetativos y reproductivos similares, como *S. helleri*, *S. baurii* y *S. incisa*; aunque sí se sugiere la introgresión entre *S. retroflexa* o *S. helleri* con *S. affinis*, al ser especies que co-ocurren en la isla Santa Cruz. En la topología del genoma del cloroplasto *S. helleri*, *S. baurii* y *S. incisa*, tampoco se agruparon en un mismo clado, es decir, no se evidenció indicios de hibridación entre las tres especies mencionadas. Sin embargo, *S. affinis*, *S. retroflexa* y *S. helleri*, sí se agruparon en un mismo clado (quinto clado de la topología del genoma del cloroplasto), haciendo más evidente el posible origen híbrido del genoma del cloroplasto de estas especies. Es necesario mencionar, que *S. affinis* evidenció un comportamiento polifilético. Los individuos pertenecientes a *S. affinis* de Isabela, se agruparon en un solo clado al igual que en la

topología de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020), mientras los especímenes de *S. affinis* pertenecientes a Santa Cruz y Floreana se mezclaron con más especies de *Scalesia*, dicho comportamiento fue descrito por Nielsen (2004), estableciendo que las poblaciones de *S. affinis* de Santa Cruz y Floreana tienden a agruparse y separarse de las poblaciones de Isabela (que también se agrupan entre sí), al estudiar la varianza molecular del ADN nuclear y del cloroplasto; lo cual podría sugerir la hibridación del genoma del cloroplasto de *S. affinis* de Santa Cruz y Floreana. Cabe recalcar que en la topología del genoma nuclear, no se evidenció gráficamente la posible hibridación ente *S. affinis*, *S. retroflexa* y *S. helleri*, ya que Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) escogieron especímenes de *Scalesia* de poblaciones bien diferenciadas.

La particularidad de nuestro estudio fue que ciertos especímenes de *Scalesia* de la misma especie, pero de diferente localidad, se encontraron distribuidos en más de un clado, evidenciando un comportamiento polifilético, aun cuando las distancias genéticas fueron muy pequeñas entre sí, como es el caso de *S. divisa*, *S. affinis*, *S. pedunculata*, *S. retroflexa*, y *S. crockeri*. Estas especies pertenecen a las islas Santa Cruz, San Cristóbal, Floreana, Isabela y Santiago, las cuales de acuerdo al cladograma de relaciones intra-archipiélago de Bisconti *et al.* (2001), son islas hermanas que poseen flora y fauna estrechamente relacionada entre sí, por lo cual un comportamiento polifilético es bastante probable (no se mencionó a las islas Fernandina y Baltra porque no se tienen especímenes de *S. affinis* de Fernandina y de *S. crockeri* de Baltra en el estudio; sin embargo, Baltra no se agrupó en el mismo clado que las islas antes mencionadas, mientras que Fernandina se encontró muy ligada a Isabela). Además, algunos especímenes de la misma localidad se encontraron en más de un clado, por ejemplo, *S. retroflexa* (LAM26), *S. crockeri* (HALM39), *S. affinis* (HAMP10, HAMP29), *S. divisa* (HALM12), y *S. pedunculata* (HALM25). Este mismo comportamiento se evidenció en los individuos de *S. cfr retroflexa* (HALM41) o *S. crockeri aspera* (HALM8), catalogados como

híbridos en base a su morfología, por lo cual, se demuestra que un comportamiento polifilético puede deducir una hibridación en el genoma del cloroplasto.

Según Hollingsworth *et al.* (1999), los índices de variabilidad genética intraespecífica en el ADN del cloroplasto suelen ser más bajos que los detectados en el genoma nuclear. Por ello, se pudo esperar una incongruencia entre los árboles construidos usando loci de cloroplastos y los construidos a partir de loci nucleares (Liston *et al.*, 2021), más no una incongruencia entre los individuos de la misma especie distribuidos en varios clados. Es decir, no se esperaba un comportamiento polifilético de *S. affinis*, *S. crockeri*, *S. baurii*, *S. divisa*, *S. retroflexa*, y *S. pedunculata*, ya que en la topología del genoma nuclear ninguna especie se distribuyó en más de un clado.

En escenarios evolutivos complejos, la visualización de la historia evolutiva de un conjunto de taxones puede ser mejor representada por una red filogenética en lugar de un árbol filogenético, ya que son útiles cuando se cree que están involucrados procesos de evolución reticulados como la hibridación (Huson & Bryant, 2006). Según Paradis (2018), el analizar las relaciones entre secuencias de ADN y haplotipos tanto dentro y entre poblaciones es crucial para probar hipótesis sobre procesos microevolutivos. Por lo tanto, se construyó una red de haplotipos del género *Scalesia* para evaluar si las incongruencias detectadas en el árbol filogenético podían resolverse.

Se evidenció que especies como *S. villosa*, *S. cordata*, *S. gordilloi*, *S. aspera*, *S. stewartii*, y *S. baurii*, presentaron haplotipos interconectados de forma intraespecífica, sin importar la procedencia de las poblaciones muestreadas, lo cual sugiere un estado más conservado de su genoma. Sin embargo, esto no necesariamente significa que estas especies sean las más antiguas de la red, ya que *S. crockeri*, *S. affinis* (las poblaciones de Santa Cruz, Floreana y San Cristóbal), *S. pedunculata*, *S. helleri*, *S. cordata*, *S. baurii*, y *S. retroflexa*, son

los haplotipos posicionados más hacia el interior, y por ende, los más antiguos (Schaal *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2019). Mientras que, basándonos en la posición dentro de la red, los haplotipos de *S. villosa*, *S. incisa*, *S. divisa* (de la población HALM12), *S. microcephala*, *S. affinis* de la isla Isabela, *S. aspera*, y *S. gordilloi*, ya sea por su posición terminal en las puntas de la red, o por ser haplotipos únicos, pueden representar linajes más recientes evolutivamente (Hou *et al.*, 2020; Schaal *et al.*, 2003); lo cual contradice parcialmente la topología filogenómica del cloroplasto, ya que allí se expresa que *S. villosa* y *S. microcephala* deberían catalogarse como especies divergentes tempranas; tal como lo expresa Fernández-Mazuecos *et al.* (2020), añadiendo a *S. affinis* según la filogenia nuclear, que coincide con la del cloroplasto para los especímenes de *S. affinis* de Isabela, únicamente.

Tomando en cuenta que los haplotipos más recientes tendrían una asociación geográfica más restringida y los más antiguos una distribución más amplia, se puede interpretar que los haplotipos que establecen más conexiones interespecíficas desde una posición central, serían los más antiguos (*S. crockeri*, *S. baurii*, *S. pedunculata*, *S. crockeri aspera*, *S. divisa*, *S. affinis*, *S. cordata*, *S. cfr retroflexa*) (Schaal *et al.*, 2003). Considerando que Schilling *et al.* (1994) estimaron que el tiempo de divergencia desde *Pappobolus* (género hermano más cercano) hasta *Scalesia* fue entre 1.9 a 6.3 millones de años, al comparar fragmentos del ADN del cloroplasto de *S. pedunculata*; la posición central de los haplotipos de *S. pedunculata*, *S. crockeri*, *S. divisa*, y *S. affinis* fue congruente con la edad de las islas más antiguas que albergan a *Scalesia*, como es el caso de San Cristóbal (2.4 a 4.0 millones de años), Santa Cruz (1.1 a 2.3 millones de años) y Floreana (1.5 a 2.3 millones de años) (Fernández-Mazuecos *et al.*, 2020). Esto fue consistente con la filogenia nuclear, ya que se comprobó que *S. pedunculata* de San Cristóbal, Santa Cruz y Floreana entran en el rango de tiempo en el cual se produjo la especiación del genoma del cloroplasto de *S. pedunculata*; sin embargo *S. pedunculata* de Santiago (0.8 a 1.4 millones de años) es la excepción (Fernández-Mazuecos *et*

al., 2020). Esto sugiere un posible evento de hibridación al comparar la topología del genoma nuclear con la de nuestro estudio, ya que *S. pedunculata* de la isla Santiago y *S. stewartii* de Bartolomé y Santiago, se agruparon en un clado exclusivo (sexto clado del árbol filogenético del genoma del cloroplasto). Las poblaciones de *S. stewartii* de Bartolomé y Santiago presentaron una distancia de 1.86 kilómetros entre sí, y 21.74 kilómetros entre la población de *S. pedunculata*, de acuerdo a las coordenadas de geolocalización tomadas cuando se realizó el muestreo. Por ello, al estar tan cercanas y agruparse en un solo clado sin individuos de otras islas, es plausible que se hayan presentado eventos de hibridación entre ambas especies. Sobre todo cuando, en la topología de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020), *S. stewartii* aparece como especie hermana de *S. atractyloides* (no considerada en nuestro estudio), la cual es endémica de la isla Santiago (Cerca *et al.*, 2022), haciendo evidente que tanto en el genoma nuclear como en el genoma del cloroplasto, las especies de esta isla tienden a tener un parentesco, el cual se puede explicar aduciendo especiación alopátrica, ya que es la característica común de todo el género *Scalesia* (Itow, 1995).

Se evidenció que los especímenes catalogados en el muestreo como híbridos por su morfología (*S. crockeri aspera* y *S. incisa divisa*), de acuerdo a los botánicos de la UCPH, o los especímenes de *S. cfr retroflexa*, tienen muchas conexiones dentro de la red de haplotipos e incluso comparten haplotipo con *S. affinis* y *S. crockeri*, en el caso de *S. crockeri aspera* (de manera independiente, es decir, no los tres en un mismo haplotipo); con *S. incisa* en el caso de *S. incisa divisa*; y con *S. divisa*, y *S. affinis* y *S. retroflexa*, en el caso de *S. cfr retroflexa* (de manera independiente), los cuales podrían ser los primeros indicios de hibridación. Cabe recalcar que, estos haplotipos compartidos también se evidenciaron entre poblaciones de especies confirmadas como *S. pedunculata* (HALM25, HAMP 30 y HAMP36) y *S. divisa* (HALM11).

En la red de haplotipos se evidenció que las poblaciones de una misma especie, establecieron relación con haplotipos de otras especies o con especímenes morfológicamente híbridos, en varias zonas de la red, como es el caso de *S. divisa*, con *S. pedunculata*, *S. incisa*, *S. cordata*, *S. helleri*, y *S. baurii*; o *S. affinis*, con *S. retroflexa*, *S. cfr retroflexa*, *S. crockeri aspera*; o *S. pedunculata* con *S. crockeri*, *S. stewartii*, y *S. baurii*; por citar tres ejemplos. Esto no necesariamente significa que se comprueban eventos de hibridación dentro del genoma del cloroplasto, pero marca un punto de partida para estudios más profundos; ya que es crucial evaluar la confiabilidad de la filogenia o red de haplotipos para que su construcción no se vea afectada por sesgos de muestreo que induzcan malas estimaciones, y en consecuencia, una incorrecta inferencia de la historia evolutiva (Paradis, 2018).

En nuestro estudio, existieron especies de *Scalesia* que contaron con más poblaciones muestreadas por localidad que otras, como es el caso de *S. divisa* (HALM11, HALM12 y HALM19), *S. incisa* (HAMP40 y HALM20), *S. crockeri* (HALM39 y HAMP5), *S. crockeri aspera* (HALM8 y HAMP7), *S. affinis* (HAMP10 y HAMP4), *S. baurii* subsp. *hopkinsii* (SLAM27 y SLAM20), y *S. cordata* (HALM53 y HALM44). Según Maddison & Knowles (2006), la reconstrucción de la filogenia de una especie se ve afectada por el número de individuos muestreados por especie; en nuestro caso, esto podría explicar las incongruencias entre la topología del genoma del cloroplasto y la del genoma nuclear, catalogadas como eventos de hibridación, ya que Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) tiene muy pocos especímenes muestreados para su estudio si se lo compara con el nuestro (35 individuos en total para las 15 especies de *Scalesia*, frente a 328 individuos en nuestra investigación).

En términos generales, la red de haplotipos se mostró congruente con la topología establecida por el árbol filogenético (salvo ciertas excepciones relacionadas con la temporalidad de la divergencia), y la distribución de los especímenes en los clados; mientras

que las distancias genéticas calculadas no arrojaron mucha información relevante para inferir procesos de hibridación. Esto se comprueba al analizar que poblaciones geográficamente distantes como *S. divisa* (HALM12) de la isla San Cristóbal, que se agrupa con *S. microcephala* y *S. cordata* de la isla Isabela, tanto en la red de haplotipos como en el árbol filogenético, o especies que no se agrupan en absoluto como *S. villosa* y *S. baurii*, por citar unos ejemplos, tienen distancias genéticas muy similares, promediando en general un valor de 0,000279%, el cual se asemeja al valor de otros estudios en los cuales se midió las distancias genéticas de géneros de plantas que albergan más de 100 especies, y cuyos valores oscilan entre 0,0002% y 0,006% (Li *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2022). Según Jiao & Guo (2014), esto se debe a que tanto el contenido genético, como el orden de los genes en los genomas de cloroplastos se conservan generalmente durante el largo período evolutivo. La distancia genética entre las secuencias de diferentes especies puede ser utilizada estadísticamente para distinguir los fenómenos de hibridación frente a ILS, entendiéndose que el tiempo de divergencia entre eventos de hibridación es menor que entre ILS (Joly *et al.*, 2009). En este estudio no fue posible establecer esa diferencia debido a que las distancias genéticas entre las secuencias de estudio tienden a cero.

Es necesario precisar que, *S. crockeri aspera*, morfológicamente catalogada como híbrida, también evidenció un comportamiento polifilético, y se vio más emparentada con *S. affinis*, *S. retroflexa* y *S. helleri*, que con *S. crockeri* y *S. aspera* luego del análisis de su genoma del cloroplasto. En contraste, *S. incisa divisa*, no presentó indicios de polifilia, y sí se comprobó su descendencia de *S. incisa* y *S. divisa*. Cabe resaltar que, no se incluyó a la especie *S. atractyloides* debido a la falta de disponibilidad de las secuencias para ensamblar el genoma del cloroplasto.

Por último, al analizar que el árbol filogenético de Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) tiene los clados bien diferenciados, mientras que los clados de la filogenia del genoma del cloroplasto se conforman con varias especies incluso de distintas islas (exceptuando el clado de *S. villosa* y *S. affinis*), es posible que tengamos un problema de baja cobertura o resolución de las secuencias (Folk *et al.*, 2017) en las lecturas polimórficas de las secuencias genómicas del cloroplasto de *Scalesia* (Pollard *et al.*, 2006), ya que se recomienda un cobertura de al menos 20x o 30x para tener ensamblajes de organelos, como el cloroplasto, que sean precisos (Dierckxsens *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Conclusiones

Se consiguió ensamblar un total de 335 secuencias genómicas, las cuales incluyeron las siguientes especies del género *Scalesia*: *S. affinis*, *S. aspera*, *S. baurii*, *S. cordata*, *S. crockeri*, *S. divisa*, *S. gordilloi*, *S. helleri*, *S. incisa*, *S. microcephala*, *S. pedunculata*, *S. retroflexa*, *S. stewartii*, y *S. villosa*. También se incluyó a las especies morfológicamente híbridas *S. cfr retroflexa*, *S. crockeri aspera* y *S. incisa divisa*; y al grupo externo de las siguientes especies: *S. sericeus*, *P. ecuadoriensis*, *P. juncosae*, *P. nigrescens*, *P. hypargyreus*, y *P. lehmanii*. Se utilizó como semilla a *S. gordilloi* y *S. incisa* en el programa Novoplasty v4.2 para ensamblar genomas de un tamaño promedio de 130.891 pb con una desviación estándar de 7.236 pb.

Se diagramó la filogenia del genoma del cloroplasto del género *Scalesia* con las especies antes descritas utilizando el programa IQ-TREE v2.1.3. Además, se construyó una red de haplotipos con el programa TCS. Tanto el árbol filogenético, como la red de haplotipos permitieron evidenciar el comportamiento polifilético de las especies *S. affinis*, *S. baurii*, *S. crockeri*, *S. divisa*, *S. incisa*, *S. pedunculata*, y *S. retroflexa*, al encontrarse en varios clados del árbol o al establecerse como haplotipos en varias regiones de la red, con distintas especies en ambos casos. Por otro lado, las distancias genéticas de todas las especies sometidas al estudio fueron muy pequeñas, con un promedio general de 0,000279%, lo cual demostró que todas las especies se encontraron estrechamente relacionadas.

Se encontraron diferencias entre la filogenia del genoma del cloroplasto y el genoma nuclear, en cuanto a la temporalidad de divergencia de las especies y las asociaciones que entre ellas establecen. Las especies divergentes tempranas del árbol filogenético del genoma del cloroplasto fueron *S. villosa*, *S. cordata* y *S. microcephala* y las especies divergentes tardías fueron *S. pedunculata*, *S. baurii*, *S. divisa*, y *S. stewartii*; mientras que Fernández-Mazuecos *et*

al. (2020) ubicó como divergentes tempranas, además de las especies de nuestro estudio, a *S. affinis* y *S. stewartii*; y como divergentes tardías a *S. pedunculata*, *S. baurii*, *S. gordilloi*, *S. divisa*, *S. incisa*.

Los eventos de hibridación fueron analizados con base en la comparación de la filogenia del genoma nuclear establecida por Fernández-Mazuecos *et al.* (2020) y la filogenia del genoma del cloroplasto y la red de haplotipos desarrollada en el actual estudio; es así que, se infirió eventos de hibridación en las especies catalogadas como polifiléticas, es decir, *S. affinis*, *S. baurii*, *S. crockeri*, *S. divisa*, *S. pedunculata*, y *S. retroflexa*, de acuerdo a bibliografía. De igual manera, en la red de haplotipos, las especies que compartieron haplotipos con otras especies (haplotipos interespecíficos), como es el caso de *S. pedunculata* y *S. divisa*, se catalogaron como híbridos. Por otro lado, las poblaciones de una misma especie que evidenciaron emparentarse con poblaciones de otras especies en varias zonas de la red de haplotipos, como es el caso de *S. divisa*, con *S. pedunculata*, *S. incisa*, *S. cordata*, *S. helleri*, y *S. baurii*; o *S. affinis*, con *S. retroflexa*, o *S. pedunculata* con *S. crockeri*, *S. stewartii*, y *S. baurii*; podrían indicar eventos de hibridación, sin embargo, es necesario estudios más específicos al respecto, ya que los ILS también pueden explicar las incongruencias detectadas en ambas topologías.

En conclusión, se comprobó la hipótesis del estudio respecto a que la filogenia obtenida mediante el genoma del cloroplasto del género *Scalesia* endémico de las islas Galápagos, permite establecer la presencia de hibridación entre sus especies, interpretando que los procesos evolutivos producto del flujo genético continúan divergiendo hacia nuevas especiaciones en islas no pobladas, o hacia la pérdida de linajes puros producto del desplazamiento de las poblaciones por el desarrollo urbano en Galápagos y la injerencia de las especies invasoras en islas pobladas. Esto conlleva a diagramar planes de acción técnicos que

permitan mitigar el impacto ambiental y priorizar la conservación, para que los procesos evolutivos naturales, aún en marcha en Galápagos, no se vean alterados. Además, esta investigación establece un punto de partida en la era genómica para investigar la radiación evolutiva de los tres géneros endémicos de Asteráceas restantes (*Lecocarpus*, *Darwiniothamnus*, *Macraea*) y entender cuál fue el patrón de endemismo dentro de la familia Asteraceae en las islas Galápagos.

Recomendaciones

Incluir a *S. attractyloides* en el estudio de la filogenia del genoma del cloroplasto del género *Scalesia*.

Realizar un árbol de inferencia bayesiana y uno de máxima verosimilitud para comparar los resultados obtenidos.

Plantear un estudio filogenético de los genes más conservados del genoma del cloroplasto.

Desarrollar una investigación en la cual se mantenga el mismo número de poblaciones muestreadas y el mismo número de muestra por población para cada especie de *Scalesia*.

Comparar los especímenes catalogados como híbridos desde la UCPH con los almacenados en el herbario de la Estación Científica Charles Darwin, y contrastar su clasificación como híbridos de acuerdo a caracteres morfológicos utilizando claves taxonómicas.

Utilizar una cobertura más profunda de al menos 30x para las secuencias genómicas y trabajar con las 15 especies de *Scalesia* sin contemplar los especímenes híbridos.

Realizar una filogenia de los especímenes catalogados como híbridos y de las poblaciones híbridas a lo largo del archipiélago.

Incluir pruebas de hibridación en los estudios de filogenia del genoma del cloroplasto.

Bibliografía

- Aldáz, I. (2004). Ecological study, management and conservation of *Scalesia retroflexa* Hemsley (Asteraceae), species in Status Critical (CR), Santa Cruz island, Galápagos. *Lyonia*, 6(2), 25–33.
- Allen, E. E., & Banfield, J. F. (2005). Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:6, 3(6), 489–498. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1157>
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* 2010 11:10, 11(10), 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrg2844>
- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P., & Wenburg, J. K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(11), 613–622. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X)
- Alverson, A. J., Wei, X., Rice, D. W., Stern, D. B., Barry, K., & Palmer, J. D. (2010). Insights into the Evolution of Mitochondrial Genome Size from Complete Sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 27(6), 1436–1448. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSQ029>
- Arbizu, C., Ruess, H., Senalik, D., Simon, P. W., & Spooner, D. M. (2014). Phylogenomics of the carrot genus (*Daucus*, Apiaceae). *American Journal of Botany*, 101(10), 1666–1685. <https://doi.org/10.3732/AJB.1400106>
- Barrett, S. C. H. (1996). The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1341), 725–733. <https://doi.org/10.1098/RSTB.1996.0067>
- Bayat, A. (2002). Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ: British Medical*

Journal, 324(7344), 1018. <https://doi.org/10.1136/BMJ.324.7344.1018>

Benestan, L. M., Ferchaud, A. L., Hohenlohe, P. A., Garner, B. A., Naylor, G. J. P., Baums, I. B., Schwartz, M. K., Kelley, J. L., & Luikart, G. (2016). Conservation genomics of natural and managed populations: building a conceptual and practical framework. *Molecular Ecology*, 25(13), 2967–2977. <https://doi.org/10.1111/MEC.13647>

Bi, Y., Zhang, M. F., Xue, J., Dong, R., Du, Y. P., & Zhang, X. H. (2018). Chloroplast genomic resources for phylogeny and DNA barcoding: a case study on *Fritillaria*. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19591-9>

Birky, C. W. (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), 11331–11338. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.25.11331>

Birky, J. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*, 35, 125–148. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.35.102401.090231>

Bisconti, M., Landini, W., Bianucci, G., Cantalamessa, G., Carnevale, G., Ragaini, L., & Valleri, G. (2001). Biogeographic relationships of the Galapagos terrestrial biota: Parsimony analyses of endemism based on reptiles, land birds and Scalesia land plants. *Journal of Biogeography*, 28(4), 495–510. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00548.x>

Blaschke, J. D., & Sanders, R. W. (2009). Preliminary insights into the phylogeny and speciation of *Scalesia* (Asteraceae), Galápagos Islands. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 3(1). <https://www.jstor.org/stable/41972150>

Carrión-Tacuri, J., Berjano, R., Guerrero, G., Figueroa, E., Tye, A., & Castillo, J. M. (2014). Fruit

set and the diurnal pollinators of the invasive *Lantana camara* and the endemic *Lantana peduncularis* in the Galapagos Islands. *Weed Biology and Management*, 14(3), 209–219.
<https://doi.org/10.1111/WBM.12048>

Carrión-Tacuri, J., Berjano, R., Guerrero, G., Figueroa, M. E., Tye, A., & Castillo, J. M. (2012). Nectar Production by Invasive *Lantana camara* and Endemic *L. peduncularis* in the Galápagos Islands¹. <https://doi.org/10.2984/66.4.2>, 66(4), 435–445.
<https://doi.org/10.2984/66.4.2>

Cerca, J., Petersen, B., Lazaro-Guevara, J. M., Rivera-Colón, A., Birkeland, S., Vizuela, J., Li, S., Li, Q., Loureiro, J., Kosawang, C., Díaz, P. J., Rivas-Torres, G., Fernández-Mazuecos, M., Vargas, P., McCauley, R. A., Petersen, G., Santos-Bay, L., Wales, N., Catchen, J. M., ... Martin, M. D. (2022). The genomic basis of the plant island syndrome in Darwin's giant daisies. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31280-w>

Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1659. <http://www.eng.auburn.edu/department/>

Crawford, D. J., & Archibald, J. K. (2017). Island floras as model systems for studies of plant speciation: Prospects and challenges. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1111/JSE.12234>

Crovello, T. J. (1981). Quantitative biogeography: an overview. *Taxon*, 30(3), 563–575.
<https://doi.org/10.2307/1219938>

DaCosta, J. M., Miller, M. J., Mortensen, J. L., Reed, J. M., Curry, R. L., & Sorenson, M. D. (2019). Phylogenomics clarifies biogeographic and evolutionary history, and conservation status of West Indian tremblers and thrashers (Aves: Mimidae). *Molecular Phylogenetics*

and Evolution, 136, 196–205. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2019.04.016>

Dagan, T. (2011). Phylogenomic networks. *Trends in Microbiology*, 19(10), 483–491.

<https://doi.org/10.1016/J.TIM.2011.07.001>

Dagan, T., & Martin, W. (2007). Ancestral genome sizes specify the minimum rate of lateral gene transfer during prokaryote evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 870–875.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.0606318104>

Daniell, H., Lin, C. S., Yu, M., & Chang, W. J. (2016). Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology* 2016 17:1, 17(1), 1–29.

<https://doi.org/10.1186/S13059-016-1004-2>

De Manuel, M., Kuhlwilm, M., Frandsen, P., Sousa, V. C., Desai, T., Prado-Martinez, J., Hernandez-Rodriguez, J., Dupanloup, I., Lao, O., Hallast, P., Schmidt, J. M., Heredia-Genestar, J. M., Benazzo, A., Barbujani, G., Peter, B. M., Kuderna, L. F. K., Casals, F., Angedakin, S., Arandjelovic, M., ... Marques-Bonet, T. (2016). Chimpanzee genomic diversity reveals ancient admixture with bonobos. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6311), 477–481. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAG2602>

Debray, K., Le Paslier, M.-C., Bérard, A., Thouroude, T., Michel, G., Marie-Magdelaine, J., Bruneau, A., Foucher, F., & Malécot, V. (2021). Unveiling the Patterns of Reticulated Evolutionary Processes with Phylogenomics: Hybridization and Polyploidy in the Genus *Rosa*. *Systematic Biology*. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYAB064>

Dierckxsens, N., Mardulyn, P., & Smits, G. (2017). NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic Acids Research*, 45(4), e18–e18.

<https://doi.org/10.1093/NAR/GKW955>

- Dierckxsens, N., Mardulyn, P., & Smits, G. (2020). Unraveling heteroplasmy patterns with NOVOPlasty. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(1).
<https://doi.org/10.1093/NARGAB/LQZ011>
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLOS ONE*, 7(4), e35071. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035071>
- Dong, W., Xu, C., Wu, P., Cheng, T., Yu, J., Zhou, S., & Hong, D. Y. (2018). Resolving the systematic positions of enigmatic taxa: Manipulating the chloroplast genome data of Saxifragales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 126, 321–330.
<https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2018.04.033>
- dos Santos, A. M., Cabezas, M. P., Tavares, A. I., Xavier, R., & Branco, M. (2016). tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*, 32(4), 627–628.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV636>
- Ellstrand, N. C., Prentice, H. C., & Hancock, J. F. (1999). Gene Flow and Introgression from Domesticated Plants into their Wild Relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 539–563. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.30.1.539>
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368–376.
<https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Feng, S., Bai, M., Rivas-González, I., Li, C., Liu, S., Tong, Y., Yang, H., Chen, G., Xie, D., Sears, K. E., Franco, L. M., Gaitan-Espitia, J. D., Nespolo, R. F., Johnson, W. E., Yang, H., Brandies, P. A., Hogg, C. J., Belov, K., Renfree, M. B., ... Zhang, G. (2022). Incomplete lineage sorting and phenotypic evolution in marsupials. *Cell*, 185(10), 1646-1660.e18.

<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.03.034>

Feng, Y., Comes, H. P., & Qiu, Y. X. (2020). Phylogenomic insights into the temporal-spatial divergence history, evolution of leaf habit and hybridization in *Stachyurus* (Stachyuraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *150*, 106878.

<https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2020.106878>

Fernández-Mazuecos, M., Vargas, P., McCauley, R. A., Monjas, D., Otero, A., Chaves, J. A., Guevara Andino, J. E., & Rivas-Torres, G. (2020). The Radiation of Darwin's Giant Daisies in the Galápagos Islands. *Current Biology*, *30*(24), 4989-4998.e7.

<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.09.019>

Folk, R. A., Mandel, J. R., & Reudenstein, J. V. F. (2017). Ancestral Gene Flow and Parallel Organellar Genome Capture Result in Extreme Phylogenomic Discord in a Lineage of Angiosperms. *Systematic Biology*, *66*(3), 320–337.

<https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYW083>

Freckleton, R. P., Harvey, P. H., & Pagel, M. (2015). Phylogenetic Analysis and Comparative Data: A Test and Review of Evidence. <https://doi.org/10.1086/343873>, *160*(6), 712–726.

<https://doi.org/10.1086/343873>

Frith, M. C., Hamada, M., & Horton, P. (2010). Parameters for accurate genome alignment. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-80/FIGURES/7>

Gautam, P. (2020). Divergent Evolution. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*, 1–8.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_501-1

Gauthier, J., Vincent, A. T., Charette, S. J., & Derome, N. (2019). A brief history of bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, *20*(6), 1981–1996.

<https://doi.org/10.1093/BIB/BBY063>

- Giribet, G. (2015). Morphology should not be forgotten in the era of genomics—a phylogenetic perspective. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 256, 96–103.
<https://doi.org/10.1016/J.JCZ.2015.01.003>
- Grant, P. R. (1996). Speciation and hybridization in island birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1341), 765–772.
<https://doi.org/10.1098/RSTB.1996.0071>
- Hamann, O. (1979). Dynamics of a stand of *Scalesia pedunculata* Hooker fil., Santa Cruz Island, Galápagos. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 78(2), 67–84.
<https://doi.org/10.1111/J.1095-8339.1979.TB02186.X>
- Hamann, O., & Wium- Andersen, S. (1986). *Scalesia gordilloi* sp. nov. (Asteraceae) from the Galápagos Islands, Ecuador. *Nordic Journal of Botany*, 6(1), 35–38.
<https://doi.org/10.1111/J.1756-1051.1986.TB00858.X>
- Havey, M. J., McCreight, J. D., Rhodes, B., & Taurick, G. (1998). Differential transmission of the Cucumis organellar genomes. *Theoretical and Applied Genetics* 1998 97:1, 97(1), 122–128. <https://doi.org/10.1007/S001220050875>
- Jäger, H. (2018). Especies Invasoras: mora. In WWF-Ecuador y FCD (Ed.), *Atlas de Galápagos, Ecuador: Especies Nativas e Invasoras* (pp. 155–181). FCD y WWF-Ecuador.
- Henderson, S., Terence, P., & Whittaker, R. (2006). Progress in invasive plant research. *Progress in Physical Geography*, 1, 1–22.
- Hibbins, M. S., & Hahn, M. W. (2022). Phylogenomic approaches to detecting and characterizing introgression. *Genetics*, 220(2). <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAB173>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2),

518–522. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSX281>

- Hodel, R., Zimmer, E., & Wen, J. (2021). A phylogenomic approach resolves the backbone of *Prunus* (Rosaceae) and identifies signals of hybridization and allopolyploidy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *160*, 107118. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2021.107118>
- Hollingsworth, M. L., Bailey, J. P., Hollingsworth, P. M., & Ferris, C. (1999). Chloroplast DNA variation and hybridization between invasive populations of Japanese knotweed and giant knotweed (*Fallopia*, Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *129*(2), 139–154. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8339.1999.TB00496.X>
- Hörandl, E., & Stuessy, T. F. (2010). Paraphyletic groups as natural units of biological classification. *Taxon*, *59*(6), 1641–1653. <https://doi.org/10.1002/TAX.596001>
- Hosegood, J., Humble, E., Ogden, R., de Bruyn, M., Creer, S., Stevens, G. M. W., Abudaya, M., Bassos-Hull, K., Bonfil, R., Fernando, D., Foote, A. D., Hipperson, H., Jabado, R. W., Kaden, J., Moazzam, M., Peel, L. R., Pollett, S., Ponzio, A., Poortvliet, M., ... Carvalho, G. (2020). Phylogenomics and species delimitation for effective conservation of manta and devil rays. *Molecular Ecology*, *29*(24), 4783–4796. <https://doi.org/10.1111/MEC.15683>
- Hou, H., Ye, H., Wang, Z., Wu, J., Gao, Y., Han, W., Na, D., Sun, G., & Wang, Y. (2020). Demographic history and genetic differentiation of an endemic and endangered *Ulmus lamellosa* (*Ulmus*). *BMC Plant Biology*, *20*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12870-020-02723-7/FIGURES/4>
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(2), 254–267. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSJ030>
- Huxel, G. R. (1999). Rapid displacement of native species by invasive species: effects of

- hybridization. *Biological Conservation*, 89(2), 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(98\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(98)00153-0)
- Itow, S. (1995). Phytogeography and Ecology of *Scalesia* (Compositae) Endemic to the Galapagos Islands! *Pacific Science*, 49, 17–30.
- Jackiw, R. N., Mandil, G., & Hager, H. A. (2015). A framework to guide the conservation of species hybrids based on ethical and ecological considerations. *Conservation Biology*, 29(4), 1040–1051. <https://doi.org/10.1111/COBI.12526>
- Janečka, J. E., Miller, W., Pringle, T. H., Wiens, F., Zitzmann, A., Helgen, K. M., Springer, M. S., & Murphy, W. J. (2007). Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5851), 792–794. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1147555>
- Jaramillo-Díaz, P., Tye, A., & Tapia, W. (2018). Asteráceas endémicas. In W.-E. y FCD (Ed.), *Atlas de Galápagos, Ecuador: Especies Nativas e Invasoras* (pp. 51–58). FCD y WWF-Ecuador.
- Jiao, Y., & Guo, H. (2014). Prehistory of the Angiosperms: Characterization of the Ancient Genomes. *Advances in Botanical Research*, 69, 223–245. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417163-3.00009-3>
- Joly, S., McLenachan, P. A., & Lockhart, P. J. (2009). A statistical approach for distinguishing hybridization and incomplete lineage sorting. *The American Naturalist*, 174(2). <https://doi.org/10.1086/600082>
- Jørgensen, S., & Mauricio, R. (2005). Hybridization as a source of evolutionary novelty: leaf shape in a Hawaiian composite. *Genetica* 2005 123:1, 123(1), 171–179. <https://doi.org/10.1007/S10709-003-2740-2>

- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 2017 14:6, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Katoh, K., Asimenos, G., & Toh, H. (2009). Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT. *Methods in Molecular Biology*, 537, 39–64. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_3
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKF436>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2014). MAFFT: Iterative Refinement and Additional Methods. *Methods in Molecular Biology*, 1079, 131–146. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_8
- Kaur, P., Banga, S., Kumar, N., Gupta, S., Akhtar, J., & Banga, S. S. (2014). Polyphyletic origin of Brassica juncea with B. rapa and B. nigra (Brassicaceae) participating as cytoplasm donor parents in independent hybridization events. *American Journal of Botany*, 101(7), 1157–1166. <https://doi.org/10.3732/AJB.1400232>
- Kelager, A., & Philipp, M. (2008). Hybridization in Scalesia (Asteraceae): Adding complexity to a problematic genus. *Journal of Pending Biological Tales*, 3, 1–35.
- Larrañaga, P., Calvo, B., Santana, R., Bielza, C., Galdiano, J., Inza, I., Lozano, J. A., Armañanzas, R., Santafé, G., Pérez, A., & Robles, V. (2006). Machine learning in bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, 7(1), 86–112. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBK007>
- Lee, M. S. Y., & Palci, A. (2015). Morphological Phylogenetics in the Genomic Age. *Current Biology*, 25(19), R922–R929. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.07.009>

- Li, W., Liu, Y., Yang, Y., Xie, X., Lu, Y., Yang, Z., Jin, X., Dong, W., & Suo, Z. (2018). Interspecific chloroplast genome sequence diversity and genomic resources in Diospyros. *BMC Plant Biology*, 18(1), 210. <https://doi.org/10.1186/S12870-018-1421-3/FIGURES/6>
- Lindhardt, M. (2006). *Reproductive biology and putative interspecific hybridisation between selected species of Scalesia on Santa Cruz, Galápagos: A study of Scalesia crockeri, S. pedunculata and S. aspera* (Issue May). University of Copenhagen.
- Lindhardt, M. S., Philipp, M., Tye, A., & Nielsen, L. R. (2009). Molecular, Morphological, and Experimental Evidence for Hybridization between Threatened Species of the Galapagos Endemic Genus Scalesia (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences*, 170(8), 1019–1030. <https://doi.org/10.1086/605113>
- Liston, A., Weitemier, K. A., Letelier, L., Podani, J., Zong, Y., Liu, L., & Dickinson, T. A. (2021). Phylogeny of crataegus (Rosaceae) based on 257 nuclear loci and chloroplast genomes: Evaluating the impact of hybridization. *PeerJ*, 9, e12418. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.12418/SUPP-8>
- Lomolino, M. V. (2000). A call for a new paradigm of island biogeography. *Global Ecology and Biogeography*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2699.2000.00185.X>
- Maddison, W., & Knowles, L. (2006). Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. *Systematic Biology*, 55(1), 21–30. <https://doi.org/10.1080/10635150500354928>
- Marques, D. A., Meier, J. I., & Seehausen, O. (2019). A Combinatorial View on Speciation and Adaptive Radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(6), 531–544. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2019.02.008>
- Mauchamp, A., Aldaz, I., Ortiz, E., & Valdebenito, H. (1997). Threatened species, a re-evaluation of the status of eight endemic plants of the Galapagos. *Biodiversity and*

Conservation, 7(1), 97–107. <https://doi.org/10.1023/A:1008863814027>

McMullen, C. (1990). Reproductive biology of Galápagos Islands angiosperms. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 32, 35–45.

McMullen, C. K. (1987). Breeding systems of selected Galapagos Islands angiosperms. *American Journal of Botany*, 74(11), 1694–1705. <https://doi.org/10.1002/J.1537-2197.1987.TB08770.X>

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., & Teeling, E. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAA015>

Myers, A. A., & Giller, P. S. (1988). Process, pattern and scale in biogeography. *Analytical Biogeography*, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1199-4_1

Nevo, E. (2001). Genetic Diversity. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 662–677. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00065-4>

Nielsen, L. R. (2004). Molecular differentiation within and among island populations of the endemic plant *Scalesia affinis* (Asteraceae) from the Galápagos Islands. *Heredity*, 93(5), 434–442. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800520>

Nielsen, L. R., Cowan, R. S., Siegismund, H. R., Adersen, H., Philipp, M., & Fay, M. F. (2003). Morphometric, AFLP and plastid microsatellite variation in populations of *Scalesia divisa* and *S. incisa* (Asteraceae) from the Galápagos Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 143(3), 243–254. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00221.x>

Nixon, K., & Carpenter, J. (1993). On Outgroups. *Cladistics*, 9(4), 413–426. <https://doi.org/10.1006/CLAD.1993.1028>

- Paradis, E. (2018). Analysis of haplotype networks: The randomized minimum spanning tree method. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(5), 1308–1317. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12969>
- Philippe, H., Brinkmann, H., Lavrov, D. V., Littlewood, D. T. J., Manuel, M., Wörheide, G., & Baurain, D. (2011). Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough. *PLoS Biology*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000602>
- Plaza Onate, F., Batto, J. M., Juste, C., Fadlallah, J., Fougeroux, C., Gouas, D., Pons, N., Kennedy, S., Levenez, F., Dore, J., Ehrlich, S. D., Gorochoy, G., & Larsen, M. (2015). Quality control of microbiota metagenomics by k-mer analysis. *BMC Genomics*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1406-7/FIGURES/4>
- Pollard, D. A., Iyer, V. N., Moses, A. M., & Eisen, M. B. (2006). Widespread Discordance of Gene Trees with Species Tree in *Drosophila*: Evidence for Incomplete Lineage Sorting. *PLOS Genetics*, 2(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.0020173>
- Rieseberg, L. H., & Brouillet, L. (1994). Are many plant species paraphyletic? *Taxon*, 43(1), 21–32. <https://doi.org/10.2307/1223457>
- Rieseberg, L. H., & Soltis, D. E. (1991). Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*, 5(1), 65–84.
- Rogalski, M., Vieira, L. D. N., Fraga, H. P., & Guerra, M. P. (2015). Plastid genomics in horticultural species: Importance and applications for plant population genetics, evolution, and biotechnology. *Frontiers in Plant Science*, 6(JULY), 586. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00586/BIBTEX>
- Rokas, A., & Carroll, S. B. (2005). More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Molecular Biology and Evolution*,

22(5), 1337–1344. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSI121>

Rønsted, N., Law, S., Thornton, H., Fay, M. F., & Chase, M. W. (2005). Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(3), 509–527. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2004.12.023>

Rounsley, S., Lin, X., & Ketchum, K. A. (1998). Large-scale sequencing of plant genomes. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(2), 136–141. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80015-0)

Roy, R. S., Bhattacharya, D., & Schliep, A. (2014). Turtle: Identifying frequent k -mers with cache-efficient algorithms. *Bioinformatics*, 30(14), 1950–1957. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU132>

Schaal, B. A., Gaskin, J. F., & Caicedo, A. L. (2003). Phylogeography, Haplotype Trees, and Invasive Plant Species. *Journal of Heredity*, 94(3), 197–204. <https://doi.org/10.1093/jhered/esg060>

Schaefer, N. K., Shapiro, B., & Green, R. E. (2017). AD-LIBS: Inferring ancestry across hybrid genomes using low-coverage sequence data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S12859-017-1613-0/TABLES/8>

Schenk, J. J. (2021). The next generation of adaptive radiation studies in plants. *International Journal of Plant Sciences*, 182(4), 245–262. <https://doi.org/10.1086/713445/ASSET/IMAGES/LARGE/FG2.JPEG>

Schilling, E. E., Panero, J. L., & Eliasson, U. H. (1994). Evidence from chloroplast DNA restriction site analysis on the relationships of *Scalesia* (Asteraceae: Heliantheae). *American Journal of Botany*, 81(2), 248–254. <https://doi.org/10.1002/J.1537->

2197.1994.TB15436.X

Scotland, R. W., Olmstead, R. G., & Bennett, J. R. (2003). Phylogeny Reconstruction: The Role of Morphology. *Systematic Biology*, 52(4), 539–548. <https://www.jstor.org/stable/3651141>

Simberloff, D. S. (2003). Equilibrium Theory of Island Biogeography and Ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5(1), 161–182.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ES.05.110174.001113>

Simberloff, D. S., & Abele, L. G. (1976). Island biogeography theory and conservation practice. *Science*, 191(4224), 285–286.

<https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.193.4257.1027>

Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.043008.092039>

Song, Y., Zhao, W., Xu, J., Li, M. F., & Zhang, Y. (2022). Chloroplast Genome Evolution and Species Identification of *Styrax* (Styracaceae). *BioMed Research International*, 2022.

<https://doi.org/10.1155/2022/5364094>

Sousa, F., Civián, P., Foster, P. G., & Cox, C. J. (2020). The Chloroplast Land Plant Phylogeny: Analyses Employing Better-Fitting Tree- and Site-Heterogeneous Composition Models.

Frontiers in Plant Science, 11, 1062. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.01062/BIBTEX>

Stöcklin, J. (2009). Darwin and the Plants of the Galápagos-Islands. *Bauhinia*, 21, 33–48.

https://www.zobodat.at/pdf/Bauhinia_21_0033-0048.pdf

Supple, M. A., & Shapiro, B. (2018). Conservation of biodiversity in the genomics era. *Genome Biology*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13059-018-1520-3/FIGURES/4>

- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(30), 11030–11035.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0404206101>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027.
<https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120>
- Toews, D. P. L., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, *21*(16), 3907–3930.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2012.05664.X>
- Tye, A., Soria, M. C., & Gardener, M. R. (1999). A strategy for Galapagos weeds. In *Turning the tide: the eradication of invasive species* (pp. 336–341).
- Wang, M., Zhang, L., Zhang, Z., Li, M., Wang, D., Zhang, X., Xi, Z., Keefover-Ring, K., Smart, L. B., DiFazio, S. P., Olson, M. S., Yin, T., Liu, J., & Ma, T. (2020). Phylogenomics of the genus *Populus* reveals extensive interspecific gene flow and balancing selection. *New Phytologist*, *225*(3), 1370–1382. <https://doi.org/10.1111/NPH.16215>
- Wang, W., Schalamun, M., Morales-Suarez, A., Kainer, D., Schwessinger, B., & Lanfear, R. (2018). Assembly of chloroplast genomes with long- and short-read data: a comparison of approaches using *Eucalyptus pauciflora* as a test case. *BMC Genomics*, *19*(1).
<https://doi.org/10.1186/S12864-018-5348-8>
- Wang, Y., Wang, S., Liu, Y., Yuan, Q., Sun, J., & Guo, L. (2021). Chloroplast genome variation and phylogenetic relationships of *Atractylodes* species. *BMC Genomics*, *22*(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/S12864-021-07394-8/TABLES/4>

- Weeks, A., & Tye, A. (2009). Phylogeography of palo santo trees (*Bursera graveolens* and *Bursera malacophylla*; Burseraceae) in the Galápagos archipelago. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(4), 396–410. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.01008.x>
- Wendel, J. F., & Percy, R. G. (1990). Allozyme diversity and introgression in the Galapagos Islands endemic *Gossypium darwinii* and its relationship to continental *G. barbadense*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18(7–8), 517–528. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(90\)90123-W](https://doi.org/10.1016/0305-1978(90)90123-W)
- Wilberg, E. W. (2015). What's in an Outgroup? The Impact of Outgroup Choice on the Phylogenetic Position of Thalattosuchia (Crocodylomorpha) and the Origin of Crocodyliformes. *Systematic Biology*, 64(4), 621–637. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYV020>
- Xiong, A. S., Peng, R. H., Zhuang, J., Gao, F., Zhu, B., Fu, X. Y., Xue, Y., Jin, X. F., Tian, Y. S., Zhao, W., & Yao, Q. H. (2009). Gene duplication, transfer, and evolution in the chloroplast genome. *Biotechnology Advances*, 27(4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2009.01.012>
- Xu, J., Shen, X., Liao, B., Xu, J., & Hou, D. (2020). Comparing and phylogenetic analysis chloroplast genome of three *Achyranthes* species. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67679-y>
- Yu, G., Lam, T. T. Y., Zhu, H., & Guan, Y. (2018). Two Methods for Mapping and Visualizing Associated Data on Phylogeny Using Ggtree. *Molecular Biology and Evolution*, 35(12), 3041–3043. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY194>
- Zhang, Y. J., & Li, D. Z. (2010). Advances in Phylogenomics Based on Complete Chloroplast Genomes. *Plant Diversity and Resources*, 33(4), 365–375.

Zhao, Y., Pan, B., & Zhang, M. (2019). Phylogeography and conservation genetics of the endangered *Tugarinovia mongolica* (Asteraceae) from Inner Mongolia, Northwest China. *PLOS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0211696>

Apéndices