



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIÓLOGA

Variación genética de *Stelis superbiens* (Lindl.), a lo largo de un gradiente altitudinal al sur de Ecuador

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORA: Flores Lozano Elena Viviana

DIRECTORA: Riofrío Guamán María Lorena, Blga.

LOJA - ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

María Lorena Riofrío Guamán

Docente de la Titulación de Biología

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación, "Variación genética de *Stelis superbiens* (Lindl.), a lo largo de un gradiente altitudinal al sur de Ecuador" realizado por Elena Viviana Flores Lozano; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 21 de Febrero de 2017

f.

María Lorena Riofrío Guamán

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Elena Viviana Flores Lozano declaro ser la autora del presente trabajo de fin de titulación: Variación genética de *Stelis superbiens* (Lindl.), a lo largo de un gradiente altitudinal al sur de Ecuador, de la titulación Biología siendo María Lorena Riofrío Guamán director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Autor: Elena Viviana Flores Lozano

Cédula: 1105581084

DEDICATORIA

A la Gran Energía y la Tierra

Que nos brinda un nuevo día para luchar y conseguir nuestros sueños iluminados por la verdad.

A mis Padres

Elsa y Augusto por su amor incondicional y esfuerzo a pesar de la distancia lo hemos logrado.

A mis Abuelos

Manuel y Cecilia por ser el pilar fundamental de mi hogar, con su cariño y empuje supieron ayudarme a cumplir esta meta.

A mis Hermanos

Thalia y Enrique sus energías positivas me inspiraran siempre a soñar y conseguirlo.

“El que no quiere a su patria no quiere a su madre. Soy América latina, un pueblo sin piernas pero que camina.” RC13

Elena.

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Técnica Particular de Loja, especialmente a la Titulación de Biología por brindarme cinco años de conocimientos, experiencias e inolvidables amistades.

A mi directora de tesis Blga. Lorena Riofrío Guamán, por brindarme su confianza y apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

Al Blgo. Carlos Naranjo, por ofrecerme su asesoría y colaboración en mi formación como estudiante.

Al Ing. Hernán Lucero quien fue de gran apoyo y me inspiró como estudiante a seguir luchando.

A la PhD. Augusta Cueva quien estuvo pendiente en cada paso de este proceso.

A mis compañeros de laboratorio Daniela, Cristian y Gabriel quienes me colaboraron sus conocimientos y me apoyaron en este proceso.

Elena

ÍNDICE DE CONTENIDOS

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. ORQUÍDEAS EPÍFITAS EN BOSQUES MONTANOS	6
1.2. <i>STELIS SUPERBIENS</i> , UNA ORQUÍDEA EPÍFITA Y SUS POBLACIONES EN LOS BOSQUES MONTANOS DEL SUR DEL ECUADOR ...	7
1.3. FACTORES QUE CONDICIONAN LA PRESENCIA DE LAS POBLACIONES.....	7
1.4. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESPUESTA FRENTE AL CAMBIO AMBIENTAL.....	8
1.5. MARCADORES MOLECULARES PARA DETERMINAR VARIACIÓN GENÉTICA - AFLP VENTAJAS Y DESVENTAJAS.....	9
1.6. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	10
CAPITULO 2.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. ÁREA DE ESTUDIO	12
2.2. ESPECIE EN ESTUDIO	12
2.3. MUESTREO	15
2.4. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN - AFLPS.....	15
2.4.1 PROTOCOLO PARA AFLPS.....	16
2.5. ANÁLISIS DE DATOS.....	17
2.5.1 ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES	17
2.5.2 AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL.....	18
CAPÍTULO 3.....	20

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
3.1. RESULTADOS.....	21
3.1.1 ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES	23
3.1.2 AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL.....	26
3.2. DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES.....	28
RECOMENDACIONES.....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMEN

Este estudio evalúa la variación en la estructura genética de *Stelis superbiens* una orquídea nativa de Ecuador en diferentes poblaciones y rangos altitudinales como respuesta a las condiciones cambiantes del medio en un bosque de niebla montano al Sur del Ecuador. Se localizaron 4 poblaciones en la Cordillera Real oriental de los Andes Sur y a través del análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), se determinaron 173 alelos polimórficos para evaluar la estructura genética de la especie a través de Structure, PCoA obteniéndose como resultado tres poblaciones genéticas coexistiendo en las poblaciones analizadas posiblemente por eventos de hibridación con otras especies. Los resultados de autocorrelación espacial en Genalex indican una estructura genético espacial débil entre todas las poblaciones coincidiendo con el bajo porcentaje de variación inter poblacional y alto porcentaje de variación intra poblacional. Estos resultados explican cambios en la estructura genética de todas las poblaciones independiente del gradiente altitudinal en el que se localizan.

Palabras clave: AFLPs, estructura genética, orquídea epífita

ABSTRACT

This study evaluates the variation in the genetic structure of *Stelis superbiens*, an orchid native from Ecuador, in different populations and altitudinal ranges as response to the changing environmental conditions in a montane cloud forest in southern Ecuador. Four populations were located in the Cordillera Real Oriental of the Southern Andes and through of analysis of polymorphisms of length of amplified fragments (AFLP), 173 polymorphic alleles were determined to evaluate the genetic structure of the species through Structure, PCoA obtaining as result three genetic populations coexisting in the populations analyzed possibly by events of hybridization with other species. The spatial autocorrelation results in Genalex, indicate a weak spatial genetic structure among all populations, coinciding with the low percentage of inter-population variation and high percentage of intra-population variation. These results explain changes in the genetic structure of all independent populations of the altitudinal gradient in which they are located.

Key words: AFLPs, Genetic structure, epiphytic orchid.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación dado lo importante del conocimiento de la estructura genética de las poblaciones para entender los cambios que se presentan a nivel poblacional y las respuestas y adaptaciones que están sucediendo, evalúa los patrones de estructura genética de las poblaciones de *Stelis superbiens* una orquídea epífita nativa de Ecuador a través del uso de marcadores moleculares permitiendo detectar si existen variaciones en las poblaciones a lo largo de un gradiente altitudinal que puedan ser respuesta a cambios ambientales.

El documento está distribuido en 4 capítulos: 1. Un marco teórico, que describe desde los bosques montanos, sus orquídeas epífitas, los factores que condicionan la presencia de las poblaciones hasta la estructura genética y marcadores moleculares que permiten evidenciar las variaciones, presentando también los objetivos y preguntas investigación; 2. Un capítulo de materiales y métodos en donde se describe el área de estudio, la especie analizada, muestreo poblacional y análisis genético, 3. Los resultados y discusiones producto de la investigación y 4. Las conclusiones y recomendaciones que se han desarrollado a lo largo del estudio.

Ante los cambios ambientales emergentes, algunas especies pueden variar su estructura genética en respuesta a los mismos, y las orquídeas epífitas son particularmente sensibles a estos cambios, al ser dependientes de los árboles hospederos para su establecimiento y desarrollo. En algunos casos el cambio climático puede llegar a comprometer la estabilidad de las poblaciones, a esto se suman factores antrópicos, por tanto este trabajo evalúa los posibles cambios que están surgiendo en las poblaciones como respuesta a la variación climática y como esto afecta a la estabilidad de las poblaciones.

Stelis superbiens una orquídea epífita distribuida principalmente en los bosques de niebla del Sur del Ecuador que cubre amplios rangos altitudinales, representa una especie modelo para poder evaluar la estructura genética y los cambios o variaciones que podrían estarse suscitando a nivel genético en respuesta a las perturbaciones ambientales, esta información permite proponer medidas adecuadas de conservación.

El objetivo de este trabajo de analizar la estructura genética existente en poblaciones de *Stelis superbiens* a través de un gradiente altitudinal para evaluar si factores ambientales están influyendo en los cambios poblacionales, a través del estudio de la estructura genética

entre las poblaciones fue cumplido permitiendo inferir un bajo porcentaje de flujo génico entre las poblaciones sin marcados cambios en la estructura genética de poblaciones de *Stelis superbiens* en las diversas altitudes mostrando una adaptabilidad de estas plantas ante los cambios ambientales.

Para determinar la variación genética de *Stelis superbiens* (Lindl.) se localizaron 4 poblaciones en un bosque montano localizadas en diferentes niveles altitudinales, se extrajo ADN de los individuos muestreados y se analizó a través de la técnica molecular: Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), utilizando dos combinaciones de cebadores, a fin de obtener un cromatograma que posteriormente se utilizó para determinar la estructura genética de la población.

**CAPÍTULO 1.
MARCO TEÓRICO**

1.1. Orquídeas Epífitas en bosques montanos

Los bosques montanos son ecosistemas muy complejos siendo un hábitat único y escaso representa el 0.14% de la superficie terrestre del planeta caracterizado por su rica diversidad de especies y procesos ecológicos claves, siendo la degradación del hábitat y la fragmentación amenazas importantes para la biodiversidad en todo el mundo (Juárez et al., 2014). Los gradientes altitudinales proporcionan un enfoque en la estructura, función y dinámica de un bosque montano, así también reflejan caracteres típicos de la vegetación como de las especies que tienen forma de vida epífita, siendo estos organismos indicadores de integración de los cambios ambientales que responden a una multitud de factores físicos y químicos (Beck, 2008)

Los bosques de los Andes son los hábitats más ricos en diversidad botánica, siendo el grupo de plantas epífitas un elemento importante debido a la riqueza de especies y el ciclo de nutrientes que desempeñan, además representan el 25% de plantas vasculares en 1 hectárea de bosque montano húmedo (Gentry and Dodson, 2013)), atribuyéndose esta alta diversidad a la distribución y crecimiento sobre árboles hospederos (forófitos) dentro del bosque (Acebey and Thorsten, 2001). Las especies epífitas entre ellas las orquídeas son utilizadas como indicadores del estado de conservación de estos bosques debido a su sensibilidad al cambio climático global y como herramientas de evaluación que responden a factores físicos y químicos a lo largo de la gradiente altitudinal proporcionando un enfoque para profundizar en muchos aspectos de la estructura, función y dinámica de un bosque (Fiedler and Beck, 2008; Mondragón et al., 2015).

La familia Orchidaceae es una de las más grandes del reino de las plantas angiospermas, las estimaciones van desde 20000 a 35000 especies en cinco subfamilias, actualmente es una familia que evoluciona de forma activa, se ubica en todos los continentes con presencia de vegetación, sin embargo su distribución no es uniforme y está sesgada hacia los trópicos. (Raven and Axelrod, 1974; Dressler, 1982, 1993; Cribb et al., 2003). Los Andes de Colombia y Ecuador son los lugares más ricos del mundo en cuanto a diversidad de orquídeas de las cuales solo se conoce una cuarta parte (Wood et al., 1993) y el 70% de todas ellas son epífitas (Gentry & Dodson, 1987). En Ecuador se catalogaron mayor número de especies en comparación a Brasil y Colombia con el 60% de las orquídeas que son epífitas (Dodson, 1994-2003), siendo por tanto un componente característico de los bosques lluviosos tropicales y los bosques de niebla (Gravendeel et al., 2004).

1.2. *Stelis superbiens*, una orquídea epífita y sus poblaciones en los bosques montanos del Sur del Ecuador

Stelis Sw., es un género perteneciente a la subtribu *Pleurothallidinae*, característica de los bosques de niebla montanos, es epífita y en Ecuador es uno de los grupos más diversos y difíciles de identificar. Distribuidas desde México hasta Brasil y las Antillas, mientras que para Ecuador y Colombia se encuentra el mayor número de especies debido a su similar topografía (Dodson, 2003; Duque, 2008). Un gran porcentaje de *Stelis* vive bajo la sombra de los árboles preferiblemente en bosques nublados entre 1000 y 3000 m s.n.m., (Suárez et al., 2008). caracterizada por ser una familia amplia y estar en constante evolución (Cribb et al., 2003).

Dentro de las especies de este género encontramos a *Stelis superbiens* (Lindl.), reportada para el sur del Ecuador en la Reserva Biológica San Francisco; esta especie presenta tendencia natural hacia la variación y por esta razón la importancia en su estudio (Duque, 2008).

1.3. Factores que condicionan la presencia de las poblaciones

Los cambios en las poblaciones son consecuencia de factores bióticos y abióticos (Allendorf & Luikart 2007), incluidos procesos de fragmentación de hábitat, presión antropogénica y de cambios en las condiciones ambientales (Mosandl et al., 2008; Ritcher et al., 2009).

La aceleración de los cambios climáticos causado por actividades antropogénicas o no, vienen acompañados de condiciones más secas o húmedas, el aumento de la gravedad en bosques nublados en donde habitan las orquídeas y estas a su vez son altamente susceptibles a estos cambios (Ackerman, 2014). En bosques montanos la alteración de la estructura en una comunidad y la interrupción de los procesos funcionales como la dinámica hidrológica, al mismo tiempo la fragmentación restringe el movimiento de polinizadores y dispersores reduciendo a su vez el flujo de genes, provocando el aislamiento de pequeñas poblaciones y aumentando las posibilidades de extinción dada por la estocasticidad ambiental y demográfica (Juárez et al., 2014).

La fragmentación de hábitats afecta a todas las especies, pero particularmente a las epífitas pues son dependientes de sus hospederos (Riofrío et al. 2007), afectando directamente a la disminución de la variación genética en las poblaciones y esto a su vez a la disminución de la capacidad para sobrevivir a los cambios ambientales existiendo una mayor probabilidad

de extinción y potencialmente aumentar sucesos como la deriva genética, endogamia, aumento de autofecundación y consanguinidad, estas poblaciones se ven más amenazadas por su situación demográfica y por su baja diversidad genética (Warghat et al., 2013).

Para conocer los efectos que los cambios ambientales (perturbaciones) pueden ocasionar en las poblaciones, se debe estudiar los patrones de variación o estructura genética (Klug et al., 2006), la estructura espacial y etaria de una población. y en las orquídeas que representan más del 20% de la diversidad de plantas en Ecuador (Dodson et al. 2004), y que ocupan en mayor porción los bosques de niebla montanos, la evaluación de los cambios que se están presentando en las poblaciones es necesaria..

1.4. Estructura genética poblacional y respuesta frente al cambio ambiental

Las especies con amplias distribuciones geográficas poseen características genéticas complejas, ya que distintos ambientes generan diferentes presiones de selección que se ve reflejada en la variabilidad genética poblacional (Donoso et al., 2004; Álvarez et al., 2011).

Para conocer los efectos que los cambios ambientales (perturbaciones) pueden ocasionar en las poblaciones, se debe estudiar los patrones de variación o estructura genética (Klug et al., 2006), la estructura espacial y etaria de una población.

La estructura genética de una población proporciona una perspectiva histórica de los cambios evolutivos de una especie y permite predecir cómo las poblaciones responderán a futuros eventos como la estocasticidad ambiental, demográfica y genética, estos eventos pueden causar una disminución en la reproducción y supervivencia, sin embargo las fluctuaciones aleatorias en el hábitat se consideran más importantes; con la pérdida de variación genética las poblaciones tienden a ser menos capaces de soportar los cambios en su entorno y son más propensos a ser afectados por la deriva genética mediado por el incremento en la depresión endogámica, la resistencia a patógenos y la pérdida de alelos de importancia ecológica que a su vez estos codifican rasgos que afectan a la supervivencia y reproducción; esto ocurre en especial en poblaciones fragmentadas a impedir el flujo de genes aumentando el riesgo de extinción (Fischer and Matthies, 1998; Keller et al., 2000; Ferrari et al., 2007).

La variación genética determinada por las características ambientales y la distribución de poblaciones en el espacio y el tiempo, proporciona información de los procesos microevolutivos a lo largo del paisaje tales como la selección, recombinación, mutación y

flujo genético y cómo estas poblaciones responderán a futuros eventos como la estocasticidad ambiental, demográfica y genética, ya que estos eventos pueden causar una disminución en la reproducción y supervivencia (Garrido and Vázquez, 2013).

Actualmente aunque han incrementado los estudios de diversidad genética en orquídeas epífitas tropicales aún son insuficientes, sobre todo por la gran diversidad existente (60% de la diversidad de orquídeas en Ecuador corresponde a orquídeas epífitas) (Ackerman & Ward 1999, Avila-Díaz et al. 2007, Alcántara et al. 2006, Vargas et al. 2006).

1.5. Marcadores moleculares para determinar variación genética - AFLP ventajas y desventajas

Para evaluar la estructura genética de las poblaciones es necesario el uso de marcadores moleculares, que desde su aplicación han contribuido al avance en el estudio de la biología de la conservación permitiendo la evaluación de efectos tales como la deriva genética sobre la variación genética, niveles de endogamia en poblaciones y la cantidad de flujo de genes entre y dentro de poblaciones lo que permite determinar la dinámica de la variación selectiva y su interacción con la condiciones ambientales (Frankham et al., 2002; Ouborg et al., 2010). Dentro de los tipos de marcadores moleculares, los marcadores dominantes son capaces de mostrar gran número de loci polimórficos, en comparación con marcadores codominantes estos marcadores se pueden desarrollar de manera fácil y económica, incluso sin tener información genética previa de la especie en investigación, siendo excelentes herramientas en estudios que requieren la estimación de parentesco entre individuos (Hardy, 2003).

Uno de los marcadores moleculares dominantes basados en ADN usados para evaluar la diversidad genética son los AFLPs (amplified fragment length polymorphism) que permiten analizar la variabilidad intra e inter poblacional, sin previo conocimiento de las secuencias del ADN (Vos et al., 1995), proporcionando una gran cantidad de datos con alta reproducibilidad de los resultados y polimorfismos (Smith et al. 2004, Vuylsteke et al. 2007). siendo de gran ayuda en estudios poblacionales permitiendo revelar loci polimórficos distribuidos en el genoma (Falush et al., 2007).

Ante lo expuesto, el evaluar los patrones de estructura genética de las poblaciones de *Stelis superbiens* una orquídea epífita en varias poblaciones distribuidas en un rango altitudinal nos permite conocer como varía la estructura génica entre las poblaciones de esta orquídea, y la variación genética inter e intra poblacional a través del gradiente en el bosque de niebla

montano, infiriendo si existe un aislamiento en las poblaciones distribuidas en rangos altitudinales. Esta información además de evaluar si existen cambios de estructura genética permite conocer la estabilidad de estas plantas ante los cambios altitudinales dentro del rango evaluado.

1.6. Preguntas de investigación

- **¿Cómo varía la estructura génica en las poblaciones de *Stelis superbiens*?**
- **¿Existen cambios genéticos en las poblaciones de *Stelis superbiens* en las diversas altitudes como respuesta a la gradiente altitudinal?**

CAPITULO 2.
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

El sitio de estudio se localiza en la provincia de Zamora Chinchipe, al sur del Ecuador en los límites del Parque Nacional Podocarpus en la cordillera Real Oriental de los Andes. Las poblaciones encontradas están en la Reservas Arcoiris y Reserva Biológica San Francisco a 25 y 40 Km de la provincia de Loja respectivamente. El tipo de bosque característico es de estas reservas es el montano (Bussmann, 2003). Se caracterizan por ser un bosque de clima tropical húmedo catalogado según Sierra (1999) como bosque de niebla montano, con 11 meses de precipitaciones según la altura, los periodos más lluviosos van de abril a julio, mientras que septiembre a diciembre las precipitaciones disminuyen (Aguirre, 2007). Con una altitud comprendida entre los 2200 hasta los 2250 m.s.n.m., una precipitación media anual de 2700 mm y una temperatura media anual entre 14.4 a 17.5°C (Bendix et al., 2008). La flora predominante del lugar son las Melastomataceas, con el género *Miconia*, Ericaceae con los géneros *Psamisia*, *Cavendishia* y *Gaultheria*, Clusaceae con el género *Clusia*, *Tovomita*, Rubiaceae con los géneros, *Psycotria*, Lauraceae, con *Nectandra*, *Persea*, *Ocotea* (Homeier et al., 2008) (Fig. 1).

2.2. Especie en estudio

Stelis superbiens (Lind.) es una orquídea epífita nativa de Ecuador, perteneciente a la subtribu Pleurothalidinae (Dodson, 1994-2003), de tamaño grande con relación a otras especies de la subtribu, con raíces delgadas, presenta hojas erectas de 10 a 16 cm de largo incluyendo el peciolo son coriáceas, elípticas, subagudas a obtusas, a continuación del peciolo cuneadas; la inflorescencia su disposición es erecta presenta racimos con numerosas flores que miden entre 13 a 30 cm de largo incluido el pedúnculo este a su vez muestra algunas brácteas; el ovario mide entre 5 a 6 mm de largo, los sépalos de color amarillo pálido teñido de violeta o morado, glabros externamente, pubescentes; los pétalos de color amarillos o morados, transversalmente cuneados un poco cóncavos, ápice redondeado con margen engrosado; el labio de color amarillo o púrpura, grueso transversalmente subcuadrado, cóncavo dentro del margen apical; la columna gruesa de 1mm de longitud y 1,5 mm de ancho, la antera y el estigma apical, el estigma bilobulado (Duque, 2008) (Fig. 2).

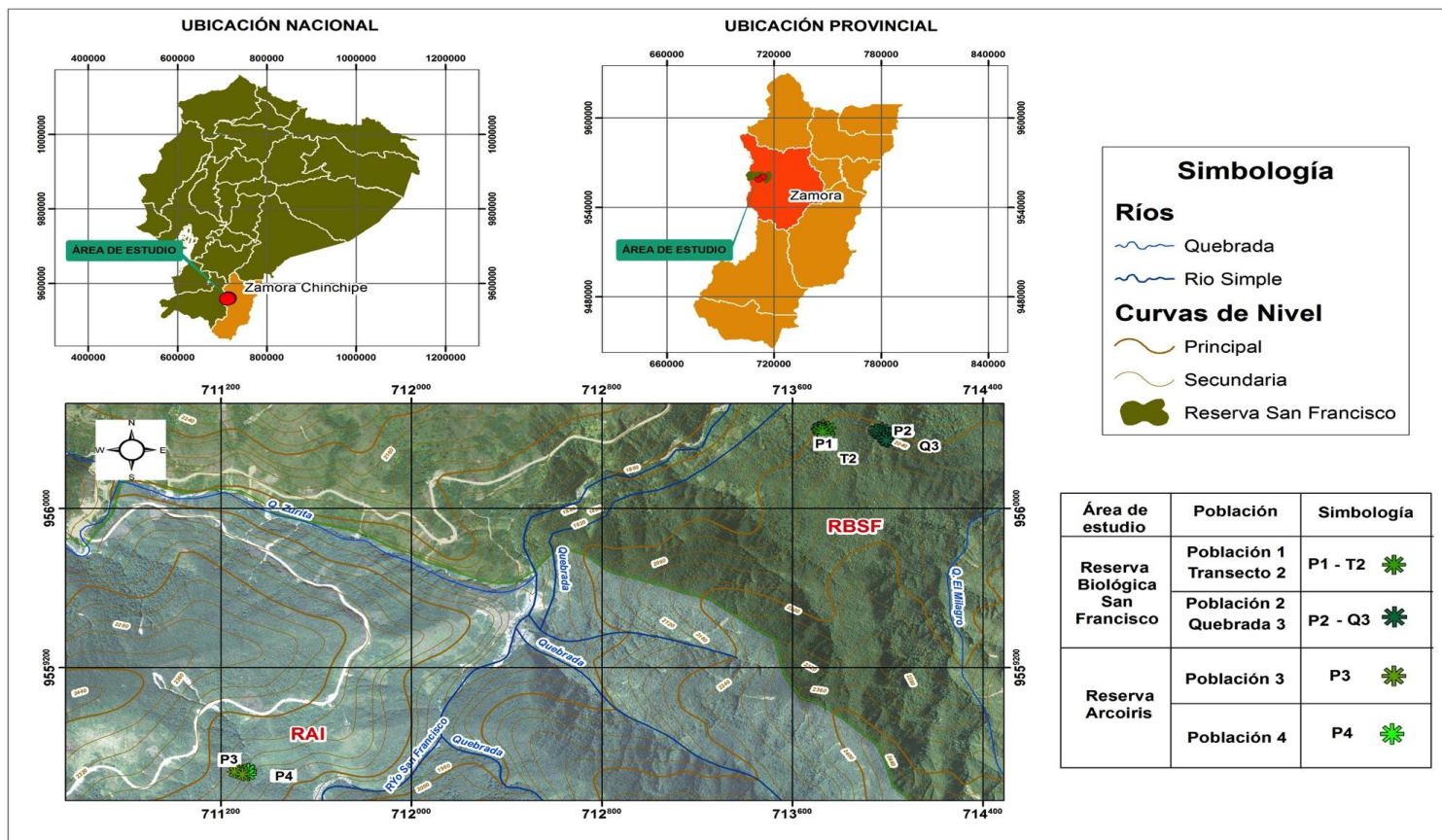


Fig. 1. Sitio de estudio, ubicación de las poblaciones estudiadas en la Reserva Biológica San Francisco y la Reserva Arcoiris (provincia de Zamora Chinchipe).

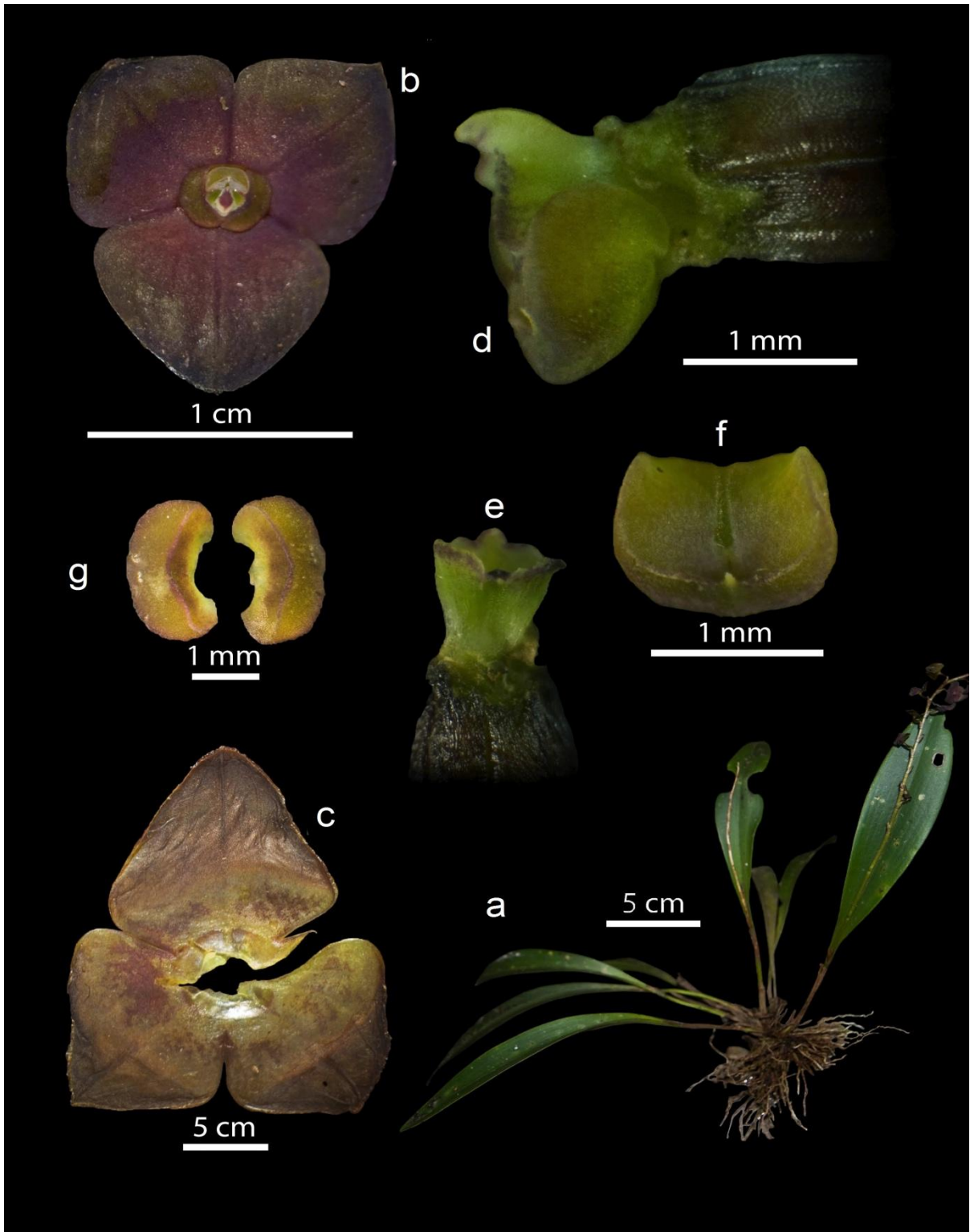


Fig. 2. Lámina de *Stelis superbiens* indicando a) Estructura de la planta completa y su hábito epífito, b) La flor desde un ángulo frontal, c) Forma de los sépalos, d) La forma lateral de la columna y el labio, e) Forma frontal de la columna y el labio, f) Forma de la capucha de la antera que cubren los polinios, g) Forma frontal de los polinios. (Elaboración: Naranjo C., Riofrío M. y Mendoza A.)

2.3. Muestreo

Se localizaron las poblaciones y en cada una de las cuatro poblaciones encontradas: dos en la Reserva Biológica San Francisco (P1 y P2) y dos zonas situados en la Reserva Arcoíris (P3 y P4) se muestrearon e identificaron los árboles hospederos de orquídeas (forófitos).

Orquídeas: Se georeferenciaron, etiquetaron y colectaron hojas jóvenes de los individuos adultos en flor de *Stelis superbiens* (Fig. 3) localizados en forófitos diferentes y fueron conservados en sílica gel a temperatura ambiente hasta realizar la extracción de ADN.



Fig. 3. Planta de *Stelis superbiens* en un forófito. Se puede apreciar su inflorescencia

2.4. Extracción de ADN y Amplificación - AFLPs

El ADN total fue extraído de 30mg de material de hoja seca usando el protocolo indicado en el Kit de extracción: DNeasy™ Plant Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). Luego de la extracción se cuantificó el ADN utilizando un fluoroespectrómetro (NanoDrop 3300, Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EE.UU.). Las muestras de ADN extraído se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.4.1 Protocolo para AFLPs

Marcadores AFLPs fueron usados para el análisis genético (Vos et al. 1995), utilizando el kit de AFLP® Plant Mapping (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la restricción del ADN el Kit utiliza las enzimas *MseI* y *EcoR I* y para la ligación la enzima T4 DNA ligasa. Las muestras se incubaron en un termociclador durante 2 horas a 37° C. Para confirmar la restricción – ligación se testó en un gel de agarosa al 2%.

La amplificación preselectiva se realizó utilizando los primers que complementan los adaptadores *MseI* (5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3) y *EcoRI* (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3') y la reacción de PCR fue realizada en un volumen total de 6.68 µl conteniendo 2 µl de producto de la restricción – ligación diluido 1:11, 7.5 µl de Core Mix y 0.5 ul de primers para preselectiva provistos en el kit. Las condiciones de PCR fueron: 72 °C por 2 minutos (un ciclo), desnaturalización 94 °C por 30 segundos, anillamiento 56 °C por 30 segundos y elongación 72 °C por 2 minutos (20 ciclos) con una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Para confirmar el producto preselectivo obtenido se visualizó por medio de un gel de agarosa al 2%.

Para la amplificación selectiva, la reacción de PCR fue realizada a un volumen de 6.66 µl conteniendo: 1 ul del producto de la preselectiva diluido 1:11, 5 µl de Core Mix, 0.33 µl de primer fluoromarcado *EcoRI* y 0.33 ul de primer *MseI*, provistos en el kit. Las condiciones de PCR fueron: 94 °C por 2 min (un ciclo), desnaturalización 94 °C por 20 segundos, anillamiento 66 °C por 30 segundos (con un gradiente de disminución de 1 °C cada ciclo) y extensión 72 °C por 2 min (10 ciclos); desnaturalización 94 °C por 20 segundos, anillamiento 56 °C por 30 segundos y extensión 72 °C por 2 min (20 ciclos), con una extensión final a 60 °C por 30 minutos.

Se realizó un screening previo para seleccionar los primers que permitan una mayor visualización de polimorfismos y alta reproductibilidad con 6 individuos (uno de cada población y dos repeticiones - control). Cuatro combinaciones de primers fueron probadas en la amplificación selectiva: *EcoRI* AAC (NED) / *MseI* CAA, *EcoRI* AGG (JOE) / *MseI* CAT, *EcoRI* AGG (JOE) / *MseI* CTA, *EcoRI* AGG (JOE) / *MseI* CTC. Dos combinaciones fueron seleccionadas para el análisis (ver Tabla 1).

Tabla 1. Combinación de primers seleccionados.

Combinación	EcoRI	MseI
C1	AAC (NED)	CAA
C2	AGG (JOE)	CAT

Los fragmentos de AFLP fueron separados en un secuenciador ABI 3500 (Applied Biosystems). Se utilizó un marcador estándar 600 LIZ® de GeneScan™ (Applied Biosystems) con cada muestra para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN. Para evaluar la reproducibilidad del protocolo, se realizaron dos extracciones independientes de ADN para ocho muestras. La tasa de error global, es decir, el porcentaje de loci distinto entre muestras repetidas, fue bajo (3%).

2.5. Análisis de Datos

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados en el programa GeneMapper® versión 4.1 (Applied Biosystems) y evaluados manualmente. Todas las bandas comprendidas entre 50 y 500 pb fueron consideradas como presentes (1) y ausente (0) y aquellas bandas que presentaban dificultad en su interpretación (bandas poco definidas o con alturas bajo los 80) fueron excluidas. En el análisis se incluyeron tanto los fragmentos monomórficos como los polimórficos.

2.5.1 Estructura genética de las poblaciones

La estructura genética de las poblaciones se analizó mediante agrupamiento bayesiano explícito realizado en Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2007). Este programa utiliza la información genética para determinar la pertenencia de individuos a una población sin asumir poblaciones predefinidas, esto es posible ya que se puede asignar cualquiera de los individuos o una fracción de su genoma a un número de grupos en base a genotipos multilocus (Chen et al., 2007); donde el equilibrio de Hardy-Weinberg y el equilibrio de la vinculación (linkage equilibrium) son minimizados, estimando las frecuencias de los alelos en cada grupo y las pertenencias de la población para cada individuo. Utiliza el método Monte Carlo de cadena de Markov (MCMC) para estimar $P(X|K)$, es decir la portabilidad posterior de los datos genotípicos multilocus de muestras individuales para encajar en un número de grupos (clusters) predefinidos (K). Se utilizó el modelo de mezcla (admixture) (que asume que los individuos pueden tener un linaje mixto) y frecuencia alélica

correlacionada. Se corrieron 10 modelos de repetición para K (número de clusters) en un rango de 1 a 10, utilizando un burn-in de 10000 interacciones seguidas por 300000 interacciones de MCMC adicionales. El valor óptimo de K se seleccionó utilizando la probabilidad posterior de los datos para un K ($\ln P(K)$) y los radios de segundo orden de cambio de la probabilidad de log de los datos entre los valores de K (ΔK) tal como sugiere (Evanno et al., 2005) . Se utilizó el programa Structure Harvester v0.6.93 (Earl and vonHoldt, 2012) para calcular el número más probable de clusters. Los individuos fueron asignados a cada grupo ignorando la información original de la población. Las corridas de la simulación con el valor modal más alto de ΔK fueron asignados usando la opción de Full Search en el clúster de concordancia y programa de permutación CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007) y la representación de un gráfico de barras fue realizada usando DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

Para una representación espacial de la distancia genética relativa entre individuos y para caracterizar la diferenciación entre poblaciones se utilizó un análisis de Coordinadas Principales (PCoA) a través del software GenAlex v.6.2 (Peakall and Smouse, 2006).

Para conocer la Variancia molecular entre las poblaciones y dentro de las poblaciones se utilizó el AMOVA (Análisis de la Varianza Molecular) implementado en GenAlex v.6.2 (Peakall and Smouse, 2006).

2.5.2 Autocorrelación espacial

Debido a que el análisis de la estructura genética de la población con Structure se identificó tres grupos genéticos en todas las poblaciones, el análisis de Autocorrelación espacial se implementó para todos los individuos GenAlex v.6.5 (Peakall and Smouse, 2012).

Se generó un coeficiente de autocorrelación (r), utilizando las matrices que contienen las distancias geográficas y las distancias genéticas (Smouse and Peakall, 1999)). El coeficiente de autocorrelación se calcula para un número determinado de clases de distancia y proporciona una medida de la similitud genética de los individuos cuya distancia geográfica cae dentro de una clase de distancia especificada. El coeficiente de autocorrelación fue calculado para todos los pares de individuos asignados a las clases espaciales de distancia 1 m de 1 a 70 m, para producir autocorrelogramas genéticos espaciales, considerando que en evaluaciones preliminares esta eran las distancias geográficas que permitían medir la estructura genética dentro de las poblaciones (datos no

mostrados). La significancia estadística se probó mediante 999 permutaciones aleatorias y 1000 bootstraps.

**CAPÍTULO 3.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1. Resultados

Se identificaron 4 poblaciones de *Stelis superbiens*, 2 en la Reserva Biológica San Francisco (P1 y P2) y 2 en la Reserva Arcoiris (P3 y P4) (Fig. 4), con un registro de 70 individuos en flor distribuidos en 11 especies de forófitos diferentes y dos categorías de forófitos, una catalogada como sin identificar y otra correspondiente a árboles muertos. La distancia entre los individuos de las poblaciones fue de aproximadamente 80 metros. La distancia máxima entre los individuos de *Stelis superbiens* fue de 3226 metros (Fig. 4). La distribución de los individuos de *Stelis superbiens* en cada población se explica en la

Tabla 3.

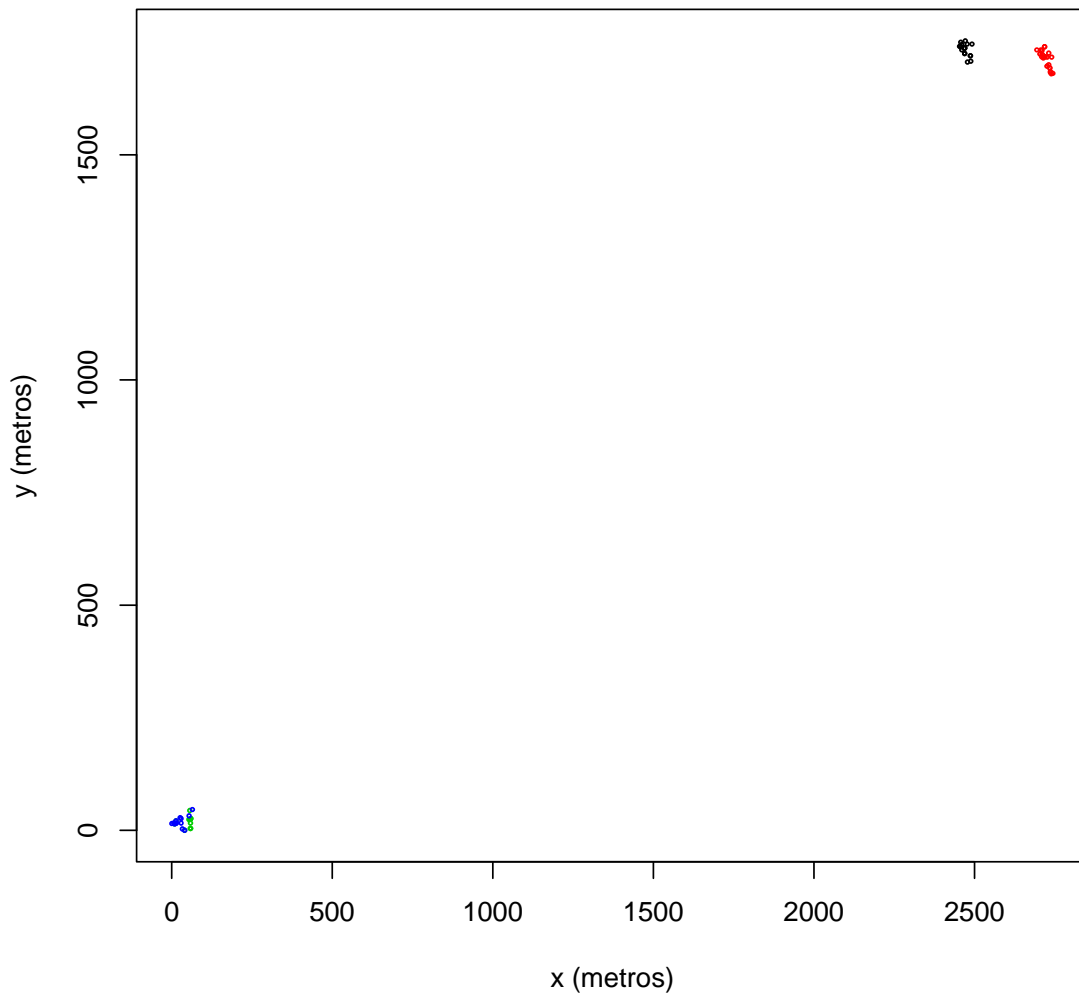


Fig. 4. Patrón espacial de puntos representando las 4 poblaciones de *Stelis superbiens* en el bosque montano de la Reserva Biológica San Francisco y Arcoiris. Los círculos negros representan la población 1, los rojos la población 2 (Reserva Biológica San Francisco), los verdes la población 3 y los azules la población 4 (Reserva Arcoiris).

Tabla 2. Forófitos de *Stelis superbiens* localizados en las cuatro poblaciones analizadas.

Familia	Especie	N° de Individuos
Alzateaceae	<i>Alzatea verticillata</i>	3
Araliaceae	<i>Schefflera</i> sp.	5
Adoxaceae	<i>Viburnum</i> sp.	1
Clusiaceae	<i>Clusia</i> sp.	2
Chlorathaceae	<i>Hedyosmun</i> sp.	4
Cyatheaceae	<i>Cyathea</i> sp.	1
Ericaceae	<i>Cavendisha</i> sp.	2
Melastomataceae	<i>Graffenrieda emarginata</i>	1
	<i>Miconia punctata</i>	1
Lauraceae	<i>Ocotea</i> sp.	1
Phyllanthaceae	<i>Hyeronima moritziana</i>	1
Podocarpaceae	<i>Sin identificar</i>	1
Araceae	<i>Sin identificar</i>	1
Sin identificar		15
Árboles muertos		29
Total		70

Tabla 3. Distribución de los individuos de *Stelis superbiens* en las poblaciones.

Poblaciones localizadas	Número de individuos de <i>Stelis superbiens</i>	Altitud m.s.n.m
Población 1	20	2027 – 2061
Población 2	24	2042 – 2085
Población 3	13	2101 - 2110
Población 4	13	2118 - 2144
Total	70	

De las cuatro combinaciones de primers evaluadas, dos fueron las que mostraron un número más alto de polimorfismos (Tabla 1) y se obtuvieron 173 loci entre 50 y 500 pb. El 52% de los loci evaluados fueron polimórficos. El número de alelos privados fue de 16 para la población 1, 21 para la población 2, 3 para la población 3 y 11 para la población 4 (Fig. 5).

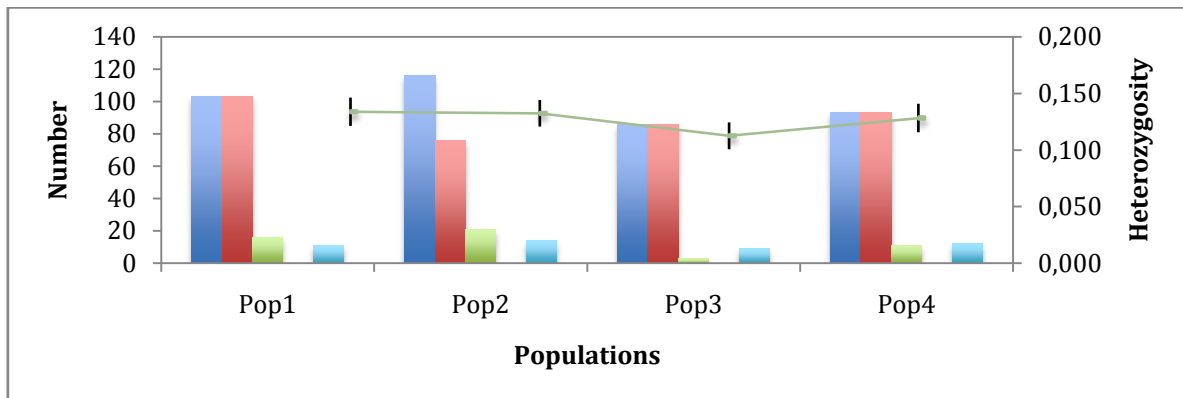


Fig. 5. Patrón del total de loci encontrados en las poblaciones analizadas. Las barras en azul explican el número de loci diferentes, las barras en rojo indican el número de loci diferentes con una frecuencia menor o igual al 5%, las barras verdes representan el número de loci únicos para cada población y las barras celestes explican el número de loci comunes localmente (con frecuencia mayor o igual al 5%) encontrados en el 50% o menos poblaciones.

3.1.1 Estructura genética de las poblaciones

Los resultados de la agrupación Bayesiana obtenidos en Structure 2.3.4 agrupan a los individuos de *Stelis superbiens* en tres poblaciones genéticas con el modelo de admixture (Fig. 6) inferido por el método de $\ln P(K)$ y ΔK . El primer valor de $\ln P(K)$ al cual la curva alcanza la meseta en (-2966.88) y el valor más alto de Delta K (2.769491) fue generado para $K=3$, lo que indica que la estructura genética producida al dividir todos los genotipos en tres grupos es la más probable (Fig. 7). Para $K=3$ la mayoría de los individuos tenían coeficientes de admixture de 0.8, excepto dos individuos los cuales tenían un coeficiente de mezcla de 0.7 (Fig. 6). Se debe destacar que en las cuatro poblaciones se encontraron individuos de los tres grupos genéticos (Fig. 6) con un mayor porcentaje de pertenencia en todas las poblaciones al grupo genético 1. Los valores sobre del 88% de pertenencia al grupo genético 1 se encontraron tanto en 1 individuo de la población uno y tres, como en 2 individuos de la población cuatro. Así mismo los valores más alto de pertenencia al grupo genético 2 (10 y 12%) estuvieron en 4 individuos tanto de la población 1 como de la 2; mientras que solo en un individuo de la población 2 se encontró el porcentaje más alto de pertenencia al grupo genético 3 (Fig. 6).

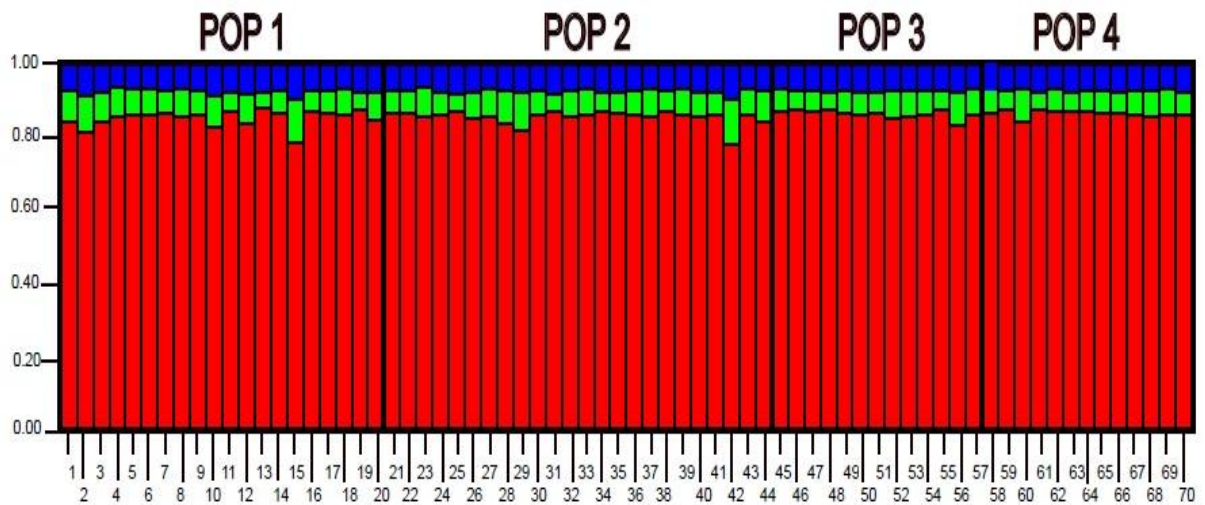


Fig. 6. Coeficientes de admixture de los individuos de *Stelis superbiens* agrupados por poblaciones representada acorde al modelo de admixture implementado en Structure para $K=3$. Los números en la parte inferior indican el número de individuos pertenecientes a cada zona muestreada, la separación entre poblaciones está resaltada por líneas verticales negras y se indica la población correspondiente en la parte superior. El grupo genético 1 está representado en color rojo, el grupo genético 2 en color verde y el grupo genético 3 en azul.

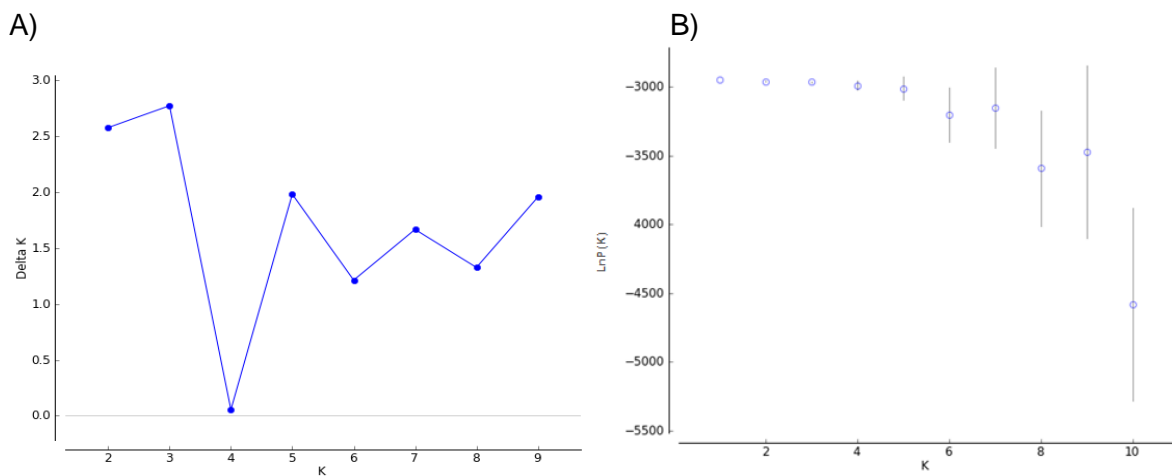


Fig. 7. Número óptimo de agrupaciones genéticas en las poblaciones estudiadas de *Stelis superbiens* acorde al modelo de admixture con alelos correlacionados implementado en Structure. A) Magnitud de ΔK (tasa de cambio en la probabilidad de log) planteado a través de K . B) $\text{Ln}P(K)$ (probabilidad posterior de los datos) como una función de K (población) sobre 10 corridas consecutivas de Structure con barras de error representando la desviación estándar y detectando tres grupos genéticos en los individuos muestreados..

El análisis del PcoA considerando los 70 individuos en los dos primeros ejes explica el 10% de la varianza entre las poblaciones (para el primer componente 5.08% de variación total, y para el segundo 5.01%) (Fig. 8). El AMOVA muestra una variación genética alta entre los individuos de las poblaciones y el 3% de la variación total es asignada a la diferencia entre poblaciones (Fig. 9).

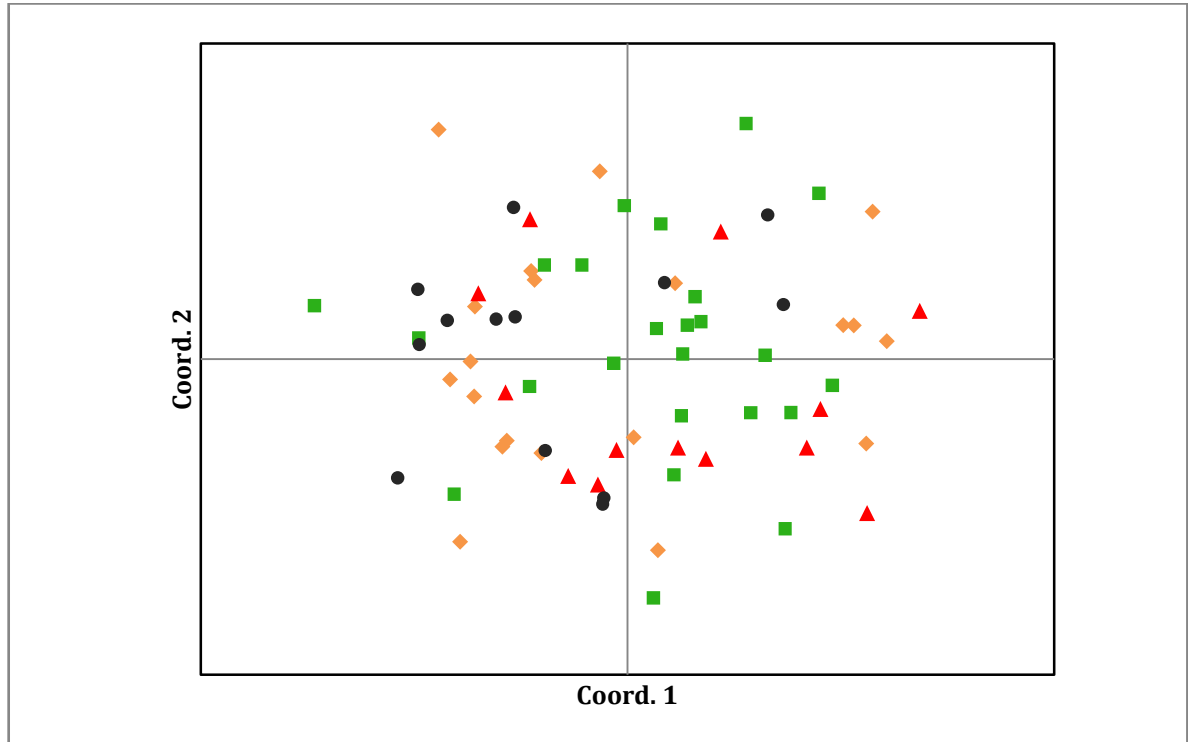


Fig. 8. Plot bidimensional de coordenadas principales (PCoA) basada en 2 combinaciones de AFLP utilizadas para caracterizar a 70 individuos de *Stelis superbiens* de cuatro poblaciones (Cada población está representada así, P1: rombos naranjas, P2: Cuadrados verdes, P3: Triángulos rojos, P4: Círculos negros).

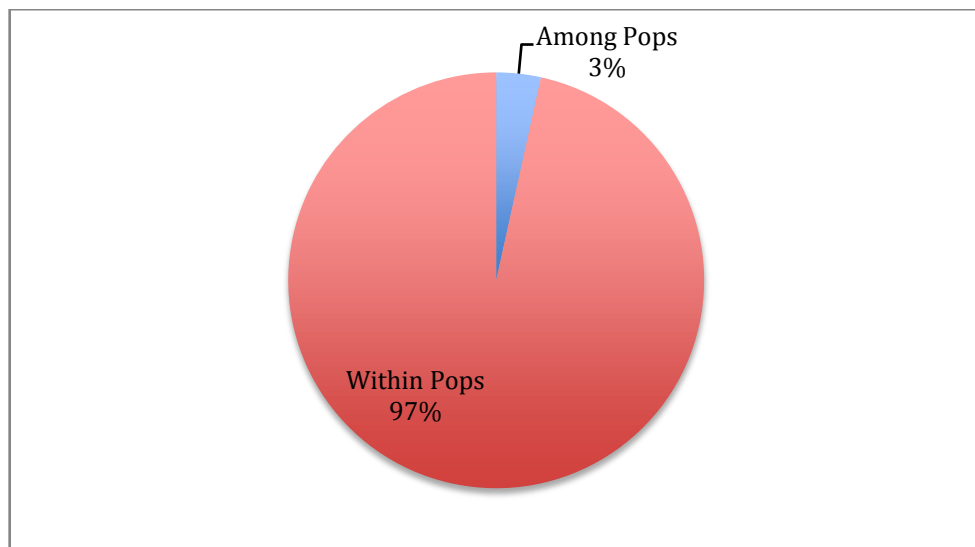


Fig. 9. Representación del porcentaje de varianza molecular encontrada entre las poblaciones (azul) y dentro de las poblaciones (rojo) con un $p=0.001$.

3.1.2 Autocorrelación espacial

Se obtuvo un autocorrelograma espacial significativo ($\omega = 232.2$, $p\text{-value} = 0.001$) evaluando todas las poblaciones de *Stelis superbiens* (Fig. 10), evidenciando la presencia de estructura genético-espacial entre las poblaciones. Una correlación genética positiva se encontró entre los individuos pertenecientes a la clase de distancia veintiunava (20-21 m) y veintisieteavos (26-27 m).

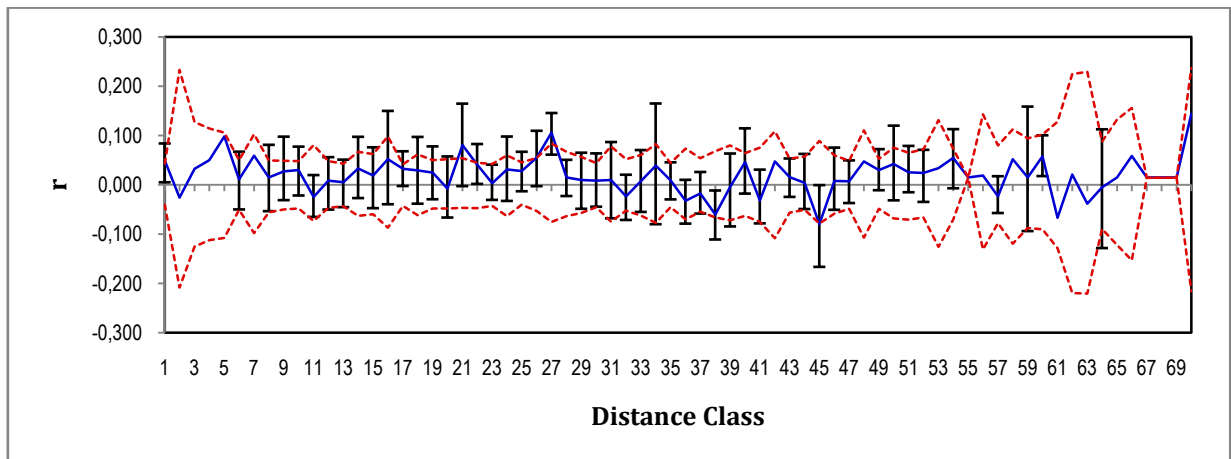


Fig. 10. Autocorrelograma de estructura genética espacial de *Stelis superbiens* mostrando el coeficiente de correlación genética (r) como una función de la distancia geográfica. Las clases de distancia varían de 1 a 70 m con intervalos de 1 m. Las líneas entrecortadas representan los límites de confianza superior e inferior del 95%, mientras que la línea continua representa r (coeficiente de autocorrelación espacial).

3.2. Discusión

El presente estudio analiza la estructura genético-espacial de una orquídea epífita en 4 poblaciones distribuidas en un rango altitudinal de 2017 a 2144 m.s.n.m. en el bosque de niebla montano, estableciéndose 3 grupos genéticos indistintamente de la población en la que se encuentran y del rango altitudinal; indicando además una alta variabilidad genética intra poblacional, sin una clara evidencia de aislamiento en las poblaciones en los diferentes rangos altitudinales, que muestra una homogenización genética por la baja diferenciación entre poblaciones.

¿Cómo varía la estructura genética en las poblaciones de Stelis superbiens?

El hecho de mantener 3 grupos genéticos distribuidos en las 4 poblaciones geográficamente distantes podría facilitarse también por la no especificidad por los polinizadores, como dípteros pequeños que presentan una mayor riqueza en estos bosques (Dodson, 1962; Pijl

and Dodson, 1969; Christensen, 1994). Por otro lado también podrían estar sucediendo posibles eventos de hibridación entre especies de *Stelis* que están coexistiendo, pues en Pleurothallidinae algunas especies pueden crecer de forma simpátrica (Fagerstrom, 1988), hecho evaluado en otras especies de orquídeas como *Epidendrum rhopalostele* (Marques et al., 2014) donde la coexistencia con otras especies de *Epidendrum* facilita la hibridación contribuyendo a la variación genética o a mecanismos evolutivos que podrían estar actuando en esta población (Vega et al., 2013).

Una facilidad para la dispersión de las semillas a larga distancia presumiblemente por el viento (Arditti & Ghani, 2000) estaría implicada en la ausencia de una estructura genético-espacial a distancias grandes entre poblaciones, mientras que lo observado a escala local es decir una estructura genético-espacial positiva a distancias entre los 20 y 26 metros después de la cual no se evidencia una autocorrelación genético-espacial explicaría una dispersión a esta distancia, indicando mecanismos de dispersión a corta y larga distancia.

¿Existen cambios genéticos en las poblaciones de Stelis superbiens en las diversas altitudes como respuesta a la gradiente altitudinal?

En *Stelis superbiens* el análisis genético muestra que tres grupos genéticos estén presentes en proporciones similares en las cuatro poblaciones que se distribuyen en lugares diferentes y con distancias geográficas considerables, también estos tres grupos genéticos están presentes en cada uno de los individuos evaluados, sin una clara delimitación espacial; esta baja diferenciación entre poblaciones supondría una estructura de una metapoblación que es presumible para orquídeas epífitas (Winkler et al., 2009). Estas orquídeas son dependientes del estado de los bosques y de la presencia de los hospederos (Riofrío et al., 2007), los bosques montanos sufren procesos de deforestación y fragmentación (Santos & Tellería, 2006) lo que ha dejado aislados pequeños parches de bosques con árboles bajos que albergan algunas de las orquídeas epífitas y que pudieron haber ocasionado la distribución en parches de la población (Winkler et al., 2009; Alexander et al., 2012), hechos que podrían en parte explicar la baja estructura genético espacial que podría ser una consecuencia de perturbaciones antropogénicas como se ha visto en otras especies de plantas (England et al., 2003) que podrían estar ocasionando cambios ambientales.

CONCLUSIONES

La estructura genética de la población indica la presencia de tres poblaciones genéticas en las cuatro poblaciones estudiadas, los grupos genéticos observados están distribuidos en cada una de las cuatro poblaciones y todos los individuos evaluados indicando una variación genética intra población alta del 97% mientras que la variación genética entre las poblaciones es baja solo del 3%.

La estructura genético espacial a pequeña escala evidencia una autocorrelación espacial a distancias entre los 21 y 27 metros dentro de las poblaciones, asumiendo distancias cortas de dispersión dentro de las poblaciones, pero a escala de todas las poblaciones no se detecta una autocorrelación espacial soportando la idea de una dispersión a larga distancia.

Dentro del gradiente altitudinal evaluado, las poblaciones no indican una estructura genética particular para cada gradiente, los patrones genéticos observados son similares en las cuatro poblaciones evaluadas por tanto el gradiente altitudinal en el rango estudiado podría no ser el único factor determinante para los patrones genéticos observados.

RECOMENDACIONES

Debido a los pocos estudios realizados para entender la variación genética en poblaciones de la familia Orchidaceae en nuestro país, se recomienda continuar con los estudios con el fin de obtener información acerca del estado de estas poblaciones para proponer medias de conservación acordes a la realidad de cada especie.

Se recomienda ampliar este estudio y localizar más poblaciones para conocer si existen posibles eventos de hibridación en las poblaciones similares a las evaluadas y entender como estas plantas al ser claves en procesos ecológicos del bosque montano son afectadas por los cambios en su hábitat.

Es necesario localizar poblaciones en rangos altitudinales más amplios de los analizados en este trabajo, para conocer si el patrón observado se sigue manteniendo o se pueden detectar otros cambios a nivel intra e inter poblacional que se puedan atribuir a las variaciones en las condiciones ambientales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBEY, A., and K. THORSTEN. 2001. Diversidad y distribución vertical de epífitas en los alrededores del campamento río Eslabón y de la laguna Chalalán, Parque Nacional Madidi, Dpto. La Paz, Bolivia. *Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica* 3: 104–123.
- ACKERMAN, J., and S. WARD. 1999. Genetic variation in a widespread epiphytic orchid: where is the evolutionary potencial? *Systematic Botany* 24: 282–291.
- ACKERMAN, J.D. 2014. Rapid transformation of orchid floras. *Lankesteriana* 13: 157–164.
- AGUIRRE, N. 2007. Silvicultural contributions to the reforestations with native species in the tropical mountain rainforest region of South Ecuador. *Germany* 148.
- ALCÁNTARA, S., J. SEMIR, and V. NISAKA. 2006. Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the atlantic rainforest of south-eastern Brazil. *Annals of Botany* 98: 6, 1207–1213.
- ALEXANDER, H., B. FOSTER, F. BALLANTYNE, C. COLLINS, J. ANTONOVIC, and R. HOLT. 2012. Metapopulation and metacommunities: combining spatial and temporal perspectives in plant ecology. *Journal of Ecology* 100: 88–103.
- ALLENORF, F., and G. LUIKART. 2007. Conservation and the genetic of populations. *Blacwell Publishing, Australia*.
- ÁLVAREZ, D., M. CHODA, L. VIESCA, J. CANO, M. BAÑUELOS, C. MATSUBA, S. GARCÍA, and G. NICIEZA. 2011. Variación genética adaptativa en gradientes altitudinales : efectos sobre la viabilidad de poblaciones subdivididas en escenarios de cambio climático. *Proyectos de investigación en parques nacionales: 2008-2011* 50.
- ARDITTI, J., and A. GHANI. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol* 145,3: 367–421.
- ÁVILA-DÍAZ, I., and K. OYAMA. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94: 2,184.
- BECK, E. 2008. Gradient Analyses as an Alternative to Experimentation. *Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador* 49–54.
- BENDIX, J., E. BECK, A. BRÄUNING, F. MAKESCHIN, R. MOSANDL, S. SCHEU, and W. WILCKE. 2008. Ecosystem Services, Biodiversity and Environmental Change in a Tropical Mountain Ecosystem of South Ecuador.
- BUSSMANN, R.W. 2003. Los bosques montanos de la Reserva Biológica San Francisco (Zamora- Chinchipe , Ecuador)– zonación de la vegetación y regeneración natural. *Lyonia* 3: 57–69.
- CHEN, C., E. DURAND, F. FORBES, and O. FRANÇOIS. 2007. Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: A new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes* 7: 747–756.
- CHRISTENSEN, F. 1994. Fly pollination in the Orchidaceae. 415–454.
- CRIBB, P.J., S.P. KELL, K.W. DIXON, and R.L. BARRETT. 2003. Orchid conservation: A global perspective. 8.
- DODSON, C. 2003. Lankesteriana No.7 1er Congreso Internacional de Orquideología

Neotropical. Manejo de Datos e Información / Información and Data Management. *Lankesteriana* 173.

- DODSON, C. 1994. Native Ecuadorian Orchids, Fourth edn. *Colina, Quito*.
- DODSON, C. 1962. The importance of polination in the evolution of the orchids of tropical America. *Am. Orch. Soc. Bull* 31: .
- DODSON, C., C. LUER, and G. ROMERO. 2004. Orchids of Ecuador. *Not published*.
- DONOSO, C., A. PREMOLI, L. GALLO, and R. IPINZA. 2004. Variación Intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. 1° Edición. Chile.
- DRESSLER, R.L. 1982. Biology of the Orchid Bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* Vol. 13: 373–394.
- DRESSLER, R.L. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. North America.
- DUQUE, O. 2008. Orchidaceae Stelis Swartz - Compendium-. Uiniversidad de Antioquia, Colombia.
- EARL, D.A., and B.M. VONHOLDT. 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- ENGLAND, P., R. WHELAN, and D. AYRE. 2003. Effects of seed bank disturbance on the fine-scale genetic structure of populations of the rare shrub *Grevillea macleayana*. *Heredity* 91, 5: 475–480.
- EVANNO, G., S. REGNAUT, and J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- FAGERSTROM, T. 1988. Lotteries in communities of sessile organisms. *Trends in Ecology and Evolution*. 3: 303–306.
- FALUSH, D., M. STEPHENS, and J.K. PRITCHARD. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578.
- FERRARI, M.J., D. DU, J.A. WINSOR, and A.G. STEPHENSON. 2007. Inbreeding Depression of Plant Quality Reduces Incidence of an Insect- Borne Pathogen in a wild gourd. *Source: International Journal of Plant Sciences International Journal of Plant Sciences* 168232109: 603–610.
- FIEDLER, K., and E. BECK. 2008. Gradient Analyses as an Alternative to Experimentation. *Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador* 49–54.
- FISCHER, M., and D. MATTHIES. 1998. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany* 85: 811–819.
- FRANKHAM, R., J. BALLOU, and D. BRISCOE. 2002. Introduction to Conservation Genetics. CAMBRIDGE. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS.
- GARRIDO, T., and E. VÁZQUEZ. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 1031–1054.

- GENTRY, H., and C. DODSON. 2013. Diversity and Biogeography of Neotropical Vascular Epiphytes. *74*: 205–233.
- GRAVENDEEL, B., A. SMITHSON, F. SLIK, and A. SCHUITEMAN. 2004. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359: 1523–1535.
- HARDY, O.J. 2003. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology* 12: 1577–1588.
- HOMEIER, J., F. A. WERNER, S.R. GRADSTEIN, S.-W. BRECKLE, and M. RICHTER. 2008. Potential vegetation and floristic composition of Andean Forests in south Ecuador, with a focus on the RBSF. *Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador: Ecological Studies* 198 198: 87–100.
- JAKOBSSON, M., and N.A. ROSENBERG. 2007. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- JUÁREZ, L., C. MONTAÑA, and M. FRANCO. 2014. The viability of two populations of the terrestrial orchid *Cyclopogon luteoalbus* in a fragmented tropical mountain cloud forest: Dormancy delays extinction. *Biological Conservation* 170: 162–168.
- KELLER, M., J. KOLLMANN, and P.J. EDWARDS. 2000. Genetic introgression from distant provenances reduces fitness in local weed populations. *Journal of Applied Ecology* 37: 647–659.
- KLUG, W., M. CUMMINGS, and C. SPENCER. 2006. *Conceptos de Genética*. 8va ed. Madrid - España.
- MARQUES, I., D. DRAPER, L. RIOFRIO, and C. NARANJO. 2014. Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary Biology* 14,1: 20.
- MONDRAGÓN, D., T. VALVERDE, and M. HERNÁNDEZ-APOLINAR. 2015. Population ecology of epiphytic angiosperms: A review. *Tropical Ecology* 56: 1–39.
- MOSANDL, R., M. RICHTER, and I. KOTTKE. 2008. The Investigated Gradients. *Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador* 55–62.
- OUBORG, N.J., C. PERTOLDI, V. LOESCHCKE, R.K. BIJLSMA, and P.W. HEDRICK. 2010. Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in genetics: TIG* 26: 177–87.
- PEAKALL, R., and P.E. SMOUSE. 2012. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.
- PEAKALL, R., and P.E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- PIJL, L.&, and H. DODSON. 1969. Orchid flowers. Their pollination and evolution. *University of Miami* 101–22.
- RAVEN, D.I., and P.H. AXELROD. 1974. Angiosperm Biogeography and Past Continental Movements. *JSTORE* Vol. 61: 539–673.
- RICHTER, M., H. DIERTL, P. EMCK, T. PETERS, and E. BECK. 2009. Reasons for an outstandig

- plant diversity in the tropical Andes of Southern Ecuador. 12: 1–35.
- RIOFRIO, M., C. NARANJO, J.M. IRIONDO, and E. TORRES. 2007. Spatial structure of Pleurothallis, Masdevallia, Lepanthes and Epidendrum epiphytic orchids in a fragment of montane cloud forest in south Ecuador. *Lankesteriana* 7(1-2): 102–106.
- ROSENBERG, N.A. 2004. DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137–138.
- SMITH, S., R. COWWAN, K. GREGG, M. CHASE, N. MAXTED, and M. FAY. 2004. Genetic discontinuities among populations of *Cleistes* (Orchidaceae, Vanilloideae) in North America. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145: 87–95.
- SMOUSE, P., and R. PEAKALL. 1999. Spatial autocorrelation analysis of multi-allele and multi-locus genetic microstructure. 561–573.
- SUÁREZ, J.P., M. WEIß, A. ABELE, F. OBERWINKLER, and I. KOTTKE. 2008. Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress* 7: 75–85.
- VARGAS, C., V. PARRA-TABLA, P. FEINSINGER, and J. LEIRANA-ALCOCER. 2006. Genetic Diversity and Structure in Fragmented Populations of the Tropical Orchid *Myrmecophila christinae* var *christinae*. *Biotropica* 38: 754–763.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, ET AL. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 21: 4407.
- VUYLSTEKE, M., J. PELEMAN, and M. EIJK. 2004. AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nature Protocols* 2:6: 1387–1398.
- WARGHAT, A.R., P.K. BAJPAI, R.B. SRIVASTAVA, O.P. CHAURASIA, and H. SOOD. 2013. Population genetic structure and conservation of small fragmented locations of *Dactylorhiza hatagirea* in Ladakh region of India. *Scientia Horticulturae* 164: 448–454.
- WINKLER, M., K. HULBER, and P. HIETZ. 2009. Population dynamics of epiphytic orchids in a metapopulation context. *Annals of Botany* 5: 995.
- WINKLER, M., K. HÜLBER, and P. HIETZ. 2009. Population dynamics of epiphytic orchids in a metapopulation context. *Annals of Botany* 104: 995–1004.
- WOOD, J., J. BEAMAN, and R. BEAMAN. 1993. The plants of Mount Kinabalu 2. Orchids. *Royal Botanic Garden* 26.