



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA
INDOAMÉRICA**

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE

CARRERA DE BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS

TEMA:

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE LA ESPECIE ENDÉMICA DEL
ECUADOR *PHAEDRANASSA GLAUCIFLORA***

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

Autor(a)

Ojeda Herrera Naybe Elizabeth

Tutor(a)

PhD. 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 TITULACIÓN**

Yo, Naybe Elizabeth Ojeda Herrera, declaro ser autor del Trabajo de Titulación con el nombre “**Estructura genética poblacional de la especie endémica del Ecuador *Phaedranassa glauciflora***”, 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 24 días del mes de febrero de 2022, firmo conforme:

Autor: Naybe Elizabeth Ojeda Herrera.

Firma: 

Número de Cédula: 1719109504.

Dirección: Pichincha, Quito, San Juan, San Juan

Correo Electrónico: maybe96herrera@gmail.com

Teléfono: 0983033483.

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE LA ESPECIE ENDÉMICA DEL ECUADOR *PHAEDRANASSA GLAUCIFLORA*” presentado por Naybe Elizabeth Ojeda Herrera, 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, 25 de febrero del 2022

.....
“Estructura genética poblacional de la especie endémica del ecuador *Phaedranassa glauciflora*”, Nora Helena Oleas Gallo.

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, 25 de febrero 2022



Naybe Elizabeth Ojeda Herrera
1719109504

APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, sobre el Tema: “ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE LA ESPECIE ENDÉMICA DEL ECUADOR *PHAEDRANASSA GLAUCIFLORA*”, 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, 25 de marzo de 2022

.....

PhD. Nora Helena Oleas Gallo
TUTOR

.....

PhD. Sofía Verónica Carvajal Endara
LECTOR

.....

PhD. Natasha Alexandra Baer Guevara
LECTOR

DEDICATORIA

La presente tesis fruto de constancia y esfuerzo se la dedico a mi madre que siempre estuvo a mi lado brindándome su mano amiga y apoyo incondicional, a mi abuelita quien es mi segunda madre que con la sabiduría de Dios me ha enseñado siempre a ser agradecida, solidaria y bondadosa, a mis hermanos que gracias a ellos adquirí el don de la paciencia, la generosidad y el apoyo incondicional, siempre estarán presentes en mi vida y a mi familia que gracias a su apoyo pude culminar mi carrera y cumplir una meta más en mi vida.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme guiado a lo largo de mi vida, por ser mi apoyo, mi luz y mi camino. Por haberme dado la fortaleza para seguir adelante en aquellos momentos de debilidad. A mis queridos docentes por su ayuda y paciencia que durante toda la carrera me guiaron y me compartieron sus conocimientos. Agradezco a la Universidad Tecnológica Indoamérica por financiar mi tesis bajo el proyecto Diversidad morfológica, genética y química de plantas que fue otorgado a Nora Oleas, PhD. Mi eterna gratitud a Nora, quien fue mi tutora de tesis, por guiarme en base a su experiencia y sabiduría, por apoyarme y por el tiempo dedicado. A Patricia por guiarme en el proceso y por su disposición en ayudarme. A mi pareja por sus palabras de aliento, su apoyo, su amor incondicional y ser un pilar fundamental en mis momentos tormentosos. A mis mejores amigas Amaniksha y María Belén por ser mis acompañantes, mis salvavidas y mis consejeras durante nuestra vida universitaria.

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

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ESTRUCTURA GENÉTICA	2
1.2 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN	3
1.3 MARCADORES MOLECULARES	4
1.4 <i>PHAEDRANASSA</i>	5
1.4.1 <i>Phaedranassa glauciflora</i>	6
1.5 OBJETIVO GENERAL	7
1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA	8
2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE ESTUDIADA	8
2.1.1 <i>Phaedranassa glauciflora</i>	8

2.2	ÁREA DE ESTUDIO	11
2.3	ANÁLISIS GENÉTICOS	13
2.3.1	Extracción de ADN	13
2.3.2	Reacción en cadenas de la polimerasa (PCR)	13
2.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	14

CAPITULO III

3.	RESULTADOS	15
3.1	ERRORES DE GENOTIPAJE Y ALELOS NULOS	15
3.2	COMPOSICIÓN GENÉTICA	15
3.3	DIVERSIDAD GENÉTICA	16
3.4	ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN	17
3.5	PRUEBA MANTEL	19

CAPITULO IV

4.	DISCUSIÓN	20
4.1	COMPOSICIÓN Y DIVERSIDAD GENÉTICA	20
4.2	ANÁLISIS DE CLÚSTER Y ASIGNACIÓN DE POBLACIÓN	21
4.3	MODELO DE AISLAMIENTO POR DISTANCIA	22
4.4	IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES ENDÉMICAS	22
	CONCLUSIONES	23
	RECOMENDACIONES	23
	LITERATURA CITADA	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Características y parámetros de diversidad genética de 5 poblaciones de <i>Phaedranassa glauciflora</i> en Ecuador	16
Tabla No. 2 Resultados del Análisis de Varianza Molecular de <i>Phaedranassa glauciflora</i> a partir de loci de Microsatélites	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 Mapa de distribución geográfica de <i>Phaedranassa glauciflora</i> en el Ecuador	9
Figura No. 2 Zonas de recolección de muestras de las poblaciones de <i>Phaedranassa glauciflora</i>	12
Figura No. 3 Análisis bayesiano de grupos genéticos, cada color indica un grupo genético (k)	17
Figura No. 4 Mapa de la Estructura genética de las poblaciones de <i>Phaedranassa glauciflora</i>	18
Figura No. 5 Parámetros de la Prueba de Evanno	19
Figura No. 6 Relación entre las distancias geográficas y distancias genéticas	19

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen No. 1 <i>Phaedranassa glauciflora</i>	10
--	----

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

TEMA: ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE LA ESPECIE ENDÉMICA DEL ECUADOR *PHAEDRANASSA GLAUCIFLORA*.

AUTOR: Naybe Elizabeth Ojeda Herrera

TUTOR: Nora Helena Oleas Gallo, PhD.

RESUMEN EJECUTIVO

La cordillera de Los Andes posee una gran variabilidad climática y geomorfológica y por esta razón tiene una alta riqueza ecosistémica. Existen varios factores para que los Andes sean una gran fuente de diversidad de especies vegetales y animales como las formaciones geográficas, el clima y su altura. Se conoce que en los Andes en el Ecuador existen alrededor de 4000 especies de flora endémica, el 83% de las especies se encuentran en peligro de extinción según los criterios de la UICN. *Phaedranassa glauciflora* pertenece a la familia Amaryllidaceae, es una especie de hierba terrestre bulbosa endémica del Ecuador, localizada en la Sierra ecuatoriana en la provincia de Chimborazo y Morona Santiago entre los 2000 y 2500 m de altitud. Sus poblaciones en su gran mayoría fueron encontradas en zonas alteradas por la agricultura y la ganadería. Debido a esto y al número limitado de poblaciones, *Phaedranassa glauciflora* se encuentra categorizada como una especie en peligro de extinción que está incluida en la lista roja. El objetivo de esta investigación se centró en determinar la estructura genética poblacional de la especie, por lo cual se estudiaron cinco poblaciones. Se genotiparon 142 individuos con 13 cebadores de microsatelites desarrollados para el género. Se utilizaron métodos bayesianos para investigar la estructura de la población, demostrando que las cinco poblaciones presentan valores bajos de diversidad genética, forman dos grupos genéticos y una sub estructura relacionada a la geografía y que existe una correlación entre distancia genética y distancia geográfica.

DESCRIPTORES: Diversidad, endémica, especies en peligro de extinción, microsátélites, población.

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

THEME: POPULATION GENETIC STRUCTURE OF THE EQUATORIAL ENDEMIC SPECIES *PHAEDRANASSA GLAUCIFLORA*.

AUTHOR: Naybe Elizabeth Ojeda Herrera

TUTOR: Nora Helena Oleas Gallo, PhD.

ABSTRACT

The Andes mountain range has a great climatic and geomorphological variability and for this reason it has a high ecosystemic richness. There are several factors that make the Andes a great source of diversity of plant and animal species, such as geographic formations, climate, and altitude. It is known that in the Andes in Ecuador there are about 4000 species of endemic flora, 83% of the species are in danger of extinction according to IUCN criteria. *Phaedranassa glauciflora* belongs to the family Amaryllidaceae, is a species of bulbous terrestrial herb endemic to Ecuador, located in the Ecuadorian Sierra in the province of Chimborazo and Morona Santiago at about 2000 and 2500 m altitude. Its populations were mostly found in areas disturbed by agriculture and livestock. Because of this and the limited number of populations, *Phaedranassa glauciflora* is categorized as an endangered species that is included in the red list. The objective of this research was to determine the genetic population structure of the species, for which five populations were studied. For this purpose, 142 individuals were genotyped with 13 microsatellite primers developed for the genus. Bayesian methods were used to investigate the population structure, showing that the five populations have low values of genetic diversity, form two genetic groups and a sub-structure related to geography and that there is a correlation between genetic distance and geographic distance.

KEYWORDS: Diversity, endemic, endangered species, microsatellites, population

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Los Andes tropicales son conocidos como un hotspot de biodiversidad ya que poseen una gran variabilidad climática y geomorfológica, y son uno de los 25 puntos críticos de biodiversidad (Cuestas et al., 2012). Existen varios factores para que los Andes tropicales sean una gran fuente de diversidad de especies vegetales y animales, tales como la topografía, el clima, y el gradiente altitudinal (Mendoza, 2014). Es uno de los lugares con mayor diversidad de plantas y alta riqueza ecosistémica, pero al mismo tiempo está sufriendo una gran pérdida de hábitat (Cuestas et al., 2012), por lo que su conservación es una prioridad.

El Ecuador es uno de los países megadiversos con la mayor concentración de especies por área en el mundo (Velázquez, 2019). Se conoce que existen más de 4000 especies de flora endémica, el 83% de las especies se encuentran en peligro de extinción según lo declara la UICN (Valencia et al., 2000). Además, la mitad se encuentran únicamente en los Andes. La gran diversidad de hábitats y la riqueza de especies se encuentra influenciada por todos los procesos geológicos. Sin embargo, la gran diversidad biológica podría ser explicada por el aislamiento de poblaciones que favorece procesos de especiación causada por la diversidad de paisajes, suelos, altitud y gradientes de temperatura (Garrido y Vázquez, 2013; Tobar, 2019).

La especiación comprende los diferentes procesos evolutivos por los cuales una población de una determinada especie diverge dando lugar a la formación de otra o varias especies genéticamente diferentes que sufren aislamiento reproductivo (Garrido y Vázquez, 2013; Tobar, 2019). Existen dos tipos de especiación que ocurren de acuerdo a la geografía, la especiación alopátrica y la simpátrica. En términos generales, la especiación simpátrica

ocurre cuando la competencia entre poblaciones conduce a la diferenciación del nicho ecológico, mientras que la especiación alopátrica requiere una barrera espacial que conduce al aislamiento genético (Losos y Glor, 2003).

1.1. Estructura genética

La estructura genética se refiere a cómo se organiza la variación genética. Lo primero que debemos hacer para estimar la estructura genética es determinar la variación genética de los individuos en la población, por otra parte, estos datos también nos ayudan con los propósitos de genética del paisaje, ya que nos permite realizar una exploración de cómo se distribuye la diversidad en el espacio (Manel et al., 2003) y finalmente conocer la estructura genética nos ayuda a conocer dónde y cómo se distribuye la diversidad de las especies para poder establecer prioridades de conservación especialmente en especies en peligro (Perfectti et al., 2009; Manel et al., 2003).

La variabilidad genética es la materia prima de la evolución, es el mecanismo por el cual las diversas poblaciones de una especie tienen el potencial de adaptarse a los cambios en su medio ambiente, aunque comparten los mismos genes llevan diferentes alelos (Eguiarte et., 2010, 2012; Furnier, 2004). Nuevas variaciones genéticas pueden surgir en una población, causadas por mutaciones espontáneas de un gen o por inmigración de individuos de poblaciones diferentes genéticamente (Furnier, 2004). Las diferentes formas alternativas de un gen en particular (o locus) son llamados alelos. El número y la abundancia relativa de los alelos dentro de una población es una medida de su variación genética, que se la conoce como “heterocigosidad”. La variación genética es una medida de la capacidad de una población para adaptarse a cambios o presiones medioambientales y, por lo tanto, de sobrevivir (Trujillo et al., 2013; Furnier, 2004).

La potencialidad de una población para evolucionar y adaptarse a cambios del medio depende fundamentalmente de su variabilidad genética. Esta variabilidad se puede

estimar a partir de la frecuencia de individuos heterocigotos, es decir, la frecuencia de individuos portadores de alelos diferentes para un gen dado, y también por la diversidad alélica, que es el número de alelos diferentes que se encuentran presentes en la población. La diversidad génica y alélica suelen estimarse actualmente con regiones de los ADN conocidos como marcadores moleculares. Puesto que la variación es la base de la potencialidad evolutiva de las especies, la diversidad genética, en su sentido más amplio, resulta fundamental para la capacidad de poder responder a los retos ambientales y, con ello, garantizar su perdurabilidad, lo que las configura como el pilar esencial de la conservación genética (Eguiarte et al., 2010).

La variabilidad genética conjuntamente con los aspectos de la estructura y las características del paisaje son componentes que interactúan entre sí y nos ayudan a describir, analizar y explicar la genética del paisaje, para luego determinar una relación entre el ambiente y la diferenciación genética entre poblaciones o en grupos de individuos (Pierce, 2019; Garrido y Vázquez, 2013). La genética del paisaje contempla varios elementos físicos tales como las montañas y ríos que cumplen la función de barreras, para facilitar el movimiento de individuos, como corredores por otro lado también considera a las variables ambientales como la temperatura, altitud y humedad, para poder determinar una relación entre todas las variables con el objetivo de determinar la relación entre dichas variables y procesos micro y macroevolutivos (Manel et al., 2003).

1.2. Genética de la conservación

La base de la genética de la conservación es tratar de preservar la diversidad genética ya que es esencial para el mantenimiento del potencial evolutivo de las especies (Loo y Canadian, 2011). La genética de la conservación se enfoca en prevenir pérdidas futuras a causa de las actividades humanas o antrópicas (Premoli et al., 2011). La viabilidad y permanencia de una población significa mantener un tamaño suficiente de individuos en

un hábitat de calidad para la supervivencia a largo plazo; esto implica mantener la capacidad de las especies para el cambio evolutivo (Eriksson, 2000).

Evaluar el estado genético de las poblaciones y proponer medidas para preservar la diversidad genética para la persistencia de las poblaciones son objetivos centrales y fundamentales de la genética de la conservación. Los marcadores moleculares han resultado ser la base fundamental en este campo ya que su aplicación puede contribuir de al entendimiento de la historia evolutiva, la demografía y la ecología de las especies en peligro (Godoy, 2009).

1.3. Marcadores moleculares

Los marcadores más tradicionales en los estudios de caracterización de poblaciones son los microsatélites, los cuales son secuencias repetitivas de ADN conformado de 1 a 6 pares de bases. Estos loci se pueden encontrar en regiones codificantes y no codificantes del ADN y se caracterizan por ser altamente polimórficos por lo cual son regiones adecuadas para usarse como marcadores moleculares a nivel poblacional (Ferreira et al., 1998). Los microsatélites presentan una alta tasa de mutación y de naturaleza codominante, esto permite estimar la diversidad genética dentro y entre poblaciones, incluso la mezcla genética entre poblaciones si están muy emparentadas (Rentarías, 2007).

Los microsatélites de ADN nuclear han sido utilizados para detectar la variación genética intra e interespecífica (Rentarías, 2007). En la actualidad también se han encontrado microsatélites en organelos citoplasmáticos, como los cloroplastos y la mitocondria, lo cual ha enriquecido los estudios evolutivos (Zamora et al., 2013; Rentarías, 2007). Los microsatélites tienen una gran ventaja a diferencia de los otros marcadores moleculares ya que son selectivamente neutros, son codominantes, la presencia de un solo

locus genético por microsatélite permite una lectura más clara y fácil de interpretar, son específicos para ciertos grupos y la mutación es homogénea (Eguiarte et al., 2013).

Las desventajas del uso de microsatélites es que son difíciles de aislar, los modelos de mutación son complicados, presentan errores en la estimación de tasas y modelos de mutación llegando a generar resultados erróneos, presentan una alta homoplasia y la eliminación de un locus o mutaciones en el lugar de unión del cebador provocan alelos nulos al impedir la amplificación de al menos uno de los alelos, reduce la diversidad genética detectada y esto genera estimaciones erróneas de las frecuencias alélicas (Eguiarte et al., 2013; Zamora et al., 2013).

1.4. *Phaedranassa*

El género *Phaedranassa* pertenece a la familia de Amaryllidaceae establecido por Herbert (1845) a partir de un espécimen originalmente llamado *P. chloracra*. Este género se encuentra distribuido en los Andes del Norte del Ecuador, Colombia y Costa Rica (Oleas, 2000). En el Ecuador podemos encontrar un total de 8 especies de *Phaedranassa* (*P. brevifolia*, *P. cinerea*, *P. cuencana*, *P. glauciflora*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. dubia* y *P. viridiflora*) (Oleas, 2011b, Minga et al., 2015). El género *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) tiene una de las proporciones más altas de especies endémicas de cualquier otro género en el Ecuador, con siete de las ocho especies conocidas sólo en el país. En el Ecuador, las poblaciones de *Phaedranassa* se encuentran aisladas y en zonas con poca vegetación nativa, por lo que seis de las ocho especies se encuentran en peligro y las restantes en estado vulnerable. Además, podemos encontrar 5 a 10 poblaciones de *Phaedranassa* con menos de 100 individuos (Oleas, 2011b). Originalmente, estas especies se encontraban en áreas que corresponden a Bosque Nuboso y Arbustos Interandinos Secos y Húmedos (Oleas, 2011b); actualmente estas áreas se encuentran destinadas a la agricultura, la minería y el desarrollo residencial.

En general, las poblaciones del género *Phaedranassa* se encuentran restringidas a un valle en particular por la fragmentación de hábitat, estas especies nunca han sido encontradas en un hábitat poco alterado. Dependiendo de la especie, se encuentran en condiciones climáticas particulares como en el caso de las especies *P. cinerea* y *P. tunguraguae* estas se encuentran en zonas húmedas, mientras que las especies *P. brevifolia* y *P. dubia* se encuentran en áreas áridas (Oleas, 2011b).

1.4.1. *Phaedranassa glauciflora*

Phaedranassa glauciflora es una especie de hierba terrestre endémica del Ecuador, localizada en la Sierra centro en la provincia de Chimborazo y Morona Santiago entre los 2000 y 2500 m de altitud (Minga et al., 2015). Es conocida por seis poblaciones las cuales en su gran mayoría fueron encontradas en zonas alteradas por la agricultura y la ganadería, cada población cuenta con unos 500 individuos muy agrupados (Oleas, 2011a). Tres de las poblaciones se encuentran dentro de la red de áreas protegidas en el Parque Nacional Sangay (Oleas y Pitman, 2003).

Phaedranassa glauciflora se encuentra en peligro según los criterios de la UICN, sus poblaciones se encuentran principalmente en zonas alteradas (Oleas, 2011a). Las pocas poblaciones pertenecientes a esta especie se encuentran en una de las regiones más deforestadas del Ecuador, en sitios con poca vegetación nativa y con ecosistemas muy fragmentados (Oleas, 2011a). Es importante diseñar mejores estrategias de conservación para preservar la diversidad genética, lo que proporciona especies con los medios para evolucionar y adaptarse en un entorno cambiante (Oleas, 2011a). Para especies en peligro es importante saber dónde y cómo se distribuye la diversidad para poder establecer prioridades de conservación, ya que al tener poblaciones muy restringidas y en peligro los esfuerzos de conservación deberían enfocarse a estas poblaciones (Loo y Canadian, 2011).

1.5. Objetivo general

Determinar la estructura genética poblacional de la especie *Phaedranassa glauciflora*.

1.6. Objetivos Específicos

- Estimar los niveles de diferenciación genética dentro y entre poblaciones de *Phaedranassa glauciflora*.
- Estimar si la diferenciación genética entre poblaciones se debe a la influencia geográfica.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Descripción de la especie estudiada

2.1.1. *Phaedranassa glauciflora*

Phaedranassa glauciflora es una especie de hierba terrestre bulbosa endémica del Ecuador, localizada en la Sierra ecuatoriana en la provincia de Chimborazo y Morona Santiago a unos 2000 y 2500 m de altitud como lo muestra la Figura 1 (Oleas, 2000). En el año de 1998 y 1999 se realizó una búsqueda exhaustiva y se encontraron seis nuevas poblaciones pertenecientes a esta especie. Cinco de las nuevas poblaciones encontradas se localizaron en zonas destinadas a la agricultura y a la ganadería y una población fue localizada en zonas alteradas dentro del Parque Sangay. Cada población cuenta con un número aproximado de 500 individuos que ocupaban un área menor a 100 m² (Oleas, 2011a).

Phaedranassa glauciflora son plantas geófitas, producen bulbos con túnica marrón y raíces contráctiles. Tienen una o dos hojas pecioladas que en su mayoría están ausentes en la floración. La lámina es elíptica a lanceolada con un ápice agudo y una base atenuada que se estrecha hacia el pecíolo (Minga et al., 2015). Las hojas tienen una nervadura central prominente a lo largo de su longitud y, a veces, son glaucas ver Imagen 1. Las hojas glaucas, así como el tamaño y el color de las hojas, son características que varían entre especies y se han utilizado en claves taxonómicas (Minga et al., 2015; Sánchez, 2020).

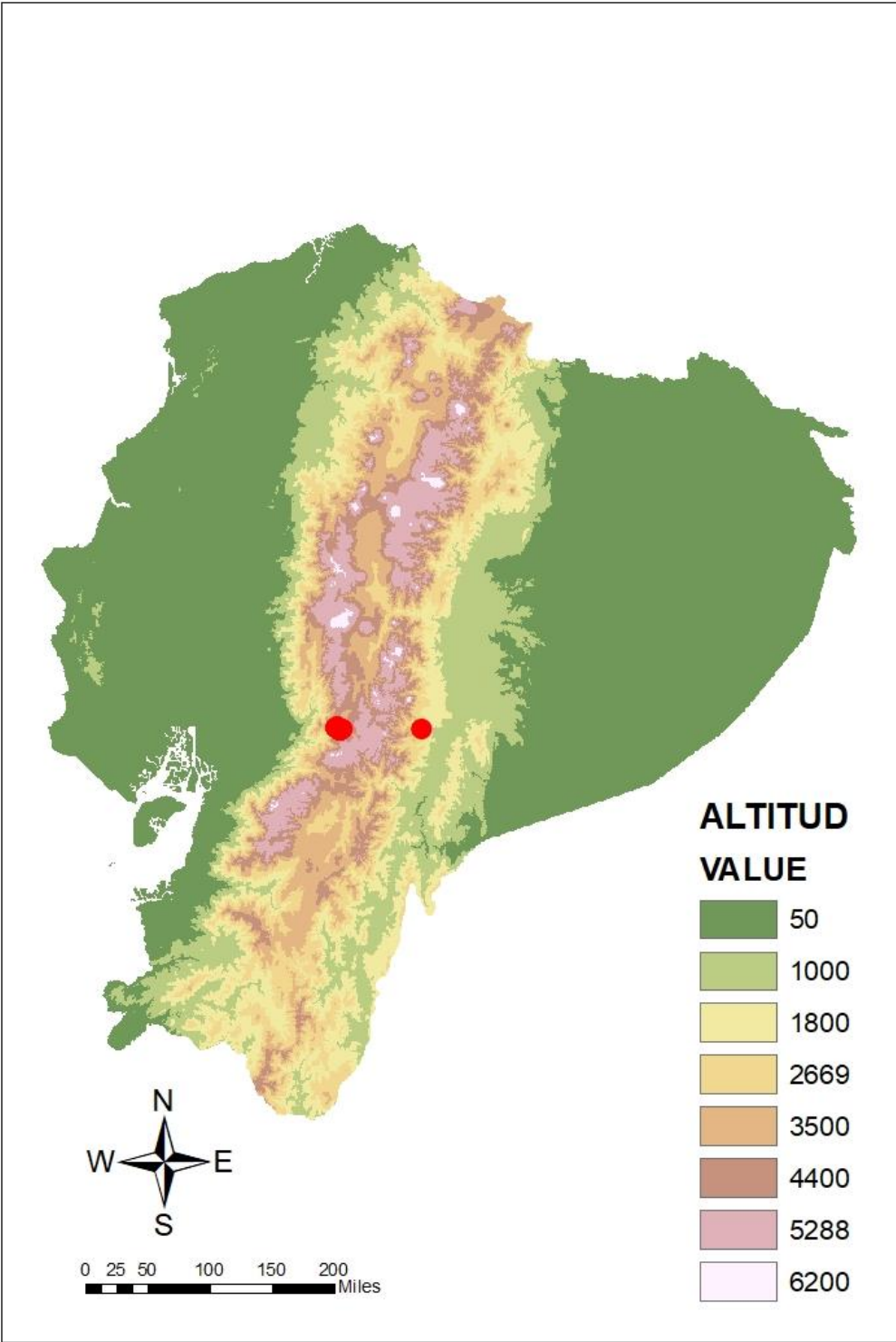


Figura 1. Mapa de distribución geográfica de *Phaedranassa glauciflora* en el Ecuador.

Phaedranassa glauciflora Meerow tiene flores notablemente glaucas que son robustas y numerosas, hojas de 30 a 50 cm de largo y de 6 a 9 cm de ancho, el tubo floral mide 12 a 13 mm de largo restringido cerca de la base, contiene una franja amarilla notablemente más ancha, especialmente en los brotes jóvenes, filamentos estaminales de color rosa pálido que miden de 37 a 43 cm a lo largo de toda su longitud y tépalos rectos o extendidos distalmente de 10 a 15 mm Imagen 1 (Meerow, 1990).



Imagen 1. *Phaedranassa glauciflora*. Fuente: Nora Oleas.

Las nuevas poblaciones fueron encontradas en áreas alteradas y muy agrupadas, por lo tanto, la destrucción del hábitat es la única amenaza conocida para la especie. Debido a esto y a su población limitada, *Phaedranassa glauciflora* se encuentra categorizada como una especie en peligro de extinción según los criterios B1 y los subcriterios ab (iii) de la UICN (Oleas y Pitman, 2003), se encuentra incluida en lista roja, según los criterios de la de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Oleas, 2011a).

2.2. Área de Estudio

Las especies fueron recolectadas en diferentes provincias del Ecuador, las cuales fueron en la provincia de Chimborazo en Alausí (C y D), Morona Santiago en el Parque Nacional Sangay (A) y Azuay (B y E). Se recolectaron un total de 142 individuos de 5 poblaciones diferentes ver Figura 2.

Los lugares de recolección se encuentran en la región sierra y presentan un clima templado semi húmedo a húmedo en la zona interandina y frío de alta montaña en los páramos, sobre los 3000 m de altitud. La región sierra recibe la influencia de masas de aire oceánicas, amazónicas y de la oscilación de la Zona de Convergencia Intertropical, por lo que registra dos estaciones lluviosas entre los meses de marzo, abril y octubre (Varela, 2018).

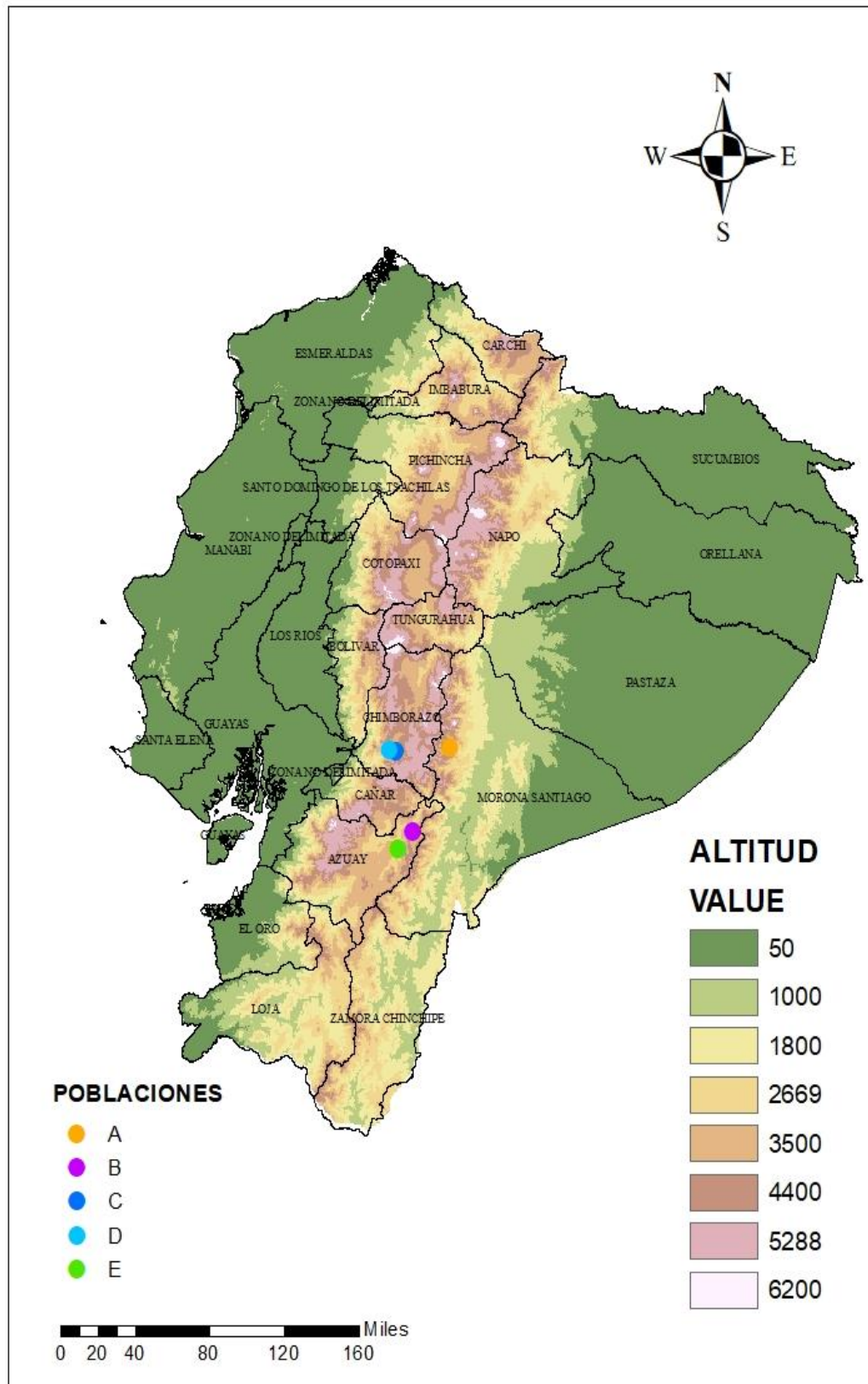


Figura 2. Zonas de recolección de muestras de las poblaciones de *Phaedranassa glauciflora*.

2.3. Análisis genéticos

2.3.1. Extracción de ADN

Utilizamos muestras de hojas frescas de 142 individuos, un promedio de 27 a 30 especímenes por población (A, B, C, D y E). Las muestras se recolectaron de plantas cuyas bases de pecíolos estaban al menos a un metro de distancia, las hojas se secaron rápidamente en gel de sílice. Además, si los individuos eran estériles al momento de la colecta, se colectaron otras muestras y se mantuvieron ex-situ hasta la obtención de flores, o se revisitaron los lugares hasta encontrar flores en la naturaleza. Los protocolos de extracción de ADN siguieron los métodos descritos en Oleas et al. (2005). Para la cuantificación del ADN, se siguió a Livingstone et al. (2009).

2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los individuos fueron genotipados con 13 cebadores microsatélites: ocho desarrollados a partir de *P. tunguraguae* pt14, pt21, pt32, pt39, pt43, pt48, pt49 y pt61 (Oleas et al., 2005); y cinco desarrollados a partir de *P. schizantha* ps2, ps13, ps16, ps27 y ps28 (Oleas et al. 2009). Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa y los procedimientos de genotipado siguieron los protocolos descritos por Oleas et al. (2005, 2009). Los procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa se repitieron tres veces si las muestras no se lograban amplificar. También se repitieron las muestras con alelos que mostraban una diferencia de un par de bases (pb) en lugar de una variación de unidad repetida como se esperaba para la mutación de microsatélites. Si la muestra todavía mostraba una diferencia de un solo par de bases, la muestra se eliminaba del análisis. También se utilizó el programa MICRO-CHECKER versión 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) para identificar errores de genotipado y alelos nulos.

2.4. Análisis estadísticos

Se estimaron estadísticas descriptivas genéticas poblacionales con ayuda del paquete GENALEX v 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). el cual nos permite realizar análisis genéticos poblacionales y conocer el número de alelos por locus, número efectivo de alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada, estadísticas F, distancia genética, alelos privados e índice de fijación (Peakall y Smouse, 2012). Se utilizó el programa GENEPOP v. 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995) para obtener los valores de desequilibrio de ligamiento. También, se utilizó el software conocido como STRUCTURE v 2.3 (Pritchard et al., 2000)., que mediante un análisis Bayesiano nos permite correlacionar las frecuencias de los alelos y asignar a los individuos en grupos genéticos (Pritchard et al., 2000).

Los análisis se corrieron con grupos genéticos (k) de uno a siete ($k = 1 - K = 7$) designando veinte repeticiones para cada k. Para identificar el número de grupos genéticos (k) se utilizó el programa STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 (Earl, 2012), que nos permite conocer el valor (k) más probable. La estadística descriptiva y el análisis Bayesiano en STRUCTURE nos permitió conocer sobre la estructura y diversidad genética entre las poblaciones de *Phaedranassa glauciflora*. También utilizamos el programa CLUMPAK (Kopelman et al., 2015) el cual nos ayuda a resumir las corridas producidas para su conjunto de datos utilizando uno o más programas de agrupamiento (Kopelman et al., 2015). Para el Modelo de aislamiento por distancia utilizamos el programa GENALEX v 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1. Errores de genotipaje y alelos nulos

Nuestros resultados sugieren la presencia de alelos nulos por lo cual se corrió en el programa MICRO-CHECKER para poder identificar los alelos nulos en las poblaciones, luego eliminamos los alelos nulos y volvimos a calcular los valores de F_{ST} , pero no obtuvimos diferencias entre los valores calculados con posibles alelos nulos o los que no tenían esos datos. Debido a que todos los loci mostraron alelos nulos dispersos entre las poblaciones y ninguno tuvo exceso de heterocigotos en todas las poblaciones, consideramos que nuestros datos muestran un verdadero exceso de homocigotos. Los alelos nulos podrían causar una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE). Para abordar este problema, analizamos cada población individualmente utilizando un conjunto de loci que no muestran indicación de alelos nulos ver Tabla 1. Incluso eliminando loci con alelos nulos, las poblaciones mostraron una desviación significativa de HWE ($F_{ST} = 0,19$).

3.2. Composición genética

Se encontraron 184 alelos en 13 loci polimórficos de 5 poblaciones de *Phaedranassa glauciflora* con el programa Gen Alex v 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). El valor promedio del número de alelos (N_a) osciló entre las poblaciones entre 3,9 y 8,5. El número efectivo de alelos (N_e), la media se reduce de 2 a 4 alelos por población. Las poblaciones con mayoría de alelos fueron B, C, D y E tenían el mayor número de alelos por locus y la población A tuvo el menor número de alelos por locus. El número de alelos privados por población (PA) estuvo en un rango de 0,2 a 1,8. La población E tenía el mayor número de alelos y el mayor número de alelos privados. Todos menos el locus 14 mostraron una desviación significativa de HWE en al menos un locus por población. No

encontramos evidencia de errores de puntuación y grandes abandonos de alelos con MICRO-CHECKER. Encontramos un rango de 5 a 10 alelos por población que muestra evidencia de alelos nulos por sitio de recolección ver Tabla 1.

Tabla 1

Características y parámetros de diversidad genética de 5 poblaciones de *Phaedranassa glauciflora* en Ecuador.

ESPECIE	ID. Recolección	N	NA	NE	HO	HE	F	LD	PA	NL
A	1pg	23	3,92	2,11	0,35	0,46	0,28	0	0,31	5
B	2pc	24	5,54	2,37	0,42	0,48	0,20	0	0,62	6
C	2pg	25	7,69	4,01	0,42	0,69	0,38	0	0,85	9
D	3pg	28	8,15	4,31	0,43	0,71	0,39	0	1,23	10
E	6pc	27,54	8,54	4,86	0,41	0,73	0,42	0	1,85	10
Media		25,23	7,69	4,01	0,42	0,69	0,38	0,00	0,85	9,00

Tamaño de la muestra (n), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigosis esperada y observada (He, Ho), alelos privados (PA), 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).

3. 3. Diversidad genética

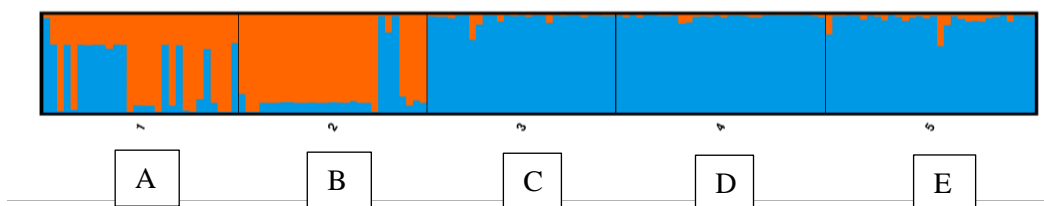
El promedio de alelos varió de 3,92 en la población A (1pg), de 5,54 para la población B (2pc), de 7,69 para la población C (2pg) y de 8 para las poblaciones D (3pg) y E (6pc). Entre las poblaciones, HO osciló entre 0,35 y 0,41 y HE entre 0,46 y 0,73. Las poblaciones más diversas fueron B, C, D y E mientras que A mostró una menor cantidad de heterocigosis en relación con HO y el número de alelos ver Tabla 1. En general, HE fue significativamente mayor que HO y estadísticamente significativa en todas las poblaciones

por la deficiencia de heterocigotos Tabla 1. Los valores de HWE en todas las poblaciones presentaron un valor $p < 0,00$ por lo que es altamente significativo.

3.4. Estructura genética de la población

Los resultados de AMOVA indican que el 80% de la diversidad existe dentro poblaciones y el 20% entre las poblaciones ($p < 0,00$) ver Tabla 2. Se logró identificar dos grupos genéticos en base a los resultados obtenidos del software STRUCTURE ver Figura 4 y 5. Se observa una división clara entre las poblaciones colectadas en Alausí (C y D), las poblaciones colectadas en el Parque Nacional Sangay (A), y las poblaciones colectadas en el Azuay (B, y E) ver Figura 4. Se evidenció una diferencia en la riqueza alélica entre los dos grupos. El programa Structure Harvester identificó $k = 2$ como el k probable. Sin embargo, podría haber una subestructura porque se encontró otro pico en $k = 4$ ver Figura 3. Las poblaciones C y D colectadas en Alausí conforman un grupo genético más homogéneo en comparación con las otras poblaciones Figura 4. Se pudo evidenciar una fuerte sub estructura relacionada a la geografía en el primer grupo.

K=2



K=4

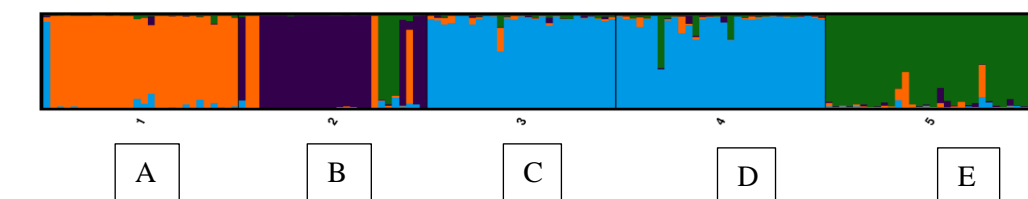


Figura 3. Análisis bayesiano de grupos genéticos, cada color indica un grupo genético (k).

Tabla 2

Resultados del Análisis de Varianza Molecular de *Phaedranassa glauciflora* a partir de loci de Microsatélites

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%	P
Entre Pops	4	259,36	64,84	1,06	20%	0,00
Dentro Pops	279	1200,64	4,30	4,30	80%	0,00
Total	283	1460,01		5,37	100%	0,00

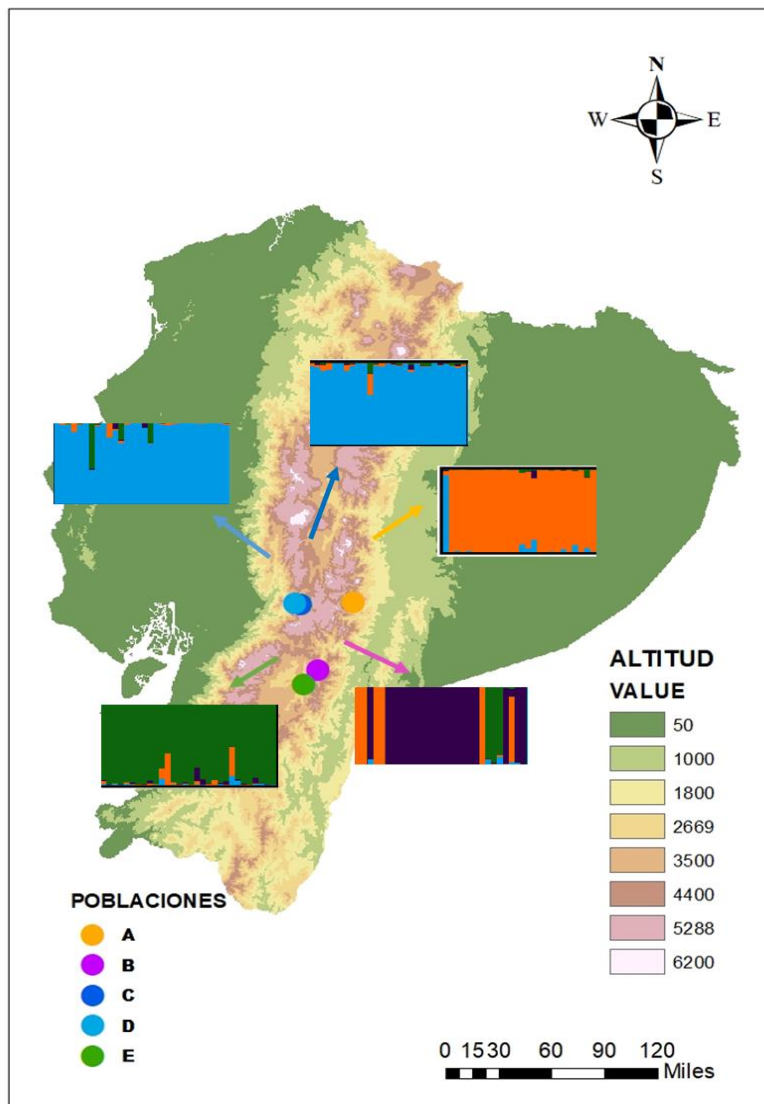


Figura 4. Mapa de la Estructura genética de las poblaciones de *Phaedranassa glauciflora*. La barra gráfica representa la estructura poblacional estimada para cada una de las poblaciones de la especie.

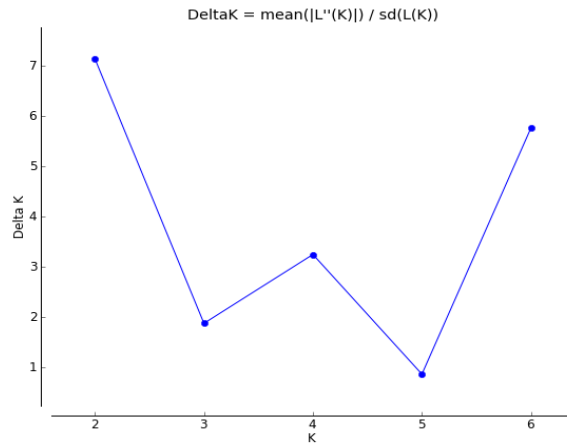


Figura 5. Parámetros de la Prueba de Evanno, Eje X se encuentran las poblaciones y Eje Y probabilidad. K2 es la más probable.

3.5. Prueba de Mantel

Se detectó correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética Nei. Lo que sugiere es que mientras más lejanas se encuentran las poblaciones más diferentes son entre sí.

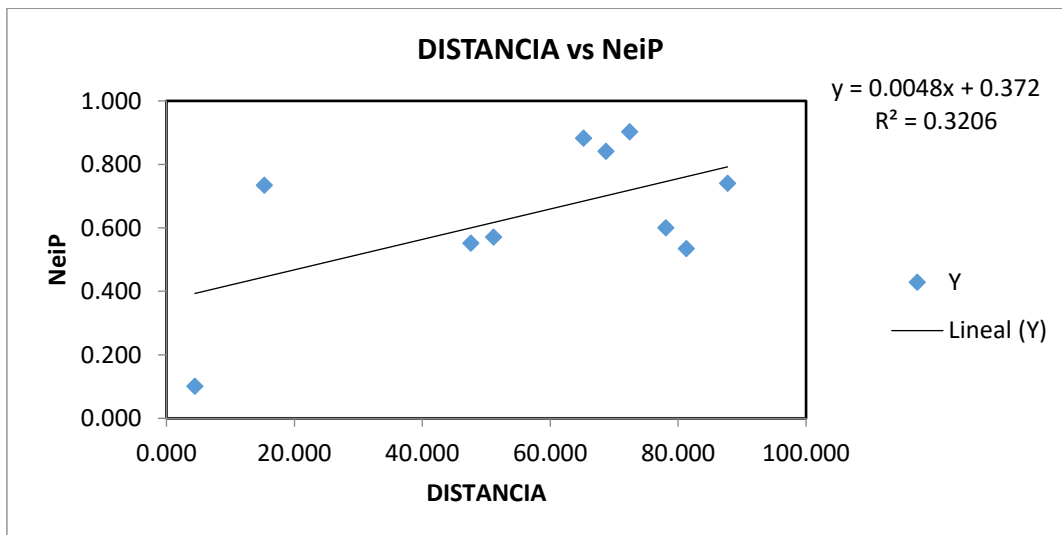


Figura 6. Relación entre las distancias geográficas y distancias genéticas para las poblaciones de *Phaedranassa glauciflora* r: coeficiente de correlación de Pearson.

CAPITULO IV

4. DISCUSIÓN

4.1. Composición y diversidad genética

Las poblaciones de *P. glauciflora* mostraron una baja variabilidad genética ya que los valores de H_o fueron menores a los de H_e ver Tabla 1, se puede explicar esta baja variabilidad porque sus poblaciones son pequeñas y aisladas como en el caso de la especie *P. schizantha* presenta valores similares con respecto a la heterocigosidad observada y esperada y se observa una baja diversidad genética debido a la consanguinidad y por procesos de deriva genética (Oleas et al., 2016). Los resultados obtenidos muestran que las poblaciones de *P. glauciflora* no se encuentran en equilibrio HWE Tabla 1, presentan un exceso de homocigotos. Esto puede indicar endogamia posiblemente debido a poblaciones pequeñas y/o fragmentación del hábitat (Azman, et al. 2020). En el AMOVA, el 80% de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones ver Tabla 2.

La pérdida de diversidad genética también se debe a la fragmentación del paisaje ya que Según Young y Boyle (2000), los efectos principales de la fragmentación en las especies son por la reducción en el número total de individuos, por la disminución del tamaño de la población ya que los individuos se limitan a fragmentos pequeños de hábitat, y por el aislamiento espacial de las poblaciones restantes dentro de un paisaje no adecuado. Los efectos que se presentan son el aumento de la deriva genética, la pérdida aleatoria de alelos, y el aumento de la endogamia. Si las poblaciones presentan aislamiento espacial, el flujo génico entre ellas es limitado y con el tiempo se producirá una fijación de alelos (Loo y Canadian, 2011). Este es un escenario probable para *P. glauciflora* porque las poblaciones encontradas se ubican en áreas alteradas ya sean agrícolas o al borde de carreteras.

4.2. Análisis de cluster y asignación de población

Con los resultados de STRUCTURE se identificaron dos grupos genéticos principales $K=2$ con el análisis bayesiano. El primer grupo consta de las Poblaciones A y B, y el segundo consta de las poblaciones C, D y E ver Figura 3. Las poblaciones C y D corresponden a las poblaciones colectadas en la parroquia de Alausí en la provincia de Chimborazo que se encuentra en una altitud de 2340 msnm, de donde fue descrita *P. glauciflora*. Las poblaciones A, B y E fueron consideradas potencialmente *P. glauciflora* por su relativa proximidad geográfica a las poblaciones en Azuay. Sin embargo, al momento de la colección dichos individuos no estaban en flor por lo que se hacía difícil la identificación por carecer de esos caracteres morfológicos. Es necesario estudiar más a fondo tanto morfológica como ecológicamente estos subgrupos porque potencialmente podrían ser nuevas especies ya que la población A se encuentra ubicada en la parte baja del parque Nacional Sangay a unos 3500 msnm y finalmente las poblaciones B y E se encuentran cercanas a la provincia de Azuay a unos 3300 msnm ver Figura 4. Es recomendable ampliar la muestra e incluir a la especie *P. cuencana* ya que probablemente la población E pertenece a esta especie y las poblaciones A y B pueden pertenecer a otras especies de *Phaedranassa*.

La diversidad alélica de *P. glauciflora* fue similar a la de otras especies del género (Oleas, 2011; Oleas et al., 2012). Sin embargo, nuestros resultados mostraron una baja diversidad al igual que en otras especies del género *Phaedranassa*, ya que sus poblaciones son pequeñas y aisladas. Por otra parte, talvez las poblaciones con menor diversidad podrían encontrarse sometidas a un nivel más alto de aislamiento debido a fragmentación del hábitat. Las poblaciones que presentaron una mayor diversidad fueron las poblaciones

C, D y E que se ubican en la parte occidental Figura 4. Las poblaciones A y B tienen el número más bajo de alelos por locus y el número más bajo de alelos privados Tabla 1

4.3. Modelo de aislamiento por distancia

Con respecto a la matriz de distancias geográficas y distancias genéticas en la Figura 6, La prueba de Mantel indicó que existe una correlación entre distancia genética y distancia geográfica en las poblaciones de *P. glauciflora* ($r = 0.32$) como lo indica la Figura 6. Lo que sugiere que probablemente hay poblaciones cercanas con escaso flujo génico y otras más lejanas con niveles de flujo más altos como en el caso de la población A que se encuentra en el parque Nacional Sangay y la población B en Azuay. Además, los resultados nos indican que probablemente la fragmentación de las poblaciones puede generar una falta de continuidad en la distribución de la especie, lo que impide el flujo génico entre algunas poblaciones (Fuentes et al., 2019).

4.4. Implicaciones para la conservación de especies endémicas

El uso de marcadores moleculares son una gran contribución hacia los esfuerzos de conservación ya que nos proporcionan información sobre la estructura y diversidad genética de las especies en peligro de extinción (Rossetto y Rymer, 2012). Además, la aplicación de marcadores moleculares conjuntamente con la teoría evolutiva nos aporta información sobre la historia evolutiva, la demografía, la ecología, el comportamiento y estado de las especies, lo cual nos puede ayudar en la evaluación de riesgos, la asignación de prioridades y el diseño de estrategias de conservación eficaces (Godoy, 2009).

La especie *P. glauciflora* se clasificó como En Peligro según los criterios B1 y los subcriterios ab (iii) de la UICN (Oleas y Pitman, 2003), debido a que la mayoría de sus poblaciones se encuentran en zonas muy fragmentadas y de uso agropecuarias y tienen poblaciones con un número muy pequeño de individuos (Oleas, 2011). Esta especie es una

candidata ideal para establecer estrategias de conservación ya que las poblaciones mostraron una baja diversidad genética y es importante mantenerlas monitoreadas, con el objetivo de identificar tendencias en la reducción del número de individuos y el aumento del aislamiento entre las poblaciones. Por otra parte, la diversidad genética no se encontraba distribuida de manera uniforme entre las poblaciones. La evidencia de una menor diversidad genética fue más aguda en la población A ubicada en el parque Nacional en la zona más oriental.

Conclusiones

- En general se observó una baja diversidad genética en las poblaciones de *Phaedranassa glauciflora*, ya que los datos de HE fue significativamente mayor que HO y todas las poblaciones presentaron una deficiencia de heterocigotos.
- Se evidenció dos grupos genéticos dentro de las poblaciones estudiadas y una subestructura relacionada a la geografía. Uno formado por las poblaciones A, B, y E y otro por las poblaciones C y D de donde *P. glauciflora* fue descrita.
- Se evidenció que existe una correlación entre distancia genética y distancia geográfica, ya que existen poblaciones cercanas con escaso flujo génico y otras más lejanas con niveles de flujo más altos como en el caso de la población A y B.

Recomendaciones

- Se requieren estudios adicionales demográficos y espaciales para entender los fenómenos que estarían influyendo en la estructura genética de la especie.
- Es necesario evaluar taxonómicamente al grupo estudiado, porque se evidenció una subestructura y esto podría indicar que las poblaciones pertenecen a varias especies.
- Se recomienda ampliar la muestra e incluir a la especie *P. cuencana*, ya que se puede encontrar una similitud genética con las poblaciones restantes.

- Se recomienda realizar más estudios para poder determinar si la correlación entre distancia genética y geográfica se debe a que es una especie con estructura marcada o varias especies.

Literatura citada

- Azman, A., Kit-Siong. K., Chin-Hong Ng., Chai-Ting L., Tnah, L. H., Zakaria, N. F., y Lee, S. (2020). Low genetic diversity indicating the threatened status of *Rhizophora apiculata* (Rhizophoraceae) in Malaysia: declined evolution meets habitat destruction. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
- Cuestas, F., Muriel, S., Beck, R., Meneses, S., Halloy, S., Salgado, S., y Becerra, M. (2012). Biodiversidad y Cambio Climático en los Andes Tropicales. Conformación de una red de investigación para monitorear sus impactos y delinear acciones de adaptación. Lima-Quito. *Red Gloria-Andes*, 180.
- Earl, Dent A., y VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program to display the output of STRUCTURE and implement the Evanno method. *Conservation Genetic Resources*. 4 (2). 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Eguiarte, L., Aguirre, E., Scheinvar, E., González, A., y Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 4(1), 1-30.
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Liguori, J. A., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E., y Souza, V. (2013). Genómica de poblaciones: nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(1), 42-56.
- Eriksson, G. (2000). Genética evolutiva y conservación genética. *Forest Systems*, 9(4), 209-219.

- Ferreira, M. E., Fernández, J. N., y Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia: *EMBRAPA-CENARGEN*, 1(1), 55-60.
- Fuentes, S. L., Solano, J. P., y Ramírez, C. (2019). Estructura genética de poblaciones de *Pinus cembroides* de la región central de México. *Revista fitotecnia mexicana*, 42(1), 57-65.
- Furnier, G. R. (2004). Métodos para medir variación genética en las plantas. *Manejo de recursos genéticos forestales*, 2(1), 20-30.
- Garrido, T., y Vázquez, E. (2013). Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(3), 1031-1054.
- Godoy, J. A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*, 18(1).
- 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.
- Livingstone, D., Freeman, B., Tondo, C. L., Cariaga, K. A., Oleas, N. H., Meerow, A. W., ... & Kuhn, D. N. (2009). Improvement of high-throughput genotype analysis after implementation of a dual-curve Sybr Green I-based quantification and normalization procedure. *HortScience*, 44(5), 1228-1232.
- Loo, J. A., y Canadian, F. S. (2011). Manual de genética de la conservación: Principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica. *Jalisco: Comisión Nacional Forestal de México*.1(1), 27-42.

- Losos, J. B., y Glor, R. E. (2003) Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends in Ecology and Evolution*. 18, 220-227.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., y Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(4), 189-197.
- Mendoza, F. (2014). Cordillera de Los Andes, una oportunidad para la integración y desarrollo de América del Sur. *Santiago: Alianza para las Montañas*. 38-42.
- Meerow, A. W. (1990). Amaryllidaceae. en G. Harling and L. Andersson, editores. Flora of Ecuador. University of Gotenborg; Riksmuseum, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Goteborg, Stockholm, Quito. (41), 38.
- Minga, D., Ulloa, C. U., Oleas, N., y Verdugo, A. (2015). A new species of *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) from Ecuador. *Phytotaxa*, 192(1), 50-53.
- Oleas, N. (2000). En Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez S. y Jørgensen, P. (eds.). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Publicaciones del Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. 66-67.
- Oleas, N., y Pitman, N. (2003). *Phaedranassa glauciflora*. The IUCN Red List of Threatened Species 2003: e.T42811A10754757. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2003.RLTS.T42811A10754757.en>
- Oleas, N. H., Meerow, A. W., y Ortega, J. (2005). Isolation and characterization of eight microsatellite loci from *Phaedranassa tunguraguae* (Amaryllidaceae). *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 791-793.

- Oleas, N. H., Meerow, A. W., y Ortega, J. (2009). Eight microsatellite loci in *Phaedranassa schizantha* Baker (Amaryllidaceae) and cross-amplification in other *Phaedranassa* species. *Conservation Genetics*, 10(6), 1887-1889.
- Oleas, N. (2011a). *Phaedranassa glauciflora*. En: León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitmam, L. Endara, C. Ulloa Ulloa y H. Navarrete (Eds). *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador*. Publicaciones del Herbario QC, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- <<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/FichaEspecie/Phaedranassa%20glauciflora>>, acceso miércoles, 30 de junio de 2021.
- Oleas, N. (2011b). Landscape Genetics of *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) in Ecuador (Tesis doctoral). Florida International University, Miami-Florida. Doi: 10.25148/etd.FI11080201.
- Oleas, N. H., Meerow, A. W., y Ortega, J. (2016). Genetic structure of the threatened *Phaedranassa schizantha* (Amaryllidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 182(1), 169-179.
- Peakall, R., y Smouse P. E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.
- Perfectti, F., Picó, F. X., y Gómez, J. M. (2009). La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas*, 18(1).
- Pierce, B. A. (2009). Genética: Un enfoque conceptual. Ed. Médica Panamericana.
- Premoli, A., Quiroga, M. P., Souto, C. P., y Mathiasen. (2011). Genética de la conservación: de poblaciones a filogeografía. *Conservación Biológica: perspectivas desde América Latina*. Publisher: Editorial Universitaria, 31-45.

- Pritchard, J. K., Stephens M., Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155, 945-959.
- Raymond, M., Rousset F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248–249.
- Rentaría-Alcántara, M. (2007). *Breve revisión de los marcadores moleculares*. En L. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (vol. 18, pp. 541-566). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. SEMARNAT. México.
- Rossetto, M., Rymer, P.D. (2012). Aplicaciones de marcadores moleculares en conservación vegetal. En: Henry J, ed. *Marcadores moleculares en plantas*. Oxford: Wiley-Blackwell, 82–96.
- Sánchez Lara, E. D. (2020). Evidencia genética de hibridación natural entre *Stenomesson aurantiacum* y *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) (Bachelor's thesis, Quito: Universidad Tecnológica Indoamérica).
- Tobar, O. B. (2019). El origen de nuevas especies. *Revista Anales* 1, (377), 147-159.
- Trujillo, J. E., Delgado-Valerio, P., Ramírez-Morillo, I., Rebolledo-Camacho, V., y Pérez-Nasser, N. (2013). Variación genética en poblaciones mexicanas de *Swietenia macrophylla* King, una especie tropical en expansión geográfica reciente. *Botanical Sciences*, 91(3), 307-317.
- Valencia, R., Pitman, N., Leon-Yanez, S., Jørgensen, P. M. (eds). (2000). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4, 535-538.

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: 31 de enero 2019.

Velázquez, E. B. (2019). La biodiversidad en el Ecuador. Quito: Universidad Politécnica Salesiana. Editorial Abya-Yala.

Zamora-Abrego, G., Manríquez-Morán, N. L., Ortiz-Yusty, C. E., y Ortega-León, A. (2013). Uso de técnicas moleculares como herramienta para conservar la diversidad biológica. *Biología molecular aplicada a la producción animal y la conservación de especies silvestres*, 313-386.