



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA  
INDOAMÉRICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**

**CARRERA DE BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS**

**TEMA:**

---

**EVIDENCIA GENÉTICA DE HIBRIDACIÓN NATURAL ENTRE  
*STENOMESSON AURANTIAECUM* Y *PHAEDRANASSA DUBIA*  
(AMARYLLIDACEAE)**

---

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos

**Autor(a)**

Sánchez Lara Enmily Dayanna

**Tutor(a)**

Ph.D. Oleas Gallo Nora Helena

QUITO – ECUADOR

2020

**AUTORIZACIÓN POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA,  
REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA  
DEL TRABAJO DE TÍTULACIÓN**

Yo, Sánchez Lara Enmily Dayanna, declaro ser autor del Trabajo de Titulación con el nombre **“Evidencia genética de hibridación natural entre *Stenomesson aurantiacum* y *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae)”**, como requisito para optar al grado de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos, y autorizo al Sistema de Bibliotecas de la Universidad Tecnológica Indoamérica, para que con fines netamente académicos divulgue esta obra a través del Repositorio Digital Institucional (RDI-UTI).

Los usuarios del RDI-UTI podrán consultar el contenido de este trabajo en las redes de información del país y del exterior, con las cuales la Universidad tenga convenios. La Universidad Tecnológica Indoamérica no se hace responsable por el plagio o copia del contenido parcial o total de este trabajo.

Del mismo modo, acepto que los Derechos de Autor, Morales y Patrimoniales, sobre esta obra, serán compartidos entre mi persona y la Universidad Tecnológica Indoamérica, y que no tramitaré la publicación de esta obra en ningún otro medio, sin autorización expresa de la misma. En caso de que exista el potencial de generación de beneficios económicos o patentes, producto de este trabajo, acepto que se deberán firmar convenios específicos adicionales, donde se acuerden los términos de adjudicación de dichos beneficios.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Quito, a los 27 días del mes de agosto de 2020, firmo conforme:

Autor: Sánchez Lara Enmily Dayanna

Firma: 

Número de Cédula: 1716475650.

Dirección: Pichincha, Quito, Calderón, Urbanización San José de Morán.

Correo Electrónico: emiisanchez646@gmail.com.

Teléfono: 0984906121.

## APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “EVIDENCIA GENÉTICA DE HIBRIDACIÓN NATURAL ENTRE *STENOMESSION AURANTIACUM* Y *PHAEDRANASSA DUBIA* (AMARYLLIDACEAE)”, presentado por Enmily Dayanna Sánchez Lara, para optar por el Título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos,

### CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Quito, 27 de agosto de 2020



“Evidencia genética de hibridación natural entre *Stenomesson aurantiacum* y *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae)”, Nora Helena Oleas Gallo, PhD.

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Quien suscribe, declaro que los contenidos y los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, como requerimiento previo para la obtención del Título de Ingeniero (a) en Biodiversidad y recursos Genéticos, son absolutamente originales, auténticos y personales y de exclusiva responsabilidad legal y académica del autor.

Quito, 27 de agosto de 2020



Enmily Dayanna Sánchez Lara

1716475650

## APROBACIÓN TRIBUNAL

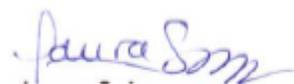
El trabajo de Titulación, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, sobre el Tema: “EVIDENCIA GENÉTICA DE HIBRIDACIÓN NATURAL ENTRE *STENOMESSION AURANTIACUM* Y *PHAEDRANASSA DUBIA* (AMARYLLIDACEAE)”, previo a la obtención del Título de Ingeniero (a) en Biodiversidad y Recursos Genéticos, reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la sustentación del trabajo de titulación.

Quito, 12 de octubre de 2020



Mónica Isabel Páez-Vacas, Ph.D.

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



Laura Inés Salazar Cotugno, Ph.D.

**VOCAL**



María José Endara, Ph.D.

**VOCAL**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi eterno ser de luz, quien me enseñó a ponerle una sonrisa a cada situación, y desde el cielo me recuerda que soy capaz de todo, a ti, tío Beto. A las mujeres de mi vida, mi abue y mi mamita, compañera de aventuras y mi cómplice, quien me motiva y me levanta siempre, te amo mami.

A cada persona especial que me acompañó en el andar, aquellos que fueron testigos del esfuerzo y el anhelo con el que cumplía cada meta de mi vida universitaria, ¡sí, a todos ustedes!

## **AGRADECIMIENTO**

Le doy gracias a Dios, por escucharme siempre y ser mi fuerza en momentos difíciles, quien me otorgó sabiduría y constancia para alcanzar cada logro. A mis queridos docentes quienes con todo el amor y la paciencia supieron compartir su conocimiento y experiencia. A Nora, mi tutora de tesis, por creer en mi capacidad y sembrar en mí, la semilla del amor por la botánica. A Dianita Flores, mentora durante la fase de laboratorio de mi tesis. A Pao Peña por su gentileza y disposición por ayudarme siempre. A Pablo Sandoval por ser parte del procesamiento de coordenadas para la elaboración de mapas. A mi mejor amiga, Mika, por las largas charlas y el aliento en cada madrugada mientras estudiaba.

¡Gracias a la ciencia!, que me permitió descubrir una versión de mí que no sabía que existía y que ahora me encanta.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
AUTORIZACIÓN PARA EL REPOSITORIO DIGITAL.....	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iv
APROBACIÓN TRIBUNAL.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. CONSECUENCIAS DE LA HIBRIDACIÓN.....	2
1.1.1. Vigor híbrido.....	2
1.1.2. Especiación.....	3
1.1.2.1. Mecanismos de especiación.....	3
1.1.2.1.1. Hibridación en alopatría o simpatría.....	3
1.1.2.1.2. Poliploidía.....	4
1.1.3. Introgresión.....	5
1.1.4. Depresión endogámica.....	5

1.2. CAUSAS DE LA HIBRIDACIÓN.....	6
1.2.1. Polinización.....	6
1.2.2. Cambio climático.....	7
1.2.3. Perturbaciones naturales y antropogénicas.....	8
1.2.4. Introducción de especies exóticas.....	8
1.3. HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS.....	9
1.3.1. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).....	11
1.3.2. Polimorfismo de fragmentos obtenidos por amplificación (AFLP).....	11
1.3.3. Microsatélites (SSR).....	12
1.4. REPORTE DE HIBRIDACIÓN EN EL ECUADOR.....	13
1.5. FAMILIA AMARYLLIDACEAE.....	14
1.5.1. <i>Stenomesson</i> .....	16
1.5.2. <i>Phaedranassa</i> .....	17
1.6. RELACIONES FILOGENÉTICAS EN AMARYLLIDACEAE.....	17
1.7. ¿OCURRE HIBRIDACIÓN EN LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE?.....	20
1.8. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	20
1.9. OBJETIVO GENERAL.....	22
1.10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22

## CAPÍTULO II

<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>23</b>
2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES.....	23
2.1.1. <i>Phaedranassa dubia</i> .....	23
2.1.2. <i>Phaedranassa viridiflora</i> .....	25
2.1.3. <i>Stenomesson aurantiacum</i> .....	28
2.2. ÁREA DE ESTUDIO.....	30
2.3. ANÁLISIS GENÉTICOS.....	33
2.3.1. Colecta y secado de muestras.....	33

2.3.2. Extracción de ADN.....	36
2.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	36
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	37
2.5. CONTRIBUCIÓN A LA CONSERVACIÓN.....	38

### **CAPÍTULO III**

<b>3. RESULTADOS ESPERADOS.....</b>	<b>40</b>
3.1. EXPOSICIÓN DE RESULTADOS ESPERADOS.....	40
3.2. IMPLICACIONES.....	41
3.3. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES .....	42
3.4. PRESUPUESTO DEL PROYECTO.....	43

### **CAPÍTULO IV**

<b>4. RESULTADOS PRELIMINARES Y PRÓXIMOS PASOS.....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Programas, proyectos, objetivos y actividades a desarrollar en la Reserva Geobotánica Pululahua.....	39
<b>Tabla 2.</b> Cronograma de actividades.....	42
<b>Tabla 3.</b> Cronograma de presupuesto por cada actividad y proyecto .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alcaloides aislados en la familia Amaryllidaceae.....	15
<b>Figura 2.</b> Mapa de distribución geográfica del género <i>Phaedranassa</i> en el Ecuador.....	18
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético de la familia Amaryllidaceae.....	19
<b>Figura 4.</b> Mapa de distribución geográfica de <i>Phaedranassa dubia</i> .....	24
<b>Figura 5.</b> <i>Phaedranassa dubia</i> .....	25
<b>Figura 6.</b> Mapa de distribución geográfica de <i>Phaedranassa viridiflora</i> .....	27
<b>Figura 7.</b> <i>Phaedranassa viridiflora</i> .....	28
<b>Figura 8.</b> Mapa de distribución geográfica de <i>Stenomesson aurantiacum</i> .....	29
<b>Figura 9.</b> <i>Stenomesson aurantiacum</i> .....	30
<b>Figura 10.</b> Cráter del Pululahua, norte del Ecuador.....	31
<b>Figura 11.</b> Ubicación del área de estudio: Reserva Geobotánica Pululahua .....	32
<b>Figura 12.</b> Germinación de semillas resultantes de los cruces entre <i>P. dubia</i> y <i>S. aurantiacum</i> .....	34
<b>Figura 13.</b> Individuos resultantes de los cruces entre <i>P. dubia</i> x <i>S. aurantiacum</i> .....	35
<b>Figura 14.</b> Diagrama de relación entre objetivos específicos, metodología y resultados esperados.....	40
<b>Figura 15.</b> Análisis bayesiano de grupos genéticos.....	44

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS**  
**GENÉTICOS**

**TEMA: “EVIDENCIA GENÉTICA DE HIBRIDACIÓN NATURAL ENTRE *STENOMESSION AURANTIACUM* Y *PHAEDRANASSA DUBIA* (AMARYLLIDACEAE)”**

**AUTOR:** Enmily Dayanna Sánchez Lara.

**TUTOR:** Nora Helena Oleas Gallo, PhD.

**RESUMEN EJECUTIVO**

La hibridación es un proceso natural que ocurre cuando individuos de dos taxa diferentes se cruzan e intercambian material genético. Este proceso no es raro entre especies y ha llevado a la especiación en diferentes grupos de plantas. Sin embargo, hay pocos reportes de hibridación entre géneros. La evidencia de la biología reproductiva sugiere que *Stenomesson aurantiacum* y *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) hibridan naturalmente en el cráter del Pululahua, al norte de Ecuador. El objetivo de esta propuesta es determinar la existencia de hibridación entre ambos géneros, usando datos genéticos. Para ello, se amplificarán once cebadores de microsatélites para un total de 96 individuos. Los resultados del genotipado se analizarán por electroforesis y los alelos se identificarán usando el programa Geneious. Se estimarán las estadísticas descriptivas con el software GenAlex y se asignarán a los individuos en grupos genéticos usando el software Structure. Esperamos encontrar evidencia de la existencia de flujo genético entre los dos géneros, y que nuestros resultados proporcionen una mejor comprensión de su hibridación natural.

**DESCRIPTORES:** Amaryllidaceae, conservación, hibridación, microsatélites, Pululahua.

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS**  
**GENÉTICOS**

**THEME: “GENETIC EVIDENCE OF NATURAL HYBRIDIZATION  
BETWEEN *STENOMESSION AURANTIACUM* AND *PHAEDRANASSA DUBIA*  
(AMARYLLIDACEAE)”**

**AUTHOR:** Enmily Dayanna Sánchez Lara.

**TUTOR:** Nora Helena Oleas Gallo, PhD.

**ABSTRACT**

Hybridization is a natural process that occurs when individuals from two different taxa interbreed and exchange genetic material. This process is not uncommon between species and has led to speciation in different groups of plants. However, there are few reports of hybridization between genera. Evidence from reproductive biology suggests that *Stenomesson aurantiacum* and *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) hybridize naturally at the Pululahua crater, in northern Ecuador. The objective of this proposal is to design a study to gather genetic evidence of hybridization between both genera, using genetic data. For this, eleven microsatellite primers will be amplified for a total of 96 individuals. Genotyping results will be analyzed by electrophoresis and alleles will be identified using the Geneious program. Descriptive statistics will be estimated with GenAlex software and individuals will be assigned into genetic groups using Structure software. We hope to find evidence of the existence of gene flow between the two genera, and that our results provide a better understanding of their natural hybridization.

**KEYWORDS:** Amaryllidaceae, conservation, hybridization, microsatellite, Pululahua.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

La hibridación es un proceso que implica el cruzamiento entre individuos de dos poblaciones genéticamente diferentes (Harrison, 1993; Fitzpatrick et al., 2015). Históricamente, el primer caso de hibridación fue reportado por el reverendo Cotton Mather en 1716, al describir variedades de plantas de maíz (*Zea mays*) y de calabaza (*Cucurbita* spp.) como híbridos (Goulet et al., 2017). Este fenómeno natural ha dado origen a nuevas especies, principalmente de plantas. Se conoce que, aproximadamente el 25% de las especies de flora producen híbridos (Mallet, 2005), mientras que, en animales ocurre hibridación en un 6 a 10% de las especies (Chen et al., 2018).

La hibridación es un evento evolutivo importante en la biología de plantas, pues desencadena procesos de adaptación, especiación, radiación adaptativa, e incluso aumenta la diversidad de fenotipos, lo cual es aprovechado en sectores agrícolas y hortícolas (Mitchell et al., 2019). Sin embargo, la hibridación puede representar problemas para las poblaciones de origen, como la invasión biológica, pérdida de diversidad genética y fenotípica, competencia e inclusive puede llevar a la extinción de ciertas especies (Campbell et al., 2019). A continuación, se presentarán algunas consecuencias que desencadena la hibridación como mecanismo evolutivo.

## **1.1. Consecuencias de la hibridación**

Además de los procesos anteriormente mencionados como consecuencias de la hibridación, se han observado características fenotípicas que diferencian a los híbridos y sus progenitores (Rothfels et al., 2015). Se sabe que estas características responden a fenómenos naturales, como el vigor híbrido, especiación híbrida, introgresión adaptativa y depresión endogámica (Abbott et al., 2016), de los cuales se hablará a continuación.

### **1.1.1. Vigor híbrido**

El vigor híbrido o heterosis, es un fenómeno que describe a los híbridos con un mayor valor adaptativo o mejor aptitud física en comparación con sus progenitores, y generalmente ocurre en la primera generación de descendientes (Hochholdinger y Baldauf, 2018). La primera persona en observar este fenómeno fue el botánico alemán Joseph Kolreuter en 1763, quien realizó cruces entre dos variedades de plantas de tabaco, y reportó que la estatura de los híbridos era superior a la de sus progenitores (Hochholdinger y Baldauf, 2018). Darwin (1877) aseguró que las plantas híbridas tienen “mayor altura, peso y fertilidad”, es decir que pueden tener mayor biomasa en la adultez y una tasa de crecimiento más rápida que sus progenitores (Hochholdinger y Baldauf, 2018; Goulet et al., 2017).

Investigaciones posteriores demostraron que los individuos heterocigotos son los que generalmente presentan rasgos superiores a sus progenitores, esto involucra un mayor tamaño, fertilidad, resistencia, entre otros (Smith y Lee, 2018).

En particular, se ha estudiado ampliamente el efecto del vigor híbrido en el maíz, en donde se identificó un incremento notorio en la aptitud y rendimiento de los híbridos a diferencia de los parentales (Shull, 1908). Las características que presentan los híbridos con respecto a sus progenitores son de gran interés, sobre todo en el sector comercial agrícola, el cual desde hace seis décadas realiza mejoramiento genético en cultivos de maíz tomando como base la heterosis (Smith y Lee, 2018).

### **1.1.2. Especiación**

La especiación se refiere a una serie de mecanismos evolutivos por el que un linaje diverge, dando lugar a nuevas especies genéticamente diferentes y con aislamiento reproductivo (Mallet, 2007; Soltis y Soltis, 2009). Los mecanismos que promueven la especiación en plantas son dos, uno de ellos es la hibridación en alopatría o simpatría y el otro, la poliploidía (Alcántar-Vázquez, 2014).

#### **1.1.2.1. Mecanismos de Especiación**

##### **1.1.2.1.1. Hibridación en alopatría o simpatría**

Sabiendo que, las plantas son organismos con ambos sexos en un mismo individuo, presentan la capacidad de autofecundarse por reproducción sexual o asexual, hecho que genera la aparición de nueva descendencia con variabilidad genética y reproductivamente aislada (Coyne y Orr, 2004).

La hibridación en alopatría o simpatría es común en poblaciones vegetales, las especies entran en contacto, intercambian material genético y se hibridan; dependiendo del éxito reproductivo y viabilidad de los híbridos, estos pueden ser reconocidos como una nueva especie (Perfectti, 2002). Dicha afirmación concuerda con un estudio en poblaciones alopátricas y simpátricas de *Fuchsia microphylla* y *Fuchsia thymifolia* de la familia Onagraceae en México, que registra la existencia de híbridos viables entre las dos poblaciones, los que posteriormente fueron evaluados bajo ciertos criterios para ser reconocidos como una nueva especie (Cervantes-Díaz, 2016).

#### **1.1.2.1.2. Poliploidía**

Por otro lado, la especiación por hibridación puede tomar dos caminos: el primero se refiere a una especiación homoploide, que implica un nuevo linaje híbrido sin un cambio en el número de cromosomas, lo cual es muy poco frecuente, como se demostró en *Helianthus anomalus*, de la familia Asteraceae (García, 2012). Mientras que, en el segundo, la especiación poliploide se basa en un incremento del tamaño del genoma debido a la presencia de tres o más juegos de cromosomas (Hegarty y Hiscock, 2005, en este caso, la poliploidía se presenta después de la hibridación como en *Aegilops speltoides*, de la familia Poaceae (Alix et al., 2017). Se ha detectado que, alrededor del 70% de angiospermas y el 95% de arbustos han pasado por eventos de poliploidía en su historia natural (Alcántar-Vázquez, 2014).

### **1.1.3. Introgresión**

La introgresión se refiere a la transferencia de genes de una población a otra a través de hibridación, esto resulta en una progenie fértil que se continúa cruzando con sus progenitores. Cuando la descendencia es estéril, quiere decir que no ha ocurrido introgresión (Suarez-Gonzalez et al., 2018). Se habla de introgresión adaptativa cuando los alelos que pasaron por introgresión se mantienen a través del tiempo por selección natural (Goulet et al., 2017; Suarez-Gonzalez et al., 2018).

La introgresión puede llegar hasta cierto punto, en donde el flujo genético de las especies se ve limitado debido a la existencia de ciertas barreras (físicas, morfológicas, genotípicas, entre otras), las mismas que afectan directamente al cruzamiento y reproducción de las especies, varios autores se refieren a esto como el “límite de las especies” (Harrison y Larson, 2014). Al mismo tiempo, la introgresión a través de la hibridación permite contribuir con nuevas combinaciones de alelos y fenotipos que no están presentes en los progenitores, a esto se le denomina “fenotipos transgresivos” (Barton, 2013).

### **1.1.4. Depresión endogámica**

Ocurre cuando los híbridos tienen menor valor adaptativo que sus progenitores, es decir, se ve una reducción en el *fitness* o rendimiento de los descendientes, que a la larga puede promover la pérdida de adaptación y una posible extinción (Tallmon et al., 2004). Este suceso es más común tras varias generaciones de entrecruzamiento (Edmands, 2007). No obstante, se ha visto que después de un

evento de hibridación al inicio puede haber depresión endogámica, pero con el pasar del tiempo los híbridos pueden aumentar su valor adaptativo (Pantoja et al., 2018).

En un estudio sobre la evaluación de la aptitud de los híbridos resultantes de cruces dentro y entre poblaciones pequeñas y aisladas de la planta *Primula vulgaris*, como parte de un programa de reintroducción y rescate genético, se encontró que existen altos valores de depresión endogámica y una alta aptitud física en todos los híbridos descendientes. Con base en estos resultados, concluyeron que la depresión endogámica podría contrarrestar los efectos positivos del rescate genético durante los primeros años de vida. Sin embargo, es necesario evaluar posteriormente otros caracteres relacionados con la reproducción, supervivencia y el crecimiento en la descendencia híbrida (Barmantlo et al., 2018).

## **1.2. Causas de la hibridación**

### **1.2.1. Polinización**

Las plantas que son polinizadas mediante mecanismos naturales sin control externo, reciben polen de fuentes desconocidas, incrementando así la variabilidad genética de la descendencia (Nie et al., 2005). Dicho esto, los polinizadores ejercen un papel fundamental en la hibridación de taxones (Yang et al., 2019), al ser generalistas, comparten y visitan diferentes especies aumentando la probabilidad de eventos de hibridación, lo que se conoce como “síndrome de polinización generalista” (Yu et al., 2014). Este es el caso de especies del género *Ligularia* (Yu et al., 2014), del género *Roscoea* (*R. humeana* x *R. cautleoides*) y *Primula* (*P. secundiflora* x *P.*

*poissonii*) que han hibridado tras ser polinizadas por los mismos insectos (Du et al., 2012).

Por otra parte, la hipótesis planteada por Darwin (1877), enuncia que las flores estériles atraen a más polinizadores. Esto se ha corroborado con estudios de biología reproductiva de *Leopoldia comosa*, una hierba nativa de Europa Central y Asia (Morales et al., 2012), en donde las flores estériles atraen a más polinizadores, evitando la geitonogamia (polen de una flor masculina que fertiliza a una flor femenina de la misma planta). Esto se debe a que las abejas no tienen preferencia por el fenotipo más común, en este caso, las flores fértiles, lo cual se demostró con estudios de ecología (Morales et al., 2012).

### **1.2.2. Cambio climático**

Otro mecanismo que promueve la hibridación es el cambio del clima y su efecto en varias especies de plantas y animales. Se ha visto que las especies responden al cambio climático con modificaciones en su distribución y rango geográfico, lo cual promueve a que las especies tengan contacto con sus congéneres, aumentando el potencial de hibridación (Todesco et al., 2016). Este fenómeno se ha reportado en las montañas de Sierra Nevada, al sureste de España, con un cambio en la distribución geográfica del 7% de las 24000 especies de plantas vasculares. A su vez, se identificó que alrededor del 25% de las especies endémicas de zonas altas pasan por procesos de hibridación con sus congéneres de zonas bajas, pues estas últimas se están adaptando a una mayor altitud (Gómez et al., 2015).

### **1.2.3. Perturbaciones naturales y antropogénicas**

Algunos autores coinciden en que un disturbio o perturbación, ya sea natural u ocasionado por el ser humano, es uno de los factores importantes que promueven la hibridación natural (Yang et al., 2019). De hecho, la gran diversidad biológica es atribuida al efecto de las perturbaciones antropogénicas (fragmentación del hábitat, sobreexplotación, deforestación, entre otros) en sinergia con las perturbaciones naturales (erupciones volcánicas, incendios, impacto de asteroides, cambio climático, entre otros), las cuales han estado presentes a lo largo de la historia (Yang et al., 2019). No obstante, las perturbaciones aumentan también la probabilidad de hibridación e incrementan la variabilidad genética por la alteración en la fenología de las plantas, lo que provoca cambios en la época de floración de las plantas, disminución en la formación de botones, reducción en la producción de frutos y semillas, cambios en el desarrollo y en la reproducción por medio de polinizadores (Aizen, 2007). También, se crean nuevos nichos o zonas híbridas, que son lugares entre dos poblaciones genéticamente distintas donde coexisten especies que se hibridan sin cruzarse con sus parentales (Abbott, 2017).

### **1.2.4. Introducción de especies exóticas**

Se ha demostrado que la introducción de especies no nativas dentro de una población, junto con otros factores como la polinización, perturbaciones antropogénicas, alteración del hábitat y cambio climático, pueden resultar en eventos de hibridación entre especies nativas e introducidas (Pliszko y Zalewska-Gałosz, 2016). Por consiguiente, si los híbridos se adaptan mejor y tienen un mayor

éxito reproductivo, estos podrían desplazar e incluso eliminar a las poblaciones originales, provocando así la pérdida de diversidad genética y pérdida de las especies raras o amenazadas de la región (Catford et al., 2018). Sin embargo, los efectos de la hibridación dependen de las características de las especies exóticas (como su densidad), y de la región receptora (como la capacidad de carga y la capacidad de las especies nativas para competir) (Kahilainen et al., 2011; Michelan et al., 2018). De acuerdo con Allendorf et al. (2001), se puede evidenciar tres modelos de hibridación entre especies nativas y exóticas: hibridación sin introgresión (cruzamiento que generalmente resulta en híbridos estériles), introgresión generalizada (híbridos son fértiles y exitosos, se cruzan con sus progenitores pudiendo desplazarlos) y mezcla completa (se pierden los genomas originales y se extienden los genomas híbridos).

### **1.3. Herramientas moleculares para identificación de híbridos**

Toda la variación genética existente en las plantas se debe a la historia evolutiva de las poblaciones, sus sistemas de cruzamiento, densidad poblacional y flujo génico (Hamrick, 1989). Los estudios enfocados en la variación y estructura genética dentro y entre poblaciones de plantas, se han tornado relevantes para un uso adecuado y una conservación eficaz de especies (Amom y Nongdam, 2017). Con el advenimiento de las técnicas moleculares y análisis genómicos, estos estudios han logrado éxito, pues los híbridos pueden ser identificados no solo por características fenotípicas, sino también genéticas (Goulet et al., 2017).

Los marcadores moleculares son herramientas poderosas empleadas en varios campos de la ciencia, como la biología, ecología, evolución y biomedicina, para identificar y aislar genes de interés (Rentarúa-Alcántara, 2007). Los trabajos relacionados con técnicas moleculares se enfocan en descifrar los patrones genéticos entre taxones estrechamente relacionados (Morris y Shaw, 2018), a su vez, son usados en estudios de conservación de especies, en donde se estiman los niveles de variación genética entre y dentro de poblaciones naturales (Elias y Rueda, 2020; Oleas, 2011a).

En el pasado, el uso de los marcadores moleculares era limitado y a su vez, no se contaba con el genoma de referencia de todas las especies. No obstante, en la actualidad, contamos con una amplia gama de marcadores y una mayor disponibilidad de genomas de referencia (Harrison y Larson, 2014). Como consecuencia, se han desarrollado diferentes marcadores moleculares para identificar patrones de diversidad genética en varios organismos, los cuales son ampliamente usados porque no son afectados por el ambiente y proveen evidencia clara de variación en el genoma (Kumar et al., 2019). Además, son herramientas esenciales en análisis de relaciones genéticas, mapeo de genes, identificación de híbridos y rastreo de ciertos loci en plantas (Amom y Nongdam, 2017).

Entre las principales herramientas moleculares para identificar hibridación en plantas, se han estudiado las siguientes: Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), Polimorfismo de fragmentos obtenidos por amplificación (AFLP) y

Microsatélites (SSR). A continuación, se discuten brevemente los puntos positivos y negativos de cada uno de estos marcadores moleculares:

### **1.3.1. SNPs**

Los SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés) son cambios de un solo nucleótido en una sola posición, que ocurren por mutaciones de sustitución, deleción o inserción, y que son usadas como marcador genético en varias especies de animales y plantas (Garrido-Cárdenas et al., 2018). En su mayoría se distribuyen en regiones no codificantes del genoma; sin embargo, se ha encontrado que un grupo de SNPs corresponden a mutaciones asociadas con enfermedades (Mateo-Bonmatí et al., 2014). Para detectar estos polimorfismos, se usan técnicas como la secuenciación de ADN propuesta por Sanger, o con técnicas de secuenciación de nueva generación como *Illumina* (Dejean, 2018). Las ventajas que presenta esta herramienta se relacionan con la posibilidad de usar muestras de ADN degradadas o muy pequeñas y una desventaja es que, al estar ubicados en una región sin función, no aportan información específica de ciertos genes (Gupta et al., 2001).

### **1.3.2. AFLP**

Los AFLP (polimorfismo de fragmentos obtenidos por amplificación, por sus siglas en inglés) son marcadores que amplifican fragmentos con dos enzimas de restricción, para ello, se usan cebadores diseñados para unirse a unas secuencias de ADN llamadas “*stick – ends*” o en español extremos pegajosos, se amplifican por

PCR y se reconocen secuencias en todo el genoma (Grover y Sharma, 2016). Es muy probable que detecten altos niveles de polimorfismo, mientras que, su limitación es que son marcadores dominantes, por lo que, reduce su actividad para detectar diversidad genética y endogamia (Amom y Nongdam, 2017).

### **1.3.3. SSR (MICROSATÉLITES)**

Los marcadores moleculares como los microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencias simples (SSR, por sus siglas en inglés) tienen alto polimorfismo, por lo que permiten probar la existencia de diferenciación poblacional, tasas de migración y eventos demográficos (Souza et al., 2019). Esto, a su vez, ha revelado que el flujo de genes entre especies o géneros proporciona nueva diversidad que puede estar adaptada a diferentes condiciones y finalmente contribuir a la especiación (Goulet et al., 2017). Los SSRs se han utilizado ampliamente como técnica para responder a preguntas referentes a genética de poblaciones en plantas, debido a que son marcadores neutros, fáciles y económicos de elaborar, identifican homocigotos y heterocigotos, son altamente variables, reproducibles en laboratorio y fáciles de analizar, además, tienen una alta tasa de mutación, lo que permite evidenciar eventos microevolutivos (Varshney et al., 2005). En cuanto a las limitaciones de los SSRs, una de ellas es que los cebadores para estos microsatélites se deben elaborar para las especies en cuestión, sin embargo, es posible usar los cebadores para otras especies que estén estrechamente relacionadas. Otra desventaja de esta técnica es la probabilidad de encontrar alelos nulos y homoplasias de tamaño del alelo (Oleas, 2011a).

#### 1.4. Reportes de hibridación en el Ecuador

En el Ecuador, se han hecho varios estudios sobre hibridación en la flora andina. Uno de ellos demuestra la ocurrencia de hibridación durante la evolución del género *Lachemilla* de la familia Rosaceae, el cual actualmente tiene alrededor de 60 especies que evidencian una pronta radiación ecológica en el clado (Morales-Briones et al., 2018). De manera similar, la hibridación en el género *Senecio* de la familia Asteraceae demuestra que este proceso promueve la diversificación y radiación adaptativa de especies, y con ello un potencial cambio en las formas de crecimiento de las plantas (Dušková et al., 2017). En una investigación para determinar hibridación natural entre especies del género *Vasconcellea* y así, comparar las características morfológicas con las genéticas, se utilizaron marcadores moleculares, sus resultados revelaron rasgos genéticos de introgresión entre especies que estarían habitando en una zona híbrida (Van-Droogenbroeck et al., 2006). Para terminar, el estudio de hibridación natural entre *Epidendrum secundum* x *Epidendrum fulgensy* de la familia Orchidaceae, reveló un intercambio de polen entre estas dos especies que, a su vez, comparten polinizadores (Pansarin y Amaral, 2008).

La mayoría de los casos reportados de híbridos en la naturaleza, han sido de hibridación interespecífica, es decir, entre especies diferentes, pero muy poco se sabe de hibridación entre géneros. No obstante, se reportó la formación reciente de un helecho híbrido intergenérico en los Pirineos franceses (Rothfels et al., 2015).

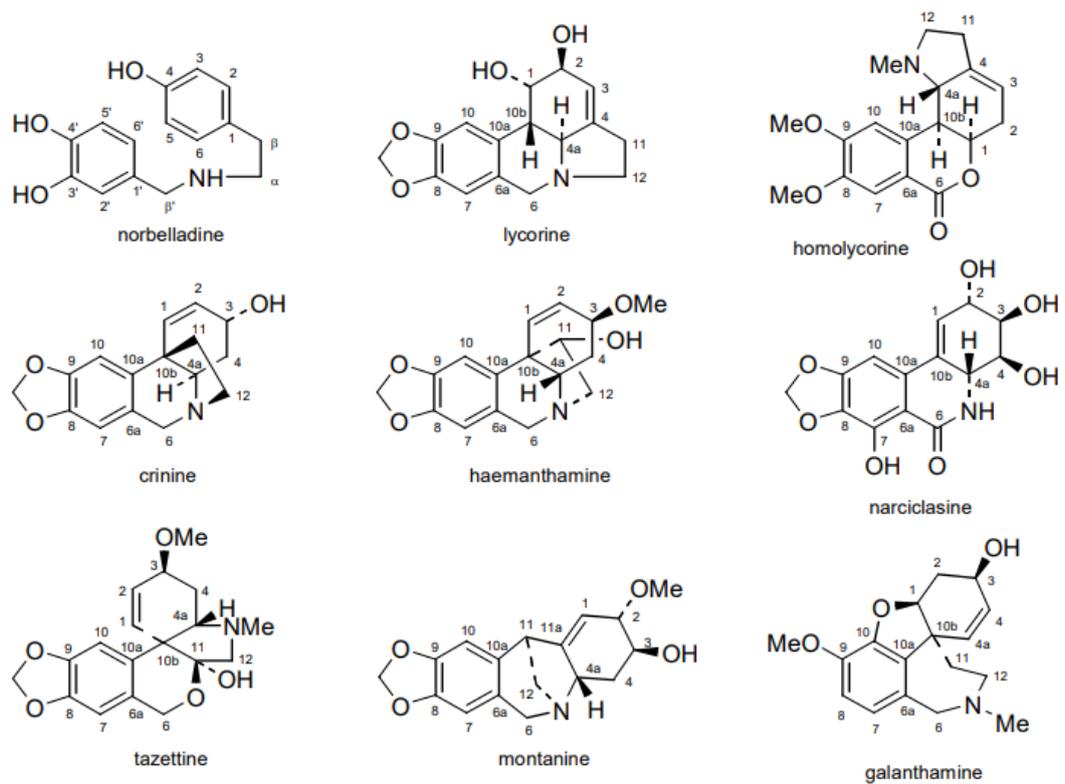
### **1.5. Familia Amaryllidaceae**

La familia Amaryllidaceae está compuesta por un tipo de plantas monocotiledóneas, herbáceas, bulbosas y perennes, de flores grandes con colores que van desde rojo, naranja, amarillo, hasta rosa, blanco y en ocasiones azul (Meerow, 1990). Tiene alrededor de 85 géneros y 1100 especies, distribuidas en los trópicos y subtropicos (Jin y Yao, 2019). Según evidencia molecular, se estima que las primeras amarilidáceas aparecieron hace aproximadamente 91 millones de años en África y posteriormente alcanzaron otros continentes, divergiendo hasta llegar a las especies actuales (Jin, 2016).

Habitan valles secos, bosques andinos, bosques secos y bosques húmedos del norte de la cordillera de los Andes, se distribuyen desde los 0 a 4000 m de altitud, generalmente crecen en áreas alteradas, veredas, zonas destinadas para actividades agrícolas y zonas ganaderas (Oleas, 2011b). Las especies endémicas de Amaryllidaceae en el Ecuador se encuentran en diferentes categorías de amenaza; ocho En Peligro y cuatro Vulnerables, debido a factores como la destrucción del hábitat, perturbación humana, sobrexplotación, y comercialización (Oleas, 2011b).

La familia Amaryllidaceae se caracteriza por producir alcaloides específicos entre sus compuestos secundarios, que hasta la actualidad se sabe existen más de 600 alcaloides aislados en diferentes especies (Jin y Yao, 2019). Estos alcaloides han demostrado tener diversos efectos, entre ellos: antitumorales, antivirales, antiparasitarios, antiinflamatorios y efectos en el Alzheimer, un hecho que

contribuye a realizar investigaciones fitoquímicas de las especies (Bastida et al., 2006; Da Silva-Júnior et al., 2019). Se han logrado identificar casi 300 alcaloides pertenecientes a nueve grupos (Bastida-Armengol et al., 2011), los cuales se observan a continuación en la Figura 1.



**Fig. 1.** Alcaloides aislados en la familia Amaryllidaceae. Fuente: (Bastida-Armengol et al., 2011, p. 67).

Para el Ecuador, se han registrado 11 géneros y 36 especies de plantas de la familia Amaryllidaceae, de las cuales 15 especies son endémicas y pertenecen a los géneros *Phaedranassa* y *Eucrosia* (Oleas, 2011b). A continuación, se mencionan dos de los géneros de Amaryllidaceae presentes en el Ecuador e involucrados en este estudio.

### **1.5.1. *Stenomesson***

Este género está conformado por un grupo de hierbas perennes, herbáceas y con bulbos. Su nombre se deriva del griego *stenosis* que significa «estrecho» y *mesaío* que quiere decir «en el medio» (Weber y Wilkin, 2007). Se conocen alrededor de quince especies dentro del género *Stenomesson*, distribuidas ampliamente en los Andes de Perú y tan solo dos para Ecuador: *Stenomesson aurantiacum*, distribuido ampliamente en la zona andina y *Stenomesson ecuadorensis*, conocido por una sola población al sur del Ecuador entre Loja y Zamora (Meerow, 1990; Meerow et al., 2015). Habita en bosques secos, bosques nubosos y valles interandinos desde los 2000 m de altitud (Meerow y Van Der Werff, 2004). Este grupo es de gran importancia en varias comunidades andinas ancestrales, debido a su carácter etnobotánico y ornamental, en donde las plantas son utilizadas como purgante para limpiar el organismo (Weber y Wilkin, 2007).

### 1.5.2. *Phaedranassa*

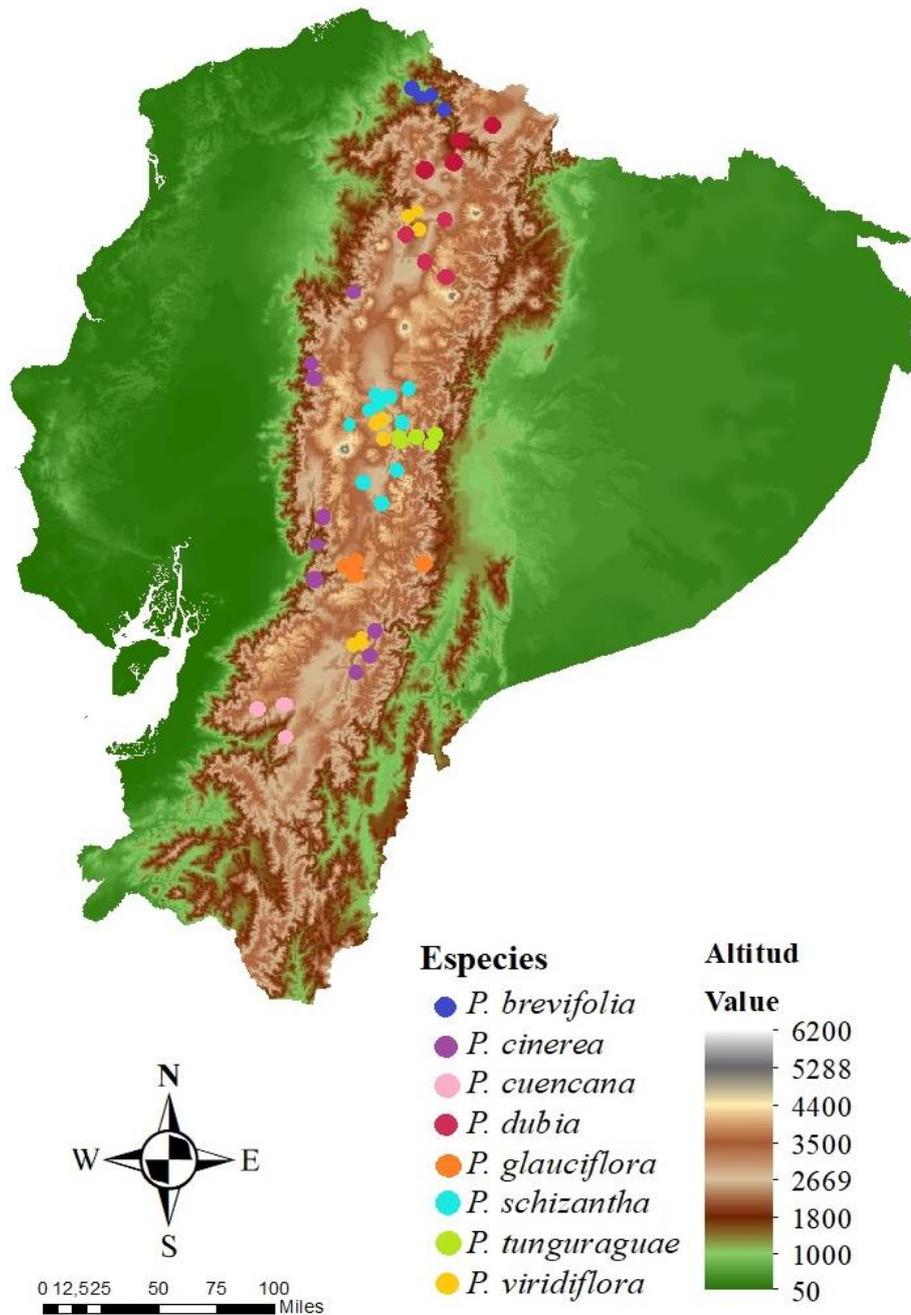
El género *Phaedranassa* fue descrito a partir de un espécimen llamado inicialmente *Phaedranassa chloracra* (Herbert, 1845). La etimología del nombre *Phaedranassa* proviene del griego *phaidos* que significa «alegre» y *anassa* que significa «reina». En nuestro país, se la conoce en quichua como “*ashpa cebolla*” que significa falsa cebolla y también como papa de lobo (Oleas, 2011a).

Este género se restringe a los Andes del norte de Ecuador, Colombia y Costa Rica. Se cree que la diversidad de microhábitats en los Andes es la responsable de la gran variedad de especies de *Phaedranassa* (Oleas, 2011a). En el Ecuador, se conocen 8 especies de *Phaedranassa* (*P. brevifolia*, *P. cinerea*, *P. cuencana*, *P. glauciflora*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. dubia* y *P. viridiflora*) y están en algunas categorías críticas de la UICN (Moreno et al., 2020). Su distribución geográfica se puede apreciar en la Figura 2.

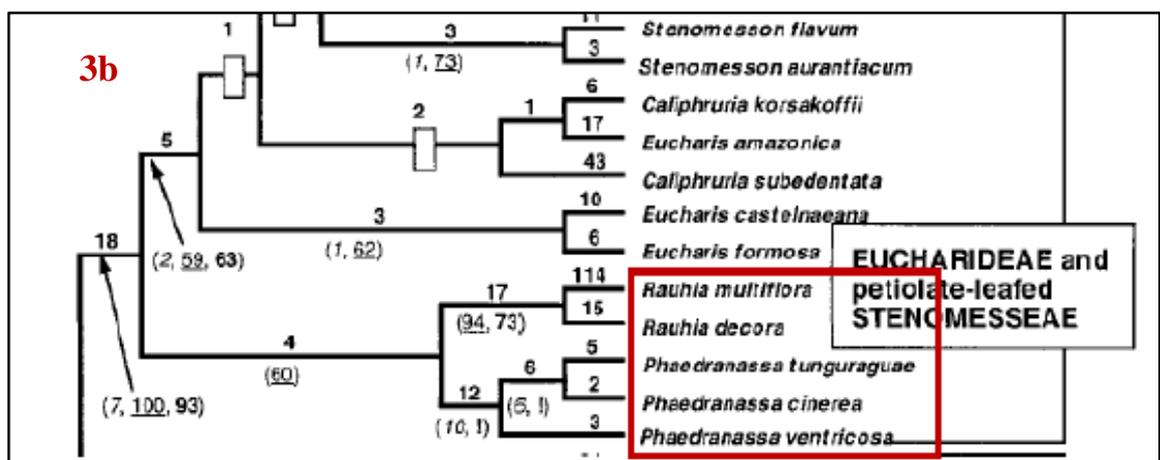
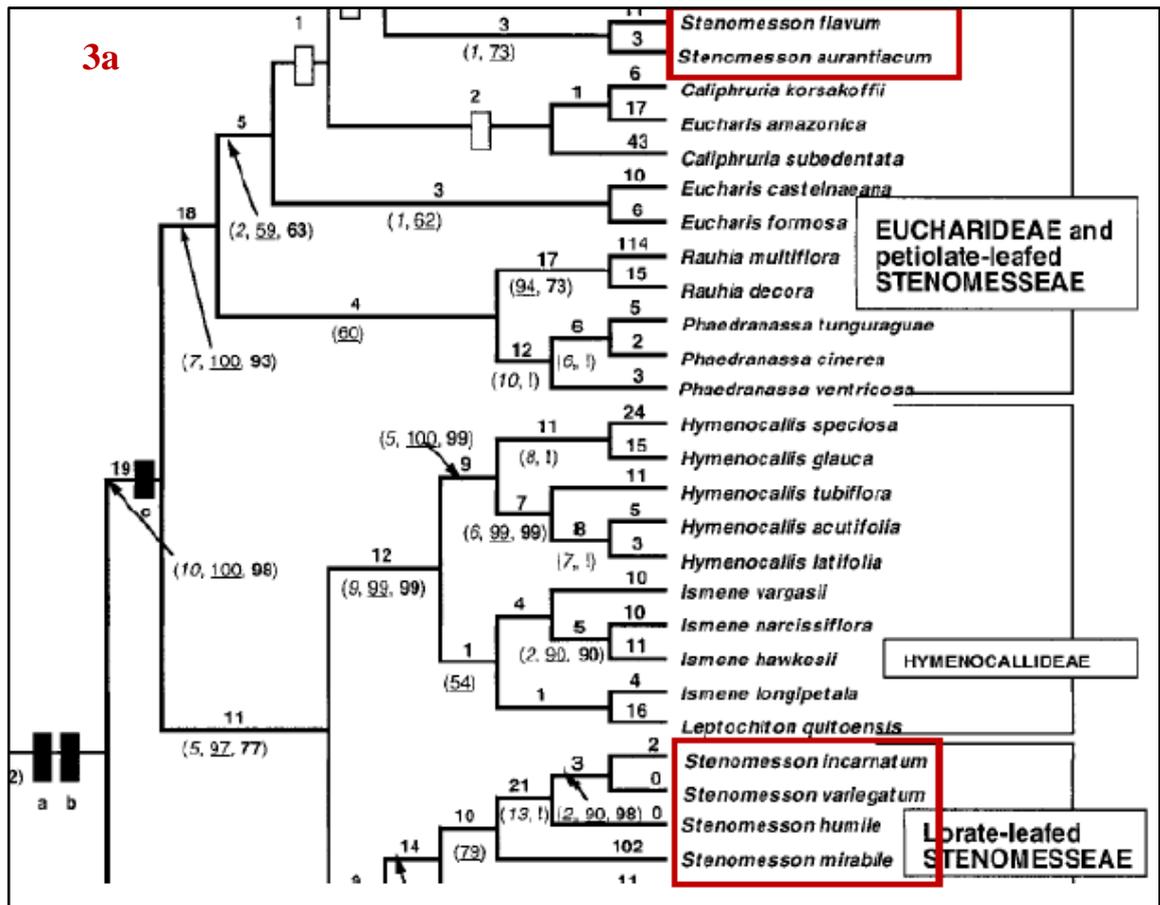
### 1.6. Relaciones filogenéticas en Amaryllidaceae

Estudios filogenéticos con ITS encontraron que *Stenomesson* no es un grupo monofilético, más bien es un grupo polifilético con respecto a *Phaedranassa*, pues no comparten el mismo ancestro común, y por lo tanto no son géneros hermanos (Meerow et al., 2000, Figura 3a). Son pocos los estudios filogenéticos con suficiente resolución que muestren las relaciones entre las especies de *Phaedranassa*, y a su vez, estos no incluyen a las especies de estudio (*P. dubia* y *P. viridiflora*), pero por lo pronto se sabe que el grupo es monofilético, esto se refiere

a que incluye al ancestro común y a todos sus descendientes. A su vez, se encontró evidencia de que el género *Rauhia* es su taxón hermano (Meerow et al., 2000, Figura 3b).



**Fig. 2.** Mapa de la distribución geográfica del género *Phaedranassa* en el Ecuador.



**Fig. 3.** Árbol filogenético de la familia Amaryllidaceae, **a.** *Stenomesson* está en un clado diferente con respecto a *Phaedranassa*, **b.** *Phaedranassa* y *Rauhia* son especies hermanas. Fuente: (Meerow et al., 2000, p. 717).

### **1.7. ¿Ocurre hibridación en la familia Amaryllidaceae?**

Varios estudios reportan hibridación en la familia Amaryllidaceae. Un estudio menciona la existencia de hibridación natural entre dos especies simpátricas de *Narcissus* (Amaryllidaceae) en la región de Alentejo, Portugal, en donde se concluye que los híbridos aportan con alta variabilidad fenotípica dentro y entre poblaciones (Marques et al., 2007). Otro ejemplo más reciente, corrobora que dentro del género *Narcissus* la hibridación es común y ha sido sujeto de estudios sobre evolución y citogenética (Marques et al., 2017). En dicha investigación se utilizaron diferentes marcadores moleculares para esclarecer la filogenia del género, con lo cual se confirmó la existencia de múltiples eventos de hibridación, incluso hibridación intersubgenérica de varias especies como *N. dubius*, *N. tortifolius*, y *N. miniatus*. Otro ejemplo, es el hallazgo de hibridación entre dos especies de la familia Amaryllidaceae (*Allium tulipifolium* y *Allium. robustum*) de la colección del Jardín Botánico Siberiano de la Universidad Estatal de Altai, (Rusia), mediante el estudio de los híbridos y sus progenitores con secuencias de ITS y ADN plastídico (Smirnov et al., 2017).

### **1.8. Presentación del Problema de Investigación y Justificación**

El primer reporte de hibridación natural registrado en la familia Amaryllidaceae en la población del Pululahua, al norte del Ecuador, consideraba que los híbridos (individuos de fenotipo con flor naranja) eran el resultado del cruce entre las especies *P. dubia* (fenotipo con flor rosa) y *P. viridiflora* (fenotipo con flor amarilla) (Oleas et al., 2013). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que

*P. viridiflora* no produce frutos ni polen viable, por lo que se sugiere que la hibridación podría ser entre géneros: *Phaedranassa dubia* y *Stenomesson aurantiacum*, y que se podrían estar hibridando porque coexisten y comparten el mismo período de floración. Del mismo modo, se realizaron cruces manuales entre estos dos géneros, y como resultado se obtuvieron semillas viables (Zweck et al., en preparación). Por esta razón, existe la necesidad de genotipar a los individuos de la población del Pululahua: *P. dubia*, *S. aurantiacum* y los híbridos, para comprender su estructura genética y corroborar esta información con la morfología observada en la naturaleza.

Es preciso mencionar que, las especies objeto de estudio cumplen con una función específica en el ecosistema (Tinaut y Ruano, 2017), como regular los niveles de pH en el suelo, aportar con abono verde, aumentar el nivel de biomasa, incremento en la visita de polinizadores, entre otros (Faucon et al., 2017; Isbell et al., 2017). Conjuntamente, en el Plan de Manejo de la Reserva Geobotánica Pululahua elaborado en 1990 y el único disponible en formato digital, se puede constatar que dentro del documento no existe información de ninguna de las especies de interés de este estudio, por lo que se piensa que no están siendo parte del manejo de flora de la región (Vargas, 1990).

## **1.9. Objetivo general**

Comprobar genéticamente la hibridación natural entre los géneros de la familia Amaryllidaceae (*Stenomesson aurantiacum* y *Phaedranassa dubia*).

## **1.10. Objetivos específicos**

- Comprender la estructura genética de los híbridos resultantes del cruce entre *Phaedranassa dubia* x *Stenomesson aurantiacum* en la Reserva Geobotánica Pululahua, usando análisis genéticos y estadísticos.
- Proveer información útil acerca de la estructura genética y la relación entre las especies objeto de estudio, para la elaboración de planes y proyectos futuros en la Reserva.

## CAPÍTULO II

### 2. METODOLOGÍA

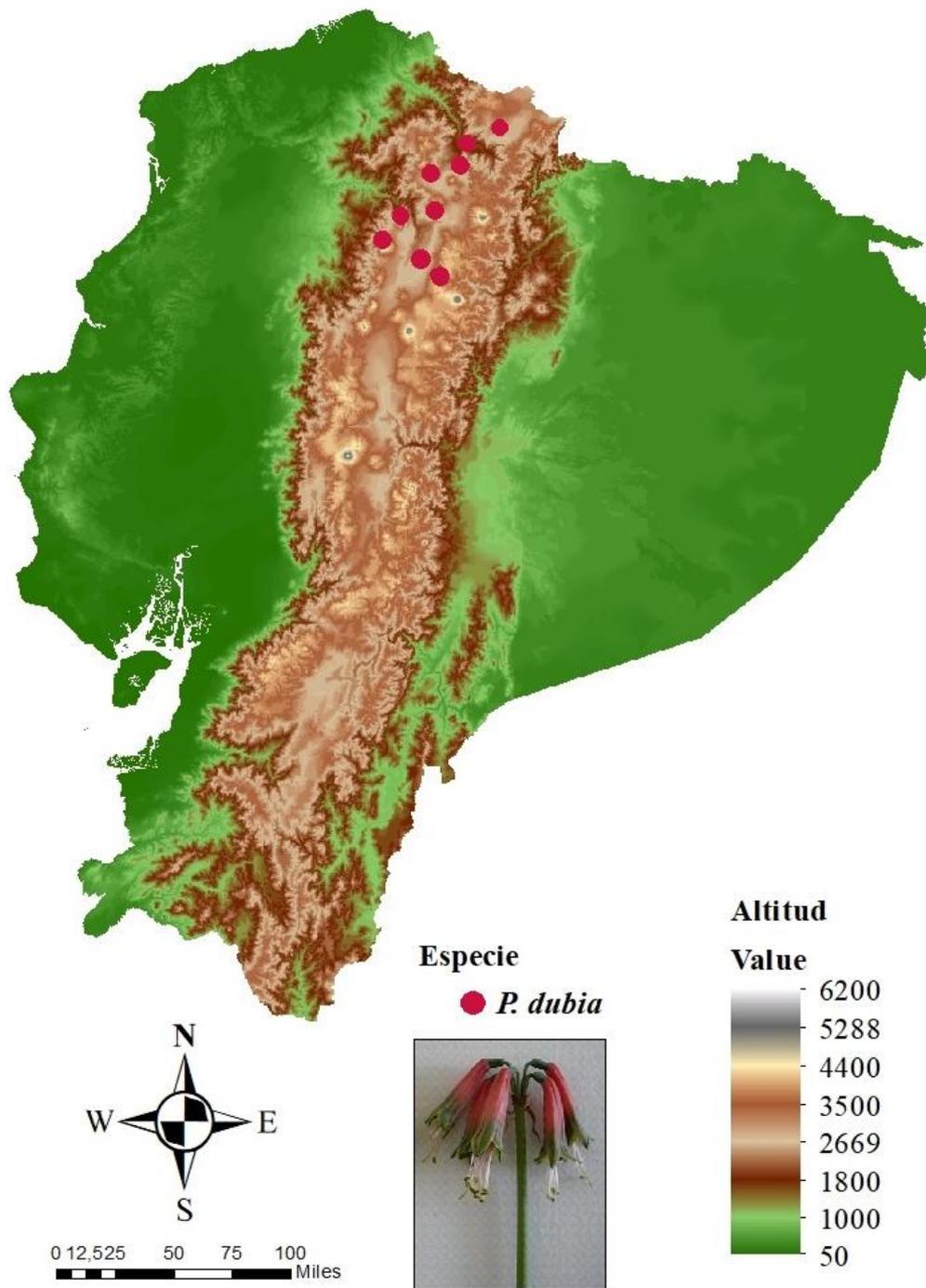
#### 2.1. Descripción de las especies estudiadas

##### 2.1.1. *Phaedranassa dubia* (Kunth) J.F. Macbr.

*Phaedranassa dubia* es una especie de hierba terrestre bulbosa nativa de los Andes de Colombia y Ecuador, restringida a los valles interandinos y zonas de pendiente. En el Ecuador, esta especie se distribuye en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha entre los 2000 y 4000 m de altitud (Oleas, 2011a), como indica la Figura 4.

*Phaedranassa dubia* se diferencia de otras especies del mismo género por tener flores vistosas de color rosa intenso, bulbo de 6 x 4,5 cm, peciolo de hasta 10 cm, flores de hasta 6 cm de largo de forma campanuladas tubuladas, tépalos rosados y márgenes de color verde con amarillo, su fruto es una cápsula de 15 mm (Meerow, 1990). Se observan imágenes de *P. dubia* en la Figura 5.

En cuanto a su estado de conservación, *P. dubia* está catalogada como “No Vulnerable”, sin embargo, siete especies endémicas del mismo género se encuentran categorizadas como “Vulnerables” o “En Peligro”, según los criterios de la lista roja para especies en peligro de la (UICN) Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Minga et al., 2015; Oleas, 2011b;).



**Figura 4.** Mapa de distribución geográfica de *Phaedranassa dubia* en el Ecuador.



**Fig. 5.** *Phaedranassa dubia*, Fuente: Nora Oleas.

### **2.1.2. *Phaedranassa viridiflora* (Baker)**

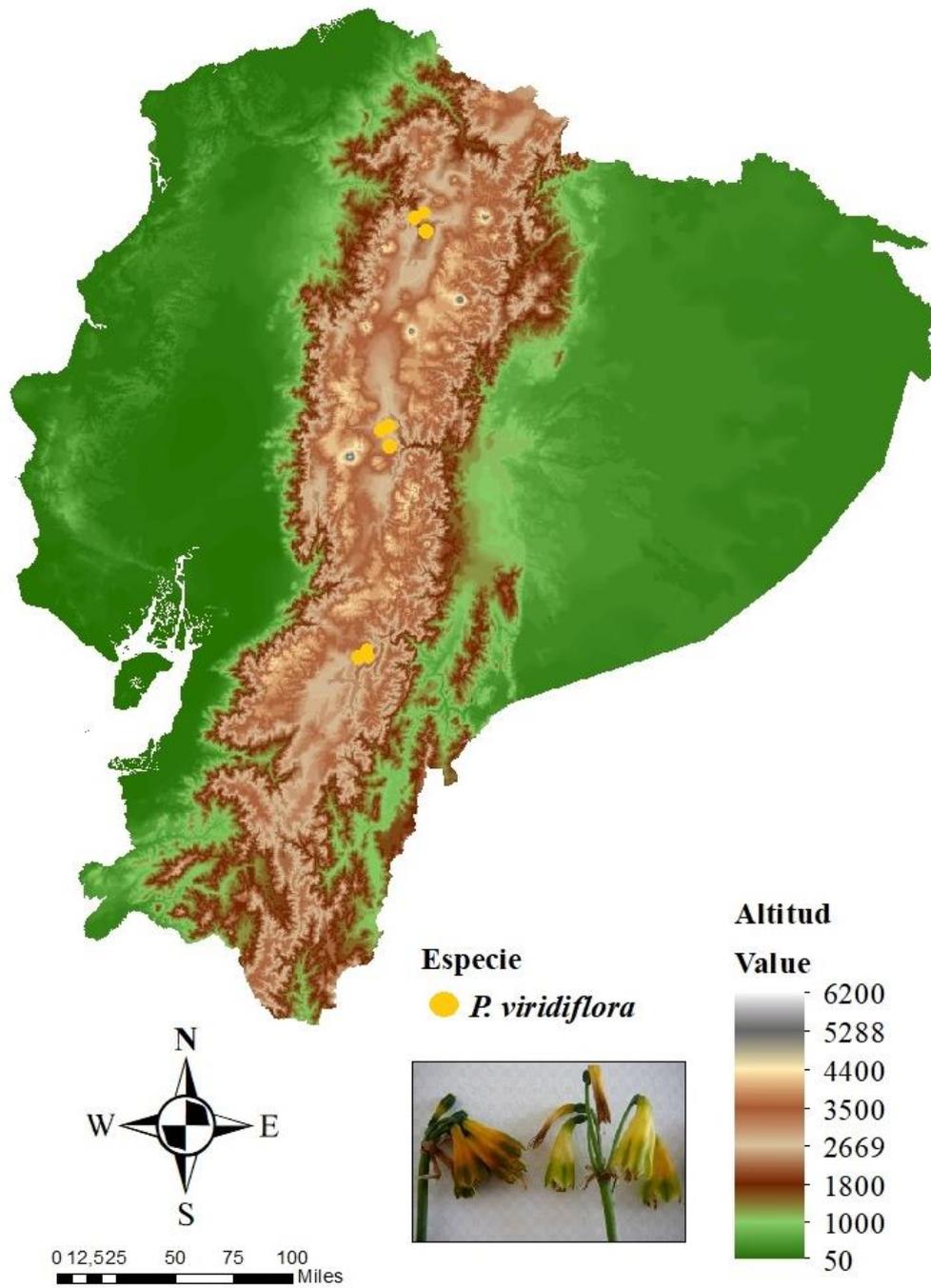
*Phaedranassa viridiflora* es considerada como la única especie del género Amaryllidaceae que tiene flores amarillas. Fue descrita a partir de una especie tipo de Perú (Meerow, 1990), sin embargo, se volvió a describir un segundo taxón de color verde y amarillo con el nombre científico de *P. viridilutea*, en analogía a *P. viridiflora* (Ravenna, 1984; Oleas et al., 2013).

*Phaedranassa viridiflora* es una especie endémica de Ecuador, presente en las provincias de Azuay, Tungurahua y Pichincha (Figura 6). Crece a partir de bulbos que pueden llegar a medir hasta 5 cm de largo y 4 cm de diámetro, posee hojas

lanceoladas de hasta 40 cm de largo, con inflorescencia acampanada y un escapo de 60 cm de largo, con seis flores de color amarillo (Meerow, 1990) (Figura 7).

En consecuencia, a la brecha que existe en el conocimiento de la historia natural de *P. viridiflora*, se ha estudiado la estructura genética de la población y se logró registrar la primera evidencia de hibridación natural entre *P. viridiflora* y *P. dubia*, en el cráter Pululahua del norte de Ecuador, mientras que, para las poblaciones del centro y sur no se encontró evidencia de hibridación (Oleas et al., 2013).

Según los criterios de la UICN, *P. viridiflora* está catalogada como “En Peligro”, debido a su distribución restringida y al reducido número poblacional. Es importante mencionar que, se ha evidenciado a *P. viridiflora* en simpatría con otras especies del mismo género, en especial con la población del cráter Pululahua (Oleas et al., 2013).



**Figura 6.** Mapa de distribución geográfica de *Phaedranassa viridiflora* en el Ecuador.

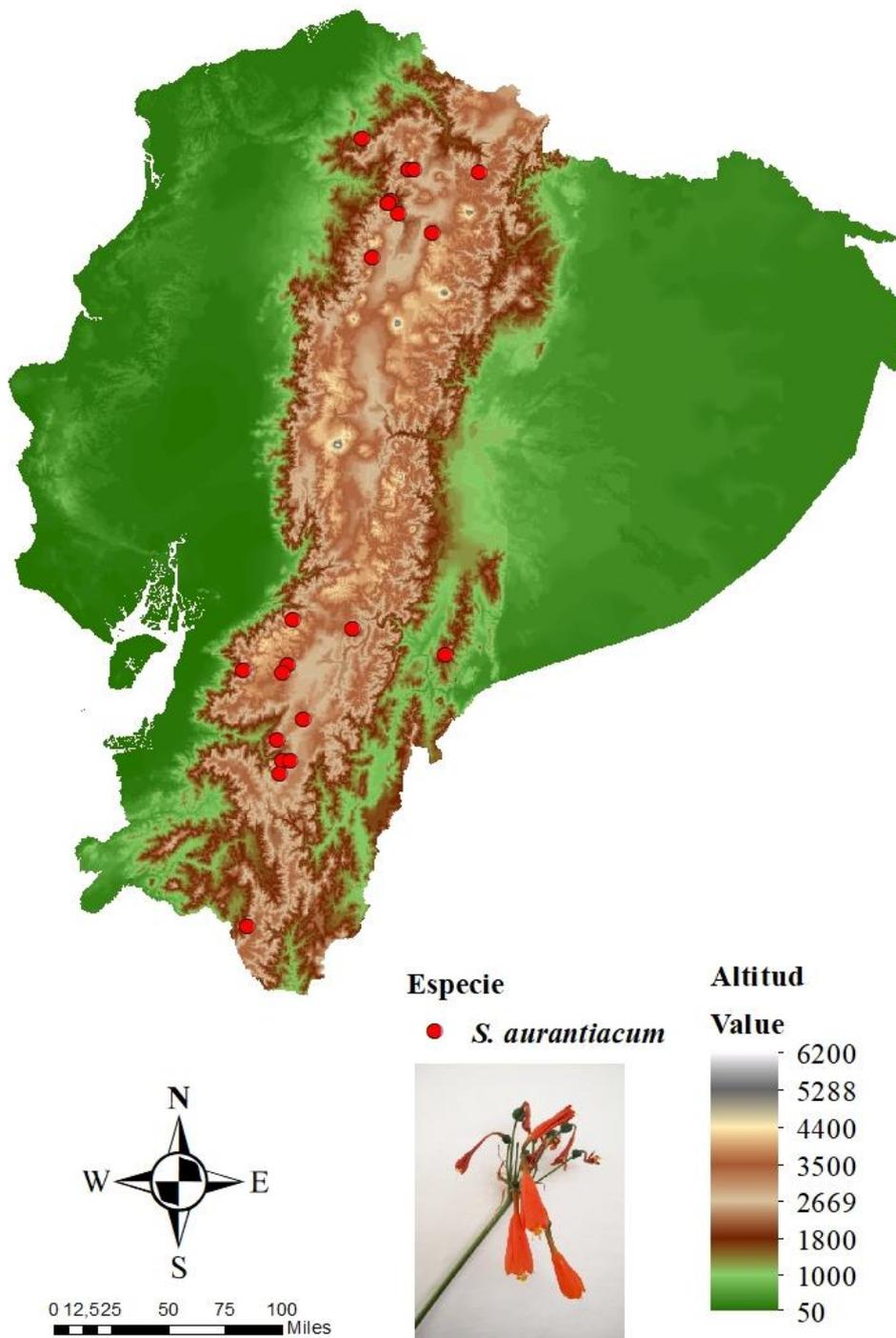


**Fig. 7.** *Phaedranassa viridiflora*. Fuente: Nora Oleas.

### **2.1.3. *Stenomesson aurantiacum* (Kunth) Herb.**

*Stenomesson aurantiacum*, se distribuye desde el sur de Colombia y Ecuador hasta el norte de Perú, desde los 1000 hasta los 4500 m de altitud. En el Ecuador, tiene una amplia distribución geográfica en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Imbabura, Loja y Pichincha (Acosta et al., 2014). (Figura 8).

Esta especie se caracteriza por tener flores de color naranja de forma campanulada, pueden medir hasta 50 cm con un bulbo de 6 x 5 cm, de 2 a 4 flores de 4 cm de largo, y su fruto es una cápsula de 15 m (Figura 9), (Acosta et al., 2014; Meerow, 1990). *S. aurantiacum* no ha sido evaluada en cuanto a su estado de conservación (GBIF, 2019).



**Fig. 8.** Mapa de distribución geográfica de *Stenomesson aurantiacum* en el Ecuador.



**Fig. 9.** *Stenomesson aurantiacum*. Fuente: Nora Oleas.

## **2.2. Área de estudio**

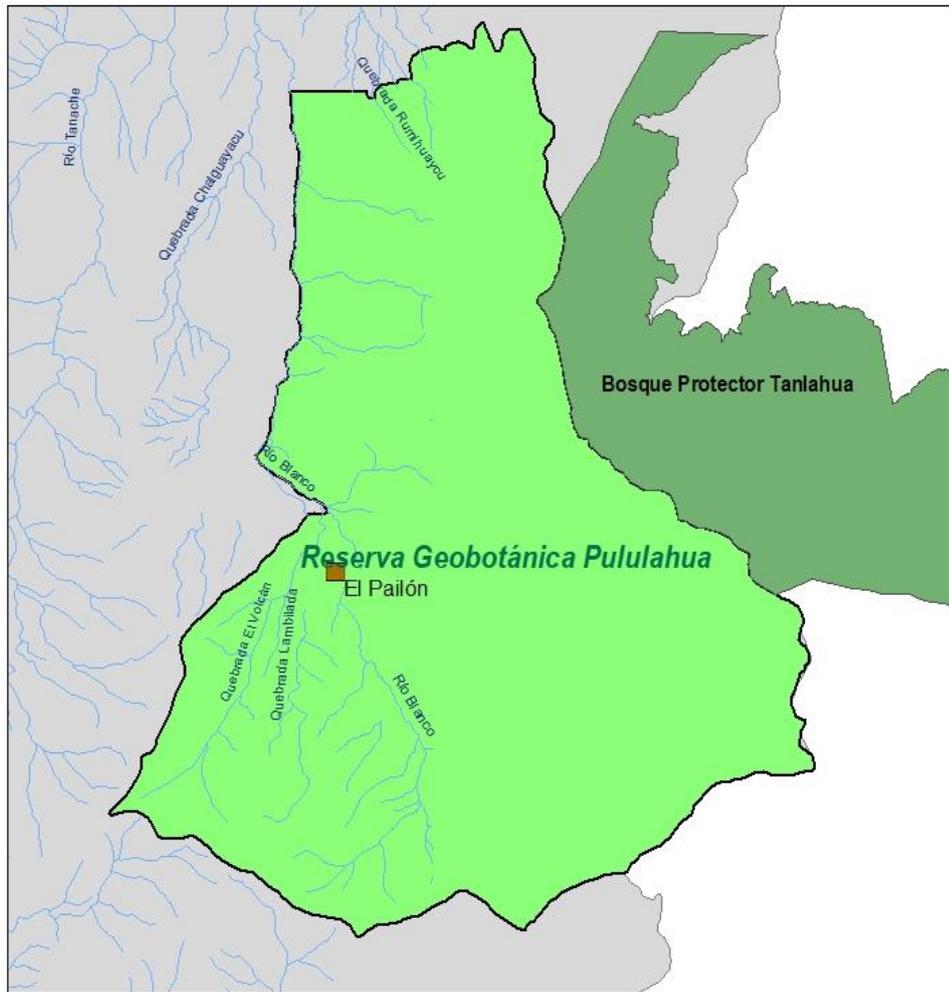
Las especies que se recolectaron para este estudio se distribuyen geográficamente en la provincia de Pichincha, en el cráter Pululahua de la Reserva Geobotánica Pululahua (78°30' 18" de longitud Oeste y 00°06' 00" de latitud Norte), al norte del Ecuador (Vargas, 1990), (Figura 10 y Figura 11).

En cuanto a la geología del lugar, el cráter se formó a partir del período Cuaternario, después de varios procesos geomorfológicos que han modelado el relieve y han resultado en una caldera de rocas y tierra acumuladas de las erupciones volcánicas (Valencia et al., 1999). La última erupción registrada del cráter Pululahua se estima hace 2300 años, a pesar de que ha permanecido inactivo existe

la probabilidad de posibles erupciones y susceptibilidad ante desastres naturales (Vargas, 1990). La precipitación promedio del área esta entre 1000 a 1600 mm, con una temperatura máxima de 29,3°C y una mínima de aproximadamente 5,2°C (Sánchez et al., 2018).

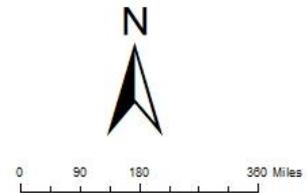


**Fig. 10.** Cráter del Pululahua, norte del Ecuador. Fuente: Nora Oleas.



**Leyenda**

- Poblados
- Ríos
- Bosque Protector
- Área de estudio
- Parroquia Calacalí



**Fig. 11.** Ubicación del área de estudio: Reserva Geobotánica Pululahua.

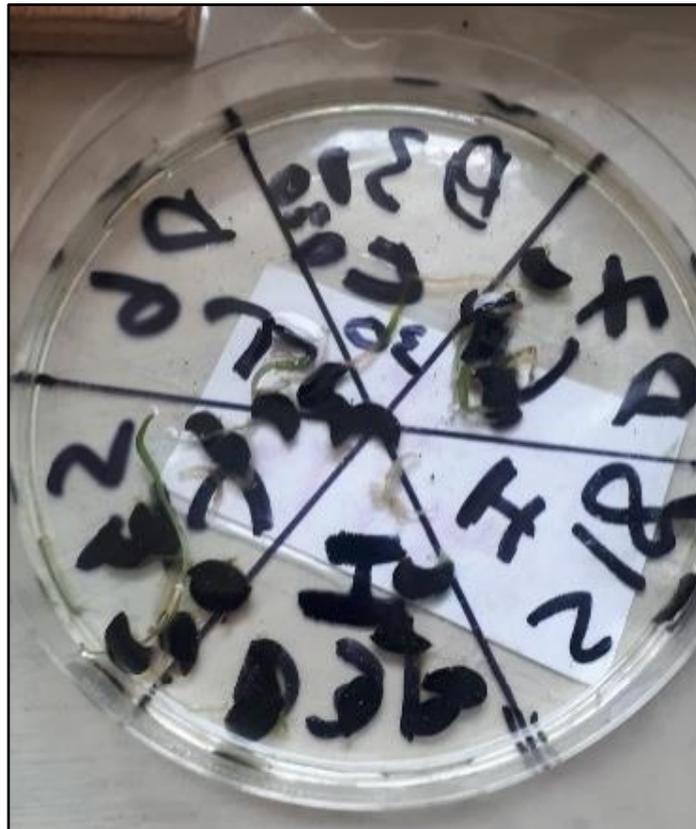
Por otro lado, la variedad de diferentes microclimas ha derivado en una peculiar biodiversidad y una cuantiosa vegetación en sus laderas (Oleas et al., 2013). Entre la flora asociada a esta región, además de las especies en cuestión -*Phaedranassa dubia* y *Stenomesson aurantiacum*- se ha registrado un total de 100 especies de bromelias y orquídeas, también se han observado “taxos silvestres” *Passiflora mixta*, “achupalla” *Puya clavata*, “pumamaqui” *Oreopanax* sp., “allpa chocho” *Lupinus pubescens*, “cascarilla” *Cinchona pubescense*, varias especies del género *Bidens*, *Taraxacum*, *Croton*, *Mimosa*, entre otras (Brito et al., 2017).

## **2.3. Análisis genéticos**

### **2.3.1. Colecta y secado de muestras**

Las muestras a ser genotipadas son el producto de un estudio de polinización en invernadero (Zweck, en preparación). En agosto de 2017, se colectaron alrededor de 30 individuos por especie del cráter del Pululahua, de los cuales se extrajeron sus bulbos y se aclimataron en un vivero en bolsas de plástico negro con tierra del mismo hábitat, y cubiertas con malla para evitar posibles agentes contaminantes. La polinización de las plantas fue manual, se realizó entre las 08:00 am y las 14:00 pm, frotando una antera contra un estigma receptivo, hasta que el estigma estuvo completamente cubierto de polen. Un mes después de la polinización, las semillas empezaron a madurar y fueron almacenadas en bolsas de papel. Se realizaron cuatro tipos de polinización: dos corresponden a polinización entre la misma especie (SC y DC) y las otras dos a polinización cruzada entre géneros (SI y DI).

Posteriormente, en noviembre del 2018, se germinaron las semillas resultantes de los cruces. Para esto, se colocaron 20 semillas por cada tipo de cruce en una caja Petri con agua, se dejó reposar a temperatura ambiente y para enero del 2019 se obtuvieron las primeras yemas de los individuos, en la Figura 12 se puede observar este proceso.



**Fig. 12.** Germinación de semillas resultantes de los cruces en cajas Petri.

Inmediatamente, estos individuos fueron plantados en recipientes con tierra negra fertilizada, todos los individuos correspondientes a un cruce estaban plantados en un recipiente. Las plántulas se demoraron entre dos y cuatro meses

en crecer y alcanzar un largo aproximado de 30 cm. Cada individuo recibió un código compuesto por el tipo de cruce y un número, por ej. DC24, DI18, SC3, SI17. El cruce DI representa a la madre (*P. dubia*) x el padre (*S. aurantiacum*) como se presenta en la Figura 13a, y el cruce SI representa a la madre (*S. aurantiacum*) x el padre (*P. dubia*), como se presenta en la Figura 13b. Mientras que, los cruces DC y SC fueron entre especie (*P. dubia* x *P. dubia* y *S. aurantiacum* x *S. aurantiacum*).



**Fig. 13.** Individuos resultantes de los cruces, **a.** *P. dubia* x *S. aurantiacum*, **b.** *S. aurantiacum* x *P. dubia*.

### **2.3.2. Extracción de ADN**

Para el análisis genético, se tomarán 2 g de hoja en buen estado (joven y verde) de cada código. En total se colectarán 24 muestras de cada cruce, dando un total de 96 individuos. Cada muestra se pondrá en un sobre de papel con silica gel para su secado rápido. La extracción de ADN se realizará con el Kit para purificación de ADN Wizard® de PROMEGA, siguiendo el procedimiento CTAB (Doyle y Doyle, 1987; Cullings, 1992). Una vez extraído el ADN, se cuantificarán las primeras extracciones mediante fluorometría *Qubit 2.0*.

### **2.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para las reacciones en cadena de la polimerasa y el proceso de genotipado se seguirán los métodos descritos por Oleas et al. (2005, 2009). Se genotiparán todos los individuos con once microsatélites: pt48, pt43, pt21, pt32, ps27, pt39, ps2, pt14, ps13, ps16 y pt61, desarrollados anteriormente para otras especies del mismo género: *P. tunguraguae* (Oleas et al., 2005, 2012b) y *P. schizantha* (Oleas et al., 2009). Los productos de PCR se analizarán por electroforesis en gel capilar, para lo cual serán enviados a MacroGen en Corea, para el análisis de fragmentos. Los alelos serán identificados utilizando el programa Geneious versión 6.1.7 (Oleas et al., 2013).

#### 2.4. Análisis estadísticos

Para el análisis se utilizarán los resultados del genotipado de los cruces de *Phaedranassa* y *Stenomesson* junto con los datos publicados en Oleas et al. (2012a). Se estimarán estadísticas descriptivas genéticas de la muestra y se realizará un (PCA) Análisis de Componentes Principales con el paquete GENALEX 6.4, que se ejecuta dentro de Microsoft Excel y permite hacer análisis genéticos poblacionales basados en la frecuencia de alelos, que incluye heterocigosidad, estadísticas  $F$ , distancia genética, entre otros aspectos (Peakall y Smouse, 2006). También, se utilizará el software STRUCTURE, un análisis Bayesiano que permite correlacionar las frecuencias de los alelos y asignar a los individuos en grupos genéticos (Pritchard et al., 2000).

Los análisis se correrán con grupos genéticos ( $k$ ) de uno a seis ( $k=1, k=2, k=3, k=4, k=5, k=6$ ) con veinte repeticiones para cada  $k$ . Para identificar el número de grupos genéticos ( $k$ ) se utilizará el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl, 2011), que calcula el valor  $k$  más probable. Tanto el PCA como el análisis Bayesiano en STRUCTURE nos permitirán identificar a qué grupo genético estudiados previamente en Oleas et al. (2012a), corresponden los cruces realizados entre *Phaedranassa* y *Stenomesson*.

## 2.5. Contribución a la conservación

Como se mencionó anteriormente, existe el vacío de información de especies de *Phaedranassa* y *Stenomesson* en la Reserva, pues no son contempladas en el monitoreo de biodiversidad, y por lo tanto existe un desconocimiento por parte de la población aledaña al área de estudio (Vargas, 1990). Por otro lado, se ha diseñado un modelo para entender la potencial expansión urbana y la vulnerabilidad de los bosques periurbanos en el Distrito Metropolitano de Quito, identificando una inevitable expansión urbana y una vulnerabilidad alta en bosques montañosos de hoja verde, ubicados al norte de la cordillera oriental, y bosques y arbustos semi-caducifolios en los valles del norte, con lo que claramente la vegetación de la Reserva Geobotánica Pululahua se vería amenazada (Bonilla-Bedoya et al., 2020).

Por esta razón, se proponen a continuación programas, proyectos y actividades que servirán como base para la conservación de las especies objeto de estudio, para difundir el conocimiento necesario, lograr un acercamiento con la comunidad y construir conjuntamente programas de conservación. El cumplimiento de estos programas involucrará la participación de actores como el Ministerio del Ambiente y Agua del Ecuador (MAE), Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de San Antonio de Pichincha, la comunidad del Pululahua y a la Universidad Tecnológica Indoamérica (UTI). A continuación, se presenta en la Tabla 1 los ejes programáticos con los que se trabajará, los proyectos, objetivos y actividades.

**Tabla 1.** Programas, proyectos, objetivos y actividades a desarrollar en la Reserva Pululahua.

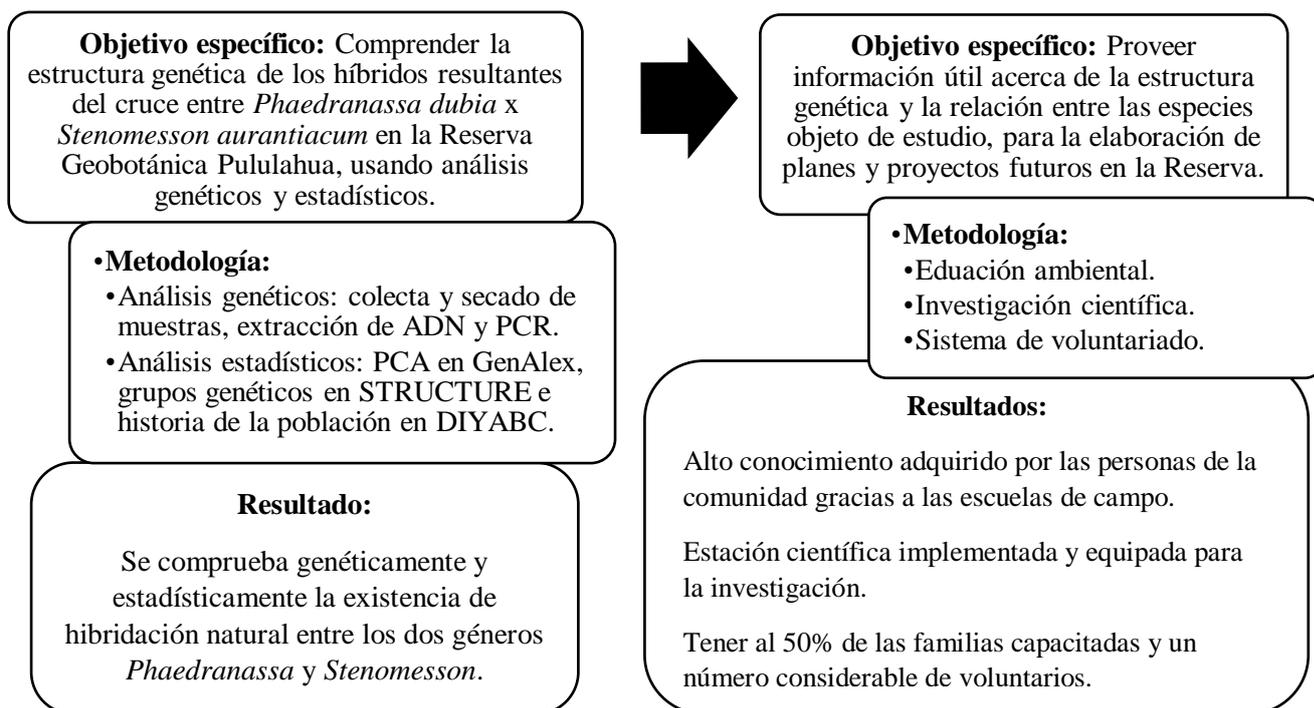
Ejes programáticos	Proyectos	Objetivos	Descripción de la actividad	Indicador de logro	Medio de verificación
<b>2.1 Educación Ambiental</b>	Muestreos y salidas de campo con habitantes de la comunidad del Pululahua.	Generar acercamientos entre las personas y la biodiversidad.	Realizar salidas de campo en las que se hablen de las especies y su importancia.	Identificación de la vegetación de la Reserva por al menos el 75% de los habitantes.	Muestras en vivo, fotografías, material didáctico (fichas, cuadernos, lápices, cámaras), cuestionario de evaluación.
	Creación de Escuelas de Campo.	*Implementar una escuela de campo en la Reserva Geobotánica Pululahua. *Aumentar el conocimiento en las personas.	Implementar escuela de campo para difundir el conocimiento acerca de la biodiversidad asociada a la Reserva, haciendo énfasis en las especies vulnerables.	*Número de personas que han asistido a las escuelas de campo. *Número de personas que han obtenido calificación alta en la evaluación.	Fotografías, videos, observación directa, listado de asistentes, cuestionario evaluador.
<b>2.2 Investigación científica</b>	Establecimiento de una pequeña estación científica en la Reserva.	Construir una estación científica que promueva la investigación para clarificar y revelar la importancia genética de las especies.	Implementar una estación científica para actualizar el estado de las especies y monitorear su evolución, incluyendo a <i>Phaedranassa</i> y <i>Stenomesson</i> .	*Número de actores involucrados en la construcción e implementación de la estación. *Porcentaje de avance en investigación de especies en la Reserva.	Informes de monitoreo de especies, acuerdos legales con instituciones de investigación, informes de impacto ambiental y evaluación ambiental.
<b>2.3 Sistema de voluntariado</b>	Programas de voluntariado para el manejo de los recursos y monitoreo de las especies.	Recibir a estudiantes interesados en aprender y colaborar en investigación y capacitación a familias en manejo y conservación de recursos naturales.	Capacitar al menos al 50% de las familias en manejo de recursos y conservación de especies y tener estudiantes universitarios involucrados en el proyecto.	*Número de familias capacitadas. *Número de estudiantes voluntarios en la Reserva.	Informes de capacitación, fotografías, videos, informes de voluntariados.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS ESPERADOS

#### 3.1. Exposición de resultados esperados

Esperamos que los datos obtenidos de los análisis genéticos para este estudio permitan comprobar genéticamente la existencia de hibridación natural entre los géneros *Phaedranassa* y *Stenomesson*. También, se llevarán a cabo planes de manejo de las especies que tendrían implicaciones en la investigación y conservación. En la Figura 14, se detallan los resultados esperados según los objetivos específicos y la metodología diseñada.



**Fig. 14.** Diagrama de relación entre objetivos específicos, metodología y resultados esperados.

### 3.2. Implicaciones

- Este trabajo de investigación nos permitiría entender el origen del individuo con morfología anaranjada, en este caso el supuesto híbrido, lo que respaldaría las diferencias morfológicas observadas en la naturaleza.
- Al encontrar evidencia genética de hibridación natural entre los dos géneros de estudio: *Phaedranassa dubia* y *Stenomesson aurantiacum*, se comprobaría que el mecanismo de especiación actuando sobre estas especies es la hibridación. Con esto, se reportaría la primera hibridación de origen natural entre estos dos géneros. De no ser así, creeríamos que existe otro mecanismo evolutivo actuando en la morfología anaranjada, o que en algún punto de la historia evolutiva de las especies de *Phaedranassa*, *P. viridiflora* y *P. dubia* estuvieron relacionadas.
- La evidencia de hibridación natural entre géneros no implicaría un cambio radical en la filogenia de la familia Amaryllidaceae, por el mismo hecho de ser entre géneros, además, el hallazgo de una morfología intermedia solo se ha reportado para una población en el Ecuador, la población del norte del Pululahua, por lo que harían falta estudios que consideren a las otras especies de *Phaedranassa*. En su lugar, los resultados mostrarían cuan variada puede ser la relación entre las especies de *Phaedranassa*.

### 3.3. Cronograma de actividades

Para el proyecto de investigación se consideraron todos los aspectos, desde la fase de laboratorio hasta la fase de conservación en campo junto a la comunidad, a continuación, se detalla el periodo a realizar cada actividad (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cronograma de actividades para el proyecto de investigación.

Cronograma de Actividades	I Trimestre			II Trimestre			III Trimestre			IV Trimestre			V Trimestre		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Escritura de artículo científico</b>	■														
<b>Extracción de ADN</b>	■														
Colecta de muestra.	■														
Extracción con el protocolo CTAB PVP.	■	■	■												
<b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b>	■														
Dilución de muestras.			■	■											
Inicio de PCR en placas.			■	■	■	■									
Envío de placas a MACROGEN.					■	■									
Inicio de análisis en Geneious.								■	■	■					
Inicio de análisis en GenAlex.												■	■	■	■
<b>Contribución a la conservación</b>	■														
Socialización de los programas con la comunidad												■	■		
Programa: educación ambiental												■	■	■	■
Programa: investigación científica												■	■	■	■
Programa: sistema de voluntariado												■	■	■	■

### 3.4. Presupuesto del Proyecto

El presupuesto diseñado considera cada fase del proyecto, incluyendo el trabajo en laboratorio, hasta la ejecución de las actividades de contribución a la conservación, como se detalla en la Tabla 3.

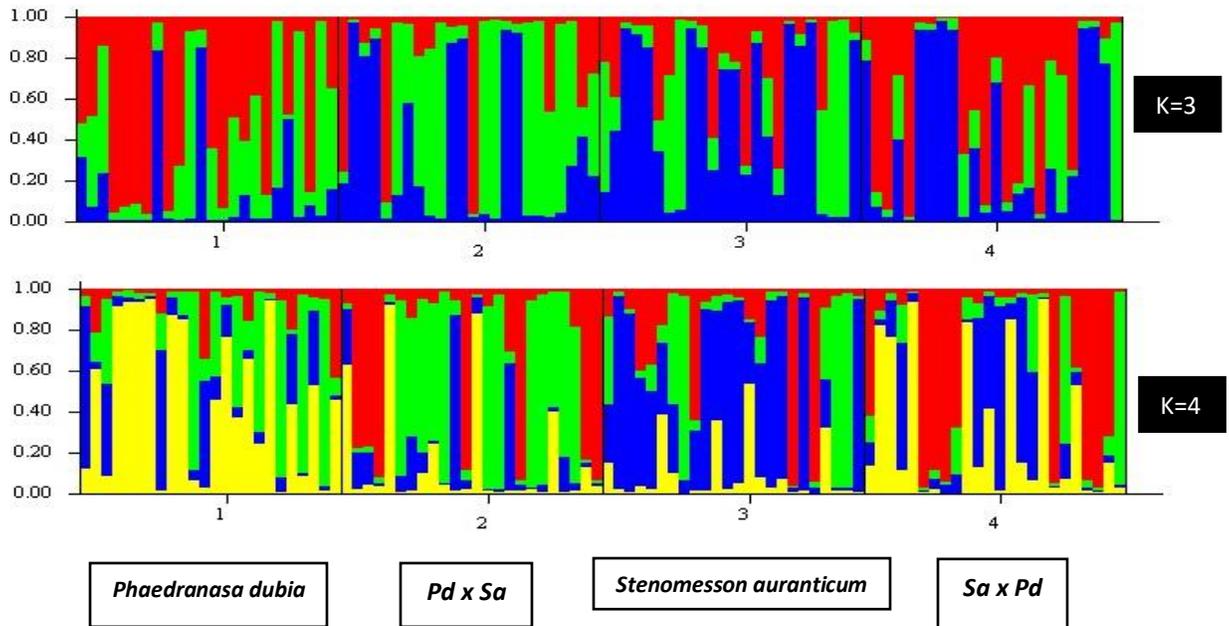
**Tabla 3.** Cronograma de presupuesto por actividad y programa.

<b>Evidencia genética de hibridación natural entre <i>Stenomesson aurantiacum</i> y <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae).</b>	
<b>Enmily Sánchez - Nora Oleas, PhD.</b>	
<b>ACTIVIDAD</b>	<b>VALOR</b>
<b>1. Extracción de ADN y PCR</b>	<b>\$960</b>
<b>2. Envío y procesamiento de muestras a Macrogen</b>	<b>\$2.400</b>
<b>3. Contribución a la conservación (tres programas)</b>	<b>\$16.700</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Programa: Educación Ambiental</b>            *Proyecto: Muestreos y salidas de campo con habitantes de la comunidad del Pululahua (gastos en material de campo y didáctico). \$200</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Programa: Creación de una Escuela de Campo</b>            (incluye gastos en materiales de construcción, maquinaria, suministros de papelería, refrigerios y movilización). \$4.000</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Programa: Investigación científica</b>            *Proyecto: Construcción de una estación científica dentro de la Reserva (incluye gastos en materiales de construcción, movilización, maquinaria, suministros de papelería, equipos de laboratorio, computadoras, entre otros). \$12.000</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Programa: Sistema de voluntariado</b>            *Proyecto: Voluntariado con estudiantes para el manejo y monitoreo de especies (incluye gastos de alimentación, hospedaje, materiales didácticos, movilización). \$500</li> </ul>	
<b>TOTAL</b>	<b>\$20.060</b>

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS PRELIMINARES Y PRÓXIMOS PASOS

Como resultados preliminares se logró amplificar 10 de los 11 loci disponibles de microsatélites. A su vez, el análisis bayesiano en STRUCTURE mostró evidencia de que existe algún flujo de genes entre *Phaedranassa dubia* y *Stenomesson aurantiacum*, sin embargo, no se distinguen los grupos genéticos específicos para cada especie, como se visualiza en la Figura 15. Como siguientes pasos, se aumentarán loci y se volverán a probar las muestras que no amplificaron, revisaremos la agrupación de los picos para nombrar los alelos y se realizarán también análisis para identificar posibles alelos nulos.



**Fig. 15.** Análisis bayesiano de grupos genéticos, cada color indica un grupo genético ( $k$ ).

## CONCLUSIONES

- Los resultados de esta investigación permitirán comprender la estructura genética de los individuos. En base a lo que conocemos, se esperaría que los híbridos con morfología amarilla-anaranjada sean el resultado de la hibridación intergenérica entre *Phaedranassa dubia* y *Stenomesson aurantiacum*.
- En cuanto al componente socio-ambiental, se aspira a difundir el conocimiento sobre estas especies en al menos el 75% de la población aledaña a la Reserva. Lograr el empoderamiento de su territorio y recursos naturales, será clave para que puedan ser tomadores responsables de decisiones. Además, esperamos difundir los resultados de este estudio a los funcionarios del Ministerio del Ambiente y Agua, y que dicha información sea tomada en cuenta para futuros planes de manejo.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda invertir en mantenimiento, vigilancia y monitoreo de especies dentro de la Reserva Geobotánica Pululahua, tomando en cuenta el problema de cacería furtiva que existe. A su vez, es necesario capacitar a todo el personal, incluyendo a guarda-parques y estudiantes que realicen voluntariados, sobre temas de conservación, manejo y educación ambiental que se puedan perpetuar a largo plazo.
- Es recomendable actualizar el Plan de Manejo de la Reserva y tener la versión digital disponible en la web, pues es un limitante para conocer el estado del área.
- Se recomienda también realizar estudios genéticos que tomen en cuenta a todas las demás especies de *Phaedranassa*, y así esclarecer las relaciones filogenéticas dentro de la familia Amaryllidaceae, hecho importante que contribuirá con el conocimiento acerca de eventos evolutivos interespecíficos e intergenéricos, como la hibridación natural.

## LITERATURA CITADA

- Abbott, R. J. (2017). Plant speciation across environmental gradients and the occurrence and nature of hybrid zones. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 238-258. [doi.org/10.1111/jse.12267](https://doi.org/10.1111/jse.12267).
- Abbott, R. J., Barton, N. H., y Good, J. M. (2016). Genomics of hybridization and its evolutionary consequences. *Molecular Ecology*, 25(11), 2325-2332. [doi.org/10.1111/mec.13685](https://doi.org/10.1111/mec.13685).
- Acosta, K., Pigni, N. B., Oleas, N., y Bastida, J. (2014). Identification of the alkaloids of *Stenomesson aurantiacum* (Kunth) Herb, an Amaryllidaceae species from the Ecuadorian Andes. *Pharmacologyonline*, 3, 178-183.
- Aizen, M. A. (2007). Enfoques en el estudio de la reproducción sexual de las plantas en ambientes alterados: limitaciones y perspectivas. *Ecología austral*, 17(1), 7-19.
- Alcántar-Vázquez, J. P. (2014). La poliploidía y su importancia evolutiva. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 18(54), 17-29.
- Alix, K., Gérard, P. R., Schwarzacher, T., y Heslop-Harrison, J. S. (2017). Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. *Annals of Botany*, 120(2), 183-194. [doi.org/10.1093/aob/mcx079](https://doi.org/10.1093/aob/mcx079).

- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P., y Wenburg, J. K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(11), 613-622. [doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X).
- Amom, T., y Nongdam, P. (2017). The use of molecular marker methods in plants: a review. *International Journal of Current Research and Review*, 9(17), 1-7. Doi: 10.7324/IJCRR.2017.9171.
- Barmantlo, S. H., Meirmans, P. G., Luijten, S. H., Triest, L., y Oostermeijer, J. G. B. (2018). Outbreeding depression and breeding system evolution in small, remnant populations of *Primula vulgaris*: consequences for genetic rescue. *Conservation Genetics*, 19(3), 545-554. [doi.org/10.1007/s10592-017-1031-x](https://doi.org/10.1007/s10592-017-1031-x).
- Barton, N. H. (2013). Does hybridization influence speciation? *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 267-269. Doi: 10.1111/jeb.12015.
- Bastida, J., Lavilla, R., y Viladomat, F. (2006). Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 63, 87-179. [doi.org/10.1016/S1099-4831\(06\)63003-4](https://doi.org/10.1016/S1099-4831(06)63003-4).
- Bastida-Armengol, J., Berkov, S., Torras Claveria, L., Pigni, N. B., Andrade, J. P., Martínez, V., Codina Mahrer, C. y Viladomat Meya, F. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. En D. Muñoz-Torrero (Ed.), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* (pp. 65-100). Department of

Natural Products, Plant Biology and Soil Science, Faculty of Pharmacy  
University of Barcelona. España.

Bonilla-Bedoya, S., Mora, A., Vaca, A., Estrella, A., y Herrera, M. Á. (2020).  
Modelling the relationship between urban expansion processes and urban forest  
characteristics: An application to the Metropolitan District of  
Quito. *Computers, Environment and Urban Systems*, 79, 101420.  
[doi.org/10.1016/j.compenvurbsys.2019.101420](https://doi.org/10.1016/j.compenvurbsys.2019.101420).

Brito, J., Pozo-Zamora, G., Freire, E., y Cerón, C. (2017). Flores comunes de la Reserva  
Geobotánica Pululahua. En *Field Museum of Natural History. Chicago*, 846.

Campbell, L. G., Blanchette, C. M., y Small, E. (2019). Risk analysis of gene flow from  
cultivated, addictive, social-drug plants to wild relatives. *The Botanical  
Review*, 85(2), 149-184. [doi.org/10.1007/s12229-019-09206-x](https://doi.org/10.1007/s12229-019-09206-x).

Catford, J. A., Bode, M., y Tilman, D. (2018). Introduced species that overcome life  
history tradeoffs can cause native extinctions. *Nature Communications*, 9(1), 1-  
7. [doi.org/10.1038/s41467-018-04491-3](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04491-3).

Cervantes Díaz, C. I. (2016). Evaluación morfológica y genética de la posible  
hibridación entre *Fuchsia microphylla* y *F. thymifolia*  
(Onagraceae). [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB\\_UMICH/1749](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1749)

Chen, J., Luo, M., Li, S., Tao, M., Ye, X., Duan, W., Zhang, C., Qin, Q., Xiao, J., y  
Liu, S. (2018). A comparative study of distant hybridization in plants and

animals. *Science China Life Sciences*, 61(3), 285-309. [doi.org/10.1007/s11427-017-9094-2](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9094-2).

Coyne, J. A., y Orr, H. A. (2004). Studying Speciation. En J. Coyne (Ed.), *Speciation* (pp. 55-55). University of Chicago, University of Rochester.

Cozzolino, S., Nardella, A. M., Impagliazzo, S., Widmer, A., y Lexer, C. (2006). Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation*, 129(1), 14-23. [doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.043](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.043).

Cullings, K. W. (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology*, 1(4), 233-240. [doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00182.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00182.x).

Darwin, C. (1876). *The Effects of Cross and Self Fertilisation in the Vegetable Kingdom*. John Murray, Albemarle Street.

Da Silva-Júnior, E. F., Schirmeister, T., y de Araújo-Júnior, J. X. (2019). Promising trypanocidal heterocyclic compounds of natural origin and their synthetic analogs. En *Discovery and Development of Therapeutics from Natural Products Against Neglected Tropical Diseases*, (pp. 165-217). Elsevier. [doi.org/10.1016/B978-0-12-815723-7.00005-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815723-7.00005-5).

Dejean, C. B. (2018). Genetic markers (SNPs/Satellites/STRs/RFLPs). *The International Encyclopedia of Biological Anthropology*, 3, 1-4. [doi.org/10.1002/9781118584538.ieba0201](https://doi.org/10.1002/9781118584538.ieba0201).

- Doyle, J., y Doyle, J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull*, 19(11), 11-15.
- Du, G. H., Zhang, Z. Q., y Li, Q. J. (2012). Morphological and molecular evidence for natural hybridization in sympatric population of *Roscoea humeana* and *R. cautleoides* (Zingiberaceae). *Journal of plant research*, 125(5), 595-603. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0478-6>
- Dušková, E., Sklenář, P., Kolář, F., Vásquez, D. L., Romoleroux, K., Fér, T., y Marhold, K. (2017). Growth form evolution and hybridization in *Senecio* (Asteraceae) from the high equatorial Andes. *Ecology and Evolution*, 7(16), 6455-6468. [doi.org/10.1002/ece3.3206](https://doi.org/10.1002/ece3.3206).
- Earl, D. A. (2011). Structure Harvester version 0.6.1. Disponible en internet [http://taylor0.biology.ucla.edu/structure\\_harvester](http://taylor0.biology.ucla.edu/structure_harvester).
- Edmands, S. (2007). Between a rock and a hard place: Evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology*, 16(3), 463-475. [doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x).
- Elias, D. E., y Rueda, E. C. R. (2020). Tools for Evolutionary and Genetic Analysis (TEGA): A new platform for the management of molecular and environmental data. *Genetics and Molecular Biology*, 43(2). [doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x)

- Faucon, M. P., Houben, D., y Lambers, H. (2017). Plant functional traits: soil and ecosystem services. *Trends in Plant Science*, 22(5), 385-394. [doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.005).
- Fitzpatrick, B. M., Ryan, M. E., Johnson, J. R., Corush, J., y Carter, E. T. (2015). Hybridization and the species problem in conservation. *Current Zoology*, 61(1), 206-216. [doi.org/10.1093/czoolo/61.1.206](https://doi.org/10.1093/czoolo/61.1.206).
- García, E. C. (2012). Mecanismos de especiación ecológica en plantas y animales. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 14(2), 7-13.
- Garrido-Cárdenas, J. A., Mesa-Valle, C., y Manzano-Agugliaro, F. (2018). Trends in plant research using molecular markers. *Planta*, 247(3), 543-557. [doi.org/10.1007/s00425-017-2829-y](https://doi.org/10.1007/s00425-017-2829-y).
- GBIF Secretariat. (2019). *Stenomesson aurantiacum* Herb. En GBIF Backbone Taxonomy. Obtenido el 4 de enero de 2020, desde sitio web GBIF.org [doi.org/10.15468/39omei](https://doi.org/10.15468/39omei).
- Gómez, J. M., González-Megías, A., Lorite, J., Abdelaziz, M., y Perfectti, F. (2015). The silent extinction: climate change and the potential hybridization-mediated extinction of endemic high-mountain plants. *Biodiversity and Conservation*, 24(8), 1843-1857. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0909-5>
- Goulet, B. E., Roda, F., y Hopkins, R. (2017). Hybridization in plants: old ideas, new techniques. *Plant Physiology*, 173(1), 65-78. [doi.org/10.1104/pp.16.01340](https://doi.org/10.1104/pp.16.01340).

- Grover, A., y Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290-302. [doi.org/10.3109/07388551.2014.959891](https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891).
- Gupta, P. K., Roy, J. K., y Prasad, M. (2001). Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Curr Sci*, 80(4), 524-535. Doi: 10.2307/24104242.
- Hamrick, J. L. (1989). Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. En D. Soltis, P. Soltis y T. Dudley. (Eds.), *Isozymes in Plant Biology* (pp. 87-105). Springer, Dordrecht. [doi.org/10.1007/978-94-009-1840-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1840-5_5).
- Harrison, R. (1993). Hybrids and hybrid zones: Historical perspective. En R. Harrison. (Eds.), *Hybrid Zones and the Evolutionary Process* (pp. 3-12). New York: Oxford University Press.
- Harrison, R. G., y Larson, E. L. (2014). Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795-809. [doi.org/10.1093/jhered/esu033](https://doi.org/10.1093/jhered/esu033).
- Hegarty, M. J., y Hiscock, S. J. (2005). Hybrid speciation in plants: New insights from molecular studies. *New Phytologist*, 165(2), 411-423. [doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01253.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01253.x).

- Herbert, W. (1845). *Phaedranassa*. En J. Lindley. (Ed.). *Edwards's Botanical Register* (pp. 17). James Ridgway & Sons, London.
- Hochholdinger, F., y Baldauf, J. A. (2018). Heterosis in plants. *Current Biology*, 28(18), R1089-R1092. Doi: [10.1016/j.cub.2018.06.041](https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.041).
- Isbell, F., Adler, P. R., Eisenhauer, N., Fornara, D., Kimmel, K., Kremen, C., y Scherer-Lorenzen, M. (2017). Benefits of increasing plant diversity in sustainable agroecosystems. *Journal of Ecology*, 105(4), 871-879. [doi.org/10.1111/1365-2745.12789](https://doi.org/10.1111/1365-2745.12789).
- Jin, Z. (2016). Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*, 33(11), 1318-1343. [doi.org/10.1039/C6NP00068A](https://doi.org/10.1039/C6NP00068A).
- Jin, Z., y Yao, G. (2019). Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*, 36(10), 1462-1488. [doi.org/10.1039/C8NP00055G](https://doi.org/10.1039/C8NP00055G).
- Kahilainen, K. K., Østbye, K., Harrod, C., Shikano, T., Malinen, T., y Merilä, J. (2011). Species introduction promotes hybridization and introgression in *Coregonus*: Is there sign of selection against hybrids? *Molecular Ecology*, 20(18), 3838-3855. [doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05209.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05209.x).
- Kumar, M., Chaudhary, V., Sirohi, U., Sharma, V. R., y Naresh, R. K. (2019). Application of Molecular Markers and their Utility in Genetic Studies of Floricultural Crops: A Review. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 12(3), 229-247. Doi: 10.30954/0974-1712.08.2019.7.

- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 229-237. [doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.010](https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.010).
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133), 279-283. [doi.org/10.1038/nature05706](https://doi.org/10.1038/nature05706).
- Marques, I., Fuertes Aguilar, J., Martins-Louçao, M. A., Moharrek, F., y Nieto Feliner, G. (2017). A three-genome five-gene comprehensive phylogeny of the bulbous genus *Narcissus* (Amaryllidaceae) challenges current classifications and reveals multiple hybridization events. *Taxon*, 66(4), 832-854. [doi.org/10.12705/664.3](https://doi.org/10.12705/664.3).
- Marques, I., Rosselló-Graell, A., Draper, D., y Iriondo, J. M. (2007). Pollination patterns limit hybridization between two sympatric species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*, 94(8), 1352-1359. [doi.org/10.3732/ajb.94.8.1352](https://doi.org/10.3732/ajb.94.8.1352).
- Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., Candela, H., y Micol, J. L. (2014). Rapid identification of *angulata* leaf mutations using next-generation sequencing. *Planta*, 240(5), 1113-1122. [doi.org/10.1007/s00425-014-2137-8](https://doi.org/10.1007/s00425-014-2137-8).
- Meerow, A. W., Guy, C. L., Li, Q. B., y Yang, S. L. (2000). Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Systematic Botany*, 25(4), 708-726. Doi: 10.2307/2666729.

- Meerow, A. W., Jost, L., y Oleas, N. (2015). Two new species of endemic Ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae). *PhytoKeys*, (48), 1. Doi: [10.3897/phytokeys.48.4399](https://doi.org/10.3897/phytokeys.48.4399).
- Meerow, A. W., y Van Der Werff, H. (2004). *Pucara* (Amaryllidaceae) reduced to synonymy with *Stenomesson* on the basis of nuclear and plastid DNA spacer sequences, and a new related species of *Stenomesson*. *Systematic Botany*, 29(3), 511-517. [doi.org/10.1600/0363644041744400](https://doi.org/10.1600/0363644041744400).
- Meerow, A.W. (1990). Amaryllidaceae. En G. Harling, L. Andersson (Eds.), *Flora del Ecuador*. University of Gotenborg; Riksmuseum, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Goteborg, Stockholm, Quito.
- Michelan, T. S., Thomaz, S. M., Bando, F. M., y Bini, L. M. (2018). Competitive effects hinder the recolonization of native species in environments densely occupied by one invasive exotic species. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1261. [doi.org/10.3389/fpls.2018.01261](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01261).
- Minga, D., Ulloa, C. U., Oleas, N., y Verdugo, A. (2015). A new species of *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) from Ecuador. *Phytotaxa*, 192(1), 50-53. [doi.org/10.11646/phytotaxa.192.1.6](https://doi.org/10.11646/phytotaxa.192.1.6).
- Mitchell, N., Campbell, L. G., Ahern, J. R., Paine, K. C., Giroldo, A. B., y Whitney, K. D. (2019). Correlates of hybridization in plants. *Evolution Letters*, 3(6), 570-585. [doi.org/10.1002/evl3.146](https://doi.org/10.1002/evl3.146).

- Morales, C. L., Traveset, A., y Harder, L. D. (2012). Sterile flowers increase pollinator attraction and promote female success in the Mediterranean Herb. *Leopoldia comosa*. *Annals of Botany*, 111(1), 103-111. [doi.org/10.1093/aob/mcs243](https://doi.org/10.1093/aob/mcs243).
- Morales-Briones, D. F., Liston, A., y Tank, D. C. (2018). Phylogenomic analyses reveal a deep history of hybridization and polyploidy in the Neotropical genus *Lachemilla* (Rosaceae). *New Phytologist*, 218(4), 1668-1684. [doi.org/10.1111/nph.15099](https://doi.org/10.1111/nph.15099).
- Moreno, R., Tallini, L. R., Salazar, C., Osorio, E. H., Montero, E., Bastida, J., Oleas, N., y Acosta León, K. (2020). Chemical Profiling and Cholinesterase Inhibitory Activity of Five *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) Species from Ecuador. *Molecules*, 25(9), 3-12. [doi.org/10.3390/molecules25092092](https://doi.org/10.3390/molecules25092092).
- Morris, A. B., y Shaw, J. (2018). Markers in time and space: A review of the last decade of plant phylogeographic approaches. *Molecular Ecology*, 27(10), 2317-2333. [doi.org/10.1111/mec.14695](https://doi.org/10.1111/mec.14695).
- Nie, Z., Wen, J., Gu, Z., Boufford, D., y Sun, H. (2005). Polyploidy in the Flora of the Hengduan Mountains Hotspot, Southwestern China. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 92(2), 275-306.
- Oleas, N. (2011a). Landscape Genetics of *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) in Ecuador (Tesis doctoral). Florida International University, Miami-Florida. Doi: [10.25148/etd.FI11080201](https://doi.org/10.25148/etd.FI11080201).

- Oleas, N. (2012a). Actualización del Estado de Conservación de la Ashpa cebolla (*Phaedranassa schizantha*), una Especie Endémica de la Sierra Central del Ecuador. *CienciAmérica: Revista de divulgación científica de la Universidad Tecnológica Indoamérica*, 1(1), 18-25.
- Oleas, N. H., Meerow, A. W., y Francisco-Ortega, J. (2009). Eight microsatellite loci in *Phaedranassa schizantha* Baker (Amaryllidaceae) and cross-amplification in other *Phaedranassa* species. *Conservation Genetics*, 10(6), 1887-1889. [doi.org/10.1007/s10592-009-9846-8](https://doi.org/10.1007/s10592-009-9846-8).
- Oleas, N. H., Meerow, A. W., y Francisco-Ortega, J. (2012b). Population Dynamics of the endangered plant, *Phaedranassa tunguraguae*, from the Tropical Andean Hotspot. *Journal of Heredity*, 103(4), 557-569. [doi.org/10.1093/jhered/ess020](https://doi.org/10.1093/jhered/ess020).
- Oleas, N. H., Meerow, A. W., y Francisco-Ortega, J. (2013). Molecular markers and conservation of plant species in the Latin-America: the case of *Phaedranassa viridiflora* (Amaryllidaceae). *The Botanical Review*, 79(4), 507-527. [doi.org/10.1007/s12229-013-9125-8](https://doi.org/10.1007/s12229-013-9125-8).
- Oleas, N. (2011b). *Amaryllidaceae*. En S. León-Yáñez, N. Valencia, L. Pitmam, C. Ulloa Ulloa y H. Navarrete (Eds). *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador* (pp. 87-89). Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Oleas, N.H., Meerow, A.W., y Francisco-Ortega, J. (2005). Isolation and characterization of eight microsatellite loci from *Phaedranassa tunguraguae*

- (Amaryllidaceae). *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 791-793.  
[doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01064.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01064.x).
- Pansarin, E. R., y Amaral, M. (2008). Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: A consequence of natural hybridization? *Plant Biology*, 10(2), 211-219.  
[doi.org/10.1111/j.1438-8677.2007.00025.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2007.00025.x).
- Pantoja, P. O., Paine, C. T., y Vallejo-Marín, M. (2018). Natural selection and outbreeding depression suggest adaptive differentiation in the invasive range of a clonal plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1882). [doi.org/10.1098/rspb.2018.1091](https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1091).
- Peakall, R. y Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6 (1), 288–295. [doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x).
- Perfectti, F. (2002). Especiación: modos y mecanismos. En M, Soler (Ed.), *Evolución: La base de la biología* (pp. 307-322). Proyecto Sur. España.
- Pliszko, A., y Zalewska-Gałosz, J. (2016). Molecular evidence for hybridization between invasive *Solidago canadensis* and native *S. virgaurea*. *Biological Invasions*, 18(11), 3103-3108. [doi.org/10.1007/s10530-016-1213-3](https://doi.org/10.1007/s10530-016-1213-3).
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

- Ravenna, P. (1984). New species in *Phaedranassa* and *Eucrosia* (Amaryllidaceae). *Phytologia*, 56, 196-198. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/13168897>.
- Rentaría-Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En L. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (pp. 541-566). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. SEMARNAT. México.
- Rothfels, C. J., Johnson, A. K., Hovenkamp, P. H., Swofford, D. L., Roskam, H. C., Fraser-Jenkins, C. R., Windham, M. D., y Pryer, K. M. (2015). Natural hybridization between genera that diverged from each other approximately 60 million years ago. *The American Naturalist*, 185(3), 433-442. Doi: 10.1086/679662.
- Sánchez, E., Cadena, M., y Moreno, D. R. (2018). Inventario de la Familia Orchidaceae en la Reserva Geobotánica Pululahua. *Revista Científica Hallazgos21*, 3(1), 1-13. <https://revistas.pucese.edu.ec/hallazgos21/article/view/207>.
- Shull, G. H. (1908). The composition of a field of maize. *Journal of Heredity*, os-4(1), 296-301. [doi.org/10.1093/jhered/os-4.1.296](https://doi.org/10.1093/jhered/os-4.1.296).
- Smirnov, S., Skaptsov, M., Shmakov, A., Fritsch, R. M., y Friesen, N. (2017). Spontaneous hybridization among *Allium tulipifolium* and *A. robustum* (*Allium* subg. *Melanocrommyum*, Amaryllidaceae) under cultivation. *Phytotaxa*, 303(2), 155-164. [doi.org/10.11646/phytotaxa.303.2.5](https://doi.org/10.11646/phytotaxa.303.2.5).

- Smith, N. C., y Lee, E. A. (2018). Heterosis and growth in a developing maize plant. *Maydica*, 61(3), 9.
- Soltis, P. S., y Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561-588. [doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092039](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092039).
- Souza, R., Dias, L., Corrêa, T. R., Caixeta, E. T., Fernandes, E., Muniz, D. R., Rosmaninho, L. B., y Cardoso, P. M. R. (2019). Genetic variability revealed by microsatellite markers in a germplasm collection of *Jatropha curcas* L. in Brazil: An important plant for biofuels. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 19(3), 337-346. [doi.org/10.1590/1984-70332019v19n3a46](https://doi.org/10.1590/1984-70332019v19n3a46).
- Suarez-Gonzalez, A., Lexer, C., y Cronk, Q. C. (2018). Adaptive introgression: a plant perspective. *Biology Letters*, 14(3), 1-8. [doi.org/10.1098/rsbl.2017.0688](https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0688).
- Tallmon, D. A., Luikart, G., y Waples, R. S. (2004). The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(9), 489-496. [doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.003](https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.003).
- Tinaut, A., y Ruano, F. (2017). Biodiversidad, Clasificación y Filogenia. En M. Soler (Ed.), *Sistemática y Filogenética* (pp. 293-306).
- Todesco, M., Pascual, M. A., Owens, G. L., Ostevik, K. L., Moyers, B. T., Hübner, S., y Rieseberg, L. H. (2016). Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, 9(7), 892-908. [doi.org/10.1111/eva.12367](https://doi.org/10.1111/eva.12367).

- Valencia, R., Cerón, C., y Palacios, W. (1999). Las formaciones naturales de la Sierra del Ecuador. En R, Sierra. (Ed.), *Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental* (pp. 81-108). Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia, Quito, Ecuador.
- Van-Droogenbroeck, B., Kyndt, T., Romeijn-Peeters, E., Van Thuyne, W., Goetghebeur, P., Romero-Motochi, J. P., y Gheysen, G. (2006). Evidence of natural hybridization and introgression between *Vasconcellea* species (Caricaceae) from southern Ecuador revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Annals of Botany*, 97(5), 793-805. [doi.org/10.1093/aob/mcl038](https://doi.org/10.1093/aob/mcl038).
- Vargas, G. (1990). Plan de manejo de la Reserva Geobotánica de Pululahua. *Paisajes Geográficos*, 23, 2-60. <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/reserva-geobot%C3%A1nica-pululahua>.
- Varshney, R. K., Graner, A., y Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48-55. [doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005).
- Weber, O., y Wilkin, P. (2007). *Stenomesson pearcei*: Amaryllidaceae. *Curtis's Botanical Magazine*, 24(2), 114-120. [doi.org/10.1111/j.1467-8748.2007.00572.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-8748.2007.00572.x).

Yang, R., Folk, R., Zhang, N., y Gong, X. (2019). Homoploid hybridization of plants in the Hengduan mountains region. *Ecology and Evolution*, 9(14), 8399-8410. [doi.org/10.1002/ece3.5393](https://doi.org/10.1002/ece3.5393).

Yu, J., Kuroda, C., y Gong, X. (2014). Natural hybridization and introgression between *Ligularia cymbulifera* and *L. tongolensis* (Asteraceae, Senecioneae) in four different locations. *PLoS One*, 9(12), e115167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115167>.