



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

TEMA:

GENÉTICA POBLACIONAL DE *Phaedranassa cinerea* (Amaryllidaceae), UNA ESPECIE VULNERABLE DEL ECUADOR

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

Autor(a)

Buenaño Robayo María Belén

Tutor (a)

Ph.D. Oleas Gallo Nora Helena

QUITO-ECUADOR

2022

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

Yo, Buenaño Robayo María Belén, declaro ser autor del Trabajo de Titulación con el nombre “**Genética poblacional de *Phaedranassa cinerea* (Amaryllidaceae), una especie vulnerable del Ecuador**”, 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 29 días del mes de marzo de 2022, firmo conforme:

Autor: Buenaño Robayo María Belén

Firma: 

Número de Cédula: 1756086474

Dirección: Pichincha, Quito, Cotocollao, Ponciano Alto.

Correo Electrónico: mabelen_b06@hotmail.com

Teléfono: 0983268434

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación " GENÉTICA POBLACIONAL DE *PHAEDRANASSA CINEREA* (AMARYLLIDACEAE), UNA ESPECIE VULNERABLE DEL ECUADOR" presentado por María Belén Buenaño Robayo, 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, 29 de marzo de 2022

“Genética poblacional de *Phaedranassa cinerea* (Amaryllidaceae), una especie vulnerable del Ecuador”, Nora Helena Oleas Gallo, Ph.D.

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, 29 de marzo de 2022



.....

María Belén Buenaño Robayo

1756086474

APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, sobre el Tema: “GENÉTICA POBLACIONAL DE *PHAEDRANASSA CINEREA* (AMARYLLIDACEAE), UNA ESPECIE VULNERABLE DEL ECUADOR” 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, 29 de marzo de 2022

.....

Nora Helena Oleas Gallo, Ph.D.

TUTOR

.....

MSc. Natasha Baer

LECTOR

.....

Sofia Carvajal Ph.D.

LECTOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, que gracias a su apoyo pude concluir mi carrera. En especial mi madre porque ha sido mi apoyo incondicional durante toda la vida, por aconsejarme, enseñarme a nunca rendirme y creer en mí. A mi padre por su apoyo económico durante toda la carrera universitaria y por enseñarme cada día que con trabajo todo se puede lograr. A mi tía Chochis que es como mi segunda mamá, gracias por los consejos, por escucharme y por apoyarme en todo lo que necesito. A mis hermanos Johanna y Andrés por estar a mi lado y por ser mi mayor motivación. A mi sobrina Arlette, que con su sonrisa y ocurrencias hacía que mis noches de desvelo sean más llevaderas. En general, a cada persona que me acompañó durante todo este tiempo.

Esta es una forma de retribuirles todo el esfuerzo que han hecho por mí.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Tecnológica Indoamérica por el financiamiento para la elaboración de esta tesis bajo proyecto de “Diversidad morfológica, genética y química de plantas”. Mi agradecimiento a mi tutora de tesis, la Dr. Nora Oleas por haberme brindado la oportunidad de trabajar y nutrirme de sus conocimientos científicos en la botánica y en la elaboración del artículo, así también por creer en mí y en mis capacidades. Mi agradecimiento también va dirigido a todos mis profesores que hacen parte de la carrera de Biodiversidad y Recursos Genéticos, gracias por su paciencia y por enseñarme lo hermoso de la ciencia. A Enmily Sánchez, por ayudarme y guiarme en el procesamiento de datos, especialmente en la utilización de los softwares. A mis compañeras y amigas, Amaniksha y Naybe por ser mis confidentes, por ofrecerme su ayuda para explicarme cualquier inquietud durante nuestras jornadas de clases y por ser mi motivación para tener este logro juntas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iv
APROBACIÓN TRIBUNAL	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN EJECUTIVO	xiv
ABSTRACT	xv

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA IMPORTANCIA DE LOS ANDES	1
1.2. GENÉTICA DEL PAISAJE Y SUS COMPONENTES	2
1.3. MICROSATÉLITES	3
1.4. AMARYLLIDACEAE	3
1.5. EL GÉNERO <i>Phaedranassa</i>	3
1.6. <i>Phaedranassa cinerea</i>	4
1.7. OBJETIVOS Y PREDICIONES	5

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA	7
----------------------	---

2.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	7
2.1.1. COSTA DEL ECUADOR	7
2.2.ESPECIE DE ESTUDIO	8
2.2.1. <i>Phaedranassa cinerea</i> Ravenna (1984)	8
2.3.RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	10
2.4.EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y GENOTIPADO DE ADN.....	10
2.5.ANÁLISIS ESTADÍSTICO	11
2.5.1. CONTROL Y CALIDAD DE DATOS:	11
2.5.2. ESTADÍSTICA DE DIVERSIDAD GENÉTICA:	11
2.5.3. ESTRUCTURA Y ASIGNACIÓN DE POBLACIONES:.....	11
2.5.4. AISLAMIENTO POR DISTANCIA	12

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS	13
3.1. CONTROL Y CALIDAD DE DATOS:.....	13
3.2. DIVERSIDAD GENÉTICA:.....	14
3.3. ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ASIGNACIÓN DE POBLACIONES	
16	
3.4. AISLAMIENTO POR DISTANCIA	19

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN	20
4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	20
4.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL Y PATRONES DEMOGRÁFICOS....	21
4.3. IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	23

RECOMENDACIONES.....	24
CONCLUSIONES.....	25
ANEXOS.....	27
LITERATURA CITADA.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadísticas descriptivas básicas de <i>Phaedranassa cinerea</i>	13
Tabla 2. Valores de F_{st} y D_{est} para las 6 poblaciones de <i>Phaedranassa cinerea</i>	16
Tabla 3. Resultados del Análisis de Varianza Molecular de <i>Phaedranassa cinerea</i>	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la distribución del género <i>Phaedranassa</i> en los Andes del Ecuador.....	6
Figura 2. Ubicación del área de estudio: Región Costa.....	8
Figura 3. Mapa de distribución geográfica de <i>Phaedranassa cinerea</i> en las estribaciones occidentales de los Andes del Ecuador.....	9
Figura 4. Estructura espacial de seis poblaciones de <i>Phaedranassa cinerea</i> con los resultados del agrupamiento Bayesiano de STRUCTURE con K=2.....	15
Figura 5. Estructura espacial de seis poblaciones de <i>Phaedranassa cinerea</i> con los resultados del agrupamiento Bayesiano de STRUCTURE con K=4.....	17
Figura 6. Delta K: muestra el valor más probable para K con STRUCTURE HARVESTER.....	18
Figura 7. Agrupamiento poblacional basado en el modelo Bayesiano de <i>Phaedranassa cinerea</i>	19

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Secuencia de cebadores para los 13 loci de microsatélites de <i>Phaedranassa cinerea</i> . Tomado de (Oleas et al., 2005; 2009).....	27
Anexo 2. Estadística descriptiva.	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 3. Estadística descriptiva de los 13 loci de microsatélites de <i>Phaedranassa cinerea</i> por cada población.....	29

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

TEMA: “GENÉTICA POBLACIONAL DE *PHAEDRANASSA CINEREA* (AMARYLLIDACEAE), UNA ESPECIE VULNERABLE DEL ECUADOR”

AUTOR: María Belén Buenaño Robayo

TUTOR: Nora Helena Oleas Gallo, PhD.

RESUMEN EJECUTIVO

Los Andes Tropicales son uno de los centros de mayor diversidad y especiación de plantas en el mundo. Sin embargo, los estudios que documentan los patrones de variación genética dentro de las especies son todavía escasos. *Phaedranassa cinerea* es una especie de planta perteneciente a la familia de las Amaryllidaceae, clasificada como “Vulnerable” según los criterios de la UICN. Esta especie está restringida en las estribaciones occidentales de los Andes ecuatorianos. El objetivo de este estudio es entender los patrones de especiación mediante la evaluación de la estructura genética de *P. cinerea* en relación con la distribución geográfica. Mediante un enfoque bayesiano, analizamos la diferenciación genética de la especie con 13 loci de microsátélites previamente desarrollados para el género. Analizamos la distancia genética y geográfica para conocer cómo se relacionan. Nuestros resultados muestran que la diversidad genética para esta especie es alta en comparación a otras especies del mismo género. En el análisis bayesiano se encontraron dos grupos genéticos de las seis poblaciones analizadas. No encontramos evidencia de aislamiento por distancia. Las poblaciones ubicadas en el noroccidente muestran menos riqueza de alelos que las poblaciones suroccidentales de los Andes. La especie muestra exceso de homocigotos. Existe evidencia de cuellos de botella reciente. Por lo cual, es necesario implementar esfuerzos de conservación para que ocurra intercambio genético entre las poblaciones, especialmente en lugares de intervención antropogénica.

DESCRIPTORES: Amaryllidaceae, microsátélites, diversidad poblacional, especies vulnerables.

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

THEME: “POPULATION GENETICS OF *PHAEDRANASSA CINEREA* (AMARYLLIDACEAE), A VULNERABLE SPECIES FROM ECUADOR”

AUTHOR: María Belén Buenaño Robayo

TUTOR: Nora Helena Oleas Gallo, PhD.

ABSTRACT

The Tropical Andes is one of the centers of the greatest plant diversity and speciation in the world. However, studies documenting patterns of genetic variation within species are still scarce. *Phaedranassa cinerea* is a species of plant belonging to the Amaryllidaceae family, classified as "Vulnerable" according to the IUCN criteria. This species is restricted to the western foothills of the Ecuadorian Andes. This study is aimed to understand speciation patterns by evaluating the genetic structure of *P. cinerea* in relation to geographical distribution. Using a Bayesian approach, the genetic differentiation of the species with 13 microsatellite loci previously developed for the genus are analyzed, and it is analyzed the genetic and geographical distance to know how they relate. Our results show that the genetic diversity for this species is high compared to other species of the same genus. The Bayesian analysis found two genetic groups of the six populations analyzed. Evidence of long-range isolation was not found. Populations located in the northwest show less allele richness than the southwestern populations of the Andes. The species shows excess homozygous. There is evidence of recent bottlenecks. Therefore, it is necessary to implement conservation efforts so that genetic exchange occurs between populations, especially in places of anthropogenic intervention.

KEYWORDS: Amaryllidaceae, microsatellites, population diversity, vulnerable species

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA IMPORTANCIA DE LOS ANDES

Los Andes son considerados una región única y constituyen uno de los cinco puntos críticos de biodiversidad y endemismo más importante alrededor del mundo (Brush et al., 2007). Esta cadena montañosa es considerada un sistema natural para la investigación del origen de la diversidad de plantas a escala espacial por algunas razones (Nevado et al., 2018). Una de ellas, es la alta tasa de radiación de especies de plantas (Luebert y Weigend, 2014). Otra de las razones, es el alto número de plantas endémicas que tiene esta región (Hughes, 2017). Se conoce que, en Ecuador de las 4500 especies endémicas, 3028 se encuentran en la región (León-Yáñez et al., 2011). Por último, se sabe que esta gran diversidad surgió en parte en el reciente levantamiento de los Andes, ocurrido en el Pleistoceno (Luebert y Weigend, 2014; Nevador et al., 2018).

Las cadenas montañosas como los Andes tienen varias funciones en el paisaje, por sus características geográficas se ha reconocido como: un corredor que promueve el intercambio de elementos bióticos de Norte a Sur, y a la vez es considerada una barrera geográfica que origina la especiación (Luebert y Weigend, 2014). Esta última característica de especiación ocurre por la heterogeneidad de los Andes que da mayor oportunidad a la colonización de nuevas especies (Hoorn et al., 2013). A menudo, se asume que el tipo de especiación que ocurre es alopátrico y sucede cuando las poblaciones se aíslan una de la otra por barreras geográficas o ecológicas, se separan los acervos genéticos y divergen las poblaciones indistintamente (Wiens y Graham, 2005; Nevador et al., 2018).

A pesar de la gran diversidad que tiene los Andes, están siendo amenazado por el cambio de uso de suelo, conductor que puede llevar a la pérdida y fragmentación del hábitat (Mittermeier et al., 2011; Rodriguez y Leiton, 2021). Esto ha producido que solamente en el Ecuador el 83% de las plantas endémicas estén clasificadas en peligro de extinción según la UICN debido a los fuertes impactos antrópicos (León-Yáñez et al., 2011; Oleas et al., 2012). Se cree que esto sucede porque las especies endémicas tienen distribución restringida, tamaños poblacionales pequeños y baja diversidad genética, por lo tanto, son más sensibles a la fragmentación del hábitat, aumenta la endogamia y se pierde el potencial de las especies a adaptarse al cambio (Allendorf et al., 2007; Forrest et al., 2017). Todos estos procesos se relacionan con los atributos de las especies de estudio como: el tamaño y la densidad poblacional, la longevidad y el modo de reproducción (Aguilar et al., 2006; Hensen et al., 2011).

1.2.GENÉTICA DEL PAISAJE Y SUS COMPONENTES

La genética del paisaje, un campo interdisciplinario, que integra la perspectiva a escala espacial determinada por los procesos biológicos y ecológicos de las especies de estudio (Holderegger y Wagner, 2006) y puede ser una herramienta útil para conocer la dinámica de las especies endémicas. Se compone de: la ecología del paisaje, la genética poblacional y las técnicas de análisis espacial (Balkenhol et al., 2015).

Por un lado, la ecología del paisaje estudia la relación patrón-proceso, ecológico y espacial y busca integrar el espacio y el tiempo para evaluar cómo un ambiente heterogéneo y cambiante puede influir en los procesos ecológicos de una especie (Balkenhol et al., 2015) La ecología del paisaje incluye en su metodología los problemas ambientales como: el cambio climático, la fragmentación, la pérdida de hábitats, entre otros (Holderegger et al., 2007).

En cuanto a la genética poblacional, estudia la composición y la variación genética en la población influenciada por procesos micro-evolutivos en la matriz espacial (Holderegger y Wagner, 2006). Uno de los factores importantes para los genetistas de la población es la variación genética (Balkenhol et al., 2015).

Uno de los marcadores moleculares neutrales son los Microsatélites (SSR) apropiados para ser aplicados en poblaciones pequeñas y en peligro (Allendorf et al., 2017). Tienen utilidad en el estudio de la genética de la población midiendo la tasa de migración, diferenciando poblaciones y en eventos demográficos, esto sucede por su alto nivel polimórfico y neutralidad. Además, son fáciles y eficientes a la hora de tipificar las muestras (Demarchi, 2009).

1.3. AMARYLLIDACEAE

La familia Amaryllidaceae son plantas herbáceas, perennes y bulbosas, tiene alrededor de 90 géneros, con 1700 a 1800 especies (Meerow y Snijman, 2006). Su distribución es amplia, específicamente se distribuye en África, Eurasia y América (Meerow et al., 2000). En Ecuador tiene 33 especies de esta familia, 12 de ellas consideradas endémicas de las cuales, ocho están “En Peligro” y cuatro “Vulnerable” del género *Phaedranassa* y *Eucrosia* (Oleas, 2011b). Originalmente, habitan valles secos, bosques andinos y bosques de litoral seco húmedo, pero por el desarrollo agrícola, expansión urbana y la implementación de carreteras, ahora las encontramos en zona alteradas (Oleas, 2011b).

1.4. EL GÉNERO *Phaedranassa*

Phaedranassa de la familia Amaryllidaceae es uno de los géneros con mayor número de especies endémicas en el Ecuador, 7 de las 8 especies son endémicas de este país (*P. cinerea*, *P. brevifolia*, *P. glauciflora*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. viridiflora*, *P.*

cuencana y *P. dubia*) y están clasificadas como “Vulnerables” o “En Peligro” por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (Oleas, 2011b; Meerow, 1990) (Figura 1). Este género se estableció a partir de la descripción de la especie *P. chloracra* por Herbert (1845). El nombre de *Phaedranassa* proviene del griego “phaidos” que significa alegre y “anassa” que significa reina. En Ecuador, el nombre común es “ashpa cebolla” que en quichua significa “falsa cebolla” (Oleas, 2011a). Es reconocido por ser un grupo monofilético dentro de la tribu *Eucharideae*, que incluye especies con hojas pecioladas, inflorescencia pseudo-umbelada que va 6 a 20 flores tubulares de color rojo, rosa, amarillo o naranja según la especie y el número de cromosomas $2n = 46$ (Meerow et al., 2020).

1.5. *Phaedranassa cinerea*

Phaedranassa cinerea es endémica del Ecuador, presente en las provincias de Pichincha, Cotopaxi y Chimborazo entre los 850 a 1800 m de elevación (Figura 3). Habita en las laderas occidental de los bosques húmedos de montaña baja a media de los Andes, en zonas secas y rocosas (Meerow, 1990). Con relación a su estado de conservación, *Phaedranassa cinerea* es una de las especies de la familia de las Amarillydaceae clasificada como “Vulnerable”, según los criterios de la Lista Roja de especies en peligro de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (Oleas y Pitman, 2003). Esto puede deberse al entorno en el que habita que generalmente que son lugares abiertos en el borde de la carretera (Oleas, 2011b).

¿Pero por qué es importante estudiar la estructura poblacional de *Phaedranassa cinerea*? porque nos permitirá evaluar la diversidad genética y a su vez saber si va a sobrevivir con el tiempo la especie. Además, con este estudio podremos identificar sitios de conservación para preservar la diversidad genética de esta especie.

Las especies endémicas como *Phaedranassa cinerea* son importantes para estudiar las dinámicas de especiación y evolución ocurridas en los puntos calientes (Hotspot) de diversidad como son los Andes, porque son especies restringidas en áreas geográficas en particular (Oleas, 2011a; Matolweni et al., 2000). Gran parte de las especies endémicas se encuentran en estado vulnerable o en peligro de extinción, lo que resulta de gran importancia estudiarlas (Oleas, 2011a; Matolweni et al., 2000).

Además, las especies de la familia Amaryllidaceae se caracterizan por tener alcaloides como la galantamina que actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa, que se incrementa cuando las personas presentan la enfermedad del Alzheimer (Jin y Yao, 2019). Por lo tanto, estudiar esta especie es importante por los potenciales usos biomédicos como tratamiento farmacológico para esta enfermedad que afecta a más de 50 millones de personas (OMS, 2017).

1.6. OBJETIVOS Y PREDICCIONES

La presente investigación pretende analizar la genética poblacional *Phaedranassa cinerea* (Amaryllidaceae) mediante el uso de microsatélites, con el objetivo de identificar la diferenciación y diversidad genética entre y dentro de las poblaciones. Analizar si el aislamiento por distancia (IBD por sus siglas en inglés) influye en la diversidad genética. Además, identificar áreas geográficas para la conservación de la diversidad genética de *P. cinerea*. Pretendemos encontrar que, a mayor distancia geográfica, mayor será la estructura poblacional y mayor diferenciación genética de *Phaedranassa cinerea*.

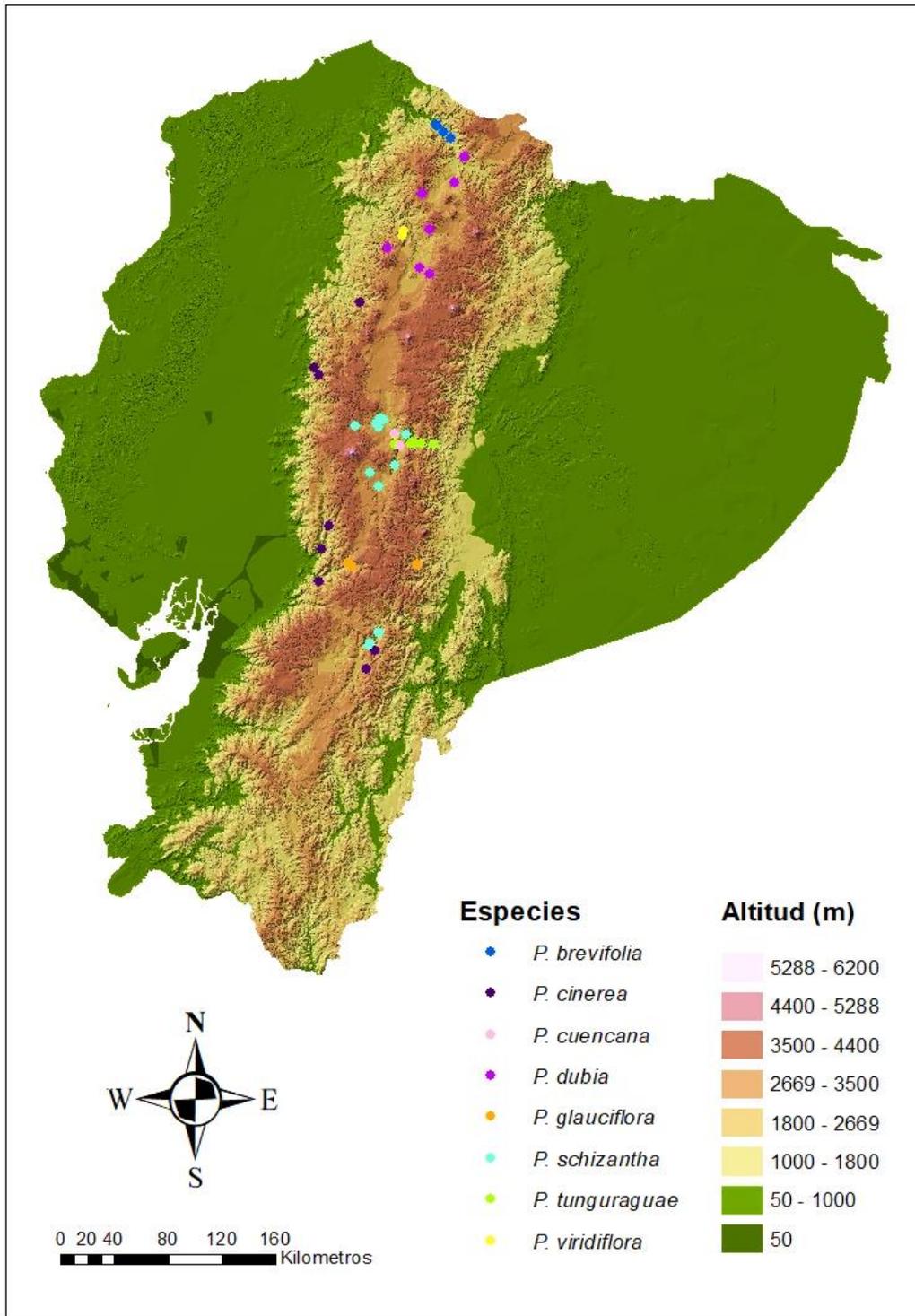


Figura 1. Mapa de la distribución del género *Phaedranassa* en los Andes del Ecuador.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. ÁREA DE ESTUDIO

2.1.1. COSTA DEL ECUADOR

La elevación de la cordillera de los Andes permitió que se separe geográficamente el Ecuador en tres regiones continentales: Costa, Sierra y Amazonía (Prat, 2018). Para este estudio nos interesa la región Costa porque *Phaedranassa cinerea*, la especie de interés se distribuye en las estribaciones occidentales de los Andes del Ecuador que forman parte de esta región (Figura 2) (Morrow, 1990).

La región Costa, o región baja occidental, se despliega desde el perfil costero hasta los 1000 m.s.n.m. (Barros y Troncoso, 2010). Su extensión es aproximadamente de 670 km de largo y 150 km de ancho, esto se debe a que en el Sur del país esta región es estrecha y se amplía desde la latitud de Guayaquil, adquiriendo mayor tamaño (Valera y Ron, 2018). Cuenta con llanuras bajas, cuencas sedimentarias, zona de piedemonte y algunas cordilleras de baja altura. La región Litoral se puede dividir en cuatro regiones: manglares, sabanas, la zona de cultivo y la zona de montaña (Prat, 2018).

El clima de la región Costa se caracteriza por ser tropical árido, seco o húmedo dependiendo de la zona. La temperatura promedio es de 24 o 25°C, puede ser menor en la cordillera con 22°C. La precipitación varía de acuerdo a la ubicación y a la corriente Humboldt, entre 60 mm a 2000 mm anuales. La presencia de la corriente de El Niño y la Zona de Convergencia Intertropical da origen a la estación húmeda en los meses de diciembre y entre abril y mayo, con altas temperaturas y lluvias abundantes. La estación

seca, de junio a noviembre o diciembre, se caracteriza por tener menores temperaturas y poca lluvia (Valera y Ron, 2018).

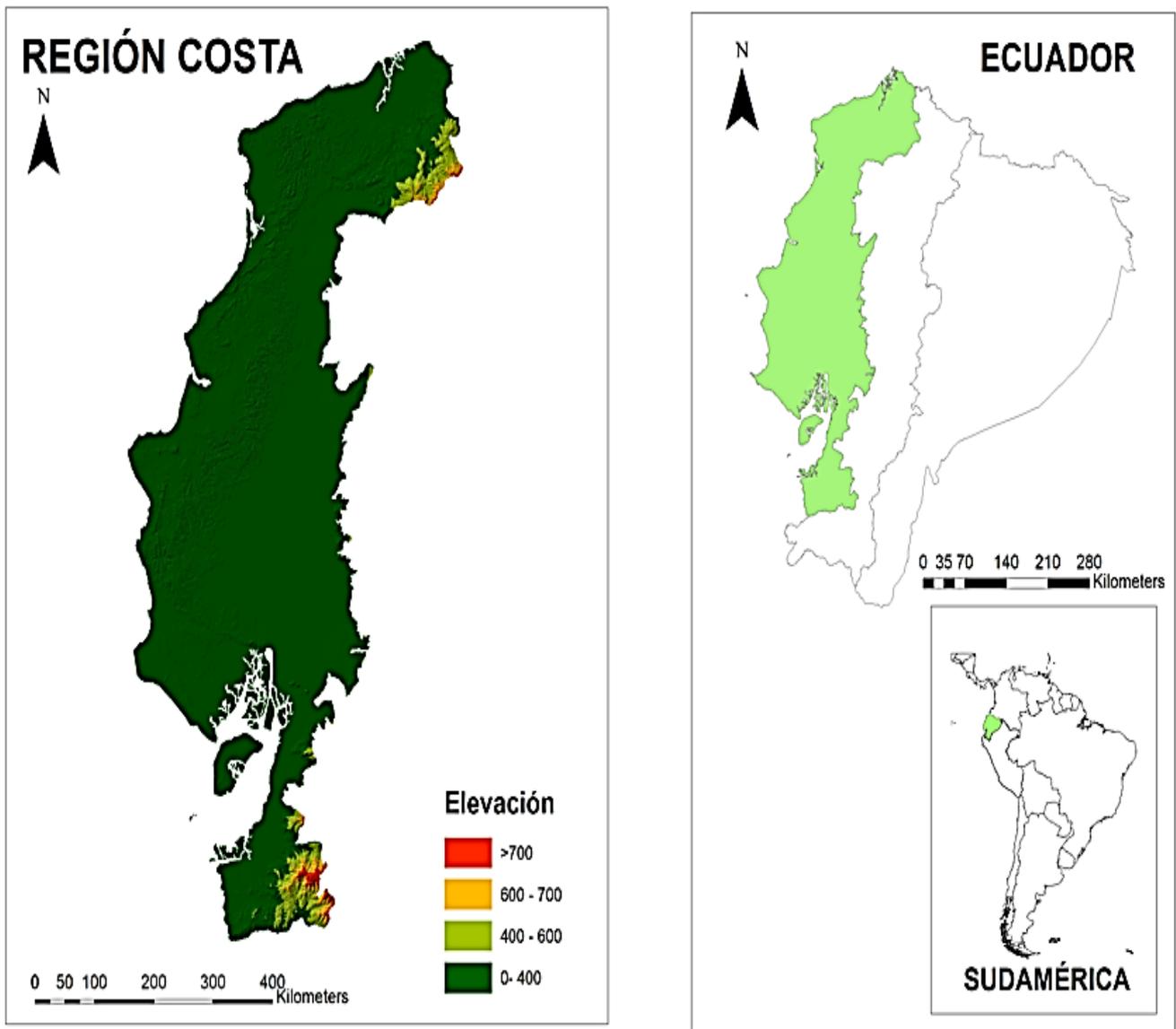


Figura 2. Ubicación del área de estudio: Región Costa

2.2.ESPECIE DE ESTUDIO

2.2.1. *Phaedranassa cinerea* Ravenna (1984)

Phaedranassa cinerea es una especie bulbosa, con hojas pecioladas y flores tubulares y de color rosa pálido o rosa coral con bandas de color verde en los tépalos y una banda amarilla que separa estas dos zonas (Meerow, 1990). La distribución se

restringe en las estribaciones occidentales de los Andes de Ecuador, específicamente en las provincias de Pichincha, Cotopaxi y Chimborazo entre los 850 a 1800 m de elevación (Figura 3). Las poblaciones de *Phaedranassa cinerea* se encuentran en lugares alterados y en el borde de la carretera (Oleas, 2011a).

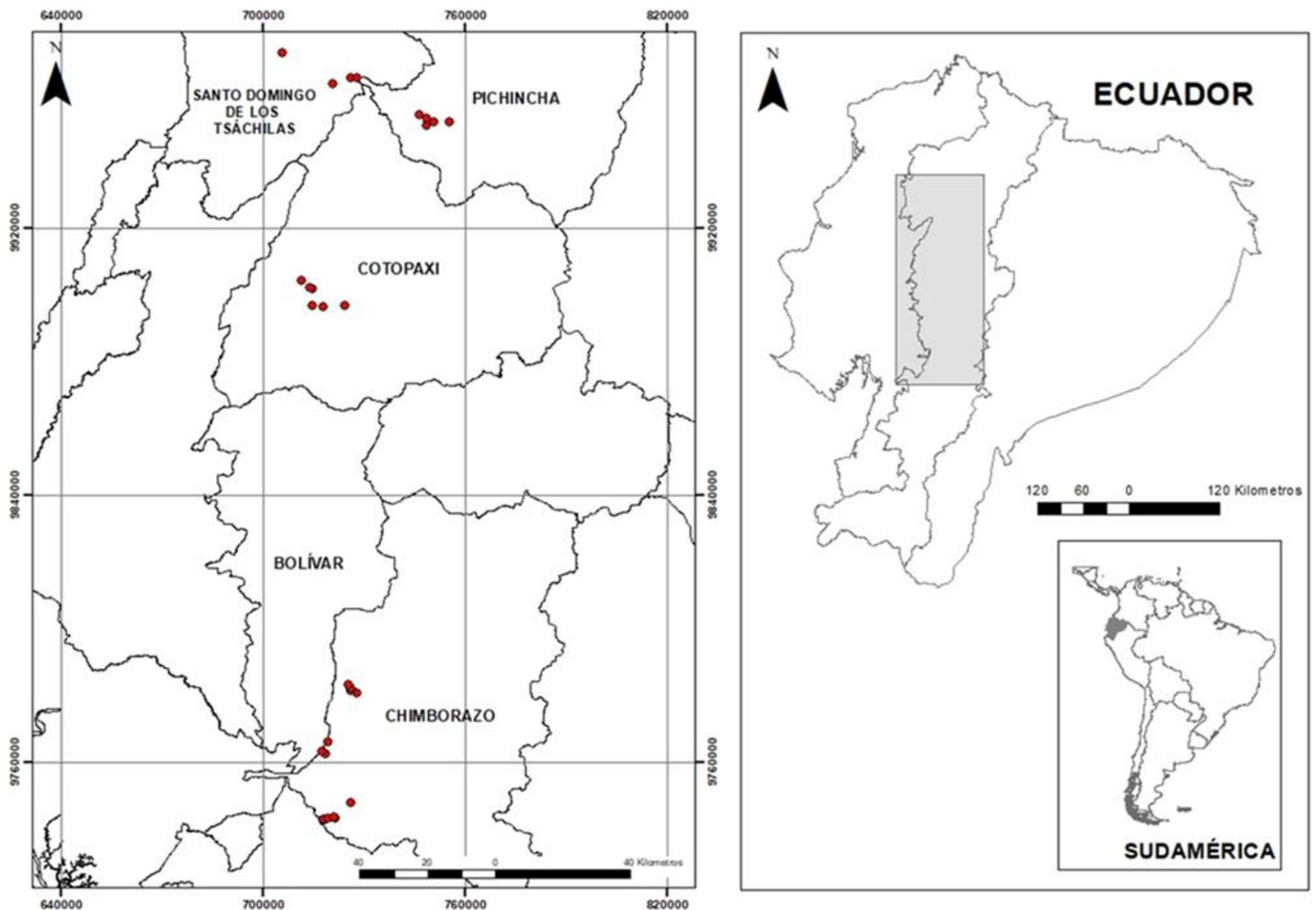


Figura 3. Mapa de distribución geográfica de *Phaedranassa cinerea* en las estribaciones occidentales de los Andes del Ecuador

2.3.RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para el estudio genético, se colectaron hojas frescas de individuos a lo largo de la distribución de *P. cinerea*. Las muestras se llevaron a secado rápido en silica gel. Para evitar muestrear el mismo individuo, se seleccionaron hojas cuya base del peciolo estaba separada por al menos un metro, debido que, las especies de *Phaedranassa* spp. tienen reproducción vegetativa clonal por bulbos (Oleas et al., 2016).

2.4.EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y GENOTIPADO DE ADN

La extracción y cuantificación del ADN se hizo en base a los protocolos descritos en Oleas et al. (2005; 2009). La extracción del ADN se realizó con el kit FastDNA de Q-Biogen. Los individuos fueron genotipados usando 13 microsatélites previamente desarrollados para *P. schizantha* (ps2, ps13, ps16, ps27 y ps28) (Oleas et al., 2009) y *P. tunguraguae* (pt14, pt21, pt32, pt39, pt43, pt48, pt49 y pt61) (Anexo1) (Oleas et al., 2005, 2009).

El procedimiento de reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) se hizo en base a los protocolos de Oleas et al. (2005, 2009). En el caso de no amplificarse y si los alelos mostraran una diferencia de un par de bases (pb) fue necesario repetir hasta tres veces el procedimiento. Después de esto, si no se observaba ningún cambio en un par de bases se eliminó del análisis (Oleas, 2011). El tamaño de los fragmentos de ADN, productos de la PCR, fueron identificados mediante electroforesis capilar de en AB3730 utilizando GeneScan 500 ROX (Oleas et al., 2005). Los alelos se identificaron con el software DNA SEQUENCIG ANALYSIS versión 3.7. (Oleas et al., 2005).

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.5.1. CONTROL Y CALIDAD DE DATOS:

Los alelos nulos, errores de genotipado y la pérdida de alelos fueron analizados con el programa Micro-Checker versión 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). La presencia de los alelos nulos no permite identificar los heterocigotos y por lo tanto complica la interpretación de los resultados (Carlsson, 2008).

2.5.2. ESTADÍSTICA DE DIVERSIDAD GENÉTICA:

La estadística descriptiva, que incluye datos del número de alelo (N), número de alelos efectivos (N_e), número de alelos privados (PA), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) e índice de fijación (F), se estimaron con el programa GENALEX versión 6.5.03 (Peakall y Smouse, 2006). El desequilibrio de ligamiento (LD) y una prueba global para evaluar la desviación Hardy-Weinberg con déficit de heterocigotos se calculó con el programa GENEPOP versión 4.7 para lo cual, se utilizaron los parámetros para la cadena de Markov: 10 000 lotes de 10 000 interacciones por lote y 10 0000 desmemorización (Raymond y Rousset, 1995; Rousset, 2008).

2.5.3. ESTRUCTURA Y ASIGNACIÓN DE POBLACIONES:

El programa GENALEX versión 5.5.03 (Peakall y Smouse, 2006) se utilizó para calcular la diferenciación genética con el F_{st} y $Dest$. Para conocer el porcentaje de divergencia entre poblaciones se realizó el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con 999 permutaciones en el programa GENALEX (Peakall y Smouse, 2006), este análisis es método para incluir diferentes estimaciones de la variación genética en distintos niveles jerárquicos como la comparación entre poblaciones, dentro la población y entre individuos de cada población (Meirmans, 2006). El análisis Bayesiano se realizó con el programa STRUCTURE versión 2.3.4, que

ayuda a identificar poblaciones distintas y asignar individuos a cada población genética (Pritchard et al., 2000). Para la ejecución, se usó un modelo de mezcla, con 2 000 000 de repeticiones y la duración del periodo de quemado de 500 000 con 20 corridas por cada K (número de poblaciones), y se estudiaron K desde 1 hasta 7. Posteriormente, los resultados se ingresaron en el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl, 2011), el cual utiliza el método de Evanno et al. (2005) y produce una gráfica que ayuda a detectar el número de grupo genético (K) que se ajusta mejor a nuestros datos (Earl y vonHolt, 2012). Además, usamos CLUMPAK (Jakobsson y Rosenberg, 2007), que resume las corridas de cada K separándolas en distintos grupos empleando el método de Evanno et al. (2005) (Kopelman et al., 2015).

2.5.4. AISLAMIENTO POR DISTANCIA

Se calculó con la extensión de GENALEX versión 6.5.03 (Peakall y Smouse, 2006), correlacionado una matriz de distancia geográfica y la matriz de distancia genética, y se probó la significancia de la correlación mediante una prueba de Mantel.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1. CONTROL Y CALIDAD DE DATOS:

Se evidenciaron alelos nulos en un rango de 5 a 10 loci por población con MICRO-CHECKER (Tabla 1). Los alelos nulos generalmente aparecen cuando las poblaciones tienen un alto tamaño poblacional efectivo y podrían desviar el equilibrio HWE (Chapuis y Estoup, 2007). Por lo tanto, para abordar esta problemática, eliminamos los dos loci que mostraban alelos nulos en todas las poblaciones. Nuestros datos no mostraron un cambio significativo en F_{st} al eliminar los alelos nulos, con los 13 loci tuvimos un $F_{st} = 0.16$ y con 11 loci el $F_{st} = 0.17$, al no existir un cambio significativo en este valor todos los análisis se realizaron con los 13 loci de microsatélites (Anexo 2).

Tabla 1. Estadísticas descriptivas básicas de *Phaedranassa cinerea*: Número de muestra (N); Número de alelos (Na); Número de alelo efectivo (Ne), heterocigosidad esperada y observada (He, Ho), índice de fijación (F), número de pares de locus con Desequilibrio de ligamiento (LD), Número de alelos privados (PA), Loci con evidencia de alelos nulos (NL)

Pop	N	Na	Ne	Ho	He	F _a	LD	PA	NL
1pc	28	5.23	2.48	0.31	0.50	0.33***	5	1	7
3pc	26	6.08	3.06	0.40	0.57	0.29***	0	1	6
4pc	28	8.69	3.19	0.43	0.60	0.30***	4	1	6
5pc	28	8.54	4.44	0.40	0.68	0.39***	2	2	8
7pc	30	6.46	2.62	0.36	0.52	0.28***	6	1	5
8pc	30	8.23	4.20	0.35	0.69	0.48***	4	1	10
Promedio	28.3	7.21	3.33	0.38	0.59	0.34	4	1	

a = Significancia determinada por la prueba Global Hardy-Weinberg con el parámetro de H_1 = déficit de heterocigotos

*** P < 0.001 **P < 0.01 y *P < 0.05

3.2.DIVERSIDAD GENÉTICA:

Se identificaron un total de 180 alelos en 13 loci de microsatélites polimórficos (SSR) en 6 poblaciones. Dentro de cada población se encontró que el número medio de alelos (N_a) es de 7.21, el rango puede ir desde 5.23 a 8.69 (Tabla 1). El número medio de alelos efectivos (N_e) fue de 3.33, varía entre el rango de 2.48 a 4.44 entre poblaciones (Tabla 1). La heterocigosidad observada (H_o) de 0.31 a 0.43 y la heterocigosidad esperada de 0.50 a 0.69 (Tabla 1). Las poblaciones más diversas fueron: 8P.c, 5P.c y 4P.c, mientras que la población 1P.c, 3P.c y 7P.c muestran menor cantidad heterocigosidad observada e en relación con la heterocigosidad esperada (Tabla 1). El índice de fijación fue más alto en la población 8P.c con 0.48 y el más bajo con 7P.c con 0.28 (Tabla 1). Por otro lado, el desequilibrio de ligamiento (LD) se encontró en poblaciones menos diversas como la 1P.c y la 7P.c, con 5 y 6 respectivamente (Tabla 1). El número de alelos privados (PA) varió de 1 a 2 en cada población (Tabla 1).

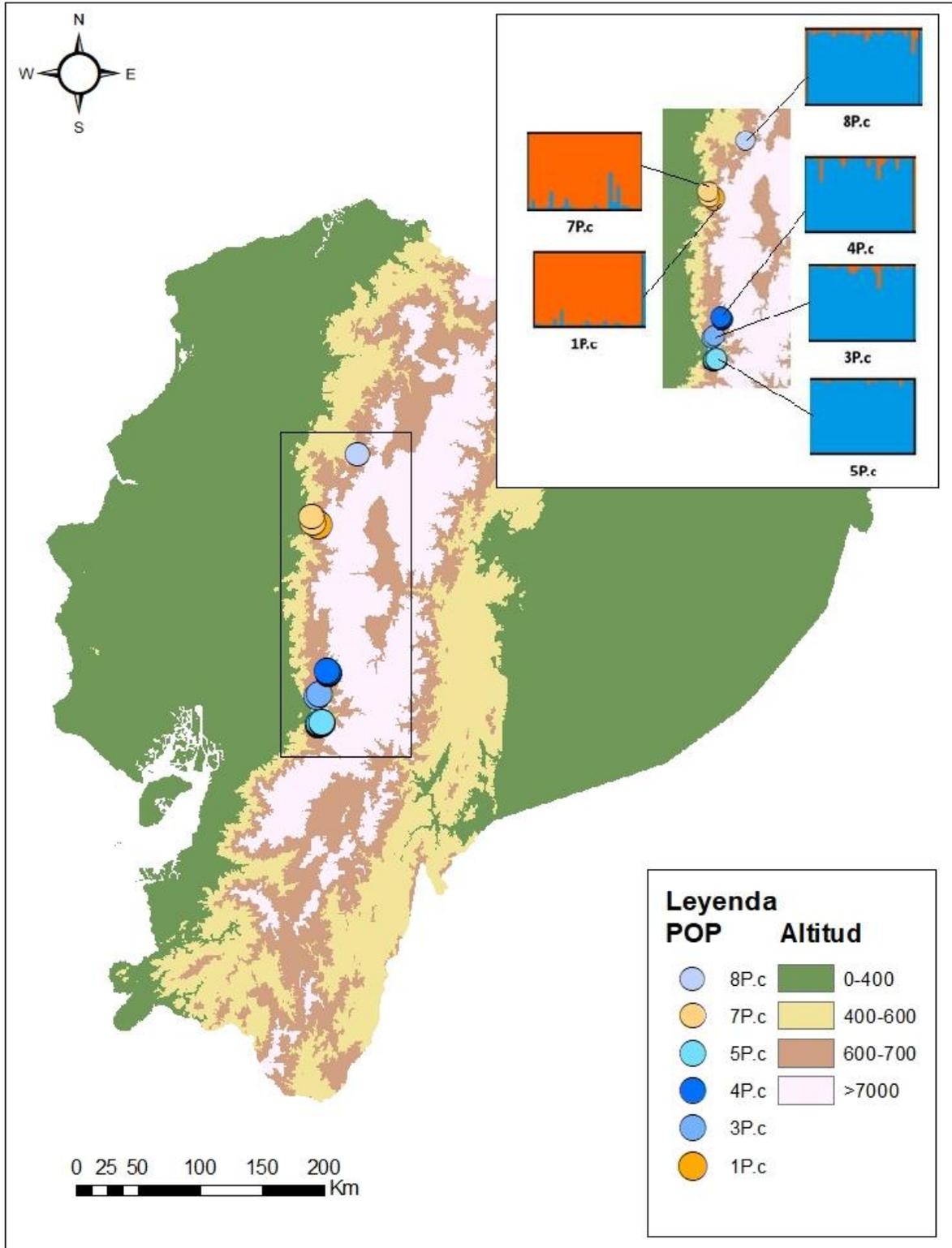


Figura 4. Estructura espacial de seis poblaciones de *Phaedranassa cinerea* con los resultados del agrupamiento Bayesiano de STRUCTURE con K=2

3.3. ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ASIGNACIÓN DE POBLACIONES

El Fst y Dest muestran las mismas tendencias de diferenciación entre las poblaciones. Por ejemplo, la mayor diferencia fue entre las poblaciones 5P.c y 7P.c con 0.53 en el Dest y 0.16 en el Fst (Tabla 2). Mientras que, las poblaciones con menor diferenciación fueron entre la población 3P.c y 4P.c con 0.07 en el Dest y 0.04 con el Fst, seguido por las poblaciones 1P.c y 7P.c con 0.13 en Dest y 0.07 con el valor de Fst (Tabla 2). Además, todos los cálculos de Fst poblacional tienen un valor de $P < 0.001$, que muestran ser altamente significativos (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de Fst y Dest para las 6 poblaciones de *Phaedranassa cinerea*

Fst debajo de la diagonal y Dest arriba de la diagonal

	1P.c	3P.c	4P.c	7P.c	8P.c	5P.c
1P.c	_____	0.33	0.35	0.13	0.23	0.44
3P.c	0.13***	_____	0.07	0.40	0.20	0.39
4P.c	0.13***	0.04***	_____	0.41	0.19	0.38
7P.c	0.07***	0.15***	0.15***	_____	0.27	0.53
8P.c	0.08***	0.07***	0.06***	0.09***	_____	0.33
5P.c	0.14***	0.11***	0.10***	0.16***	0.08***	_____

Los resultados del AMOVA indican que el 15% de diversidad entre las poblaciones y el 85 % dentro de las poblaciones. El valor $P < 0.001$, por lo tanto, es significativo (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del Análisis de Varianza Molecular de *Phaedranassa cinerea*

Fuente de variación	% variación	Estadísti cas de F	Valor F	P
Entre poblaciones	15%	Fst	0.154	0.000
Dentro de poblaciones	85%			
Total	100%			

*** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$

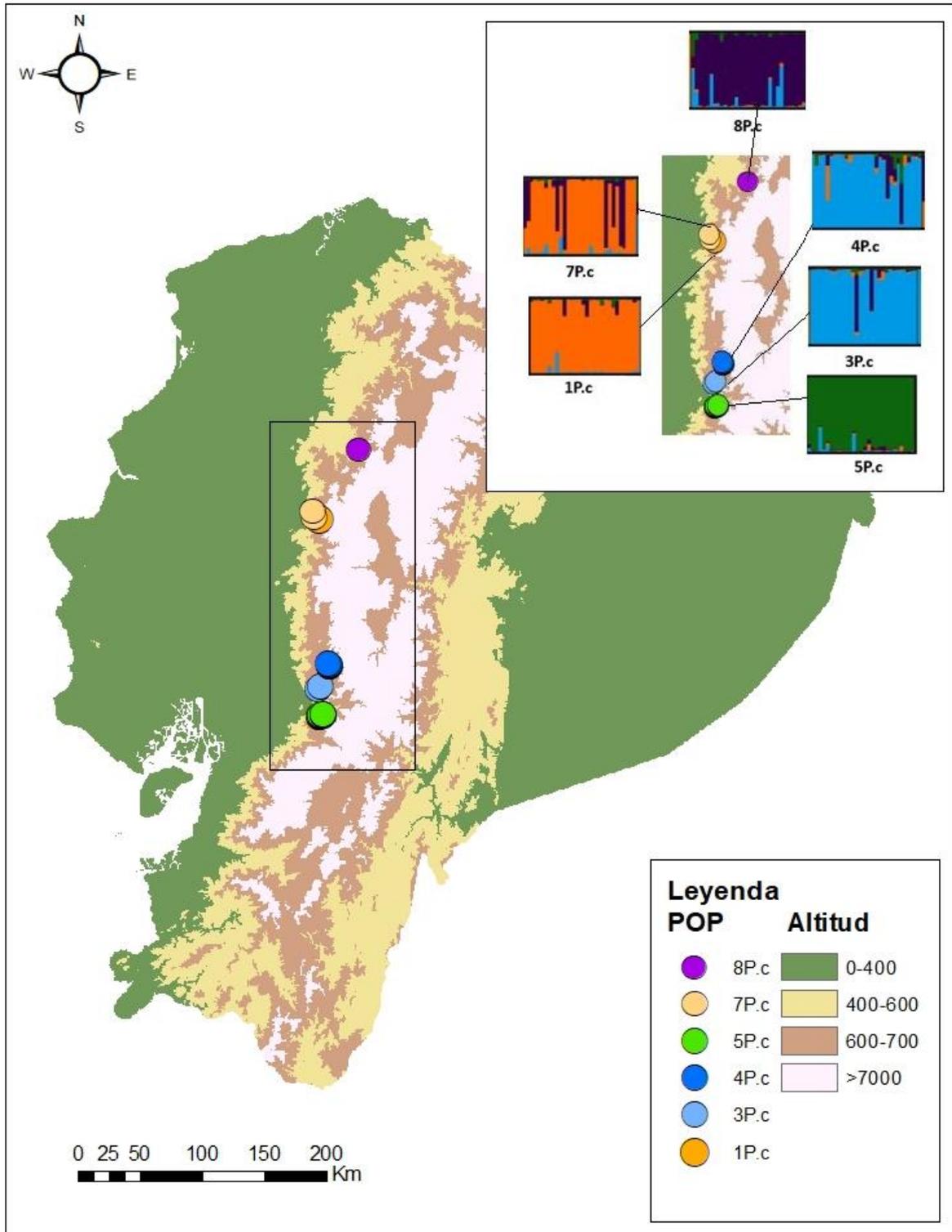


Figura 5. Estructura espacial de seis poblaciones de *Phaedranassa cinerea* con los resultados del agrupamiento Bayesiano de STRUCTURE con K=4

Utilizando el método delta K de Evanno et al. (2005) en STRUCTURE HARVESTER indican que la mejor K es igual a 2, seguido por el K igual a 4 (Figura 6). Cuando K= 2 se forman dos grupos, uno formado por las poblaciones 1P.c y 7P.c y otro por las poblaciones 3P.c, 4P.c, 5P.c y 8P.c (Figura 5A) (Figura 4). Mientras que, cuando K=4 se identificó cuatro grupos poblacionales, uno formado por 1P.c y 7P.c, el segundo por 3P.c y 4P.c y los dos últimos formados por las poblaciones 8P.c y 5P.c (Figura 5). Todas las poblaciones se ubican entre los 600 a 700 m de altitud de la cordillera occidental de los Andes (Figura 4 y 5). Las poblaciones 1P.c, 7P.c y 8P.c se encuentran al norte y las poblaciones 3P.c, 4P.c, 5P.c al sur de la cordillera occidental de los Andes (Figura 4 y 5).

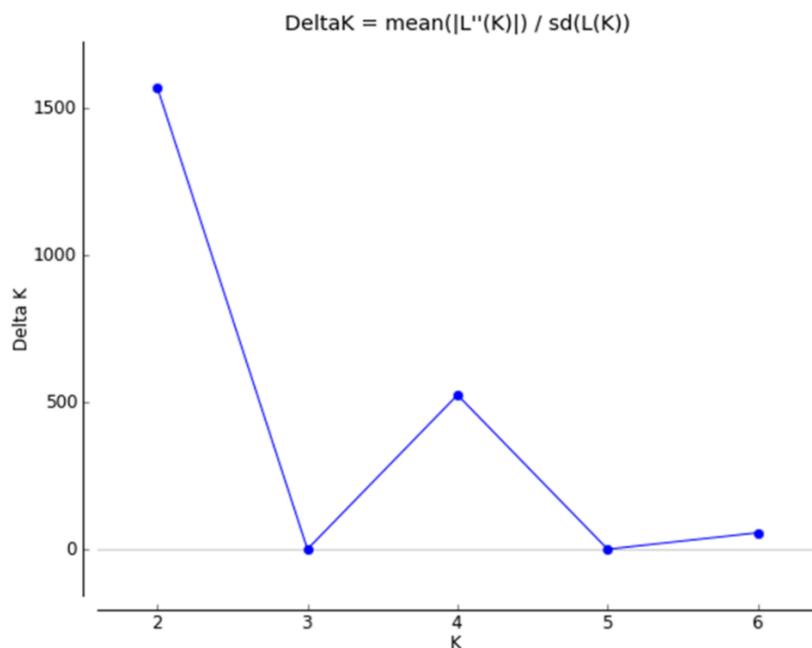


Figura 6. Delta K: muestra el valor más probable para K con STRUCTURE HARVESTER

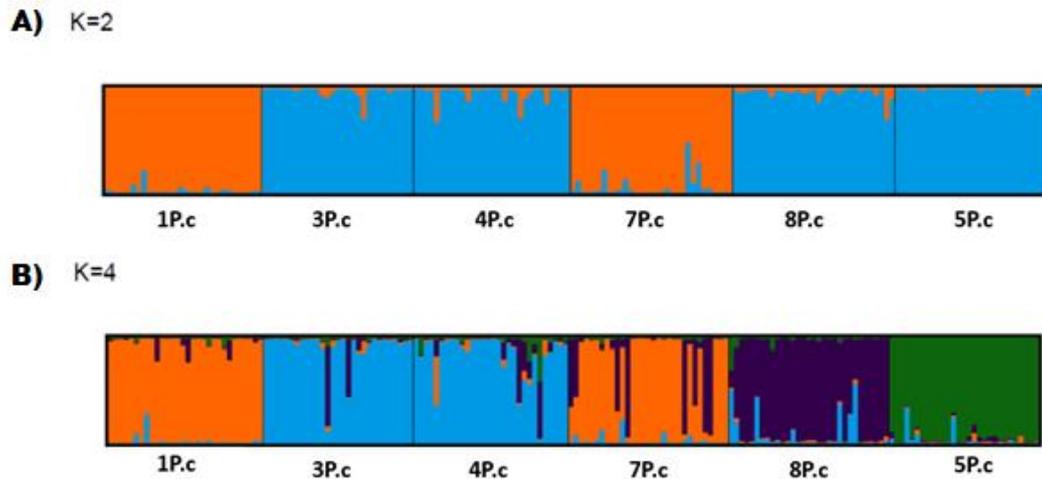


Figura 7. Agrupamiento poblacional basado en el modelo Bayesiano de *Phaedranassa cinerea*: A) Método de Evanno et al. (2005) asumiendo $K=2$ y B) Método de Evanno et al. (2005) asumiendo $K=4$.

3.4. AISLAMIENTO POR DISTANCIA

No se evidenció correlación entre la distancia geográfica en kilómetros y la distancia genética con el F_{st} por Pares, tal como indican los valores de $R=0.276$ y $P=0.164$ (Figura 7).

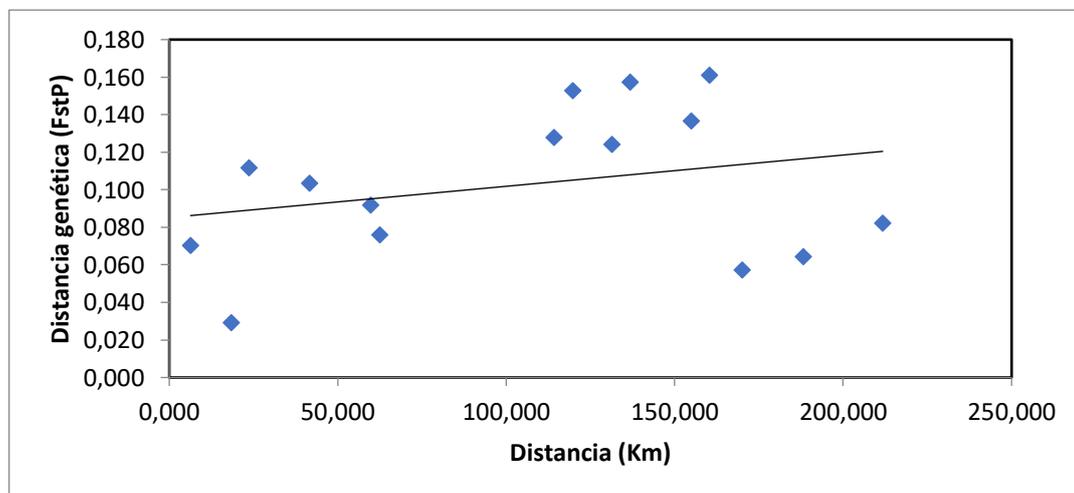


Figura 8. Prueba de Mantel para determinar la relación entre la distancia genética (F_{stP}) y la distancia geográfica (Km) entre las poblaciones de *Phaedranassa cinerea*

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

Este trabajo presenta un primer análisis de la estructura genética poblacional de *Phaedranassa cinerea* mediante la identificación la diversidad genética y el análisis de la influencia de los patrones geográficos en la diversidad genética. Con la información recabada se pudo identificar áreas de conservación para las poblaciones *P. cinerea* y se detallará en las siguientes secciones de la discusión

4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA

Para las poblaciones de *P. cinerea* analizadas en este estudio mostraron niveles bajos de diversidad genética (Cueva-Agila et al., 2019; García-Montes et al., 2022), pero altos en relación con otras especies de *Phaedranassa* previamente analizadas con los mismos microsatélites (Oleas et al., 2012; 2016) (Tabla 1). La diversidad *P. cinerea* ($H_e=0.59$) es alta con respecto con *P. tunguraguae* ($H_e=0.18$) y *P. schizantha* ($H_e=0.29$). Este valor está relacionado con lo que se espera para especies que tienen una distribución restringida, son endémicas y además son vulnerables o están en peligro de extinción (Oleas, 2011; Oleas, et al., 2012; 2016; García-Montes et al., 2022).

El número de alelos (N_a) para las poblaciones ubicadas al noroccidente de la cordillera de los Andes es menor y esto puede deberse a un nivel más alto de endogamia entre las poblaciones 1P.c y 7P.c (Tabla 1) (Figura 6). Mientras que, las poblaciones ubicadas al suroccidente manejan un número de alelos (N_a) mayor, incluyendo la 8P.c (Tabla 1) (Figura 6). A pesar de la diferencia del número de alelos (N_a) existe un flujo genético entre las poblaciones, esto lo podemos apreciar en el análisis bayesiano de STRUCTURE (Figura 7)

Phaedranassa cinerea efectivamente muestra un exceso de homocigotos, por lo tanto, se viola uno de los supuestos del equilibrio HWE (Tabla 1). Esta afirmación se verificó con un cambio no significativo del F_{st} al corregir los loci con alelos nulos que se presentaban en todas las poblaciones (Anexo 2). Lo que pueden estar ocurriendo con *P. cinerea* es que al tener pequeñas poblaciones exista endogamia, deriva genética, flujo de genes restringidos y pérdida de heterocigotos (Frankham et al., 2002). De hecho, los efectos de la deriva genética son mayores en poblaciones pequeñas, lo que provoca que las frecuencias alélicas cambian, se pierda la variación genética y cuando no hay variación genética los alelos se fijan (Allendorf et al., 2007). Esto se muestra en el índice de fijación (F) que es cercano a 1 (Tabla 1).

La Tabla 2 muestra un valor mayor para los D_{st} y menor para el F_{st} , esto ocurre porque F_{st} puede minimizar la diferenciación genética al momento de realizar comparaciones entre poblaciones y entre cada locus (Heller y Siegismund, 2009). En el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) muestra que el 85% de la variación genética está dentro de las poblaciones y solo el 15% entre las poblaciones, este valor es parecido para especies de este género (Oleas et al., 2012; 2016).

4.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL Y PATRONES DEMOGRÁFICOS

Las especies del género *Phaedranassa* están restringidas a áreas pequeñas de los Andes, sin embargo, *Phaedranassa cinerea* es una de las especies que muestra una distribución amplia (Oleas, 2011; Oleas et al., 2012; 2016) (Figura 6). En el análisis Bayesiano en STRUCTURE se observa la presencia de dos grupos genéticos. Un grupo está formado por las poblaciones ubicadas en el noroccidente de los Andes que es 1P.c y 7P.c, y el otro grupo está formado por las poblaciones 3P.c, 4P.c, 5P.c y 8P.c, ubicados en el suroccidente de los Andes, excepto por la población 8P.c ubicada en el

noroccidente (Figura 5a y Figura 6). Las poblaciones que tienen mayor número de alelos por locus muestran valores altos de alelos efectivos y son aquellas que se ubican al suroccidente de los Andes. Por otro lado, las poblaciones ubicadas al noroccidente exhibieron baja diversidad genética con altos valores en el desequilibrio de ligamiento (Tabla 1 y Figura 6). Este aumento ligero en el desequilibrio de ligamiento (LD) puede deberse a cuellos de botella recientes en las poblaciones (McVean, 2002).

Sugerimos que la historia demográfica de *P. cinerea* es reciente, es decir, han ido colonizando nuevas áreas o sus poblaciones han sido reducida por cuellos de botella recientes (Oleas, 2011). En el caso de *P. cinerea* se encontró evidencia de cuellos de botella en la prueba de signos en todas las poblaciones (Oleas, 2011). Esto fue similar en la estructura genética poblacional de *P. schizantha* y *P. tunguraguae* (Oleas et al., 2012; 2016).

El análisis de aislamiento por distancia (IBD por sus siglas en inglés) que correlaciona la matriz de distancia genética y la matriz de distancia geográfica, con pendiente de regresión cerca de cero, muestra que no existe correlación entre estas dos variables (Figura 7). Estos mismos resultados se mostraron en las otras especies de este género (Oleas et al., 2012; 2016). El modelo de aislamiento por distancia evalúa en línea recta, es decir, no toma en cuenta los accidentes geográficos como las montañas, las costas, colinas, entre otros, que impide el flujo genético entre poblaciones, y tampoco variables ecológicas y climáticas (Bohonak, 2002; Cushman et al., 2013). Por lo tanto, sugerimos utilizar el modelo de aislamiento por resistencia que permitirá eliminar estas limitaciones que dificultan comprender la estructura poblacional de *Phaedranassa cinerea* (Cushman et al., 2013)

Para entender mejor los patrones demográficos de *P. cinerea* debemos utilizar cálculos bayesianos que puedan inferir diferentes escenarios geográficos. Por ejemplo, podemos inferir dos hipótesis principales de colonización que pudiese estar ocurriendo en las poblaciones de *P. cinerea*, son: 1) las poblaciones originales son aquellas que se encuentran en el suroccidente de los Andes 3P.c, 4P.c y 5P.c, incluyendo la 8P.c y después divergió las poblaciones 1P.c y 7P.c y 2) Las poblaciones que se encuentran en el noroccidente de los Andes, 1P.c y 7P.c podrían ser la fuente original de variación y las poblaciones del suroccidente de los Andes 3P.c , 4P.c, 5P.c y 8P.c son las poblaciones recientes.

4.3. IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

Las poblaciones que enfrentan un riesgo de extinción presentan baja diversidad genética, mayor fuerza de la deriva genética y consanguinidad. Sin esta variación genética las poblaciones no pueden evolucionar y sobrevivir con el tiempo (Allendorf et al., 2007). Generalmente, este proceso está influenciado por varios factores, así como la historia demográfica, la actividad humana y el cambio climático (Pimm et al., 2004).

Los resultados de la genética poblacional de *P. cinerea* muestra que la diversidad genética es alta a comparación a las otras especies del género y no tiene una la diversidad genética distribuida de manera homogénea entre las poblaciones (Tabla1). Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos proponemos tres áreas de manejo: 1) las poblaciones 1P.c y 7P.C que muestran baja diversidad genética y necesitan que sean monitoreadas continuamente, 2) las poblaciones que se ubican al suroccidente 3P.c, 4P.c y 5P.c de los Andes que tienen diversidad genética pero se debe mantener la conectividad entre ellas para mantener la población , y 3) la población 8P.c debería ser

una fuente de variación para las poblaciones que presentan baja diversidad como es la 1P.c y 7P.c.

Phaedranassa cinerea está clasificada como Vulnerable según la categoría y criterio B1ab(iii) de la UICN (Oleas y Pitman, 2003). Se refiere cuando la población está enfrentando un riesgo de extinción porque su distribución geográfica está restringida es menor de 20. 000 km² (UICN, 2012). Además, la zona de ocupación se encuentra severamente fragmentada con una disminución continua, observada, inferida o proyectada (UICN, 2012). Presentan una forma de reproducción asexual y autopolinización, lo cual ayuda a que su extinción no ocurra en un periodo de tiempo corto sin embargo aumenta la endogamia (Niklas y Cobb, 2016; Wilcock, y Neiland, 2002). Otra de las ventajas es la morfología de la planta, como son bulbos le ha proporcionado larga vida para que pueda sobrevivir en un entorno cambiante como son el borde de las carreteras o en lugares alterados (Phillips, 2010).

Este estudio ejemplifica lo que está sucediendo en especies vulnerables, restringidas a área demográfica específicas y que manifiestan la baja diversidad genética, como es *P. cinerea* y otorga información importante para la planificación de estrategias de conservación de esta especie.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios demográficos adicionales para entender mejor la estructura poblacional de *P. cinerea*. El F_{st} es una medida de diferenciación genética que tienen una relación con el número de migrantes y estos datos deben ser complementados para evitar cualquier mal interpretación de los datos, por ejemplo, si la tasa de migración es menor va a existir menor combinación genética entre las poblaciones (Allendorf et al., 2007). Además, es necesario conocer las barreras

genéticas y geográficas que impiden el flujo de genes entre poblaciones. Finalmente, este estudio también planea conocer cómo surgió la diferenciación entre las poblaciones y si esto se debe a cambios al azar en el paisaje, la degradación causada por la actividad antropogénica o el cambio climático.

Como medida de prevención de la pérdida de diversidad genética recomendamos que las áreas de conservación sugeridas en la sección de implicaciones para la conservación sean conectadas mediante la protección de bosques naturales. Además, al ser una especie con flores vistosas puede ser utilizada de forma ornamental, esto ayudará a traer especies polinizadores y a su vez que las poblaciones *P. cinerea* expandan su distribución

CONCLUSIONES

En conclusión, los Andes representan un lugar para estudiar la diversidad genética y la estructura poblacional de especies endémica. Los resultados muestran que *P. cinerea* tiene una alta diversidad genética con relación a otras especies de *Phaedranassa*, lo que podría deberse a su forma de reproducción asexual, autopolinización, morfología de la planta y a su mayor área de distribución. Además, se encontró que las seis poblaciones que pertenecen a *Phaedranassa cinerea*, se dividen en dos grupos principales según el análisis de STRUCTURE, y estos dos grupos evidencian una diferencia genética moderada entre las poblaciones del noroccidente que tienen menor diversidad genética, excluyendo la población 8P.c y las poblaciones suroccidentales de los Andes con mayor diversidad. No mostraron evidencia de aislamiento por distancia (IBD por sus siglas en inglés). Por lo cual, es importante realizar estudios complementarios demográficos que demuestren cuando ocurrió la divergencia y entender los factores responsables detrás de la divergencia entre las

poblaciones noroccidentales, las poblaciones suroccidentales de los Andes, y el aislamiento de la población 8P.c con las poblaciones 1P.c y 7P.c

ANEXOS

Anexo 1. Secuencia de cebadores para los 13 loci de microsatélites de *Phaedranassa cinerea*. Tomado de (Oleas et al., 2005; 2009).

Loc us	No. de acceso GenBank	Cebador delantero (5'-3')	Cebador reverso (3'-5')
Ps2	FJ427510	TCTTGATGTACGCCCTCGG	TTTCGGCTCACACCCTCC
Ps13	FJ429258	AGCTTGGAAGAGGTCAGGC	AGCTTTCTCACATCTTGGCT TC
Ps16	FJ429259	TGGACATTGAAGTCGAACT CTTATC	TCGTGTCAACAAATATCAA GTGTG
Ps27	FJ571145	TCCTGGTGTTCCTCCCTC	TGAATTGTCTGAAGTCTAC TACTGC
Ps28	FJ429260	TGGCAATCAACCAAGGCT C	GCTTGGCATCTCCTCTTT GC
Pt14	AY994159	TCCTTGATCGTATGCTCCC	CAAACGCTGTATCCCCT TC
Pt21	AY971880	GATGGAAAATGATGACGCA AG	ACCCTTCCTTTGAACCCT AC
Pt32	AY934527	AACGTACACGTACATTGTCT G	TCCTTGATCACGAAAAT CGTAG
Pt39	AY971882	TCAAAACACTCATAACCAAC ACC	CCTCTCTCTCCAAACTCT CTC
Pt43	FJ380999	TTCTCCTTACGAATGCTCAC	GACCAAACCCATTTCTCTA C
Pt48	FJ381000	CCAACCTCAAGATAAGTTC AAG	CTAAATGATGATGGCTGAC C
Pt49	FJ381001	GGCATCACAAGGCATCATT G	GGCTAAATGTGAATGAA CTTGC
Pt61	FJ381002	GCTTTACAGCTCAATAACA GG	TCGAGGCACATGATTAA GTC

Anexo 2. Estadística descriptiva: A) Promedio de las estadísticas de F de 13 loci en todas las poblaciones (Fis, Fst, Dest). B) Promedio de las estadísticas de F de 11 loci en todas las poblaciones (Fis, Fst, Dest).

A	Fis	Fst	Dest	B	Fis	Fst	Dest
Loci14	0.674	0.102	0.424	Loci14	-	-	-
Loci21	0.366	0.143	0.803	Loci21	0.366	0.143	0.803
Loci32	0.142	0.106	0.402	Loci32	0.142	0.106	0.402
Loci39	0.032	0.095	0.383	Loci39	0.032	0.095	0.383
Loci48	0.253	0.147	0.311	Loci48	0.253	0.147	0.311
Loci43	0.672	0.092	0.123	Loci43	-	-	-
Loci49	0.114	0.116	0.073	Loci49	0.114	0.116	0.073
Loci2	0.675	0.243	0.449	Loci2	0.675	0.243	0.449
Loci16	0.107	0.277	0.329	Loci16	0.107	0.277	0.329
Loci13	0.587	0.401	0.684	Loci13	0.587	0.401	0.684
Loci61	0.162	0.087	0.114	Loci61	0.162	0.087	0.114
Loci28	0.507	0.137	0.159	Loci28	0.507	0.137	0.159
Loci27	0.444	0.141	0.251	Loci27	0.444	0.141	0.251
Total	0.366	0.161	0.308	Total	0.300	0.173	0.321

Nota: los datos de la parte B de la tabla que se encuentran vacíos son los que se mostraron nulos y nos sirvieron para comprobar si efectivamente la población mostraba exceso de heterocigotos

Anexo 3. Estadística descriptiva de los 13 loci de microsátélites de *Phaedranassa cinerea* por cada población. Tamaño de muestra (n), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), Heterocigosidad observada y esperada (Ho-He), índice de fijación (F) y equilibrio H-W con valores de p(Sig). ns= no significativo *** P < 0.001 **P < 0.01 y *P < 0.05

Poblaciones	Locus	n	Na	Ne	Ho	He	F	Sig
1pc	Loci14	23	7.000	3.699	0.522	0.730	0.285	***
	Loci21	29	5.000	2.817	0.138	0.645	0.786	***
	Loci32	30	7.000	2.296	0.400	0.564	0.291	ns
	Loci39	28	6.000	2.942	0.714	0.660	-0.082	ns
	Loci48	30	3.000	1.183	0.100	0.155	0.355	ns
	Loci43	30	4.000	1.963	0.333	0.491	0.320	***
	Loci49	30	2.000	1.385	0.267	0.278	0.040	ns
	Loci2	29	3.000	1.150	0.103	0.130	0.205	***
	Loci16	29	3.000	2.100	0.552	0.524	-0.053	ns
	Loci13	30	7.000	2.381	0.100	0.580	0.828	***
	Loci61	30	3.000	1.484	0.333	0.326	-0.022	ns
	Loci28	25	5.000	2.311	0.120	0.567	0.788	***
	Loci27	18	0 13.00	6.545	0.389	0.847	0.541	***
3pc	Loci14	28	8.000	3.980	0.179	0.749	0.761	***
	Loci21	29	0 14.00	5.820	0.655	0.828	0.209	ns
	Loci32	28	0 11.00	6.426	0.857	0.844	-0.015	ns
	Loci39	29	7.000	3.681	0.690	0.728	0.053	ns
	Loci48	29	5.000	2.885	0.483	0.653	0.261	***
	Loci43	25	4.000	2.828	0.360	0.646	0.443	*
	Loci49	28	4.000	1.247	0.214	0.198	-0.080	ns
Loci2	22	6.000	3.796	0.	0.	0.691	***	

					227	737		
					0.	0.		
	Loci16	28	2.000	1.415	357	293	-0.217	ns
					0.	0.		
	Loci13	16	3.000	1.210	063	174	0.640	**
					0.	0.		
	Loci61	27	5.000	3.006	593	667	0.112	ns
					0.	0.		
	Loci28	28	4.000	1.714	179	416	0.571	**
					0.	0.		
	Loci27	27	6.000	1.772	296	436	0.320	***
4pc					0.	0.		
	Loci14	28	13.00	4.094	429	756	0.433	***
		0			0.	0.		
	Loci21	30	15.00	5.732	500	826	0.394	**
		0			0.	0.		
	Loci32	29	12.00	3.689	828	729	-0.135	*
		0			0.	0.		
	Loci39	30	10.00	6.569	867	848	-0.022	ns
		0			0.	0.		
	Loci48	30	4.000	2.699	567	629	0.100	ns
					0.	0.		
	Loci43	29	7.000	2.199	172	545	0.684	***
					0.	0.		
	Loci49	29	4.000	1.238	138	192	0.282	***
					0.	0.		
	Loci2	19	8.000	2.959	211	662	0.682	***
					0.	0.		
	Loci16	28	5.000	1.652	143	395	0.638	***
					0.	0.		
	Loci13	18	7.000	1.430	222	301	0.262	***
					0.	0.		
	Loci61	29	13.00	4.738	690	789	0.126	***
		0			0.	0.		
	Loci28	29	4.000	1.922	345	480	0.281	**
					0.	0.		
	Loci27	30	11.00	2.507	533	601	0.113	***
7pc					0.	0.		
	Loci14	31	9.000	4.038	0.194	752	0.743	***
					0.	0.		
	Loci21	31	10.00	4.643	0.419	785	0.466	***
		0			0.	0.		
	Loci32	31	7.000	2.957	0.581	662	0.123	**
					0.	0.		
	Loci39	31	10.00	4.954	839	798	-0.051	**
		0			0.	0.		
	Loci48	31	6.000	2.321	548	569	0.037	ns
					0.	0.		
	Loci43	29	5.000	2.339	034	573	0.940	***
					0.	0.		
	Loci49	29	3.000	2.116	0.	0.	-0.112	ns

					586	527		
	Loci2	28	4.000	1.399	0. 214	0. 285	0.248	ns
	Loci16	31	3.000	1.916	0. 355	0. 478	0.258	ns
	Loci13	27	5.000	1.260	0. 185	0. 206	0.103	**
	Loci61	31	3.000	1.255	0. 097	0. 203	0.524	**
	Loci28	30	4.000	1.146	0. 133	0. 127	-0.048	ns
	Loci27	30	15.00 0	3.758	0. 433	0. 734	0.410	**
8pc	Loci14	31	10.00 0	6.768	0. 065	0. 852	0.924	***
	Loci21	31	14.00 0	6.840	0. 452	0. 854	0.471	***
	Loci32	31	12.00 0	7.479	0. 774	0. 866	0.106	ns
	Loci39	31	9.000	4.793	0. 710	0. 791	0.103	ns
	Loci48	31	15.00 0	6.220	0. 419	0. 839	0.500	***
	Loci43	28	6.000	1.754	0. 179	0. 430	0.585	*
	Loci49	30	7.000	2.195	0. 367	0. 544	0.327	***
	Loci2	24	5.000	4.071	0. 083	0. 754	0.890	***
	Loci16	31	4.000	1.796	0. 419	0. 443	0.054	ns
	Loci13	30	7.000	4.604	0. 233	0. 783	0.702	***
	Loci61	31	6.000	2.330	0. 387	0. 571	0.322	ns
	Loci28	28	4.000	2.501	0. 286	0. 600	0.524	**
	Loci27	29	8.000	3.241	0. 207	0. 691	0.701	***
5pc	Loci14	28	10.00 0	6.817	0. 143	0. 853	0.833	***
	Loci21	29	17.00 0	8.899	0. 897	0. 888	-0.010	ns
	Loci32	29	13.00 0	7.313	0. 448	0. 863	0.481	***
	Loci39	29	7.000	4.861	0. 655	0. 794	0.175	ns
	Loci48	29	12.00 0	7.281	0. 655	0. 863	0.241	ns
	Loci43	29	5.000	3.440	0.	0.	0.951	***

				034	709		
Loci49	27	5.000	1.483	0. 259	0. 326	0.204	***
Loci2	21	7.000	3.938	0. 238	0. 746	0.681	***
Loci16	29	6.000	1.704	0. 448	0. 413	-0.085	ns
Loci13	29	8.000	3.746	0. 345	0. 733	0.530	***
Loci61	29	12.00 0	3.210	0. 621	0. 688	0.098	***
Loci28	29	6.000	3.729	0. 379	0. 732	0.482	***
Loci27	29	3.000	1.279	0. 103	0. 218	0.526	***

LITERATURA CITADA

- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., y Aizen, M. A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9(8), 968-980.
- Allendorf, F. W., Luikart, G., y Aitken, S. N. (2007). Conservation and the genetics of populations. *Mammalia*. 189-197.
- Balkenhol, N., Cushman, S., Storfer, A., y Waits, L. (2015). Landscape genetics: concepts, methods, applications. *John Wiley & Sons Ltd*.
- Barros, J. G., y Troncoso, A. Y. (2010). Atlas climatológico de Ecuador. Tesis de grado, Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
- Bohonak, A. J. (2002). IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93(2), 153-154.
doi.org/10.1093/jhered/93.2.153
- Brush, M. B., Hanselman, J. A., y Hooghiemstra, H. (2007). Andean montane forests and climate change. In: Tropical Rainforest Responses to Climatic Change. *Springer Praxis Books*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi.org/10.1007/978-3-540-48842-2_2
- Carlsson, J. (2008). Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing, *Journal of Heredity*, 99 (6), 616–623. doi.org/10.1093/jhered/esn048
- Chapuis, M. P., y Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation, *Molecular Biology and Evolution*, 24 (3), 621–631.
doi.org/10.1093/molbev/msl191

- Cueva-Agila, A., Vélez-Mora, D., Arias, D., Curto, M., Meimberg, H., y Brinegar, C. Genetic characterization of fragmented populations of *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae), a threatened tree of the northern Andean cloud forests. *Tree Genetics & Genomes* 15, 81 (2019). doi.org/10.1007/s11295-019-1393-y
- Cushman, S. A., Shirk, A. J., y Landguth, E. L. (2013). Landscape genetics and limiting factors. *Conservation Genetics*, 14(2), 263-274. <https://doi.org/10.1007/s10592-012-0396-0>
- Demarchi, D. A. (2009). Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 11(1).
- Earl, D. A (2011). Structure Harvester version 0.6.1. Disponible en: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>
- Earl, D.A. y vonHoldt, B. M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620. doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Forrest, A., Escudero, M., Heuertz, M., Wilson, Y., Cano, E., y Vargas, P. (2017). Testing the hypothesis of low genetic diversity and population structure in narrow endemic species: the endangered *Antirrhinum charidemi* (Plantaginaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 183(2), 260-270. doi.org/10.1093/botlinnean/bow002

- Frankham, R., Ballou, J. D. y Briscoe, D. A (2002). Chapter 3: Genetic diversity. Introduction to conservation genetics. *Cambridge University Press*. 45-68.
- García-Montes, M. A., Cibrián-Jaramillo, A., Reyes-Zepeda, F., Chacón-Hernández, J. C., Vanoye-Eligio, V., Sánchez-González, A., y Octavio-Aguilar, P. (2022). *Magnolia tamaulipana*: Genetic Evaluation Shows High Vulnerability in a Narrow Distribution. *International Journal of Plant Sciences*, 183(2), 000-000
- Hedrick, P. W. (1999). Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53(2), 313-318. doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb03767.x
- Heller, R., y Siegismund, H. R. (2009). Relationship between three measures of genetic differentiation GST, DEST and G'ST: how wrong have we been?. *Molecular ecology*, 18 (10), 2080-2083.
- Hensen, I., Cierjacks, A., Hirsch, H., Kessler, M., Romoleroux, K., Renison, D., y Wesche, K. (2011). Historic and recent fragmentation coupled with altitude affect the genetic population structure of one of the world's highest tropical tree line species. *Global Ecology and Biogeography*, 21(4), 455–464. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00691.x>
- Holdengger, R., Gugerli, F., Scheidegger, C., y Taberlet, P. (2007). Integrating population genetics with landscape ecology to infer spation-temporal processes. Kienast F., Wildi O., Ghosh S. (Eds) A Changing World. *Landscape Series*. (vol. 8, pp.145-156). doi.org/10.1007/978-1-4020-4436-6_10
- Holderegger, R., y Wagner, H. (2006). A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21(6), 793-796.

- Hoorn, C., Mosbrugger, V., Mulch, A. y Antonelli, A. (2013). Biodiversity from mountain building. *Nature Geosci* **6**, 154. doi.org/10.1038/ngeo1742
- Hughes, C. E. (2017). Are there many different routes to becoming a global biodiversity hotspot?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (17), 4275-4277. doi.org/10.1073/pnas.1703798114
- Jakobsson, M., y Rosenberg, N.A. (2007). "CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure." *Bioinformatics*, 23(14),1801-1806.
- Jin, Z. y Yao, G. (2019). Amaryllidaceae and *Scelletium* alkaloids. *Natural Product Reports*, 36 (10), 1462-1488. doi.org/10.1039/C8NP00055G
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., y Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1179-1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., y Navarrete, H. (Eds.) (2011). Libro rojo de las plantas endémicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2da edición. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Luebert, F., y Weigend, M. (2014). Phylogenetic insights into Andean plant diversification. *Frontiers in Ecology and Evolution* **2**, 27. [/doi.org/10.3389/fevo.2014.00027](https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00027)
- Matolwani, L. O., Balkwill, K., y McLellan, T. (2000). Genetic diversity and gene flow in the morphologically variable, rare endemics *Begonia dregei* and *Begonia homonyma* (Begoniaceae). *American Journal of Botany*, 87(3), 431-439.

- McVean, G. A. (2002). A genealogical interpretation of linkage disequilibrium. *Genetics*, 162(2), 987-991. doi.org/10.1093/genetics/162.2.987
- Meerow, A. W., Gardner, E. M., y Nakamura, K. (2020). Phylogenomic of the Andean tetraploid clade of the American Amaryllidaceae (subfamily Amaryllidoideae): unlocking a polyploid generic radiation abetted by continental geodynamics. *Frontiers in Plant Science*, 11(582422), 1-26.
- Meerow, A. W. (1990). Amaryllidaceae. En G. Harding, L. Andersson (Eds.), Flora del Ecuador. University of Gotenborg; Riksmuseum, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Goteborg, Stockholm, Quito.
- Meerow, A. W., y Snuman, D. A. (2006). The never-ending story: multigene approaches to the phylogeny of Amaryllidaceae. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*, 22(1), 355-366.
- Meerow, A. W. y Snijman, D. A. (1998). Amaryllidaceae. Kubitzki K. (Ed.), Flowering Plants. Monocotyledons, The Families and Genera of Vascular Plants (Vol.3, pp 83-110). *Springer*, Berlin, Heidelberg. doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7_11
- Meirmans, P. G. (2006). Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 60(11), 2399-2402. doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01874.x
- Mittermeier, R. A., Turner, W. R., Larsen, F. W., Brooks, T. M., y Gascon C. (2011). Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. Zachos F., Habel J. (Eds) Biodiversity Hotspots (pp 3-22). *Springer*, Berlin, Heidelberg. doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_1

- Nevado, B., Contreras-Ortiz, N., Hughes, C., y Filatov, D. A. (2018). Pleistocene glacial cycles drive isolation, gene flow and speciation in the high-elevation Andes. *New Phytologist Foundation*, 219(2), 779-793. doi.org/10.1111/nph.15243
- Niklas, K. J., y Cobb, E. D. (2017). The evolutionary ecology (evo-eco) of plant asexual reproduction. *Evolutionary Ecology*, 31(3), 317–332. doi.org/10.1007/s10682-016-9828-5
- Oleas, N. (2011a). Landscape genetics of *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) in Ecuador (Tesis doctoral). Florida International University, Miami-Florida.
- Oleas, N. H., Meerow, A. W., y Ortega, J. (2012). Population dynamics of the endangered plant, *Phaedranassa tunguraguae*, from the Tropical Andean Hotspot. *Journal of Heredity*, 103(4), 557-569.
- Oleas, N. y Pitman, N. (2003). *Phaedranassa cinerea*. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2003: e.T42810A10754648. <https://www.iucnredlist.org/species/42810/10754648>. Descargado el 25 de junio de 2021.
- Oleas, N. (2011b). Amaryllidaceae. León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, 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., Meerow, A. y Francisco-Ortega, J. (2005). Isolation and characterization of eight microsatellite loci from *Phaedranassa tunguraguae* (Amaryllidaceae). *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 791-793.

- Oleas, N., Meerow, A. y Ortega, J. (2016). Genetic structure of the amenazada *Phaedranassa schizantha* (Amaryllidaceae), *Botanical Journal of the Linnean Society* 182(1),169–179. doi.org/10.1111/boj.12444
- Oleas, NH, Meerow, AW 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
- Organización Mundial de la Salud (2017). Datos y cifras del Alzheimer. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Peakall, R. O. D., 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
- Phillips, N. (2010). Seed and bulb dormancy characteristics in new world *Allium* L. (Amaryllidaceae): a review. *International Journal of Botany*, 6(3), 228-234.
- Pimm, S. L., Jenkins, C. N., Abell, R., Brooks, T. M., Gittleman, J. L., Joppa, L. N., Raven, P.H., Roberts, C. M., y Sexton, J. O. (2014). The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science*, 344 (6187), 1246752–1246752. doi.org/10.1126/science.1246752
- Prat, C. (2018). The soils of Ecuador (pp. 1-25). J., Espinosa, J., Moreno, J y Bernal, G. (Eds.). *Springer International Publishing*.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

- Raymond, M y Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86, 248-249.
- Rodriguez-Echeverry, J., y Leiton, M. (2021). Loss and fragmentation of native forest ecosystems and its influence on habitat diversity in the Tropical Andes hotspot. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92, 1-14.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103-106. doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- UICN. (2012). Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1, Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. Vi+ 34pp. Originalmente publicado como UICN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition. (Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2012).
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Willis, D. P., y Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538. doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Varela, L. A., y Ron, S. R. (2018). Geografía y clima del Ecuador. BIOWEB. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: <https://bioweb.bio/geografiaClima.html> Consulta: 10 de diciembre 2021
- Wiens, J. J., y Graham, C. H. (2005). Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 519-539. doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102803.095431

Wilcock, C., & Neiland, R. (2002). Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science*, 7(6), 270–277. [doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02258-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02258-6)