

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Pristimantis buckleyi* (Boulenger, 1882) (Anura:
Strabomantidae) EN EL COMPLEJO DE PÁRAMOS LA COCHA-PATASCOY,
DEPARTAMENTO DE NARIÑO**

NATHALIA CONSTANZA LÓPEZ CABRERA

INGRID VANESSA USBEKC LÓPEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOLOGÍA

2018

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Pristimantis buckleyi* (Boulenger, 1882) (Anura: Strabomantidae) EN EL COMPLEJO DE PÁRAMOS LA COCHA-PATASCOY, DEPARTAMENTO DE NARIÑO

NATHALIA CONSTANZA LÓPEZ CABRERA

INGRID VANESSA USBEKC LÓPEZ

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de Biólogas

ASESORES:

SONIA MAHECHA VAHOS
Magister en Genética

BELISARIO CEPEDA, Ph. D. (c)

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOLOGÍA

2018

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las líneas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autoras”

Artículo 1ro del acuerdo No. 324 de Octubre de 1966 emanado por el Honorable Consejo Superior Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de aceptación

Sonia Mahecha Bahos
ASESORA

Belisario Cepeda Quilindo
ASESOR

Mariane Targino Rocha
JURADO

Carlos Enrique Guarnizo
JURADO

San Juan de Pasto, 17 de Agosto de 2018

Agradecimientos

A nuestros asesores Sonia Mahecha y Belisario Cepeda, por su apoyo, paciencia, motivación y por su total disposición y ayuda para la construcción de este trabajo.

A nuestros Jurados Mariane Targino y Carlos Guarnizo por sus aportes y por el tiempo que le dedicaron a la revisión del documento.

A la doctora Edith Mariela Burbano, por sus consejos y sugerencias durante el proceso de laboratorio.

Al doctor Tulio Cesar Lagos director del laboratorio de Frutales Andinos y todos sus integrantes por el préstamo de los equipos.

A Alejandro Guerrero, Edison Martínez, Rodrigo Muñoz, Daniel Pantoja, María Elena Zúñiga, Anderson Ordoñez, Wilmer Navarrete, Pablo Portillo y Camilo Chávez por su apoyo en la fase de muestreo.

A nuestra familia por su apoyo y paciencia, por ser el motor de nuestra vida y felicidad, gracias a ustedes por su gran cariño.

Resumen

La variabilidad genética de las poblaciones puede ser afectada por diferentes causas tanto ecológicas como fisiológicas y su reducción está directamente relacionada con el aumento del riesgo de extinción; en el caso de los anuros, las alteraciones de los hábitats y el alto grado de estructuración genética pueden dar lugar a la pérdida de variabilidad genética. Desde una perspectiva de la genética de poblaciones, las especies del género *Pristimantis*, son excelentes modelos de estudio por presentar dinámicas poblacionales diferentes a otros anfibios, como por ejemplo su desarrollo directo. Una especie destacada dentro de este grupo es *Pristimantis buckleyi*, que se caracteriza por ser abundante, de amplia distribución y exclusiva de zonas de alta montaña.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de variabilidad genética de esta especie, en cuatro localidades del Complejo de Páramos La Cocha – Pastascoy del Departamento de Nariño. Para ello se estandarizó las condiciones de amplificación por PCR de primers microsatelitales heterólogos, sin embargo la amplificación no fue exitosa dado que se presentaron más de dos alelos para cada una de las muestra analizadas, por lo anterior se optó realizar el análisis con el gen COI que involucró la amplificación y secuenciación de un fragmento de 657pb de 54 ejemplares, dando como resultado 20 haplotipos diferentes de los cuales el más frecuente fue el haplotipo H8 (22,64%) y es el único que se comparte entre los páramos de Puerres y los páramos azonales de Santa Isabel. Además, se detectó una diversidad haplotípica alta (0,910) y una diversidad nucleotídica baja (0,01970); la estructura genética mediante AMOVA mostro alta variación entre las localidades (82,89%) y las comparaciones pareadas de los valores de *Fst* mostraron que existen diferencias genéticas significativas entre las localidades. Estos resultados permiten inferir que las cuatro localidades están altamente estructuradas, que se complementó

con los bajos valores de flujo genético, por ello se concluye que cada localidad representa una población para *P. buckleyi* en el Complejo de páramos La Cocha – Patascoy.

Palabras clave: Variabilidad genética, *Pristimantis buckleyi*, citocromo oxidasa 1, estructuración, flujo genético.

Abstract

The genetic variability of populations can be affected by different causes, both ecological and physiological, and their reduction is directly related to the increased risk of extinction; in the case of anurans, alterations in habitats and the high degree of genetic structuring can lead to the loss of genetic variability. From a perspective of population genetics, the species of the genus *Pristimantis*, are excellent study models for presenting population dynamics different from other amphibians, such as their direct development. A prominent species within this group is *Pristimantis buckleyi*, which is characterized by abundant, wide distribution and exclusive high mountain areas.

The objective of this work was to evaluate the levels of genetic variability of this species, in four localities of the Páramos La Cocha - Pastascuyo Complex of the Department of Nariño. To this end, the amplification conditions were standardized by PCR of heterologous microsatellite primers, however, the amplification was not successful since more than two alleles were presented for each of the samples analyzed, so it was decided to perform the analysis with the COI gene, which involved the amplification and sequencing of a fragment of 657bp of 54 specimens, resulting in 20 different haplotypes of which the most frequent was the H8 haplotype (22.64%) and is the only one shared between the páramos of Puerres and the azonal páramos of Santa Isabel. In addition, high haplotypic diversity (0.910) and low nucleotide diversity (0.01970) were detected; the genetic structure by means of AMOVA showed high variation between the localities (82.89%) and the paired comparisons of the *Fst* values showed that there are significant genetic differences between the localities. These results allow us to infer that the four localities are highly structured, that was complemented

with the low values of genetic flow, for that reason it is concluded that each locality represents a population for *P. buckleyi* in the La Cocha - Patascoy páramos Complex.

Key words: Genetic variability, *Pristimantis buckleyi*, cytochrome oxidase 1, structuring, gene flow.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	16
1. Problema.....	18
2. Pregunta de investigación.....	21
3. Justificación.....	22
4. Objetivos.....	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos específicos.....	25
5. Marco teórico.....	26
5.1. Los anfibios.....	26
5.1.1. <i>Pristimantis buckleyi</i> (Boulenger, 1882).....	27
5.2. Complejo de Páramos La Cocha-Patascoy.....	29
5.3. Variabilidad genética.....	31
5.3.1. Variabilidad genética en anfibios.....	34
5.4. Marcadores moleculares.....	37
5.4.1. Microsatélites.....	39
5.4.2. Secuencias de ADN.....	40
6. Materiales y métodos.....	42
6.1. Área de estudio.....	42
6.1.1. Zonas de estudio.....	42
6.2. Obtención de las muestras.....	43
6.3. Extracción de ADN.....	45
6.4. Calidad y concentración de ADN.....	45
6.5. Marcadores moleculares microsatelitales.....	47
6.6. Marcadores de secuencia.....	49
6.6.1. Análisis de datos.....	51
7. Resultados.....	53
7.1. Obtención de muestras.....	53
7.2. Extracción y cuantificación de ADN.....	53

	Pág.
7.3. Evaluación de los primers heterólogos de <i>P. ockendeni</i> en el proceso de amplificación de las zonas microsatélitales de <i>P. buckleyi</i>	54
7.4. Determinación de la variabilidad genética <i>P. buckleyi</i> en cada localidad de estudio....	57
Discusión.....	62
Estandarización de Marcadores Moleculares Microsatélites.....	62
Variabilidad genética de <i>P. buckleyi</i>	65
Conclusiones.....	71
Recomendaciones.....	72
Bibliografía.....	73
Anexos.....	94

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Áreas y porcentajes de páramo por municipio y departamento en el complejo de páramos La Cocha - Patascoy.....	30
Tabla 2. Ejemplos de microsatélites perfectos, imperfectos y compuestos clonados de diferentes compartimentos genómicos. Las secuencias de microsatélites nucleares del garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>).....	39
Tabla 3. Primers de <i>Pristimantis ockendeni</i> propuesto por Elmer et al., (2006)	47
Tabla 4. Concentración de los componentes de la PCR para amplificación de los marcadores microsatelitales de <i>Pristimantis buckleyi</i>	48
Tabla 5. Condiciones de amplificación de los microsatélites de <i>Pristimantis ockendeni</i>	48
Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación del gen citocromo oxidasa 1 (COI).....	49
Tabla 7. Concentración de los reactivos de PCR para amplificación del gen COI.....	50
Tabla 8. Condiciones de amplificación para el gen COI.	50
Tabla 9. Muestras colectadas de <i>P. buckleyi</i> en las cuatro localidades del complejo de páramos la Cocha-Patascoy.....	53
Tabla 10. Concentración de los componentes de la PCR para amplificación de los primers Romeo & Juliet, Batman & Robin y Jean & Simone.	55
Tabla 11. Concentración de los componentes de la PCR para amplificación del primer Laurel & Hardy.....	55
Tabla 12. Condiciones de termociclado para el primer Thelma & Louise.	56
Tabla 13. Condiciones de termociclado para el primer Bert & Ernie.....	56

	Pág.
Tabla 14. Numero de alelos amplificados por cada primer en <i>P. buckleyi</i>	57
Tabla 15. Sitios polimórficos del gen COI de <i>P. buckleyi</i> en las localidades estudiadas.....	58
Tabla 16. Número de haplotípos e índices de diversidad del gen COI de <i>P. buckleyi</i> en las localidades estudiadas.	59
Tabla 17. Análisis de varianza molecular del gen COI de <i>P. buckleyi</i> en las localidades estudiadas.	59
Tabla 18. Estimativos del flujo génico de <i>P. buckleyi</i> entre las localidades analizadas.....	60
Tabla 19. Comparación pareada realizada a partir de los valores F_{st} del gen COI de <i>P. buckleyi</i> en las localidades estudiadas.....	60

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Mapa de distribución de <i>Pristimantis buckleyi</i> . Tomado de: IUCN.....	29
Figura 2. Zonas de estudio del complejo La Cocha- Patascoy, A) Cerro de Morasurco B) páramo El Fraile; C) páramos azonales de Santa Isabel y D) páramos de Puerres. Fuente: Este estudio.	43
Figura 3. Muestras de ADN de Puerres diluidas 10ng/μl. (El resto de zonas en el Anexo 2). Fuente: este estudio.....	54
Figura 4. Amplificación del gen COI de <i>P. buckleyi</i> . Fuente: este estudio.....	58
Figura 5. Red de haplotipos para el gen Citocromo Oxidasa I de <i>P. buckleyi</i> , construido con el programa Network 5.0 usando el algoritmo median-joining. Cada círculo representa un único haplotipo y el área es proporcional al número de individuos. Fuente: este estudio.....	61

Lista de Anexos

	Pág.
Anexo 1. Cuantificación y calidad de ADN.	94
Anexo 2. Muestras de ADN diluidas 10ng/μl. de A. Páramo el Fraile, B. Cerro de Morasurco y C. Páramos azonales de Santa Isabel.	96
Anexo 3. Amplificación de los siete microsatélites bajo las condiciones sugeridas por Elmer et al. (2006).	96
Anexo 4. Amplificación de los siete microsatélites bajo las condiciones requeridas por la TaqPolimerasa.	97
Anexo 5. Amplificación de los microsatélites Batman & Robin, Romeo & Juliet y Jean & Simone bajo las condiciones requeridas por la TaqPolimerasa aumentando el número de muestras.	97
Anexo 6. Modificación de la concentración de cloruro de magnesio para el microsatélites Laurel & Hardy.	98
Anexo 7. Prueba de gradiente de temperatura A) Beauty & Beast, B) Bert & Ernie y C) Thelma & Louise.	98
Anexo 8. Amplificación de los microsatélites Thelma & Louise (63°C) y Bert & Ernie (58°C), aumentando el número de muestras.	99
Anexo 9. Análisis de Blast de las secuencias del gen COI de <i>P. buckelyi</i>	^^

Introducción

La variabilidad genética es entendida como las variaciones heredables que ocurren en cada individuo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Martinazzo, 2011). Puede verse afectada por diferentes causas, tanto ecológicas como fisiológicas y su reducción está directamente relacionada con el aumento del riesgo de extinción de las poblaciones (Feral, 2002; Frankham, Ballou, Briscoe, & McInnes, 2004; Herguedas, 2009; Höglund, 2009; Freeland, Kirk, & Petersen, 2011); es por ello que debe ser un aspecto prioritario en la investigación para la protección de especies y restauración de ecosistemas (Allendorf, Luikart, & Aitken, 2013; Kahilainen, Puurtinen, & Kotiah, 2014).

En el caso de los anuros, factores como las alteraciones de los hábitats y el alto grado de estructuración genética, que es debida a su baja movilidad y alta filopatría, pueden dar lugar a la pérdida de variabilidad genética, disminución de su potencial evolutivo (Markert, Champlin, Gutjahr, Grear, Kuhn, & McGreevy, 2010) y de su tasa de supervivencia (Bijlsma & Loeschke, 2012). Teniendo en cuenta que Colombia es uno de los países más ricos en el orden Anura (748 especies) y uno de los más diversos en el género *Pristimantis* (Acosta & Cuentas, 2018), los estudios genético-moleculares y poblacionales se hacen cada vez más necesarios para complementar y brindar datos sobre la genética actual de estas poblaciones.

Además, desde una perspectiva de la genética de poblaciones, las especies del género *Pristimantis*, son excelentes organismos modelo para este tipo de estudios, en primer lugar, por presentar dinámicas poblacionales diferentes a otros anfibios (Hedges, Duellman, & Heinicke, 2008; Padial, Grant, & Frost, 2014) y, en segundo lugar, la facilidad en el análisis del flujo génico interindividual (Marsh & Trenham, 2001; Elmer, Dávila, & Loughheed, 2007). Una

especie destacada dentro de este grupo es *Pristimantis buckleyi*, que se caracteriza por ser abundante, de amplia distribución y exclusiva de zonas de alta montaña.

Por otro lado, una herramienta útil para el análisis de la variabilidad genética son los marcadores moleculares como los microsatélites o secuencias de ADN, los cuales permiten hacer su evaluación, determinando algunos parámetros como la diversidad haplotípica y la diversidad nucleotídica; lo anterior permite ofrecer herramientas efectivas para promover políticas correctas de conservación a futuro de la especie *P. buckleyi* en cuatro localidades del Complejo La Cocha – Patascoy del Departamento de Nariño.

1. Problema

En los últimos años se ha evidenciado un declive en las poblaciones de anuros a nivel global (Houlahan, Findlay, Schmidt, Meyer, & Kuzmin, 2000; Brede & Beebee, 2004; Alroy, 2015; Urban, 2015), debido a diferentes factores, como la sensibilidad a patógenos, el cambio climático, enfermedades, la introducción de especies, contaminación, la acidificación ambiental y sobre todo la pérdida y fragmentación del hábitat (Stuart, et al., 2004; Cushman, 2006; Pimm, et al., 2014; Fasola, Ribeiro, & Lopes, 2015; Meredith, VanBuren, & Antwis, 2016).

Otro aspecto importante que podría explicar la disminución de las poblaciones de las especies de anfibios, es el alto grado de estructuración genética que presentan en comparación con el resto de vertebrados, incluso en distancias geográficas relativamente cortas, como consecuencia de la movilidad limitada y alta fidelidad del sitio de reproducción (filopatría) (Vos, Antonisse-de, Goedhart, & Smulders, 2001; Palo et al., 2004; Funk, y otros, 2005; Cushman, 2006; Knopp & Merila, 2009; Blouin, Phillipsen, & Monsen, 2010; Fouquet, Ledoux, Dubut, Noonan, & Scotti, 2012).

Bijlsma y Loeschcke (2012), sugieren que la alta estructuración de los anfibios y el incremento de las alteraciones en los hábitats, puede dar lugar a la interrupción del flujo génico, disminución del tamaño de la población y por tanto, sean más propensos a la pérdida de alelos, con la consiguiente pérdida de variabilidad genética, la cual es medida mediante la heterocigosidad y la riqueza alélica, conceptos claves para la supervivencia a largo plazo de las especies (Frankham, 2005; Markert, Champlin, Gutjahr, Gear, Kuhn, & McGreevy, 2010; Luquet, Garner, Léna, & Bruel, 2012; Banks, et al., 2013; Fasola et al., 2015; Potvin, et al., 2016).

Halverson, Skelly y Caccone (2006) señalan que la disminución de la variabilidad genética afecta la supervivencia, más que a las medidas de desarrollo o crecimiento; además, tiene como consecuencia la reducción de la flexibilidad evolutiva futura y de la adaptabilidad a ambientes cambiantes o potencial evolutivo (Markert et al., 2010); Rauch y Bar-Yam, (2005) lo indican en su texto: “La oportunidad de las especies para su supervivencia se basa en su variabilidad genética, es decir que entre más heterogéneos sean los individuos hay mayor probabilidad de que algunos combinaciones genéticas puedan enfrentar los cambios ...”.

También, se ha evidenciado que la disminución de la variabilidad genética está relacionada con la baja conectividad de las poblaciones y en el caso de los anuros, factores como la dispersión parecen estar más fuertemente restringidos en zonas altas como los bosques altoandinos y páramos, debido a que las montañas pueden actuar como barreras importantes para la dispersión y el flujo genético; además, estos organismos presentan baja tolerancia a cambios del hábitat, puesto que requieren condiciones medioambientales específicas necesarias para su supervivencia (Monsen & Blouin, 2003; Fouquet et al., 2012; Mendez, 2014).

Tal es el caso de las ranas del género *Pristimantis*, el cual incluye 203 especies en Colombia (Acosta & Cuentas, 2018) y es el más diverso en zonas de alta montaña, con 40 especies distribuidas en los 36 complejos de páramo (Acosta, 2000; Lynch & Suárez, 2002; Bernal & Lynch, 2008; Sarmiento, Cadena, Sarmiento, Zapata, & León, 2013). No obstante, se desconoce la dinámica de la genética de poblaciones de estas especies y su estado de conservación es preocupante dado que es uno de los géneros más amenazados en el país (Urbina, 2011).

Es de especial interés *Pristimantis buckleyi*, especie que está ampliamente distribuida, desde el Norte del Ecuador hasta los Departamentos del Cauca, Nariño, Valle del Cauca, Putumayo y Tolima en Colombia (Ron, Coloma, Guayasamin, & Yáñez-Muñoz, 2012; Frost, 2018; Acosta &

Cuentas, 2018); sin embargo, su hábitat está restringido a los páramos y bosques Andinos (Lynch, 1981), como los del complejo La Cocha-Patascoy, ecosistemas que se han visto afectados por el avance de la frontera agropecuaria, deforestación, actividad maderera, asentamientos humanos y minería; alteraciones reportadas como las principales amenazas para esta especie (Yáñez, Almeida, Castro, Coloma, Ron, & Bolívar, 2010; Ron et al., 2012). Además, el desconocimiento sobre su estado genético actual, podría limitar la comprensión de cómo los factores antropogénicos afectan a sus poblaciones (Emel & Storfer, 2012; Blouin et al., 2010).

2. Pregunta de investigación

¿Cuál es la variabilidad genética de *Pristimantis buckleyi* (Boulenger, 1882) (Anura: Strabomantidae) en el Complejo de Pámos La Cocha-Patascoy del Departamento de Nariño?

3. Justificación

La variabilidad genética, se entiende como las variaciones heredables y su efecto dentro y entre las poblaciones, es por ello que entender la forma, la velocidad y las causas de su pérdida sea crucial para asegurar la persistencia a largo plazo de las especie (Piñero, et al., 2008), por dos razones importantes: 1) la variabilidad genética está relacionada con el potencial adaptativo de las poblaciones (Blows & Hoffmann, 2005) y 2) refleja la consanguinidad y la deriva genética que reducen la viabilidad de las poblaciones (Reed & Frankham, 2003; O'Grady et al., 2006; (Kahilainen, Puurtinen, & Kotiah, 2014).

En consecuencia, la reducción de la variabilidad genética está directamente relacionada con el aumento de extinción de las poblaciones naturales, por ello, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (International Union for Conservation of Nature (IUCN), 2017), reconoce que la variabilidad genética es una de las formas de diversidad de importancia en investigación para la protección de especies y ecosistemas; siendo cada vez más frecuente que se ocupen de taxones cuya historia natural o incluso su identidad taxonómica es poco conocida (Allendorf, Luikart, & Aitken, 2013).

Dado que el objetivo final de la conservación es asegurar la persistencia a largo plazo de las especies, el mantenimiento de la variabilidad genética debe ser un aspecto prioritario (Kahilainen et al., 2014); es por ello, que en el marco de la décima reunión Internacional del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB, 2010), se determinó que la evaluación de la diversidad genética es un componente importante para la planificación de estrategias de conservación y restauración de los ecosistemas y es uno de los niveles de diversidad biológica que requieren conservación.

Colombia al ser uno de los países firmantes del Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020, se ha comprometido con su cumplimiento, incluyendo la meta 13, que

especifica la implementación de políticas para minimizar la erosión genética y salvaguardar la diversidad genética de las poblaciones (Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD), 2017); por lo tanto, es necesario redireccionar los estudios de variabilidad genética hacia poblaciones locales (Frankham, 2005), esto permitirá que los esfuerzos de conservación sean más notorios. Sin embargo, los estudios de las características genéticas de las poblaciones deben ser evaluadas caso por caso, particularmente en el contexto de la conservación para no dar lugar a generalizaciones (Knopp & Merila, 2009; Blouin et al., 2010).

Teniendo en cuenta, que Colombia cuenta con cerca del 14% del total de las especies de anfibios del mundo (805 especies), siendo uno de los más ricos en el orden Anura (748 anuros) con 396 especies para la región andina (Acosta, 2000; Bernal & Lynch, 2008; Acosta & Cuentas, 2018), se hace necesario la recopilación de datos sobre la genética actual de estas poblaciones, puesto que hasta la fecha se han realizado pocos estudios sobre variabilidad genética a escala global y fina en especies de anfibios de alta montaña. Así, desde una perspectiva de genética de poblaciones, las especies del género *Pristimantis* son excelentes organismos de estudio, debido a que se caracterizan por ser ranas de reproducción terrestre y desarrollo directo, que los hace independientes de la presencia de cuerpos de agua para su ciclo de vida (Heinicke, Duellman, & Hedges, 2007; Hedges, Duellman, & Heinicke, 2008; Padial, Grant, & Frost, 2014) y porque facilitan el análisis del flujo génico interindividual (Marsh & Trenham, 2001; Elmer, Dávila, & Loughheed, 2007).

Por otro lado, teniendo en cuenta que aproximadamente el 20% de las especies de *Pristimantis* presentes en el país se encuentran en zonas de alta montaña y dada la importancia de estos ecosistemas, sumado a la creciente influencia antropogénica ejercida sobre ellos, se hace necesario caracterizar y monitorear con la mayor precisión posible estos recursos genéticos

(Álvarez, et al., 2011). Tal es el caso de *Pristimantis buckleyi*, especie ampliamente distribuida con un hábitat exclusivo en zonas de alta montaña y de la cual se desconoce información sobre su estado genético actual.

Por ello, determinar la variabilidad genética de *P. buckleyi*, permitirá establecer y crear propuestas alternativas para su protección y conservación (Emel & Storfer, 2012); Blouin et al., 2010), sobre todo dirigidas a mantener el flujo génico entre las poblaciones y en lo posible a evitar los cuellos de botella (Brede & Beebee, 2004; Knopp & Merila, 2009; Blouin et al., 2010). Esto es respaldado por Winans (1989), quien señala que es importante saber la cantidad de variación genética presente en las poblaciones para diseñar un apropiado programa de conservación.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar los niveles de variabilidad genética en *Pristimantis buckleyi*, en cuatro localidades del Complejo de Páramos La Cocha - Pastascoy, Departamento de Nariño.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar los primers heterólogos de *Pristimantis ockendeni* en el proceso de amplificación de las zonas microsatólitas de *Pristimantis buckleyi*.
- Determinar los parámetros de variación de *Pristimantis buckleyi* en cada localidad de estudio.

5. Marco teórico

5.1. Los anfibios.

Los anfibios aportan una gran cantidad de biomasa entre los vertebrados, por lo tanto son considerados como uno de los componentes más importante en los ecosistemas, que contribuyen activamente a la dinámica trófica de varias comunidades (González D. C., 2010). Sin embargo, en los últimos años se han visto afectados por eventos de extinción a nivel global, producto de la acción combinada de diferentes alteraciones, como cambios en la radiación ultravioleta, depredación, contaminación ambiental, enfermedades emergentes, especies invasoras o cambios en los patrones del clima; siendo la degradación del ecosistema, la fragmentación y la pérdida del hábitat, las principales causas de la desaparición de un alto número de especies o que estén en peligro de desaparecer, tanto en áreas intervenidas como protegidas (McCoy, 1994; Lips, 1998; Alford & Richards, 1999; Young, et al., 2001; Blaustein & Bancroft, 2007; Gardner, Ribeiro, Barlow, Sauer, Hoogmoed, & Peres, 2009).

En este contexto, Colombia no es ajena a ésta problemática y es aún más importante el tema si se tiene en cuenta que es el segundo país con mayor número de especies de anfibios en el mundo (Acosta, 2000; Instituto Alexander von Humboldt (IAvH), 2016), con 803 especies, de las cuales 367 son endémicas y 55 especies presentan algún grado de amenaza (Andrade, 2011; Frost, 2018; Sistema de información sobre biodiversidad de Colombia (SIB), 2017). Es uno de los países más ricos y diversos en el género *Pristimantis*, que pertenece a la familia Strabomantidae (Heinicke, Lemmon, Lemmon, McGrathc, & Hedges, 2018) del clado no clasificado Terrarana (Hedges et al., 2008), que paso a ser Terraranae según Duellman, Marion & Hedges, (2016), el cual está conformado por las ranas del Nuevo Mundo (Padial, Grant, & Frost, 2014) que se caracterizan por su desarrollo directo ya que alcanzan el estado adulto sin

pasar por una fase acuática (Hedges et al., 2008). Además, constituyen el grupo de anfibios con la mayor cantidad de especies conocidas, distribuidas en gran parte en América tropical y particularmente diversas en los Andes tropicales (Guayasamin & Arteaga, 2013).

Así mismo, las ranas de este género tienen una distribución restringida y a medida que se exploran zonas poco conocidas, comúnmente se encuentran taxones aún sin describir (Barrio, Heinicke, & Hedges, 2013). Su diversidad es producto de la combinación de diferentes variables, tanto climáticas y geográficas ocurridas durante los últimos millones de años con el levantamiento de los Andes, como biológicas por ejemplo el desarrollo directo de los huevos en microhábitats terrestres, lo cual ha permitido que haya una adaptación evolutiva y ha impulsado su especiación, permitiendo que ocupen casi todo tipo de hábitats desde los pisos tropicales hasta los páramos (Reyes, Yáñez-Muñoz, Cisneros-Heredia, & Ramírez, 2010).

5.1.1. *Pristimantis buckleyi* (Boulenger, 1882).

Una especie destacada dentro de los *Pristimantis* es *P. buckleyi*, que se caracteriza morfológicamente por ser una rana pequeña o mediana, con los siguientes caracteres diagnósticos (Lynch J. D., 1981):

“Longitud Rostro – Cloaca: Machos adultos Promedio = 30.0mm (rango 23.8–38.7); Hembras adultas, Promedio = 42.95 mm, (rango = 37.1–48.8mm;); Piel dorsal con verrugas bajas y aplanadas; vientre areolado; pliegues dorsolaterales ausentes o poco prominentes; plegue discoidal prominente; tímpano visible, 1/3–1/2 del tamaño del ojo, hocico subacuminado visto dorsalmente, redondeado en vista lateral, párpado superior más angosto que la distancia interorbital, sin tubérculos punzantes; crestas craneales presentes, odontóforos vomerinos oblicuos en individuos pequeños, triangulares en hembras grandes, machos sin hendiduras vocales ni saco vocal; con almohadillas nupciales no espinosas; dedo I de la mano más corto que

el II; dedos de las manos con discos ampliamente expandidos en almohadillas angostas y truncadas; dedos de las manos con quillas laterales; sin tubérculos ulnares; talón y borde externo del tarso sin tubérculos; borde interno del tarso con un tubérculo; tubérculo metatarsal interno oval, 3–4 veces el tamaño del externo que es redondo; tubérculos plantares supernumerarios ausentes o pocos e indistintos; dedos de los pies con rebordes cutáneos angostos, sin membrana basal; almohadillas de los dedos de los pies pequeñas, tan grandes como los de los dedos de las manos” (Lynch J. D., 1981).

“En vida, la coloración dorsal de esta especie es variable entre amarilla, café clara, café oscura y gris, con o sin tonalidades rojizas; tiene flecos o manchas negras dispersas, presenta una barra cantal y supratimpánica café oscuras o negras y una línea pálida en el labio superior; presenta o no barras labiales; la región inguinal y superficies ocultas tienen colocación variable, pudiendo ser amarillo, crema, blanco apagado o gris uniformes o a manera de manchas; el vientre varía de blanco a crema sucio o gris con o sin flecos o marmoleado café; el iris puede ser cobre, café rojizo, bronce o dorado con reticulaciones negras, con o sin una línea media horizontal café ” (Lynch J. D., 1981).

Filogenéticamente *P. buckleyi* está relacionada a *P. vertebralis* y *P. devillei* y recientemente fue asignada al grupo de especies de *Pristimantis devillei* por Padial et al., (2014), aunque Hedges et al., (2008) asignaron esta especie al grupo de especies de *Pristimantis curtipes* y discuten sobre la estrecha relación entre los miembros de ambos grupos, sugiriendo que deberían fusionarse.

Esta especie se distribuye en los Andes del Norte de Ecuador y en los Departamentos del Cauca, Nariño, Valle del Cauca, Putumayo, Huila y Tolima en Colombia (Mueses, 2005) (Figura 1), en rangos altitudinales desde 1900 a 3700 msnm (Acosta, 2000); su estado de conservación es

de preocupación menor según la lista roja de la IUCN, 2017. Con respecto al departamento de Nariño se encuentra ampliamente distribuida en los complejos paramunos, como el complejo La Cocha-Patascoy.



Figura 1. Mapa de distribución de *Pristimantis buckleyi*. **Tomado de:** IUCN

5.2. Complejo de Páramos La Cocha-Patascoy.

El complejo paramuno La Cocha - Patascoy está ubicado al suroeste de Colombia, entre los departamentos de Nariño, donde abarca la extensión de 14 municipios, y el departamento del Putumayo, con 5 municipios (Tabla 1). Tiene una extensión total de 152.830 hectáreas (ha) (Instituto Alexander von Humboldt (IAvH), 2016), presenta influencia de las regiones Andinas y del Piedemonte Amazónico Colombiano y Ecuatoriano. Se ubica en un rango altitudinal entre 2.850 y 4.210 m y presenta ecosistemas de páramo, bosque de niebla y páramos azonales (Corponariño, Corporación Autónoma Regional de Nariño y Corpoamazonia, Corporación para el Desarrollo Sostenible del Sur de la Amazonia, 2002; Morales, et al., 2007).

Tabla 1. Áreas y porcentajes de páramo por municipio y departamento en el complejo de páramos La Cocha - Patascoy.

Departamento	Municipio	Área municipal (ha)	Área de Municipio en el complejo (ha)	% municipio en el complejo	% complejo en el municipio
Nariño	Pasto	109.884	46.399	42%	30%
	Funes	39.476	16.111	41%	11%
	Ipiales	157.989	15.812	10%	10%
	Potosí	37.653	13.021	35%	9%
	Tangua	37.653	13.021	35%	9%
	Buesaco	63.596	11.918	19%	8%
	Puerres	35.014	8.446	24%	6%
	Córdoba	30.463	7.216	24%	5%
	Consaca	11.935	1.744	15%	1%
	Yacuanquer	10.274	978	10%	1%
	La Florida	13.631	296	2%	0,2%
	Sandoná	10.161	269	3%	0,2%
	Nariño	2.585	258	10%	0,2%
Chachagüí	14.627	250	2%	0,2%	
Putumayo	Santiago	34.192	13.217	39%	9%
	Villagarzón	139.697	3.529	3%	2%
	Orito	193.94	2.787	1%	2%
	San Francisco	40.736	2.146	5%	1%
	Mocoa	130.464	320	0,2%	0,2%
TOTAL			152.83		

Tomado de: IAvH, (2016)

Este complejo presenta el 28% de las especies de anfibios de alta montaña y páramo registradas para el país, las cuales pertenecen a las familias Bufonidae, Centrolenidae, Hemiphractidae, Hylidae, Dendrobatidae y Strabomantidae, siendo ésta última la más representativa con 35 especies (Lynch & Suárez, 2002; Bernal & Lynch, 2008); IAvH, 2016). Además, se registran 16 especies en diferentes categorías de amenaza pertenecientes a los géneros *Atelopus*, *Centrolene*, *Gastrotheca*, *Hypodactylus*, *Osornophryne* y *Pristimantis* y cinco

especies endémicas: *Atelopus ardila*, *Osornophryne bufoniformis*, *P. farisorum*, *P. repens* e *Hyloscirtus tigrinus* (IAvH, 2016).

Cabe resaltar que éstas zonas poseen una biodiversidad extraordinaria y tienen una función clave en la prestación de servicios ecosistémicos, particularmente en procesos como la regulación y provisión hídrica, influyendo sobre altiplanos, valles interandinos, zonas costeras, llaneras y amazónicas (Buytaert, et al., 2006); IAvH, 2016). Sin embargo, solo el 5,26% de toda la extensión del complejo se encuentra dentro del Sistema de Parques Nacionales Naturales, tal es el caso del Santuario de Flora y Fauna (SFF) Galeras (Morales, et al., 2007).

Dado lo anterior, la mayor parte de la extensión del complejo es susceptible a diferentes presiones antrópicas, como la agricultura, ganadería, deforestación, quemas, contaminación de fuentes hídrica, lo cual posibilita la pérdida de su biodiversidad, los ecosistemas, la oferta hídrica y otros servicios ambientales (Corponariño, Corporación Autónoma Regional de Nariño y Corpoamazonia, Corporación para el Desarrollo Sostenible del Sur de la Amazonia, 2002; Morales, et al., 2007); IAvH, 2016).

5.3. Variabilidad genética.

La variabilidad genética se entiende como las variaciones heredables que ocurren en cada individuo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Martinazzo, 2011), las cuales se reflejan en las diferencias de caracteres a nivel morfológico, fisiológico y molecular de casi todos los organismos (Feral, 2002; Frankham, Ballou, Briscoe, & McInnes, 2004).

La variación surge por mutación del material hereditario, que genera diferencias en las secuencias de ADN y probablemente da lugar a cambios bioquímicos, morfológicos o

funcionales, que pueden causar diferencias en la tasa de reproducción, supervivencia o de comportamiento de los individuos (Frankham, et al, 2004).

En el contexto de la biología de la conservación, analizar la información genética es importante, porque permite comprender los procesos evolutivos y las relaciones entre organismos tanto en poblaciones separadas geográficamente, como entre individuos dentro de una población, para la maximización del potencial evolutivo y reducción del riesgo de extinción a largo plazo de una especie, por ende va dirigida al intento de proteger la diversidad genética (Freeland, Kirk, & Petersen, 2011; Allendorf, Luikart, & Aitken, 2013).

Así, la variabilidad genética es un mecanismo de adaptación de las poblaciones a ambientes cambiantes dirigido por factores evolutivos como la mutación, la selección, el flujo de genes y la deriva genética. El desequilibrio de éstos, se debe a factores como la disminución y discontinuidad de las poblaciones, lo cual, se refleja en la disminución de la diversidad genética, genera procesos de endogamia, reducción de la aptitud reproductiva y disminución en la supervivencia de las especies e incrementa el riesgo de extinción de las poblaciones (Feral, 2002); Frankham, et al, 2004; Herguedas, 2009; Höglund, 2009; Freeland, et al., 2011).

Para la cuantificación de la variabilidad genética se han establecido diferentes criterios, generalmente para datos diploides se estima el **porcentaje de loci polimórficos** que hace referencia a la medida de los loci variables en una población (Smith, 1999; Sosa, Batista, González, & Bouza, 2002; Höglund, 2009). Otro criterio, es la **riqueza alélica**, que depende del tamaño poblacional y se estima teniendo en cuenta el número de alelos por locus y el menor número de individuos en cada uno de los grupos de especies/poblaciones (Höglund, 2009). También se encuentra la **heterocigosidad esperada (He)**, la cual se podría denominar como la

diversidad genética y es una de las medidas más apropiadas en la variabilidad genética ya que cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los loci (Sosa, et al., 2002).

El **índice de diversidad haplotípica** equivale a la H_e para datos haploides, se estima en términos del número de haplotipos presentes en una muestra y su frecuencia; es definido como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes (Nei, 1988) y se expresa por la fórmula:

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right)$$

Donde n es el tamaño de la muestra, K es el número de haplotipos y p_i , es la frecuencia del haplotipo de la muestra.

La **heterocigosidad observada (H_o)**, es el parámetro que mide la proporción de heterocigotos observados en una muestra de la subpoblación y se obtiene dividiendo el número de individuos heterocigotos por el número total de individuos de la población analizada (Höglund, 2009; Balkenhol, A, Storfer, & Waits, 2016). El **índice de diversidad nucleotídica (π)** determina la heterocigosidad a nivel de nucleótidos, por medio de las diferencias entre secuencias de haplotipos y es entendido como la probabilidad de que dos nucleótidos que se encuentran en igual posición y sea escogidos al azar, sean diferentes (Nei & Li, 1979; Nei & Tajima, 1981). Se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j>i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

Donde p son las frecuencias de cada nucleótido, d la distancia genética entre nucleótidos y L , el número de loci. Otro estimativo es el **número promedio de diferencias por sitio**, es decir, calcula el número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre dos haplotipos.

Finalmente, la **diferenciación poblacional** (*F_{st}*), mediante el cual se puede determinar el coeficiente de endogamia en una población que se encuentre subdividida determinando la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones. La diferenciación poblacional es calculada así (Balkenhol, et al., 2016).

$$F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$$

Donde H_T es el promedio de la heterocigosidad esperada en la población total y H_S es el promedio de la heterocigosidad esperada dentro de subpoblaciones; este parámetro es muy utilizado en los estudios de conservación donde se espera que la deriva aumente cuando el tamaño de la población es pequeño y el **Flujo génico** que se refiere a los diferentes modelos requeridos para que los haplotipos pasen de una población a otra y así se mantengan los procesos ecológicos en las poblaciones (Balkenhol, et al., 2016). Además se ha determinado que el número de individuos que migran por generación se relaciona inversamente con la diferenciación poblacional, donde las subpoblaciones de igual tamaño se encuentran bajo condiciones de equilibrio. Se calcula mediante la fórmula:

$$F_{st} = 1 / (1 + 4 Nm)$$

Donde el número de migrantes efectivos (Nm) se calculan multiplicando el tamaño efectivo (N_e) por la tasa de migración (m) (Höglund, 2009).

5.3.1. Variabilidad genética en anfibios.

Los estudios en variabilidad genética en anfibios se han centrado en diferentes aspectos, como por ejemplo los efectos de las características del ecosistema y la baja movilidad en los patrones de dispersión y flujo de genes. Funk et al. (2005), mediante el análisis de seis loci evaluaron la variabilidad genética de *Rana luteiventris* en Montana y Idaho, EE.UU. y

comprobaron que las diferencias en el paisaje influyen en la diferenciación genética, sugiriendo que el flujo de genes en este caso está limitado por la forma y elevación de las montañas.

Asimismo, Fouquet et al. (2012), evaluaron el impacto de las características del paisaje, como los ríos y los eventos históricos, sobre la estructura genética de *Adenomera andreae*, rana del bosque amazónico y encontraron que la especie está significativamente estructurada a nivel espacial entre individuos a una escala geográfica notablemente pequeña, esto debido a la capacidad de dispersión restringida que probablemente está ligada a sus rasgos de historia de vida y por la acción de los ríos.

Por otro lado, autores como Hoffman, Schueler & Blouin (2004), no sólo se interesaron por determinar la estructura genética actual, sino su estabilidad en el tiempo en 5 poblaciones de *Rana pipiens*, concluyeron que la estructura genética entre las poblaciones fue muy estable en el tiempo y sugirieron que no estaban sufriendo frecuentes extinciones y recolonización.

Otro aspecto importante en la variabilidad genética es el efecto del tamaño de la población, es así como Brede & Beebe (2004) determinaron que *B. bufo* se caracteriza por tener poblaciones más grandes; sin embargo, exhibió niveles significativamente más bajos de diversidad genética, cuando se comparó con *R. temporaria*, quien mostró un alto flujo de genes.

Un grupo de interés es el género *Eleutherodactylus* que se caracteriza por su desarrollo directo e independencia de cuerpos de agua para sus ciclos de vida, lo cual hace que presente diferentes dinámicas poblacionales; Elmer et al., (2007) evaluaron los patrones de diversidad genética de *P. ockendeni* y determinaron que la población es continua, no panmíctica, con aislamiento interindividual por distancia, tiene alta diversidad alélica y un exceso de homocigotos en todos los loci, lo cual refleja el patrón de distribución de los genotipos.

El caso de *Eleutherodactylus coqui*, rana endémica de Puerto Rico, que fue introducida en Hawai a finales de 1980, es muy interesante, dado que la supervivencia de las especies invasoras puede depender en gran medida de la preservación de la información genética a través del proceso de invasión; no obstante, en la evaluación de Peacock et al., (2009), de riqueza alélica (RT) y diversidad genética se evidenció que los valores fueron significativamente menores en Hawai, sin embargo, se caracteriza por ser un invasor agresivo y exitoso.

Knopp & Merila, (2009) evaluaron los patrones de diversidad genética y diferenciación dentro y entre las poblaciones de *R. arvalis*, la diversidad genética alcanzó su punto máximo en las poblaciones de latitudes medias y disminuye hacia las latitudes norte. Al comparar la diversidad de esta especie con la rana común (*R. temporaria*), se estableció que la primera presenta una menor diferenciación genética, aunque el patrón de aislamiento por distancia fue similar para ambas especies.

También se han realizado estudios en poblaciones híbridas como es el caso de *Pelophylax esculentus*, una rana propia del sur de Suecia y que es producto del cruce de *P. ridibundus* (RR) y *P. lessonae* (LL), esta especie híbrida ha alcanzado la independencia reproductiva mediante el uso de híbridos triploides (LLR, LRR) y encontraron una baja variabilidad genética dentro de los genotipos discretos; sin embargo, las poblaciones de todos los híbridos de *P. esculentus* aparentemente no están sufriendo los efectos directos en su adaptabilidad, lo cual podría ser el resultado a la condición de híbrido somático, aumentando la diversidad a través de la combinación de los genotipos de dos especies (Arioli, Jakob, & Reyer, 2010).

En especies amenazadas como *Rana pretiosa*, se determinó que esta especie está fuertemente estructurada y presenta baja diversidad genética (Promedio = 0,31) en comparación

con *R. cascadae* (Promedio = 0,54) y las dos presentan una tasa de migración baja, resultado de una escasa conectividad entre ellas (Blouin et al., 2010).

En general, para la evaluación de la variabilidad genética se han implementado técnicas moleculares, siendo el desarrollo de los marcadores moleculares, uno de los eventos más importantes, no solo para este tipo de estudios, sino también en diferentes disciplinas como la taxonomía y la ecología (Weising, Nybom, Wolff, & Kahl, 2005).

5.4. Marcadores moleculares.

Un marcador es “cualquier molécula de proteína, ARN o ADN cuyo tamaño o peso molecular es conocido” (Avisé, 1994; Sharma & Gupta, 2013). Según Azofeifa (2006), se ha definido como “cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente (polimorfismos), por ello puede ser cualquier molécula orgánica o inorgánica, que es característica de un organismo o proceso”.

Actualmente, los marcadores moleculares se clasifican según la macromolécula utilizada en dos tipos: los basados en proteína: (1) aloenzimas o isozimas, y los basados en ácidos nucleicos como el ADN: (2) ADN mitocondrial, (3) ADN de cloroplastos, (4) ADN nuclear y (5) ARN (Sharma & Gupta, 2013).

Un marcador basado en el ADN, es un punto de referencia en un cromosoma, que corresponde tanto a regiones que codifican productos génicos, como a aquellas con funciones desconocidas, a nivel de un locus o varios loci en particular (Avisé, 1994; Regitano, 2001; Helguera & Echenique, 2003; Schlotterer, 2004).

Este tipo de marcadores son muy estables, ya sea que modifiquen o no su fenotipo, por ello, permiten comparar e identificar especies o poblaciones (Lewin, 2004). Así mismo, según el tipo de genoma, se diferencian entre haploides y diploides, y según la información que proveen sobre

un alelo, entre dominantes, cuando sólo permiten observar el alelo dominante en individuos heterocigotos, y codominantes, los cuales son más precisos debido a que permiten distinguir los dos alelos de un locus (Jiménez & Collada, 2000; Freeland et al., 2011).

Los atributos ideales para que un marcador molecular sea útil son: ser moderada o altamente polimórfico o variable dentro y entre especies, de herencia mendeliana no epistática, ser insensible a la influencia o efectos ambientales, ser codominante (lo cual permite diferenciar los estados homocigoto o heterocigoto en organismos diploides), ser frecuente, y estar distribuido en todo el genoma; tener un comportamiento selectivamente neutro, de fácil expresión; ser reproducible, de ensayo rápido, sencillo y de fácil acceso (Helguera & Echenique, 2003); Weising et al., 2005). Sin embargo, cabe mencionar que no existen marcadores moleculares que cumplan con todos estos criterios, por lo tanto se debe tener en cuenta el objetivo del estudio para seleccionar el más adecuado que combine algunas o la mayoría de estas propiedades (Gonzales, 1998; Weising et al., 2005; Freeland et al., 2011).

Una ventaja de usar marcadores moleculares de ADN para analizar la variación, es que se pueden aplicar a cualquier tipo de organismo, además, permiten observar diferencias directas en la parte del genoma que se está analizando, por lo tanto, la tasa de variación obtenida dependerá de la tasa de mutación que está presente (Weising et al., 2005).

Los marcadores moleculares más utilizados para detectar variación en las poblaciones consideran que parte de la información genética es específica de cada individuo y difiere entre individuos; sin embargo, en algunas especies solo es posible estimar dicha variación a través de marcadores altamente variables como los RAPDs, AFLPs o ISSRs (Rentarúa, 2007). Otras técnicas comúnmente utilizadas son la hibridación de ADN, los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), la huella digital del ADN (VNTRs o fingerprinting), los mapas de

sitios de restricción polimórficos en productos de PCR (MRSPs) y la secuencia de ADN (Beuzen, Stear, & Chang, 2002; Freeland et al., 2011); aunque, se usan otro tipo de marcadores que generan información específica sobre dicha variación a nivel de individuos, poblaciones o especies, puesto que son tan sensibles que permiten detectar mutaciones puntuales, tal es el caso de los microsatélites o la conformación polimórfica de cadena sencilla (SSCP) (Gonzales, 1998; Weising et al., 2005; Rentarúa, 2007).

5.4.1. Microsatélites.

Los microsatélites son fragmentos específicos de repeticiones de secuencias de ADN muy cortas en tándem (1-6 pb, por ejemplo (TG)_n, (AAT)_n), usados como marcadores genéticos moleculares codominantes (Kantartzi, 2013). Para su implementación en el laboratorio es necesario conocer previamente la secuencia de la región de interés para el diseño y síntesis de primers específicos que amplifiquen la región repetitiva (el microsatélite) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Freeland et al., 2011; Kantartzi, 2013).

Se reconoce tres categorías de microsatélites según la perfección de los arreglos, la primera consisten en repeticiones perfectas, refiriéndose en una sola matriz sin interrupciones de un motivo particular; la segunda en repeticiones imperfectas, en las cuales la matriz es interrumpida por una o varias bases fuera de marco; y la tercera son repeticiones compuestas, con arreglos perfectos o imperfectos entremezclados de varios motivos (Weising et al., 2005; Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de microsatélites perfectos, imperfectos y compuestos clonados de diferentes compartimentos genómicos. Las secuencias de microsatélites nucleares del garbanzo (*Cicer arietinum*).

Repeticiones perfectas	...(AG) ₃₂ ...
	...(TAT) ₂₅ ...
	...(CAA) ₇ ...
Repeticiones imperfectas	...(TC) ₆ A(TC) ₁₃ ...
	...(AG) ₁₂ GG(AG) ₃ ...

Repeticiones compuestas...(AT)₆(GT)₄₂AT(GT)₅(GT)₁₀......(AT)₁₄(AG)₈......(GAA)₂₁...(TA)₂₃...

Tomado de: Weising et al., (2005)

Los microsatélites han tenido ventaja sobre otros marcadores genéticos debido a que se caracterizan por ser abundantes, dispersos en todo el genoma, altamente mutagénicos, polimórficos (por su carácter hipervariable), alta tasa de mutación e informativos. Además, su naturaleza codominante permite detectar heterocigotos, son experimentalmente reproducibles, se pueden transferir entre taxones relacionados, ya que pueden ser homólogos para diferentes especies o incluso géneros; son rentables, fáciles de detectar y pueden usarse con ADN de baja calidad y cantidad (Jiménez & Collada, 2000; Abdurakhmonov, 2016).

Dadas estas características, han tenido impacto en el estudio de la genética de animales y plantas, dado que se puede evaluar la evolución molecular, la taxonomía, realizar análisis de flujo genético, establecer relaciones filogeográficas, detectar la estructura genética de las poblaciones y a partir de los resultados obtenidos generar planes de conservación y restauración para la biodiversidad (Aranguren, Román, Isea, Villasmil, & Jordana, 2004; Kantartzi, 2013; Abdurakhmonov, 2016).

En genética de poblaciones han sido ampliamente utilizados, debido a que permite analizar las relaciones genéticas existentes entre las poblaciones, identificar cada alelo por locus, calcular las frecuencias alélicas, determinar distancias genéticas, entre otros (Aranguren et al., 2004; Freeland et al., 2011).

5.4.2. Secuencias de ADN.

La secuenciación del ADN es un método útil para determinar la variabilidad genética del ADN en detalle sin precedentes de la región de interés para diferentes individuos, siendo un

marcador molecular con alta precisión, aunque presenta una limitación ya que dicha variación solo es detecta en una pequeña fracción del genoma; este método es frecuentemente seleccionado para reconstruir los árboles filogenéticos y las redes filogeográficas y para la conversión de marcadores RAPD o AFLP en regiones amplificadas caracterizadas por secuencias (Weising et al., 2005).

Entre las principales ventajas que tiene el uso de la secuenciación de ADN, es su alta reproducibilidad y su carácter codominante, por el contrario, su mayor limitante es su alto costo (Rentarías, 2007).

6. Materiales y métodos

El presente estudio corresponde al tipo no experimental y analítico, con comparaciones de los valores de variabilidad genética de *P. buckleyi* en cuatro localidades de muestreo.

6.1. Área de estudio.

El Complejo de Páramos La Cocha – Patascoy abarca un área de 68.547 hectáreas y se encuentra ubicado sobre un área de la cordillera Centro – Oriental y el Nudo de Los Pastos, su mayor distribución es hacia el oriente y suroriente del departamento de Nariño (89.3%) y en menor proporción en la parte alta del departamento del Putumayo (10.7%); es por ello, que las características físicas y bióticas son muy diversas, teniendo influencia tanto andina, como amazónica. En este entorno sobresalen las coberturas de bosques y áreas seminaturales que ocupan la mayor parte del territorio 62.5%, seguido de las áreas agrícolas con el 36.4% (Solarte, Armero, Narváez, Ortíz, Salas, & Leonel, 2015).

Además, presenta ecosistemas de páramo, bosque de niebla y páramos azonales, con pequeños parches de bosques chaparros, turberas, pantanos, lagunas, pajonales y frailejonales, en un rango altitudinal entre 2.850 y 4.210 m, con una precipitación de dos tipos: uno monomodal con tendencia bimodal relacionado al área andina y otro enteramente monomodal relacionado al área amazónica, entre 1.000 y 3.500 mm anuales y con variaciones de temperatura entre los 5°C y los 14°C (Corponariño y Corpoamazonia, 2002; IAvH, 2016; Morales et al., 2007).

6.1.1. Zonas de estudio.

Las zonas de estudio se establecieron de acuerdo a su distribución a lo largo del complejo, siendo seleccionados, el Cerro de Morasurco del municipio de Pasto (Páramo Las Antenas); el páramo El Fraile y los páramos azonales de Santa Isabel (ubicados por debajo de los 3000m (Corponariño y Corpoamazonia, 2002) del corregimiento El Encano; páramos de Puerres (Figura

2). Sin embargo, zonas de interés como Patascoy y Siberia no se escogieron por razones económicas, por su difícil acceso y por ser poco seguras.

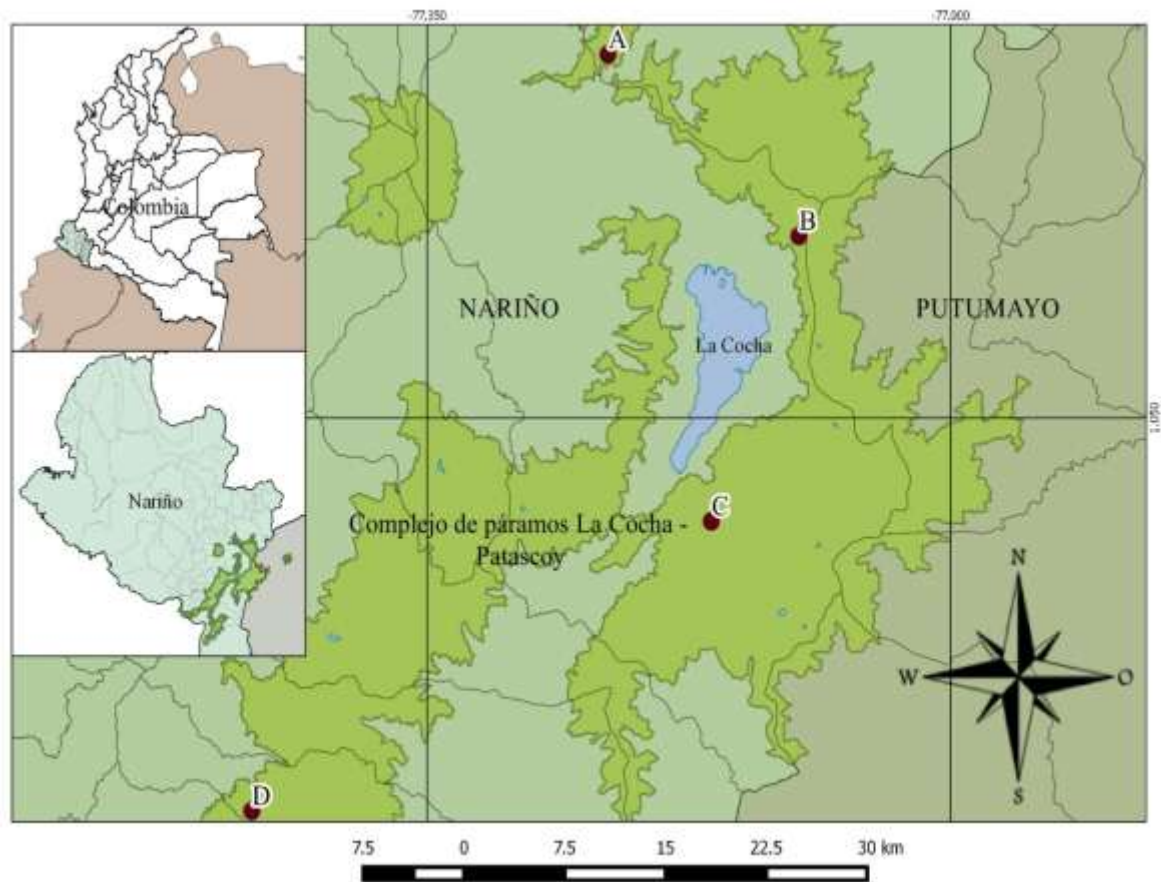


Figura 2. Zonas de estudio del complejo La Cocha- Patascoy, A) Cerro de Morasurco B) páramo El Fraile; C) páramos azonales de Santa Isabel y D) páramos de Puerres. **Fuente:** Este estudio.

6.2. Obtención de las muestras.

Por cada localidad se obtuvo un mínimo de 12 individuos adultos, los tejidos de algunos ejemplares fueron suministrados por los proyectos realizados por el Grupo de Investigación en Biología de Paramos y Ecosistemas Andinos de la Universidad de Nariño: “Estudio Técnico, Económico, Social y Ambiental del Complejo de Páramos Chiles-Cumbal, La Cocha Patascoy y Doña Juana - Chimayoy como insumo para su delimitación” en colaboración con el Instituto de

Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH) en el 2015 y “ Estudio Biofísico, Socioeconómico y Ambiental para la declaratoria como Área Protegida del ecosistema de Alta Montaña del Cerro Negro - San Francisco” realizado en el año 2017 con el acompañamiento de La Gobernación de Nariño, CORPONARIÑO, las Alcaldías de los municipios de Puerres, Córdoba y Potosí y el Resguardo de Males.

No obstante, para los tejidos restantes se realizó la búsqueda de los ejemplares siguiendo las técnicas de Muestreo de Relevamiento Sistemático (MRS), el cual consiste en la búsqueda rigurosa a corto plazo limitada por una cantidad preseleccionada de individuos a encontrar (Angulo, Rueda, Rodríguez, & La Marca, 2006). En cada localidad se realizó búsquedas libres atrapando los ejemplares manualmente, con jornadas de trabajo entre las 18:00 - 24:00 horas, teniendo en cuenta la facilidad o accesibilidad que tengan los lugares para ser muestreados y para minimizar el grado de consanguinidad, se colectaron individuos que se encontraban separados un radio mínimo de 10 metros, ya que esta es la distancia mínima de movilidad es de aclarar que ésta distancia se superpone de estudios realizados en *Eleutherodactylus fitzingeri*.

Los especímenes capturados fueron identificados siguiendo la descripción original de los caracteres diagnósticos reportados por Lynch (1981) y fotografiados, posteriormente algunos de ellos fueron sacrificados siguiendo las técnicas estandarizadas por Simmons (1987) y se procedió a tomar una muestra de tejido del músculo del muslo izquierdo; la muestra de tejido de otros individuos, se tomó mediante corte de disco pedial de la pata trasera, se realizó la desinfección con violeta de genciana y se liberaron en el mismo sitio de donde fueron recogidos (Crawford & Paz, 2017); todas las muestras fueron almacenadas en tubos ependorff con etanol absoluto, rotulados con el número de campo, el cual contenía tres letras indicando el nombre de la especie, seguidas de un numero diferente para cada individuo y la fecha de recolección. Se almacenó el

tejido en el laboratorio de Genética y Evolución de la Universidad de Nariño a -18°C y los voucher de cada individuo sacrificado fueron depositados en el Museo de Historia Natural PSO CZ – Colección Herpetológica de la Universidad de Nariño (Anexo 1).

6.3. Extracción de ADN.

El protocolo en el que se basó la extracción implica un proceso de homogenización y lisis del tejido (Linacre & Tobe, 2013), para las muestras procedentes de musculo de muslo izquierdo se pesó aproximadamente 50mg del tejido colectado y se sometieron a rompimiento mecánico utilizando nitrógeno líquido debido a la cantidad de muestra y a la presencia de partes óseas; para las muestras de disco pedial no fue necesario realizar este paso debido a su menor peso (entre 0.2mg y 11,1mg) y fácil rompimiento. Posteriormente, se adicionó a cada muestra de tejido 500 μl de buffer de lisis (Tris HCl: 50mM pH 8,0; EDTA 0.1M; NaCl 50mM; SDS 1%) y se dejó en suspensión con Proteinasa K (20mg/mL; Thermo Scientific) a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 60°C , durante 16 horas para las muestras voucher y, 2 horas aproximadamente para las muestras de disco pedial (Larramendy & Soloneski, 2016).

La purificación de ADN se realizó mediante la extracción orgánica, siguiendo la técnica estandarizada de fenol – cloroformo (Sambrook & Rusell, 2001), modificada en el laboratorio de Genética y Evolución de la Universidad de Nariño, la cual solo emplea cloroformo. La principal ventaja de utilizar este método es que permite obtener un ADN altamente puro y libre de una alta proporción de contaminantes, en comparación con otros métodos comúnmente utilizados, no obstante, la principal desventaja es la toxicidad del fenol (Linacre & Tobe, 2013); el cual, no se utilizó para éste estudio.

6.4. Calidad y concentración de ADN.

Para estimar la concentración de ADN, se utilizó dos métodos:

1. Por espectrofotometría (NanoDrop One, Thermo Scientific), este método permite medir la cantidad de ADN basado en la absorbancia de la luz (Linacre & Tobe, 2013), pero contaminantes como ARN, proteínas, oligonucleótidos, entre otros, interfieren en la medición, por lo tanto, solo es útil para muestras de ADN puro y de altas concentraciones (Weising et al., 2005). Para este método, se determinó la concentración de ADN y su pureza usando agua ultra pura como blanco y se tuvo como parámetros de buena calidad valores que se aproximen a 1,8 en una relación de absorbancia de 260/280nm (Desjardins & Conklin, 2010).

2. Mediante electroforesis, esta técnica se basa en la intensidad de fluorescencia, inducida por la luz UV emitida por los complejos del colorante utilizado, el cual, se intercala en la doble hélice de ADN. La principal ventaja de este método es que se requiere de poca muestra de ADN, permite cuantificar el ADN y estimar tanto el grado de contaminación por ARN, como la integridad o calidad del ADN (Weising et al., 2005). En este caso, se empleó gel de agarosa al 1% diluido en tampón de electroforesis TBE 1X, pH 8 y como colorante se usó GelRed (Invitrogen). Se diluyó una alícuota de cada muestra de ADN en agua ultra pura, a una concentración de 10ng/μl y se mezcló 5μl de cada dilución de ADN con 2μl de azul de bromofenol 2X (DNA Loading Dye, Thermo Scientific), el cual permite visualizar la muestra y actúa como marcador del frente de corrida (Wilson & Walker, 2009). Las muestras se cargaron en los respectivos carriles y se dejaron correr durante 90min a 75V; la evaluación se realizó visualmente empleando un transiluminador (UVP marca DyNA Light™) a 302nm y como referencia de marcador de tamaño el ADN de Fago λ predigerido con HindIII (Invitrogen), finalmente se documentaron los resultados mediante fotografía.

6.5. Marcadores moleculares microsatélitales.

Debido a que el costo en tiempo y recursos económicos, para desarrollar primers específicos para *P. buckelyi* es muy alto, se evaluaron los iniciadores diseñados para *P. ockendeni* (es de aclarar que con la redistribución del género *Eleutherodactylus*, realizada por Hedges et al. (2008), *Eleutherodactylus ockendeni* paso a ser *Pristimantis ockendeni*) (Tabla 3), los cuales se amplificaron mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en un termociclador (MyGenie96 Thermal Block BiONEER). En un primer ensayo se evaluó 3 muestras al azar con el protocolo propuesto por Elmer et al., (2006) y posteriormente, se realizaron modificaciones siguiendo los requerimientos establecidos por la ADN Taq Polimerasa Platinum® (Invitrogen), como se indica en la tabla 4, manteniendo constante la concentración de Cloruro de Magnesio para cada primer y las condiciones de termociclado (Tabla 5) propuesto por Elmer y colaboradores (2006).

Tabla 3. *Primers de Pristimantis ockendeni propuesto por Elmer et al., (2006)*

Locus	Motivo de repetición	Secuencia de cebadores (5'-3')	Ta(°C)	MgCl ₂ (mM)
Eloc — Bert & Ernie	(CTAT)19 (CCAT)3	(F): GAAAAGAAATGGAGCTGTNED (R):5'AGCTAGAGATAGATATACAGATG	54	2,5
Eloc — Beauty & Beast	(CTAT)19	(F): GGTTCACCTCCACTCTATATCVIC (R): GTTGACCAACTATAGGCAACA	61	6,25
Eloc — JeanPaul & Simone	(CTAT)11 (CTAC)1 (CTAT)7	(F): CCTCCACTCTATATCATGACAG6-FAM (R): CTCCACTGACCAGTTGACCA	62	5
Eloc — Romeo & Juliet	(GATA)17	(F): CACAAGATGCACTACATGAANED (R): CCTCCACTCTATATCATGAC	56	7,5
Eloc — Thelma &	(CCTG)5 (TCTG)3 (TCTA)11	(F): AATCTGTGCTCTGTGCAGAGVIC (R): CAGTACTTTCAGCCACACAG	57	2,5

Louise	(TCTG)5			
Eloc — Laurel & Hardy	(CTAT)23	(F):CACGAGGAGCATTGAGACTGPET (R): CCCATGAGCCTGTAGCTACG	66	5
Eloc — Batman & Robin	(GATA) (GAT) (GATA)3 (GATG) (GATA)11 (AATA) (GATA)2 (GAT) (GATA)	(F): CCTTTGGGTTGGCTTACCTCA6-FAM (R): GACCAAACAATGTTTGCTTGG	56	5

Tabla 4. Concentración de los componentes de la PCR para amplificación de los marcadores microsatelitales de *Pristimantis buckleyi*

Reactivo	Concentración final	
	Elmer, Dávila y Loughheed (2006)	Protocolo modificado
Buffer 10X	1 X	1X
Magnesio	Según Elmer <i>et al.</i>, (2006)	
dNTP's	0,5 mM	0,2 mM
Iniciador	0,5 µM (cada uno)	0,2 µM (cada uno)
TaqPol	0,25 Unidades	0,25 Unidades
ADN	10 ng/mL	10 ng/mL
BSA	-	0,4mg/ml

Tabla 5. Condiciones de amplificación de los microsatélites de *Pristimantis ockendeni*.

Condiciones del PCR	Microsatélites	
	Tiempo	Tempetarura
Desnaturalización Inicial	2 minutos	94°C
Desnaturalización	35 segundos	94°C
Anillamiento	20 segundos	52-66°C (tabla 3)
Extensión	20 segundos	72°C
	35 ciclos	
Ciclo de elongación	5 minutos	72°C

Tomado de: Elmer et al., (2006)

Los primers que no mostraron amplificaciones o amplificaciones inespecíficas fueron sometidos a las siguientes pruebas de manera independiente:

- Para los primers que presentaron amplificaciones inespecíficas se realizó un gradiente de temperatura de anillamiento aumentando en intervalos de 2°C, iniciando desde la temperatura sugerida por Elmer y colaboradores (2006).
- Para los primers que no amplificaron, se realizó la modificación en la concentración de MgCl₂ en un gradiente de 1.5, 3.5 y 5mM

En todos los casos se realizó ensayos de reproducibilidad para cada primer aumentando el número de muestras a 7. Finalmente, la evaluación de los productos de PCR se realizó mediante visualización electroforética en geles de agarosa al 1,8%, disuelta en tampón TBE 1X y teñido con GelRed (Invitrogen); las muestras se prepararon mezclando 5µl de cada amplicon con 2µl de azul de bromofenol 2X (DNA Loading Dye, Thermo Scientific) se montaron en cada poso y se dejó correr a 75V durante 2,30h. Como marcador de peso se utilizó escalera de 100 pb de Invitrogen (Mantilla, 2000). Finalmente la purificación y genotipificación se realizó en la Universidad de Los Andes.

6.6. Marcadores de secuencia.

Se realizó la amplificación del gen citocromo oxidasa 1 (COI) (Tabla 6), el gen mitocondrial se eligió debido a su rápida tasa de evolución (Guayasamin, Castroviejo, Ayarzagüena, Trueb, & Vilà, 2008).

Tabla 6. *Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación del gen citocromo oxidasa 1 (COI).*

Gen	Iniciador	Dirección	Secuencia
COI	LCO1490	Forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
COI	HCO2198	Reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA

Tomado de: Palumbi, Martin, Romano, McMillan, Stice, & Grabowski, (1991)

La amplificación del fragmento de citocromo oxidasa 1 (COI), se realizó teniendo en cuenta las concentraciones y volúmenes que se muestran en la tabla 7 y las condiciones de amplificación en la tabla 8 (Guerrero, 2017).

Tabla 7. *Concentración de los reactivos de PCR para amplificación del gen COI.*

Reactivo	Concentración Final
Buffer 10X	1 X
dNTPs	0,2 mM
Iniciador	0.2 (cada uno)
Taq Polimerasa	0,25 Unidades
ADN	10ng
MgCl ₂	2,5 mM
BSA	0,4mg/ml

Tomado de: Guerrero, (2017).

Tabla 8. *Condiciones de amplificación para el gen COI.*

Condiciones del PCR	Gen COI	
	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización Inicial	5 minutos	94°C
	35 ciclos	
Desnaturalización	30 segundos	94°C
Anillamiento	30 segundos	52°C
Extensión	1 minuto	72°C
Extensión final	7 minutos	72°C

Tomado de: Guerrero, (2017).

Todas las amplificaciones o productos de PCR se verificaron en gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular (Escala de 100pb) y aquellas muestras que generaron bandas que posean las características deseadas, como nitidez y tamaño esperado, se enviaron para la purificación y posterior secuenciación automática al Laboratorio de Secuenciación de la Universidad de los Andes. Una vez recibidas las secuencias, se editaron manualmente en el programa BioEdit (Hall, 2005), eliminando los extremos en los que la identificación de bases de la secuencia no es fiable y posteriormente, se alinearon en el software

ClusterX2 (Larkin, et al., 2007), verificando con los cromatogramas, con el fin de corroborar una vez más la calidad de las secuencias, tomando únicamente las muestras que presenten picos estables y coherencia en la secuencia (Jaramillo, 2014).

6.6.1. Análisis de datos.

Los análisis de variabilidad, heterogeneidad y flujo génico se realizaron mediante diferente programas, en primer lugar en con el programa FaBox 1.41 (Villesen, 2007) se calculó el número de haplotipos (h) y la frecuencia haplotípica ; en DnaSP, versión 5.10 (Rozas, Sánchez, Messenguer, & Rozas, 2010), se determinó el número de secuencias distintas en el total de los individuos; se calculó también, los sitios polimórficos (S), con el fin de determinar el número de posiciones nucleotídicas de las secuencias analizadas que presentan más de una variante y el numero promedio de diferencias nucleotídicas (k), para determinar el número de posiciones variables entre parejas de secuencias o haplotipos (Cortes, 2008; Caldera, Jaramillo, Cochero, Pérez, & Bejarano, 2013).

En el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), se realizó una analisis AMOVA para determinar la variabilidad genética dentro y entre las localidades, usando 10.000 permutaciones y un análisis de flujo génico los diferentes estimativos de Nei (1982); Lynch & Crease (1990) y Hudson, Slatkin & Maddison (1992), igualmente se realizó una comparación pareada entre las localidades analizadas. A través del programa Network (Versión: 5.0.0.3) se realizó la red haplotípica, debido a que Posada y Crandall (2001), afirman que este tipo de graficas son las más apropiadas para representar las relaciones entre los haplotipos dentro de una especie. Finalmente, mediante el programa Rstudio se realizó una comparación mediante la prueba de Mantel (1967), con el fin de saber si existe una correlación entre las distancias

geográfica y genética de las localidades estudiadas y lograr determinar si siguen o no un modelo de aislamiento por distancias (Wright, 1943).

7. Resultados

7.1. Obtención de muestras.

En total se analizaron 64 muestras de tejido de *P. buckleyi*, de las cuales el 29% (14) provenían del banco de tejidos de la colección herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad de Nariño (PSO) y que para este estudio corresponden a las muestras de los páramos de Puerres y algunas muestras del Cerro de Morasurco; el resto de las muestras fueron obtenidas de salidas de campo a las localidades de estudio, donde se realizó un esfuerzo de muestreo total de 180 horas/hombre. El número de muestras obtenidas en cada localidad se indican en la tabla 9, siendo el páramo El Fraile la zona con más muestras obtenidas y el cerro Morasurco con la menor cantidad.

Tabla 9. Muestras colectadas de *P. buckleyi* en las cuatro localidades del complejo de páramos la Cocha-Patascoy

Localidad	Total muestras	Porcentaje (%)	Esfuerzo muestreo (horas/hombre)
Cerro de Morasurco	13	20	58
Páramos azonales de Santa Isabel	17	26	34
Páramo El Fraile	22	35	88
Páramos de Puerres	12	19	
TOTAL	64	100	180

7.2. Extracción y cuantificación de ADN.

El protocolo de extracción con fenol-cloroformo modificado permitió obtener diferentes cantidades de ADN del total de las 64 muestras de tejido conservado y fresco, las cuales mediante cuantificación en Nanodrop One, Thermo Scientific, indicaron concentraciones entre 21,4 y 1534,9ng/μl de ADN y presentaron una relación de pureza A260/280 entre 1,04 y 2,0, donde el 58% de las muestras indicaron valores entre 1.8 y 2 y 37,5% en un valor inferior (Anexo 1). Igualmente, la visualización en geles de agarosa al 1% de las muestras extraídas, por

cada zona, permitió verificar la calidad del proceso de extracción, mediante la presencia de una banda definida en la parte superior del gel, indicando la integridad del ADN y una óptima degradación de ARN debido a que no se evidencio un barrido por debajo de las bandas, como se observa en la Figura 3.

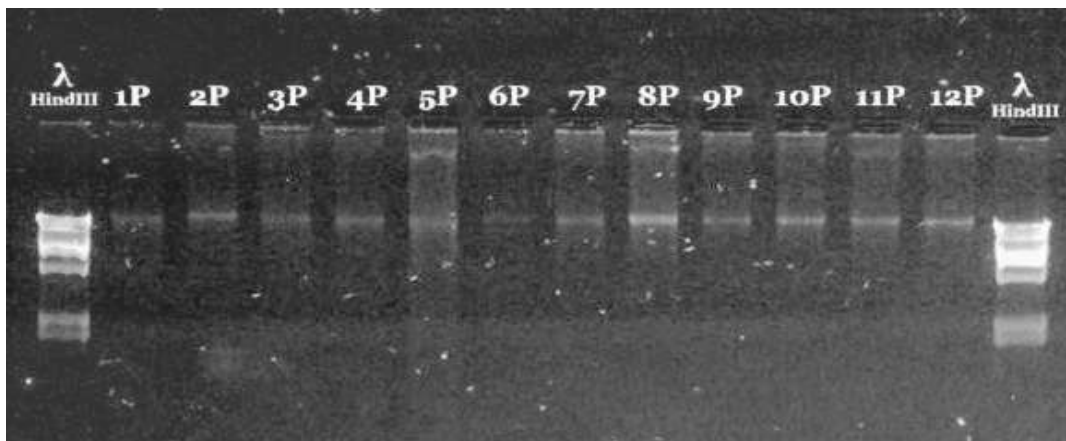


Figura 3. Muestras de ADN de Puerres diluidas 10ng/ul. (El resto de zonas en el Anexo 2).
Fuente: este estudio.

7.3. Evaluación de los primers heterólogos de *P. ockendeni* en el proceso de amplificación de las zonas microsatélitales de *P. buckleyi*.

Los ensayos realizados teniendo en cuenta las condiciones de amplificación sugeridas por Elmer et al. (2006), no permitieron obtener resultados positivos, tal como se observa en el Anexo 3, donde no se evidencia la presencia de amplificaciones. Por lo anterior, los siguientes ensayos se realizaron bajo las condiciones requeridas por ADN Taq Polimerasa Platinum® (Invitrogen), sin modificar el programa de termociclado y la concentración de magnesio, recomendadas por Elmer et al. (2006).

La evaluación de la amplificación por medio de los geles de agarosa permitió observar la amplificación de todas las muestras evaluadas con los primers Romeo & Juliet (dos bandas), Batman & Robin (3 bandas) y Jean & Simone (dos bandas) (Anexo 4), comportamiento que fue

constante al realizar los ensayos de reproducibilidad (Anexo 5). El protocolo para estos primers se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. *Concentración de los componentes de la PCR para amplificación de los primers Romeo & Juliet, Batman & Robin y Jean & Simone.*

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1 X
MgCl	2.50–7.50 mM (Tabla 3)
DNTP	0,2 Mm
Iniciador	0,2 μ M (cada uno)
Taq Polimerasa	0,2 Unidades
ADN	10 ng

En el caso de los primers Laurel & Hardy, bajo las condiciones mencionadas, los geles de agarosa mostraron la amplificación del 33% de las muestras evaluadas (Anexo 4); al realizar las pruebas con el gradiente de la concentración de cloruro de magnesio (1.5, 3.5 y 5 mM), se observó que con 1.5 y 5 mM continuó amplificando el 33% de las muestras y con la concentración de 3.5mM se obtuvo la amplificación del 66% de las muestras, permitiendo observar una banda definida (Anexo 6). El protocolo final para este primer se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. *Concentración de los componentes de la PCR para amplificación del primer Laurel & Hardy.*

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1 X
MgCl	3.5 mM
DNTP	0,2 Mm
Iniciador	0,2 μ M (cada uno)
Taq Polimerasa	0,2 Unidades
ADN	10 ng

Para los primers Beauty & Beast, Thelma & Louise y Bert & Ernie se evidenció amplificaciones inespecíficas (Anexo 4) en el gel de agarosa; por ello, se realizó la prueba de

gradiente de temperatura evaluando rangos de 61-65°C, 57-63°C y 54-60°C, respectivamente (Anexo 7). Según los resultados obtenidos, el primer Thelma & Louise con temperaturas de anillamiento de 57, 59 y 61°C presenta múltiples bandas con poca definición, sin embargo a 63°C se obtuvo dos bandas con mayor nitidez (Anexo 7), resultados que se mantuvieron al realizar las pruebas de reproducibilidad (Anexo 8) y permitió definirla como la temperatura de anillamiento en el programa de termociclado como se indica en la tabla 12.

Tabla 12. *Condiciones de termociclado para el primer Thelma & Louise.*

Condiciones del PCR	Microsatélites	
	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización Inicial	2 minutos	94°C
Desnaturalización	35 segundos	94°C
Anillamiento	20 segundos	63°C
Extensión	20 segundos	72°C
	35 ciclos	
Ciclo de elongación	5 minutos	72°C

Para el primer Bert & Ernie con temperaturas de anillamiento de 54, 56 y 60°C, en los geles de agarosa no se observa bandas definidas, sin embargo a 58°C se obtuvieron bandas con mayor nitidez (Anexo 7), lo cual se mantuvo al realizar los ensayos de reproducibilidad (Anexo 8) y permitió definirla como la temperatura de anillamiento en el programa de termociclado como se indica en la tabla 13.

Tabla 13. *Condiciones de termociclado para el primer Bert & Ernie.*

Condiciones del PCR	Microsatélites	
	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización Inicial	2 minutos	94°C
Desnaturalización	35 segundos	94°C
Anillamiento	20 segundos	58°C
Extensión	20 segundos	72°C
	35 ciclos	
Ciclo de elongación	5 minutos	72°C

Finalmente, el primer Beauty & Beast con el gradiente de temperatura no mostró amplificaciones en el gel de agarosa, como se observa en el Anexo 7.

Los amplificadores se enviaron al servicio de genotipificación de la Universidad de los Andes y los resultados (Tabla 14) no muestran un patrón coherente con los resultados derivados de las evaluaciones realizadas por los geles de agarosa, dado que hay más de dos alelos para cada una de las muestras analizadas en cada uno de los primers evaluados. El único par de primers que presenta dos alelos para cada una de las muestras es Romeo y Juliet, sin embargo los tamaños de los picos son iguales, por lo tanto se trata de unos primers monomórficos que para los análisis de variabilidad genética no son informativos.

Tabla 14. *Numero de alelos amplificados por cada primer en P. buckleyi.*

Microsatélite	Muestra						
	1	2	3	4	5	6	7
Batman & Robin	12	5	16	10	18	7	27
Beauty & Beast	0	0	0	0	0	0	0
Bert & Ernie	11	11	13	12	12	12	12
Jean & Simone	6	7	7	6	6	8	7
Laurel & Hardy	5	4	4	4	5	5	3
Romeo & Juliet	2	2	2	2	2	2	2
Thelma & Louise	8	16	11	18	11	10	8

7.4. Determinación de la variabilidad genética *P. buckleyi* en cada localidad de estudio.

Las amplificaciones con el gen COI realizadas mediante PCR con los primers LCO1490 y HCO 2198 a partir del ADN extraído de las diferentes localidades, permitió obtener un fragmento de aproximadamente 600pb para 54 de las 64 muestras; las cuales fueron elegidas por presentar los mejores resultados de pureza y rendimiento a partir del proceso de extracción de ADN (100%) (Figura 4). Posterior a la secuenciación, una muestra no se pudo analizar debido a que el forward y el reverse eran de un tamaño de 60pb, al realizar el análisis con BLAST, 52 de

las 53 secuencias presentan un porcentaje de identidad entre 84 y 86% con respecto a una especie de *Pristimantis* (*P. jubatus*, *P. hectus* y *P. cf. mendax*) y la muestra restante no se relacionó con ninguna especie de este género, por lo cual se decidió eliminarla para los siguientes análisis (Anexo 9).

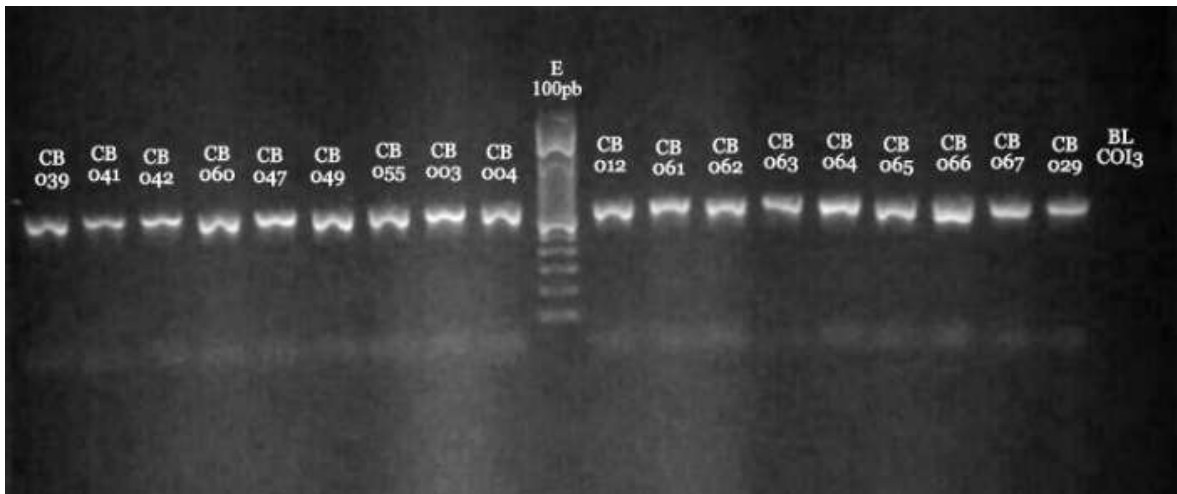


Figura 4. Amplificación del gen COI de *P. buckleyi*. **Fuente:** este estudio.

El alineamiento realizado en ClusterX2 (Larkin et al., 2007), permitió obtener una matriz de 53 secuencias de una longitud de 657 pb, sin gaps y sin sitios perdidos. Los análisis realizados en el programa DNAsp (Rozas et al. 2010), arrojaron que en general, las secuencias contienen 605 sitios invariables (monomórficos), 52 sitios polimórficos, 53 mutaciones en total y 12 sitios variables singletons. Los valores de estos índices detallados para cada localidad se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Sitios polimórficos del gen COI de *P. buckleyi* en las localidades estudiadas.

	Puerres	Sta. Isabel	Fraile	Morasurco	Total
Sitios perdidos o gaps	0	0	0	0	0
Sitios invariables (monomórficos)	624	653	656	648	605
Sitios variables polimórficos	33	4	1	9	52
Número total de mutaciones	33	4	1	9	53

Sitios variables singletons	18	3	0	4	12
-----------------------------	----	---	---	---	----

Mediante el análisis con FaBox 1.41 (Villesen, 2007) se identificaron 20 haplotipos diferentes en las cuatro localidades analizadas (Tabla 16), los haplotipos más frecuentes fueron H8 (22,64%), H1 y H2 (13,20%), mientras que los demás tuvieron una frecuencia entre 1,9 y 5,7%. Los parámetros de diversidad que se hallaron con el programa DNAsp (Rozas et al. 2010) mostraron una diversidad haplotípica total de 0,910, con una desviación estándar de 0,023 y una diversidad nucleotídica total de 0,01970, en la tabla 16 se presentan los parámetros detallados para cada localidad.

Tabla 16. Número de haplotipos e índices de diversidad del gen COI de *P. buckleyi* en las localidades estudiadas.

	Puerres	Sta. Isabel	Freile	Morasurco	Total
Número de haplotipos	7	4	2	8	20
Diversidad haplotípica	0,894	0,467	0,538	0,927	0,910
Diversidad nucleotídica PI	0,01204	0,00099	0,00082	0,00448	0,01970

El Análisis de Varianza Molecular (Arlequin 3.5); (Excoffier & Lischer, 2010) mostró mayor variación entre las localidades analizadas (82,89%), (P=0,0000) que dentro de cada localidad (17,11%) (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de varianza molecular del gen COI de *P. buckleyi* en las localidades estudiadas.

Fuente de variación	Grados libertad	Σ cuadrados	Varianza	% Variación
Entre poblaciones	3	263,720	6,68885	82,89
Dentro de poblaciones	48	66,261	1,38043	17,11
Total	51	329,981	8,06928	

Los diferentes valores de flujo génico se obtuvieron mediante los datos informativos de secuencias mediante los diferentes estimativos de Nei (1982); Lynch & Crease (1990) y Hudson,

Slatkin & Maddison (1992), los cuales se muestran en la tabla 18. Según, Slatkin, (1994) valores de Nm es mucho mayor a 1 existe un flujo genético entre las poblaciones, lo que impide la diferenciación local, por el contrario si es menor a 1 significa que no existe flujo genético entre las poblaciones.

Tabla 18. *Estimativos del flujo génico de P. buckleyi entre las localidades analizadas.*

Autor	Nm
Nei (1982)	0,13
Lynch & Crease (1990)	0,11
Hudson, Slatkin & Maddison (1992)	0,11

A partir de la comparación pareada de los Fst a nivel de localidades, los valores presentaron un rango de 0,76 a 0,89, con altos niveles de significancia ($P = 0,00$), lo cual demuestra que las localidades están significativamente separadas a nivel genético una de otra (Tabla 18).

Tabla 19. *Comparación pareada realizada a partir de los valores Fst del gen COI de P. buckleyi en las localidades estudiadas.*

	Fraile	Morasurco	Sta Isabel	Puerres
Fraile	0.00000			
Morasurco	0.88125	0.00000		
Sta Isabel	0.89881	0.89785	0.00000	
Puerres	0.76347	0.80298	0.77817	0.00000

P = 0,00

La red haplotípica, mostró que la mayoría de los haplotipos son únicos para cada localidad estudiada, es así como el páramo el Fraile presentó dos haplotipos (H1 y H2); el cerro de Morasurco contó con ocho haplotipos (H3, H4, H5, H6, H7, H11, H12 y H13); los páramos azonales de Santa Isabel presentaron tres haplotipos (H9, H10 y H14) y para los páramos de

Puerres se determinaron cinco haplotipos (H15, H16, H17, H18, H19 y H20), solo el haplotipo H8 está presente en Puerres y Santa Isabel (Figura 5).

El coeficiente de correlación calculado con el test de Mantel en el programa RStudio entre las distancias genéticas y geográficas de cada una de las localidades, fue negativo (-0,797) y no significativo (P= 0,83).

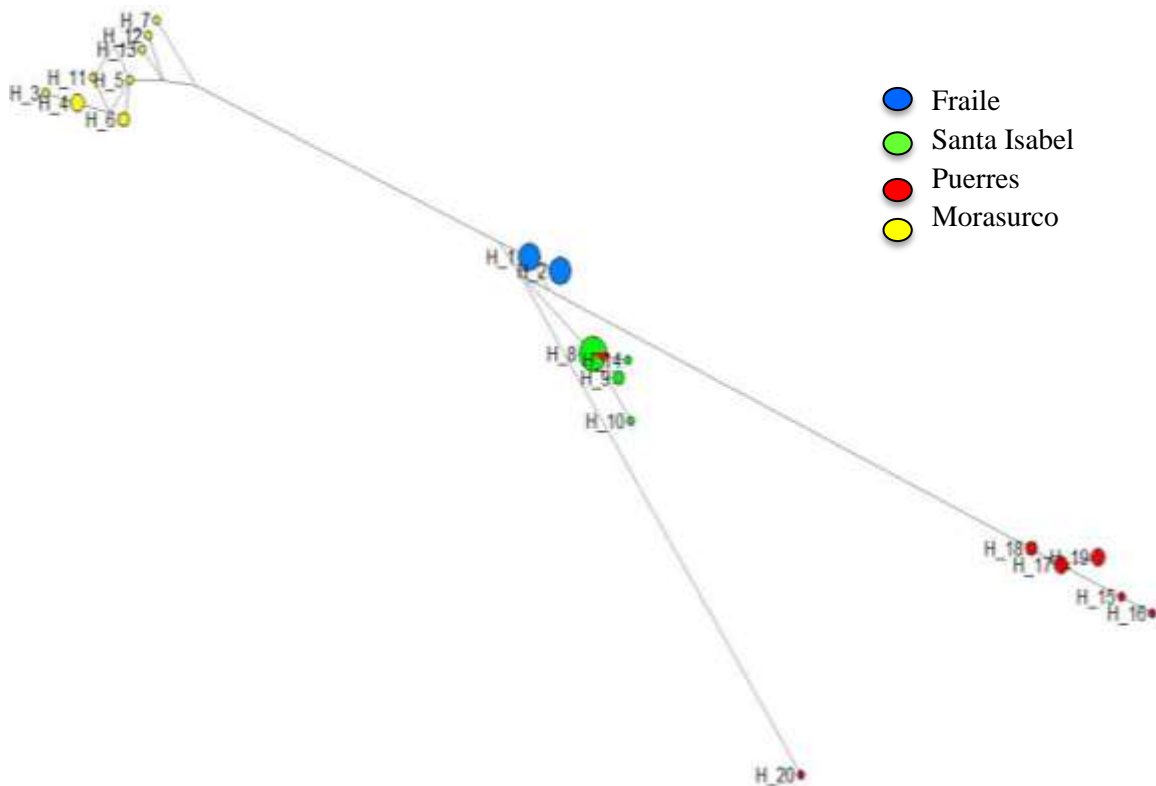


Figura 5. Red de haplotipos para el gen Citocromo Oxidasa I de *P. buckleyi*, construido con el programa Network 5.0 usando el algoritmo median-joining. Cada círculo representa un único haplotipo y el área es proporcional al número de individuos. **Fuente:** este estudio.

Discusión

Estandarización de Marcadores Moleculares Microsatélites

El éxito de la estandarización de marcadores moleculares microsatélites depende de procesos iniciales de la extracción de ADN y la cuantificación, es por ello que en este estudio se demostró la efectividad del método modificado de extracción con cloroformo- alcohol isoamilico, el cual permitió obtener cantidades de DNA entre 21,4 y 1534,9ng/ μ l de ADN con un rendimiento entre 0,26 y 412,50 a partir de muestra de músculo femoral y disco pedial, siendo este tejido el que mostro un mejor rendimiento y que está de acuerdo con lo expuesto por Larramendy & Soloneski (2016) , quienes indican una relación entre la cantidad y calidad de la muestra de partida y la cantidad y calidad del ADN extraído.

La técnica de fenol cloroformo es de bajo costo y alto rendimiento, ya que permite extraer mayor cantidad de ADN en comparación con los kits comerciales (Barrio P. , 2012), lo anterior es apoyado por los estudios de Wagner, Waite & Taylor (2015) quienes obtuvieron mayor rendimiento medio utilizando este método (59,15 μ g/ml) en comparación con diferentes Kits de aislamiento utilizados, con los cuales muestran un menor rendimiento (2,62 μ g/ml), al igual que menores índices de pureza ($A=1.06$). Igualmente Schiebelhut y colaboradores (2016), obtuvieron mayor rendimiento medio con la extracción estándar de fenol-cloroformo (1891 ng/mg), que con diferentes Kits comerciales como Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit, Thermo Scientific KingFisher Cell and Tissue DNA Kit with RNase o Glass Fiber Plate DNA Extraction; desempeñándose mejor en términos de producción de ADN puro y teniendo un alta tasa de éxito en la PCR.

El 62.5% de las muestras extraídas mostró una relación de pureza entre 1,8 y 2,0 que está relacionado con los valores óptimos registrados por diversos autores como Sambrook, & Rusell,

(2001), Desjardins & Conklin (2010), Larramendy & Soloneski, (2016) y Carvalho & colaboradores (2018), quienes afirman que los valores de absorbancia 260/280nm entre 1.8 y 2.0 son indicativos de muestras de ADN puro, posiblemente derivado del uso del cloroformo, que proporciona una mejor desnaturalización de proteínas, elimina los polisacáridos, lípidos y otras sustancias no polares de la fase acuosa (Larramendy & Soloneski, 2016).

La evaluación de los primers heterologos mediante geles de agarosa demostró la amplificación de los siete primers utilizados, autores como Scribner & Pearce (2000) afirman que la amplificación cruzada utilizando cebadores de una especie en otra distinta, suele mantenerse cuando se emplean en individuos del mismo género o géneros separados recientemente, debido a que, las regiones flanqueantes de los microsátélites generalmente son muy conservadas, lo cual ha sido reportado en varios estudios en diferentes especies (Bushar, Maliga, & Reinert, 2001; González E. G., 2003; Cuervo, 2010; Hale, Heard, Smith, Blacket, Austin, & Melville, 2011; GiL & Cantera, 2015; Yuliatmy, Roesma, & Tjong, 2016).

La amplificación con los primers Romeo & Juliet, Batman & Robin y Jean & Simone fue exitosa al realizar la modificación disminuyendo la concentración final de los primers y de los dNTP's. Con respecto a los primers se pasó de 0,5 μ M a 0,2 μ M, lo anterior teniendo en cuenta que a altas concentraciones la fidelidad del proceso se verá afectada negativamente al conducir la Taq ADN-polimerasa a errores de incorporación a una tasa mayor de lo normal y por lo tanto disminuir la probabilidad de formación de dímeros de primer y el error en el emparejamiento con secuencias no objetivo (McPherson & Møller, 2006).

Con respecto a los resultados para los primers Laurel & Hardy, que implicó pruebas en la disminución de la concentración de cloruro de magnesio, debido a que era necesario aumentar la especificidad y eficiencia de la reacción de PCR. Con los resultados obtenidos, se determinó que

a la concentración más baja (1.5mM) o a la más alta (5mM) continuo amplificando el 33% de las muestras, pero a una concentración intermedia de 3.5mM se obtuvo la amplificación del 66% de las muestras; esto se debió posiblemente a que si la concentración de Mg^{2+} es baja, se disminuye el rendimiento, mientras que si es alta, reduce la fidelidad de la ADN polimerasa (McPherson & Møller, 2006; Roux, 2009; Kantartzi, 2013; Obradovic, et al., 2013).

Para el caso de los primers con amplificaciones inespecíficas (Thelma & Louise; Bert & Ernie) al realizar el gradiente de temperatura (aumentando la temperatura) se obtuvo una disminución en el número de bandas, debido a que el acoplamiento completo o parcial entre el primer y la secuencia plantilla depende de manera crítica de la temperatura de alineamiento, por ello, cuanto más alta sea la temperatura mayor será la especificidad y la probabilidad de amplificación (McPherson & Møller, 2006; Roux, 2009; Cuervo, 2010).

En el caso del primer Beauty & Beast, al modificar la temperatura de anillamiento no se obtuvieron resultados positivos, puesto que a temperaturas altas el cebador no logra encontrar complemento exacto en el ADN plantilla, lo cual puede deberse a que los cebadores no se diseñaron específicamente para la especie y como se evidencia en algunos estudios no siempre todos los primers funcionan en su totalidad (Galan, Cosson, Aulagnier, Maillard, Thévenon, & Hewison, 2003; Yuliatmy, Roesma, & Tjong, 2016; Hale et al., 2011).

Cuando se evaluó los resultados de la genotipificación de las siete muestras, se observó amplificaciones inespecíficas; debido posiblemente a que el sistema de separación de fragmentos amplificados utilizado, como el gel de agarosa, no permite una buena diferenciación de alelos de tamaños similares y generalmente se interpretan como un único alelo, en este caso autores como Valadez, Kahl, Rubluo, y Arreguín (2005), recomiendan técnicas de mayor resolución como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la genotipificación.

Posiblemente las amplificaciones inespecíficas, pudieron deberse a procesos de duplicación de genes, que generan aumento en el número de copias génicas, ya que un solo par de primers microsatelitales pueden amplificar varios alelos distintos, debido a que pueden anillarse a secuencias complementarias ubicadas en diferentes regiones (Zhang & Rosenberg, 2007).

Aunque las duplicaciones en el genoma han sido menos reconocida como un impulsor de la diversificación animal, se presenta en una amplia gama de grupos y son particularmente comunes en peces y anfibios (Mable, Alexandrou, & Taylor, 2011), lo cual se ha evidenciado en loci microsatelitales duplicados en muchas especies de esturión (por ejemplo: (Jenneckens, et al., 2001; David, Blum, Feldman, Lavi, & Hillel, 2003; Rodzen & May, 2005; Shao, Lek, & Chang, 2005), así como en especies de anuros (por ejemplo: (Huang, Zhao, Luo, & Wu, 2016; Session, et al., 2016).

Las duplicaciones de genes puede complicar los estudios genéticos poblacionales porque muchos de los análisis (por ejemplo, la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg y otras pruebas que dependen de los datos de frecuencia de los alelos) suponen la condición diploide de los individuos (Welsh & May, 2006).

Dados los resultados expuestos, los marcadores microsatélites desarrollados para *Pristimantis ockendeni* y evaluados en *Pristimantis buckleyi*, no son viables para medir la variabilidad genética en este estudio, es por ello que se optó por realizar el análisis con secuencias de COI.

Variabilidad genética de *P. buckleyi*

De acuerdo con los resultados, COI presentó en total una alta diversidad haplotípica (H_d) (0,910) y el análisis por localidades mostró valores ≥ 0.5 . Por el contrario, la diversidad nucleotídica (π) en total fue baja (0,01970), con un comportamiento similar para las cuatro localidades con valores $\leq 0,01$, que indica que los cambios nucleotídicos en las secuencias

ocurren en muchos sitios pero pocas veces, lo que además corrobora el bajo número de sitios informativos encontrados en comparación con los sitios polimórficos (Vela, 2014). Igualmente valores de diversidad reportados en estudios que trabajan con ADNm, como los de Draški, Wangkulankul, Martínez & Vörös (2018) quienes obtuvieron un $H_d = 0,73$ y una $\pi = 0,01$ para la especie *Leptobrachium hendricksoni* (Anura: Megophryidae); Martinazzo (2011), donde se obtuvieron valores altos H_d en tres de las cuatro poblaciones estudiadas (0,4-0,8) y una baja π (0,0-0,003) para *Atelognathus patagonicus* y *Atelognathus praebasalticus*, son similares a los obtenidos en este estudio.

Estos valores de alta H_d y baja π , conducen a inferir que pudo ocurrir un rápido crecimiento poblacional a partir de poblaciones ancestrales pequeñas y acumulación de mutaciones, lo que conlleva a un exceso de haplotipos con baja frecuencia, es decir, un alto número de haplotipos únicos (Caiafa, 2013), esta etapa de crecimiento poblacional pudo haber sido lo suficientemente larga para permitir la recuperación de la variación haplotípica a través de la mutación, pero demasiado breve como para acumular grandes divergencias de las secuencias (Grant & Bowen, 1998).

Además, la red haplotípica, permitió diferenciar las cuatro localidades analizadas mediante la agrupación de sus respectivos haplotipos y establecer que la mayoría de éstos son únicos para cada localidad y solo uno (H8) se comparte entre los páramos de Puerres y los páramos azonales de Santa Isabel (Figura 5). La alta diversidad de haplotipos y la baja diversidad de nucleótidos en combinación con un mínimo número de haplotipos compartidos entre las poblaciones, sugieren bajos niveles de flujo de genes entre las localidades, lo cual se evidencia en los valores obtenidos mediante los diferentes estimativos del flujo genético (Tabla 18), de los que se puede inferir que

no existe flujo entre las localidades; además, el valor alto de $F_{ST}=0,8282$ ($P=0,0000$), indica que existe una estructuración genética significativa entre las localidades de estudio.

Lo anterior, concuerda con investigaciones realizadas en anuros de la zona tropical, es así como el estudio de Fouquet et al. (2012), quienes determinaron que la rana del bosque amazónico *Adenomera andreae*, esta significativamente estructurada en una escala geográfica relativamente pequeña obteniendo valores de $F_{st} = 0,58$; un caso similar es el estudio realizado por García y colaboradores (2012), que determina que las poblaciones de *P. brevifrons* y *P. palmeri* se encuentran altamente estructuradas en los Andes del sur de Colombia, obteniendo valores de $F_{st} = 0,98$ y $0,95$ respectivamente. Es necesario indicar que existe un número variado de análisis de diversidad genética en anuros, sin embargo, una alto porcentaje de ellos se han realizado en zonas templadas que no es comparable geológicamente con las zonas tropicales, y en especies con historias de vida y filogenéticamente muy diferentes a la de los *Pristimantis*.

Cabe resaltar, que las poblaciones de anuros exhiben un alto grado de estructura espacial, principalmente cuando las distancias interpoblacionales son grandes; además, presentan mayor grado de subdivisión poblacional que cualquier otro taxón animal, como consecuencia de la heterogeneidad del hábitat y la fragmentación, lo cual puede ser atribuido a las actividades que afectan su distribución, a la historia natural de la especie y a los eventos climáticos y geológicos en las zonas de distribución de la especie (Palo, Schmeller, Laurila, Primmer, Kuzmins, & Merila, 2004; Arens, van der Sluis, van't Westende, Vosman, Vos, & Smulders, 2007; Moresco, Maniglia, Oliveira, & Margarido, 2013).

En el caso de los efectos antropogénicos como la agricultura y la ganadería, generan discontinuidad en el paisaje, lo que da lugar a limitaciones en la conectividad de las

poblaciones (Palo, et al., 2004; Arens, et al., 2007; Moresco, et al., 2013). Tal sería el caso del complejo de Páramos La Cocha Patascoy, que a pesar de poseer zonas de alta conservación, tiene áreas de bosque y páramo, que están siendo amenazadas por el accionar de las comunidades campesinas e indígenas que se encuentran asentadas en las zonas aledañas, quienes practican actividades como pastoreo extensivo, cultivos en su mayoría de papa, cebolla, legumbres, maíz, tomate, entre otros y la extracción maderera para el uso y venta, además de explotación de los servicios ecosistémicos asociados a la belleza paisajística y contaminación por descarga directa o indirecta de aguas residuales y de desecho, etc. (Solarte et al., 2015); lo cual, posiblemente ha afectado la conectividad de las poblaciones de *P. buckleyi*.

Lo anterior, se evidenció durante las salidas de campo realizadas en este estudio, donde se observó que la presencia de la carretera al lado del páramo El Fraile, puede influir en la configuración espacial del hábitat, generando que la conectividad demográfica de las poblaciones cambie, con implicaciones sobre la estructura genética dentro de las poblaciones y entre ellas (Banks, et al., 2013), caso similar ocurre en los páramos de Santa Isabel, Morasurco y Puerres, donde la ganadería y agricultura, principalmente, están afectando la integridad de estos ecosistemas.

Con respecto a la estructuración genética de las poblaciones y la historia de vida de los anuros, es de anotar que estos se caracterizan por una alta filopatría o fidelidad al sitio de reproducción y la baja movilidad o capacidad de dispersión, lo cual limitaría la conectividad y el flujo genético de los individuos presentes en sitios distantes y permitiría la acumulación de diferencias genéticas, lo cual ha sido apoyado por autores como Blouin et al, (2010) quienes atribuyen la estructuración de la población al comportamiento filopatríco y una capacidad limitada para dispersar grandes distancias y más fuertemente restringida en zonas de alta

elevación u otros hábitats agresivos, porque la topografía montañosa compleja y la variación climática facilitan el aislamiento genético entre las poblaciones (Guarnizo & Cannatella, 2013).

Así mismo, la estructuración genética puede explicarse mediante los procesos históricos que dieron origen a los ecosistemas paramunos, como el levantamiento de los Andes que inicio hace 40 Ma atrás, sin embargo, fue hasta el Plioceno (aprox. 5 y 2.5 Ma atrás), que las cordilleras se levantaron hasta su altitud actual, con áreas relativamente extensas por encima de lo que era el límite altitudinal del bosque, posteriormente, se generaron procesos de evolución-adaptación de especies desde niveles inferiores e inmigraciones, hacia los centros de colonización emergentes desde la región andina austral, holártica y mesoamericana, lo cual, ha jugado un papel importante, al causar la división entre poblaciones de animales y plantas desde ambientes de tierras bajas, hasta ambientes de alta montaña como los páramos (Hofstede, et al., 2014; Gómez, Pérez, & Ochoa, 2015).

Durante el periodo Cuaternario (2,4 Ma) hasta hoy, se presentaron varios ciclos interglaciares, donde la temperatura era similar a la actual y ciclos glaciales con temperaturas muy bajas, por lo cual, los glaciares ocuparon zonas de elevaciones más bajas (2.000 msnm) (Hooghiemstra, Wijninga, & Cleef, 2006; Cleef, 2013), estas oscilaciones en el clima generaban conectividad y separación de las áreas de páramo, lo cual, promovió la extinción, especiación, distribución de la biota y diferenciación genética (Castaño, 2002; Vargas & Pedraza, 2004; Marín, Restrepo, & Daza, 2016). Además, autores como Marín, Restrepo y Daza (2016), afirman que tanto el levantamiento de los Andes como los ciclos glaciales afectan la conectividad de comunidades de anfibios que son propias de estos ecosistemas, debido a que actúan como una fuerte barrera geográfica al flujo genético.

La disminución de la franja de vegetación en periodos del Holoceno medio y la finalización de la última máxima glaciación dió lugar a que los páramos se aislaran formando islas en el continente (Van Der Hammen, 1974), por lo cual es probable que las poblaciones de *P. buckleyi* en el complejo la Cocha – Patascoy estén bajo un modelo de aislamiento por islas o un modelo de aislamiento por distancia.

Para comprobar si las poblaciones de *P. buckleyi* corresponde a un modelo de aislamiento por distancia se realizó la prueba de Mantel, que arrojó un coeficiente de correlación negativo (-0,797) y no significativo ($P= 0,83$), por lo tanto, debido a que el valor P calculado es mayor que el valor de significación ($\alpha = 0,05$), no existe una correlación entre la distancia genética y geográfica, lo que conduce a asumir que las localidades analizadas podrían acoplarse a un modelo de aislamiento por islas, que es necesario probar con un mayor número de datos.

Conclusiones

Las condiciones requeridas por la ADN TaqPolimerasa y las posteriores modificaciones permitieron la amplificación de los siete marcadores microsatélites heterólogos en *Pristimantis buckleyi*, esto debido a que la amplificación cruzada, suele mantenerse cuando se emplea en individuos del mismo género o géneros separados recientemente.

La presencia de un mayor número de alelos por cada primer microsatelital evidenciado en el servicio de secuenciación, pudo ser consecuencia de procesos de duplicación de genes que generan un aumento en el número de copias génicas, ya que un solo par de primers pueden amplificar varios alelos distintos.

P. buckleyi presentó altos niveles de variabilidad genética con una alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica lo que conduce a hipotetizar un rápido crecimiento poblacional a partir de poblaciones ancestrales y una acumulación de mutaciones que conlleva a tener un alto número de haplotipos únicos como se evidenció en la red haplotípica.

Las cuatro localidades analizadas en este estudio, cada una representa una población para *P. buckleyi* en el Complejo de páramos La Cocha – Patascoy, debido a que no existe flujo genético entre ellas y presentan una estructuración genética significativa.

Recomendaciones

- Introducir métodos de secuenciación de próxima generación para desarrollar microsatélites propios de la especie *P. buckleyi*.
- Ampliar el estudio a un número mayor de poblaciones en el complejo de páramos La Cocha - Patascoy y otros complejos de páramo.
- Ampliar el número de genes a evaluar.

Bibliografía

- Abdurakhmonov, I. Y. (2016). Introduction to Microsatellites: Basics, Trends and Highlights. En I. Y. Abdurakhmonov, *Microsatellite Markers* (págs. 1-238). Process Manager.
- Acosta, A. R. (2000). Ranas, salamandras y caecilias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. *Biota Colombiana*, 1(3), 289-319.
- Acosta, A. R., & Cuentas, D. (17 de Agosto de 2018). *Lista de los Anfibios de Colombia*. Obtenido de Batrachia: <http://www.batrachia.com>
- Alford, R. A., & Richards, S. J. (1999). Global Amphibian declines: A problem in applied ecology. *Annual review of Ecology and Systematics*, 30, 133-165.
- Allendorf, F. W., Luikart, G., & Aitken, S. N. (2013). *Conservation and the genetics of population*. Estados Unidos: Wiley-Blackwell.
- Alroy, J. (2015). Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(42), 13003–13008.
- Álvarez, D., Choda, M., Viesca, L., Cano, J. M., Bañuelos, M. J., Matsuba, C., y otros. (2011). Variación genética adaptativa en gradientes altitudinales: efectos sobre la viabilidad de poblaciones subdivididas en escenarios de cambio climático. En L. Ramírez, & B. Asensio, *Proyectos de Investigación en parques nacionales: 2008-2011* (págs. 125-150). España: Naturaleza y Parques Nacionales, Serie investigación en la red.
- Andrade, C. M. (2011). Estado de conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(137), 491-507.

- Angulo, A., Rueda, J., Rodríguez, J., & La Marca, E. (2006). *Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina*. Bogotá: Panamericana Formas e Impresos S.A.
- Aranguren, J. A., Román, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2004). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*, 13(1), 30-42.
- Arens, P., van der Sluis, T., van't Westende, W., Vosman, B., Vos, C., & Smulders, M. (2007). Genetic population differentiation and connectivity among fragmented Moor frog (*Rana arvalis*) populations in The Netherlands. *Landscape Ecology*, 22, 1489–1500.
- Arioli, M., Jakob, C., & Reyer, H. (2010). Genetic diversity in water frog hybrids (*Pelophylax esculentus*) varies with population structure and geographic location. *Molecular Ecology*, 19(9), 1814-28.
- Avise, C. J. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman y Hall.
- Azofeifa, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en frutales tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Balkenhol, N., A. C. S., Storfer, A. T., & Waits, L. P. (2016). *Landscape genetics: Concepts, methods, applications*. Idaho: Wiley Blackwell.
- Banks, S. C., Cary, G. J., Smith, A. L., Davies, I. D., Driscoll, D. A., Gill, A. M., et al. (2013). How does ecological disturbance influence genetic diversity? *Trends in Ecology y Evolution*, 28(11), 1-2.

- Barrio, C. L., Heinicke, M. P., & Hedges, S. B. (2013). A new tuberculated *Pristimantis* (Anura, Terrarana, Strabomantidae) from the Venezuelan Andes, redescription of *Pristimantis pleurostriatus*, and variation within *Pristimantis vanadisae*. *Zootaxa*, 3647(1), 43-62.
- Barrio, P. (2012). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 39(2), 54-62.
- Bernal, M. H., & Lynch, J. D. (2008). Review and Analysis of Altitudinal Distribution of the Andean Anurans in Colombia. *Zootaxa*, 1-25.
- Beuzen, N. D., Stear, M. J., & Chang, K. C. (s.f.). Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, 160, 42–52.
- Bijlsma, R., & Loeschcke, V. (2012). Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications*, 5(2), 117-129.
- Blaustein, A. R., & Bancroft, B. A. (2007). Amphibian Population Declines: Evolutionary Considerations. *BioScience*, 57(5), 437-444.
- Blouin, M. S., Phillipsen, I. C., & Mosen, K. J. (2010). Population structure and conservation genetics of the Oregon spotted frog, *Rana pretiosa*. *Conservation Genetics*, 11(6), 2179–2194.
- Blows, M. W., & Hoffmann, A. A. (2005). A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology*, 86(6), 1371–1384.
- Brede, E. G., & Beebee, T. J. (2004). Contrasting population structures in two sympatric anurans: implications for species conservation. *Heredity*, 92(2), 110–117.
- Bushar, L., Maliga, M., & Reinert, H. (2001). Cross-species amplification of *Crotalus horridus* microsatellites and their application in phylogenetic analysis. *Journal of Herpetology*, 79, 53–72.

- Buytaert, W., Célleri, R., De Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., y otros. (2006). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Reviews*, 79, 53–72.
- Caiafa, I. (2013). Evaluación de la variación y estructura genética del *Jurel Caranx Hippos* (*Pisces: Carangidae*) en el Caribe Colombiano. (U. N. Caribe, Ed.) Colombia.
- Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., Cochero, S., Pérez, A., & Bejarano, E. (2013). Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica*, 33(1), 89-98.
- Carvalho, J., Negrinho, R., Azinheiro, S., Garrido, A., Barros, J., & Prado, M. (2018). Novel approach for accurate minute DNA quantification on microvolumetric solutions. *Microchemical Journal*, 540-549.
- Castaño, C. (2002). *Páramos y ecosistemas alto andinos de Colombia en condición Hot spot y Global Climatic Tensor*. Bogota: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia.
- Cleef, A. M. (2013). Origen, evolución, estructura y diversidad biológica de la alta montaña colombiana. En J. Cortés, C. E. Sarmiento, & A. P. Suárez, *Visión socioecosistémica de los páramos y la alta montaña colombiana: memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación de páramos* (págs. 3-21). Bogota: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD). (2010). *Informe de la décima reunión de la conferencia de las partes en el Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Recuperado el 2017, de <https://www.cbd.int>

- Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD). (2017). *Perspectiva mundial sobre la diversidad Biológica*. Recuperado el 2017, de <https://www.cbd.int>
- Corponariño, Corporación Autónoma Regional de Nariño y Corpoamazonia, Corporación para el Desarrollo Sostenible del Sur de la Amazonia. (2002). *Plan de manejo del corredor andino amazónico páramo de Bordoncillo – Cerro de Patascoy, La Cocha, como ecorregión estratégica para los departamentos de Nariño y Putumayo*. Corponariño y Corpoamazonia. Pasto.
- Cortes, O. (2008). Análisis de la variabilidad genética en raza bovina de lidia utilizando información molecular. (*Tesis Doctoral*). Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Crawford, A., & Paz, A. (2017). Anfibios. En M. A. Gonzalez, & A. H, *Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos* (págs. 1-33). Bogota: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Cuervo, L. (2010). Caracterización genética de la población ex situ de *Crocodylus intermedius* (Graves, 1819) en Colombia mediante microsatélites. (*Tesis de Maestría*). Bogota, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Cushman, S. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*, 128(2), 231-240.
- David, L., Blum, S., Feldman, M., Lavi, U., & Hillel, J. (2003). Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 1425–1434.

- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleate acids 2. High sentivity microvolume Nucleic acid quantitation using the NanoDrop 3300. *Journal of visualized experiment*, 45, 1-4.
- Draškić, G., Wangkulangkul, S., Martínez, Í., & Vörös, J. (2018). Strong genetic subdivision in *Leptobrachium hendricksoni* (Anura: Megophryidae) in Southeast Asia. *Amphibia-Reptilia*, 39, 99–111.
- Duellman, W. E., Marion, A. B., & Hedges, S. B. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 1-109.
- Elmer, K. R., Dávila, J. A., & Loughheed, S. C. (2006). Isolation of simple and compound polymorphic tetranucleotide microsatellites for the neotropical leaf litter frog *Eleutherodactylus ockendeni* (Leptodactylidae). *Molecular Ecology Notes*, 6, 891–893.
- Elmer, K. R., Dávila, J. A., & Loughheed, S. C. (2007). Applying new inter-individual approaches to assess fine-scale population genetic diversity in a neotropical frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *Heredity*, 99(5), 506–515.
- Emel, S., & Storfer, A. (2012). A decade of amphibian population genetic studies: synthesis and recommendations. *Conservation genetics*, 13(6), 1685-1689.
- Excoffier, L., & Lischer, H. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Recursos de Ecología Molecular*, 10, 564-567.
- Fasola, E., Ribeiro, R., & Lopes, I. (2015). Microevolution due to pollution in amphibians: A review on the genetic erosion hypothesis. *Environmental Pollution*, 204, 181-190.

- Feral, J. (2002). How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 268, 121-145.
- Fouquet, A., Ledoux, J., Dubut, V., Noonan, B., & Scotti, I. (2012). The interplay of dispersal limitation, rivers, and historical events shapes the genetic structure of an Amazonian frog. *Biological Journal of the Linnean Society*, 106, 356–373.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biology Conservation*, 126(2), 131–140.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A., & McInnes, K. (2004). *A Primer of Conservation Genetics*. New York: Cambridge University Press.
- Freeland, J., Kirk, H., & Petersen, S. (2011). *Molecular Ecology*. Estados Unidos: John Wiley y Sons, Ltd.
- Frost, D. R. (2018). *Amphibian Species of the World*. Recuperado el 2018, de <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>
- Funk, W., Blouin, M. S., Corn, P. S., Maxell, B. A., Pilliod, D. S., Amish, S., y otros. (2005). Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology*, 14, 483–496.
- Galan, M., Cosson, J., Aulagnier, S., Maillard, J., Thévenon, S., & Hewison, A. (2003). Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 142-146.
- García, J. C., Crawford, A. J., Mendoza, A. M., Ospina, O., Cardenas, H., & Castro, F. (2012). Comparative phylogeography of direct-developing frogs (Anura: Craugastoridae: *Pristimantis*) in the southern Andes of Colombia. *PLoS One*, 7(9), e46077.

- Gardner, T., Ribeiro, M., Barlow, J., Sauer, T., Hoogmoed, M., & Peres, C. (2009). The Value of Primary, Secondary, and Plantation Forests for a Neotropical Herpetofauna. *Conservation Biology*, 21(3), 775–787.
- GiL, J. (2015). Identificación de microsátélites polimórficos por ampliación cruzada en anadara similes (mollusca: Arcidae). (Tesis). Cali. Colombia: Universidad del Valle.
- Gómez, A., Pérez, N., & Ochoa, L. (2015). Levantamiento de la Cordillera Oriental de los Andes colombianos. *Apuntes científicos Uniandinos*, 19, 68-73.
- Gonzales, D. (1998). Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista mexicana de Micología*, 14, 1- 21.
- González, D. C. (2010). Ensamblaje de anfibios y su relación con variables del microhábitat en un gradiente potrero- borde- interior de bosque en la Reserva Forestal San José en la laguna protectora y productora de Pedro Palo (Tena, Cundinamarca). (Tesis de Pregrado). Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- González, E. G. (2003). Microsátélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388.
- Grant, W. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89, 415-426.
- Guarnizo, C., & Cannatella, D. (2013). Genetic divergence within frog species is greater in topographically more complex regions. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 51(4), 333-340.

- Guayasamin, J. M., & Arteaga, A. F. (2013). A new species of the *Pristimantis Orestes* group (Amphibia: Strabomantidae) from the high Andes of Ecuador, Reserva Mazar. *Zootaxa*, 3616(4), 345-356.
- Guayasamin, J. M., Castroviejo, S. A., Ayarzagüena, J., Trueb, L., & Vilà, C. (2008). Phylogenetic relationships of glassfrogs (Centrolenidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 574–595.
- Guerrero, J. A. (2017). Aproximación a la identificación de anuros del Complejo de Páramo la Cocha-Patascoy utilizando códigos de barras de ADN. (*Tesis de Pregrado*). Colombia: Universidad de Nariño.
- Hale, J., Heard, G., Smith, K., Blacket, M., Austin, J., & Melville, J. (2011). Microsatellite loci for the endangered growling grass frog (*Litoria raniformis*), with cross amplification in other Australian frog species. *Conservation Genetics Resources*, 3, 593–595.
- Hall, T. (2005). Bioedit sequence alignmet editor. Version 7.0.0.
- Halverson, M. A., Skelly, D. K., & Caccone, A. (2006). Inbreeding Linked to Amphibian Survival in the Wild but Not in the Laboratory. *Journal of Heredity*, 97(5), 499-507.
- Hedges, S. B., Duellman, W. E., & Heinicke, M. P. (2008). New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737, 1-182.
- Heinicke, M. P., Duellman, W. E., & Hedges, S. B. (2007). Major Caribbean and Central American frog faunas originated by oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10092–10097.

- Heinicke, M., Lemmon, A., Lemmon, E., McGrathc, K., & Hedges, S. (2018). Phylogenomic support for evolutionary relationships of New World direct-developing frogs (Anura: Terraranae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 118, 145–155.
- Helguera, M., & Echenique, V. (2003). Biotechnology in wheat breeding. *Advances In Plant Physiology*, 7.
- Herguedas, A. (2009). Flujo genético, demografía y variabilidad genética en una conífera mediterránea emblemática, el pino negral o rodeno. (*Tesis Doctoral*). Palencia, España: Universidad de Valladolid.
- Hoffman, E., Schueler, F., & Blouin, M. (2204). Effective population sizes and temporal stability of genetic structure in *Rana pipiens*, the northern leopard frog. *Evolution*, 58(11), 2536–2545.
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., y otros. (2014). *Los páramos andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo*. Quito, Ecuador: UICN.
- Höglund, J. (2009). *Evolutionary conservetion genetics*. Estados Unidos: Oxford University Press.
- Hooghiemstra, Wijninga, V., & Cleef, M. (2006). The Paleobotanical Record of Colombia : Implications for Biogeography and Biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93(2), 297–324.
- Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H., & Kuzmin, S. L. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404, 752-755.

- Huang, L., Zhao, M., Luo, Z., & Wu, H. (2016). Allelic Polymorphism, Gene Duplication and Balancing Selection of MHC Class IIB Genes in the Omei Treefrog (*Rhacophorus omeimontis*). *Asian Herpetological Research*, 7, 1-11.
- Hudson, R., Slatkin, M., & Maddison, W. (1992). Estimation of levels of gene flow from dna sequence data. *Genetics*, 132, 583–9.
- Instituto Alexander von Humboldt (IAvH). (2016). *Recomendación para la delimitación, por parte del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, del Complejo de Páramos La Cocha - Patascoy a escala 1:25.000*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- International Union for Conservation of Nature (IUCN). (2017). *Global Amphibian Assessment*. Recuperado el 2017, de <http://www.globalamphibians.org>
- Jaramillo, M. F. (2014). *Filogenética y genética de poblaciones de Potos flavus (Carnivora: Procyonidae) con secuencias de ADN mitocondrial*. (Tesis maestría), Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Jennekens, I., Meyer, J., Hörstgen, G., May, B., Debus, L., Wedekind, H., y otros. (2001). A fixed allele at microsatellite locus LS-39 exhibiting species-specificity for the black caviar producer *Acipenser stellatus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 17, 39–42.
- Jiménez, P., & Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Investigación agraria. *Sistemas y recursos forestales*, 9(2), 237-248.
- Kahilainen, A., Puurtinen, M., & Kotiah, J. S. (2014). Conservation implications of species–genetic diversity correlations. *Global Ecology and Conservation*, 2, 315–323.
- Kantartzi, S. (2013). *Microsatellites: Methods and Protocols*. Estados Unidos: Human Press.

- Knopp, T., & Merila, J. (2009). Microsatellite variation and population structure of the moor frog (*Rana arvalis*) in Scandinavia. *Molecular Ecology*, 18, 2996–3005.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., y otros. (2007). Clustal W y Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Larramendy, M., & Soloneski, S. (2016). *Nucleic Acids: From Basic Aspects to Laboratory Tools*. ExLi4EvA.
- Lewin, B. (2004). *Genes VIII*. New York, Estados Unidos: Pearson Prentice Hall.
- Linacre, A., & Tobe, S. (2011). *Wildlife DNA Analysis, Applications in Forensic Science*. Estados Unidos: Wiley-Blackwell.
- Lips, K. R. (1998). Decline of a Tropical Montane Amphibian Fauna. *Conservation Biology*, 12(1), 106-117.
- Luquet, E., Garner, T., Léna, J., & Bruel, C. (2012). Genetic erosion in wild populations makes resistance to a pathogen more costly. *Evolution*, 5(1), 217-231.
- Lynch, J. D. (1981). *Leptodactylid frogs of the genus Eleutherodactylus in the Andes of Northern Ecuador and adjacent Colombia*. Lawrence, Estados Unidos: Miscellaneous Publications.
- Lynch, J. D., & Suárez, A. (2002). Análisis biogeográfico de los anfibios paramunos. *Caldasia*, 24, 471-480.
- Lynch, M., & Crease, T. (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution*, 7, 377–394.
- Mable, B., Alexandrou, M., & Taylor, M. (2011). Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. *Journal Zoology*, 284(3), 151-182.

- Mantel, N. (1967). The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.
- Mantilla, J. R. (2000). *Genética Molecular, Manual de Laboratorio. Curso Teórico – Práctico “Fundamentos Básicos de Genética Molecular y Genotipificación”*. Universidad Nacional de Colombia.
- Marín, C., Restrepo, A., & Daza, J. (2016). *Evolución en islas tropicales de alta montaña: filogeografía comparada de anfibios paramunos. En Asociación Colombiana de Herpetología 2017*. Recuperado el 2017, de Libro de resúmenes. I Congreso Colombiano de Herpetología: Conocer para conservar en un país biodiverso: www.acherpetologia.org
- Markert, J. A., Champlin, D. M., Gutjahr, R., Grear, J. S., Kuhn, A., & McGreevy, T. J. (2010). Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1-13.
- Marsh, D. M., & Trenham, P. C. (2001). Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conservation Biology*, 15(1), 40–49.
- Martinazzo, L. (2011). *Sistemática, filogenia y filogeografía de las ranas patagónicas *Atelognathus patagonicus* y *Atelognathus praebasalticus**. Universidad Nacional de la Plata, Argentina: (Tesis de doctorado).
- McCoy, E. D. (1994). "Amphibian decline": a scientific dilemma in more ways than one. *Herpetológica*, 50(1), 98-103.
- McPherson, M., & Møller, S. (2006). *PCR*. New York, Estados Unidos: Taylor & Francis Group.
- Mendez, J. (2014). Diversidad de anfibios y reptiles en hábitats altoandinos y paramunos de la cuenca del río Fúquene, Cundinamarca, Colombia. *Biota Colombiana*, 15(1), 94-103.

- Meredith, H. M., VanBuren, C. S., & Antwis, R. E. (2016). Making amphibian conservation more effective. *Conservation Evidence*, 13, 1-5.
- Monsen, K. J., & Blouin, M. S. (2003). Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear-mitochondrial discordance. *Molecular Ecology*, 12, 3275–3286.
- Morales, M., Otero, J., Van der Hammen, T., Torres, A., Cadena, C., Pedraza, C., y otros. (2007). *Atlas de páramos de Colombia*. Bogotá, Colombia: Grey Comercializadora Ltda.
- Moresco, R., Maniglia, T., Oliveira, C., & Margarido, V. (2013). The pioneering use of ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) in Neotropical anurans: preliminary assessment of genetic diversity in populations of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Leiuperidae). *Biological Research*, 46(1), 53-7.
- Mueses, J. J. (2005). Fauna anfibia del Valle de Sibundoy, Putumayo-Colombia. *Caldasia*, 27, 229-242.
- Nei, M. (1982). Evolution of human races at the gene level. En B. Bohhe, P. Cohen, & R. Goodman, *Human Genetics, Part A: The Unfolding Genome* (págs. 167–181). New York, Estados Unidos: Alan R. Liss.
- Nei, M. (1988). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Estados Unidos: Columbia University Press.
- Nei, M., & Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Genetics*, 76(10), 5269-5273.
- Nei, M., & Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97(1), 145-63.

- O'Grady, J. J., Brook, B. W., Reed, D. H., Balloua, J. D., Tonkync, D. W., & Frankham, R. (2006). Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biological Conservation*, *133*(1), 42–51.
- Obradovic, J., Jurisic, V., Tosic, N., Mrdjanovic, J., Perin, B., Pavlovic, S., y otros. (2013). Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *27*(6), 487–493.
- Padial, J. M., Grant, T., & Frost, D. R. (2014). Molecular systematics of terraranas (Anura: Strabomantidae) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa*, *3825*(1), 1-132.
- Palo, J. U., Schmeller, D. S., Laurila, A., Primmer, C. R., Kuzmins, S. L., & Merila, J. (2004). High degree of population subdivision in a widespread amphibian. *Molecular Ecology*, *13*(9), 2631–2644.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., & Grabowski, G. (1991). *The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0*. Publicacion privada, University of Hawaii, Honolulu.
- Peacock, M. M., Beard, K. H., O'Neill, E. M., Kirchoff, V. S., & Peters, M. B. (2009). Strong founder effects and low genetic diversity in introduced populations of Coqui frogs. *Molecular Ecology*, *18*(17), 3603-3615.
- Pimm, S. L., Jenkins, C. N., Abell, R., Brooks, T. M., Gittleman, J. L., Joppa, L. N., et al. (2014). The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science*, *344*(6187), 1246-752.
- Piñero, D., Caballero, J., Cabrera, D., Canteros, C. E., Casas, A., Castañeda, A., et al. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la

- biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In J. Soberón, G. Halffter, & J. Llorente, *Capital Natural de México, vol I: Conocimiento actual de la biodiversidad* (pp. 437-494). México: Conabio.
- Posada, D., & Crandall, K. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecology Evolution*, *16*(1), 37-45.
- Potvin, D. A., Parris, K. M., Smith, K. L., Keely, C. C., Bray, R. D., Hale, J., et al. (2016). Genetic erosion and escalating extinction risk in frogs with increasing wildfire frequency. *Journal of Applied Ecology*, (versión online) 1365-2664. doi: 10.1111/1365-2664.12809.
- Rauch, E. M., & Bar-Yam, Y. (2005). Estimating the total genetic diversity of a spatial field population from a sample and implications of its dependence on habitat area. *Proceedings National Academic of Science*, *102*, 9826-9829.
- Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, *17*(1), 230-237.
- Regitano, L. C. (2001). Introdução à análise de marcadores moleculares. En L. & Regitano, *Biología molecular aplicada à produção animal*. Brasília, Brasi: EMBRAPA.
- Rentaría, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología molecular*. Coyoacán, Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Reyes, J. P., Yáñez-Muñoz, M. H., Cisneros-Heredia, D. F., & Ramírez, S. (2010). Una nueva especie de rana *Pristimantis* (Terrarana: Strabomantidae) de los bosques nublados de la cuenca alta del río Pastaza, Ecuador. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, *2*(3), 78-82.
- Rodzen, J. A., & May, B. (2005). Inheritance of microsatellite loci in the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genome*, *45*, 1064-1076.

- Ron, S. R., Coloma, L. A., Guayasamin, J. M., & Yáñez-Muñoz, M. H. (2012). *Amphibia Web Ecuador*. Recuperado el 2017, de Ecuador, Recuperado de:
<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios>
- Roux, K. (2009). Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 4(4), doi:10.1101/pdb.ip66.
- Rozas, J., Sánchez, J., Messenguer, X., & Rozas, R. (2010). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. New York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarmiento, C., Cadena, C., Sarmiento, M., Zapata, J., & León, O. (2013). *Aportes a la conservación estratégica de los páramos de Colombia: actualización de la cartografía de los complejos de páramo a escala 1:100.000*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Schiebelhut, L., Abboud, S., Gómez, L., Swift, H., & Dawson, M. (2016). A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. *Molecular Ecology Resources*, 17(4), 721-729.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers- just a matter of fashion? *Natural Reviews Genetics*, 5(1), 63-9.
- Scribner, K. T., & Pearce, J. M. (2000). Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic level. En A. Baker, *Molecular Methods in Ecology* (págs. 235–271). London: Blackwell Science Limited.

- Session, A., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J., Toyoda, A., Takahashi, S., y otros. (2016).
Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538(7625), 336-343.
- Shao, Z., Lek, S., & Chang, J. (2005). Complex mutation at a microsatellite locus in sturgeons:
Acipenser sinensis, *A. schrenckii*, *A. gueldenstaedtii* and *A. baerii*. *Journal of Applied
Ichthyology*, 21, 2–6.
- Sharma, U., & Gupta, D. P. (2013). A study on population genetics and molecular markers with
its applications in conservation of wildlife. *International Journal of Pharma and Bio
Sciences*, 4(3), 287 – 298.
- Simmons, J. E. (1987). Herpetological collecting and collections management. Society for the
Study of Amphibians and Reptiles. *Herpetological*, 16, 1-70.
- Sistema de información sobre biodiversidad de Colombia (SIB). (2017). Recuperado el 2018, de
Sistema de información sobre biodiversidad de Colombia:
<http://www.sibcolombia.net/web/sib/cifras>
- Slatkin, M. (1994). Linkage disequilibrium in growing and stable populations. *Genetics*, 137(1),
331-336.
- Smith, J. M. (1999). *Evolutionary Genetics, Second Edition*. Estados Unidos: Oxford University
Press.
- Solarte, M. E., Armero, M., Narváez, G., Ortíz, E., Salas, V. F., & Leonel, H. F. (2015). *Estudio
Técnico, Económico, Social y Ambiental para la Identificación y Delimitación a escala
1:100.000 del Complejo de Páramos La Cocha-Patascoy*. Instituto Humboldt –
Universidad de Nariño: Convenio de Cooperación No. 14-13-014-166CE.
- Sosa, P., Batista, F., González, M. A., & Bouza, N. (2002). La Conservación Genética de las
Especies Amenazadas. En A. Bañares, *Biología de la Conservación de Plantas*

- Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación* (págs. 133-160).
Madrid, España: Organismo Autónomo de Parques Nacionales.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., et al. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, *306*, 1783–1786.
- Urban, M. C. (2015). Accelerating extinction risk from climate change. *Science*, *348*(6234), 571-573.
- Urbina, J. N. (2011). Gradientes andinos en la diversidad y patrones de endemismo en anfibios y Reptiles de Colombia: Posibles respuestas al cambio climático. Universidad Militar Nueva Granada. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *7*(1), 74 – 91.
- Valadez, E., Kahl, G., Rubluo, A., & Arreguín, R. (2005). Optimización de las huellas de DNA obtenidas con RAPDS y MP-PCR mediante la técnica RAMPNR. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *11*(2), 351-356.
- Van Der Hammen, T. (1974). The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. *Journal of Biogeography*, *1*(1), 3-26.
- Vargas, O., & Pedraza, P. (2004). *Parque Natural Chigaza*. Bogotá, Colombia: Gente Nueva Editorial.
- Vela, M. (2014). Variación genética de *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Villesen, P. (2007). FaBox: an online toolbox for fasta sequences. En *Molecular Ecology Notes* (Vol. 7, págs. 965–968).

- Vos, C. C., Antonisse-de, A. G., Goedhart, P. W., & Smulders, M. J. (2001). Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity*, 86, 598–608.
- Wagner, B., Waiteand, D., & Taylor, T. (2015). Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Frontiers in Microbiology*, 6(130), 1-11.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants. Principles, Methods and Applications*. Estados Unidos: Taylor y Francis group.
- Welsh, A., & May, B. (2006). Development and standardization of disomic microsatellite markers for lake sturgeon genetic studies. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 337–344.
- Wilson, K., & Walker, J. (2009). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Estados Unidos: Cambridge University Press.
- Winans, G. A. (1989). Genetic variability in Chinook salmon stocks from the Columbia River Basin. *North American Journal of Fisheries Management*, 9(1), 47-52.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28(2), 114-138.
- Yáñez, M., Almeida, D., Castro, F., Coloma, L., Ron, S., & Bolívar, W. (2010). *Pristimantis buckleyi*. Recuperado el 2017, de www.iucnredlist.org
- Young, B. E., Lips, J. K., Reaser, R., Ibáñez, A. W., Salas, J. R., Cedeño, L. A., y otros. (2001). Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology*, 15(5), 1213-1223.
- Yuliatmy, P., Roesma, D., & Tjong, D. (2016). Genetic variation of *Rana parvaccola* (Inger, Stuart and Iskandar, 2009) based on DNA microsatellites in West Sumatra. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(4), 1068-1071.

Zhang, K., & Rosenberg, N. (2007). On the Genealogy of a Duplicated Microsatellite. *Genetics*, 177(4), 2109-2122.

Anexos

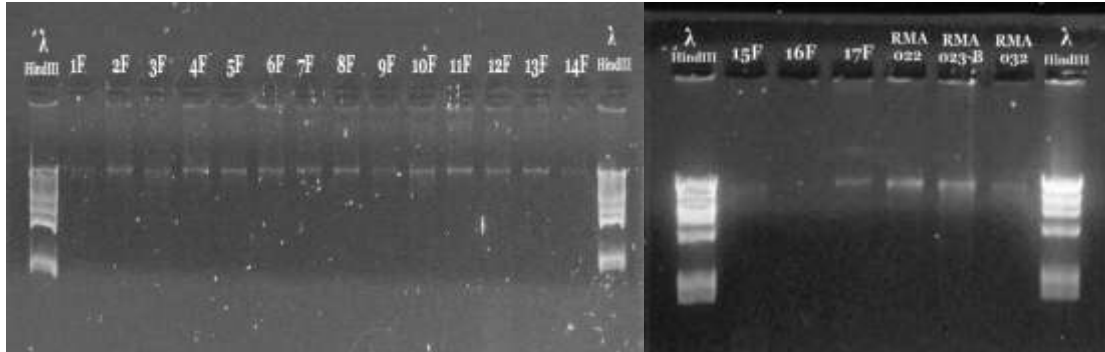
Anexo 1. Cuantificación y calidad de ADN.

Localidad	Muestra	Peso (mg)	Concentración (ng/ul)	A 260/280	A 230/260	Rendimiento (µg ADN/mg material de partida)
Páramos de Puerres	BUC001	4,5	400,6	2,0	2,02	89,02
	BUC002	14,7	1330,6	1,9	1,29	90,52
	BUC003	10	656,2	2,0	1,99	65,62
	BUC004	13,5	122,0	2,0	1,7	9,04
	BUC005	9	929,7	1,9	1,56	103,30
	BUC006	18,6	1534,9	1,9	1,81	82,52
	BUC007	20	1473,0	1,9	1,75	73,65
	BUC008	13,9	542,5	2,0	1,84	39,03
	BUC009	18,6	1229,1	1,8	1,35	66,08
	BUC0010	7,6	950,4	1,9	1,82	125,05
	BUC0011	14,8	600,7	2,0	1,79	40,59
	BUC0012	12,8	347,1	1,9	1,79	27,12
Páramos azonales de Santa Isabel	BUC016	2,6	42,6	1,7	0,85	16,38
	BUC017	2,5	67,2	1,9	1,47	26,88
	BUC018	3,8	113,2	1,6	0,84	29,79
	BUC019	3,5	44,4	1,6	0,7	12,69
	BUC020	1,2	106,5	1,6	1,04	88,75
	BUC021	3,6	57,4	1,7	1,05	15,94
	BUC022	7,5	166,9	1,6	0,85	22,25
	BUC023	3,3	41,9	1,7	0,44	12,70
	BUC024	3,4	21,9	1,04	0,76	0,26
	BUC025	3,8	87,9	1,6	0,66	23,13
	BUC026	5,7	242,6	1,7	0,96	42,56
	BUC027	2,8	111,7	1,7	1,02	39,89
	BUC028	1,7	78,9	1,7	0,95	46,41
	BUC029	1,8	90,4	1,7	0,81	50,22
	BUC030	1,6	86,6	2,0	1,93	54,13
	BUC031	7,4	98,7	1,7	0,93	13,34
BUC032	4,3	628,0	1,5	0,54	146,05	
Páramo El Fraile	RMA 022	43	216,0	1,8	0,94	5,02
	RMA 023	47	601,0	1,5	0,66	12,79
	RMA 024	53	67,0	1,5	0,57	-1,26

RMA 032	52	568,2	2,0	1,5	10,93
RMA 033	37	21,4	1,09	0,35	0,06
BUC041	6,9	282,6	1,9	1,48	40,96
BUC042	5,4	257,7	2,0	1,84	47,72
BUC043	2,3	153,2	2,0	2,1	66,61
BUC044	1,2	69,4	2,0	1,68	57,83
BUC045	0,8	37,5	1,9	1,64	46,88
BUC046	0,8	123,6	1,9	1,98	154,50
BUC047	0,9	71,7	1,9	1,94	79,67
BUC048	0,4	36,6	2,0	1,63	91,50
BUC049	0,2	21,4	1,8	2,03	107,00
BUC050	1,9	49,4	1,9	1,98	26,00
BUC051	0,8	114,5	2,0	1,81	143,13
BUC052	0,7	107,5	2,0	1,7	153,57
BUC053	0,2	82,5	2,0	1,71	412,50
BUC054	8,7	622,7	2,0	1,53	71,57
BUC055	0,8	120,2	2,0	1,74	150,25
BUC056	4,5	407,2	1,9	1,69	90,49
BUC057	11,1	725,5	2,0	1,76	65,36
<hr/>					
MAA1049	51	301,2	1,5	0,73	5,90
BCQ 1156	50	519,3	1,8	0,86	10,39
BCQ 1157	45	584,9	1,8	0,93	12,99
BUC061	3,3	237,9	1,6	0,77	72,09
BUC062	3,9	156,8	1,8	1,67	40,21
Páramo BUC063	1,7	42,3	1,7	1,06	24,88
Cerro de BUC064	2,4	31,8	2,0	1,35	13,25
Morasurco BUC065	6,5	333,6	1,7	1,8	51,32
BUC066	3	190,8	1,8	1,45	63,60
BUC067	4,6	175,8	2,0	2,29	38,22
BUC068	3,8	159,8	2,0	2,03	42,05
BUC069	1,8	35,6	1,7	2,37	19,78
BUC070	2,7	51,2	1,7	2,04	18,96

Anexo 2. Muestras de ADN diluidas 10ng/μl. de A. Páramo el Fraile, B. Cerro de Morasurco y C. Páramos azonales de Santa Isabel.

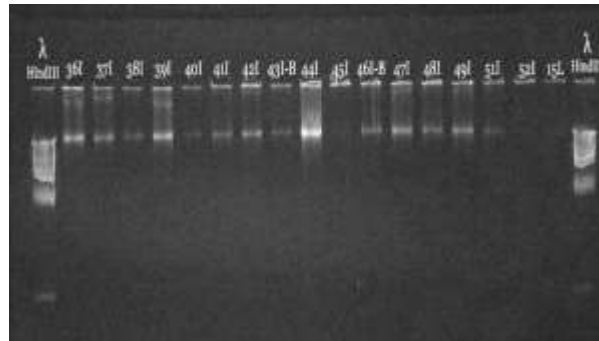
A



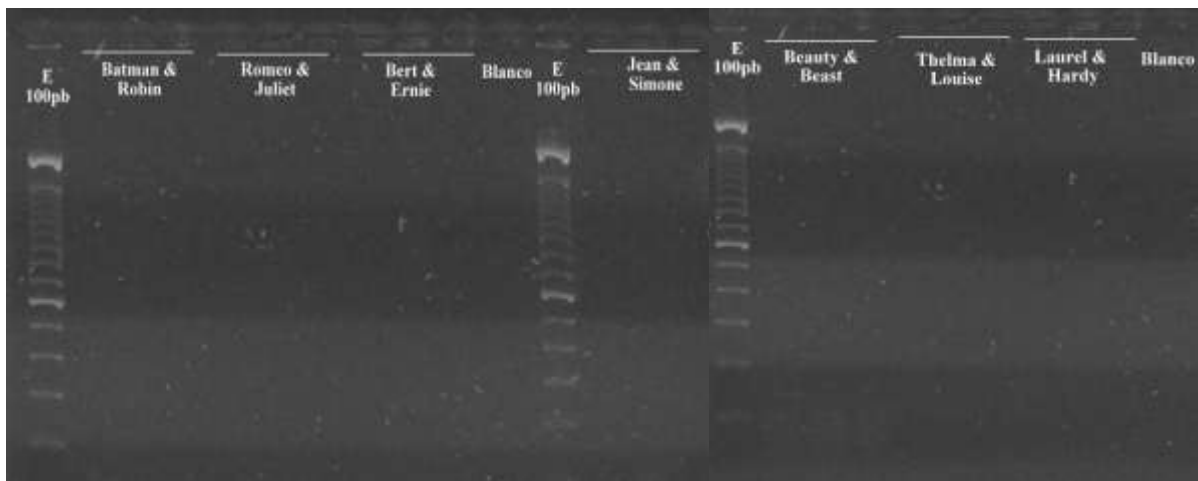
B



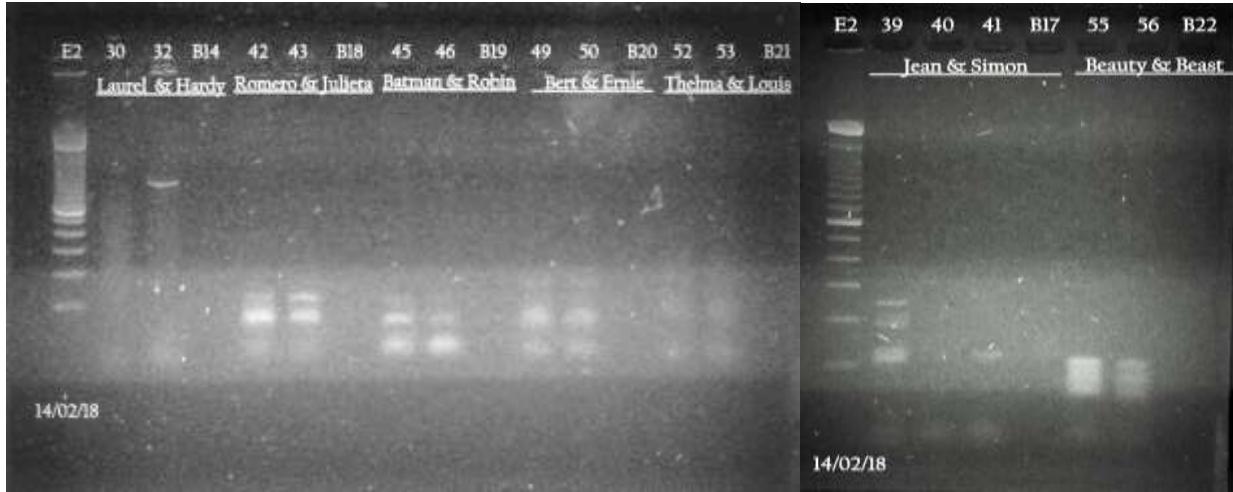
C



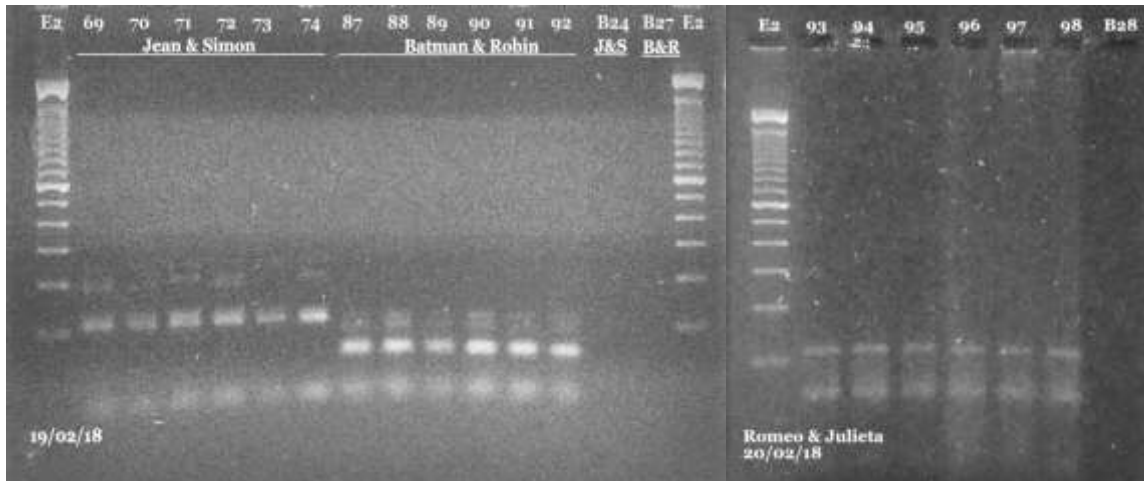
Anexo 3. Amplificación de los siete microsatélites bajo las condiciones sugeridas por Elmer et al. (2006).



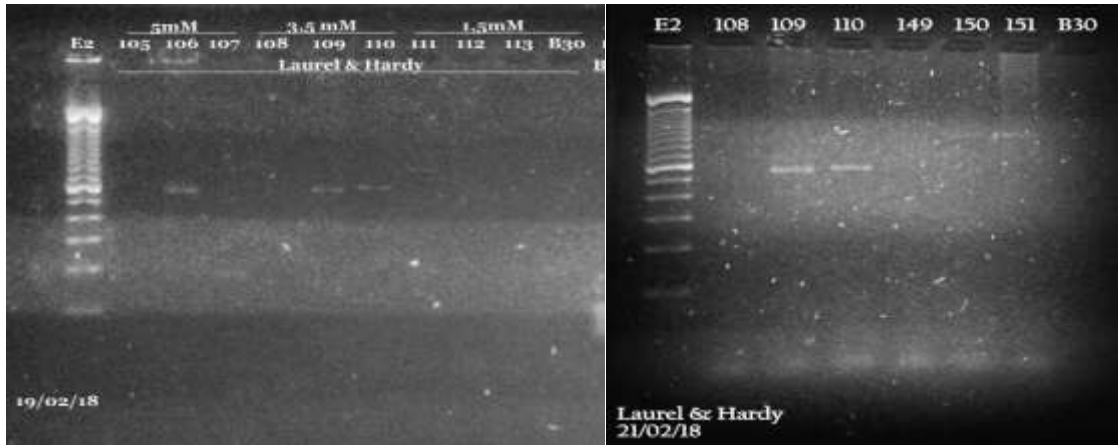
Anexo 4. Amplificación de los siete microsatélites bajo las condiciones requeridas por la TaqPolimerasa.



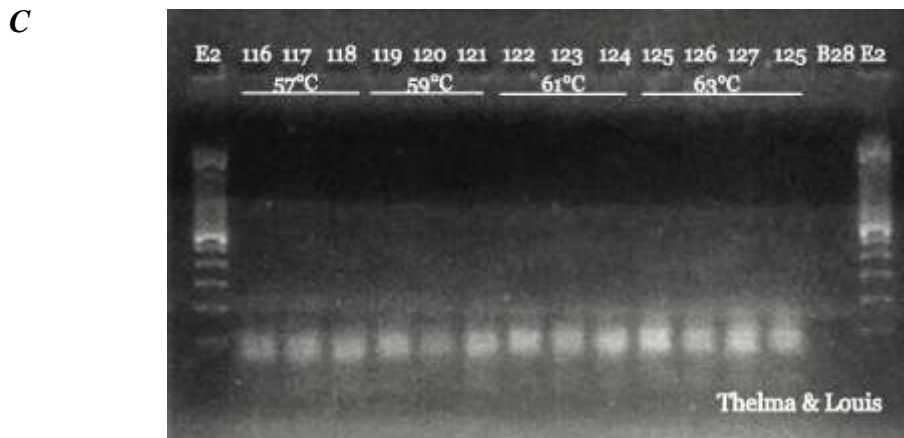
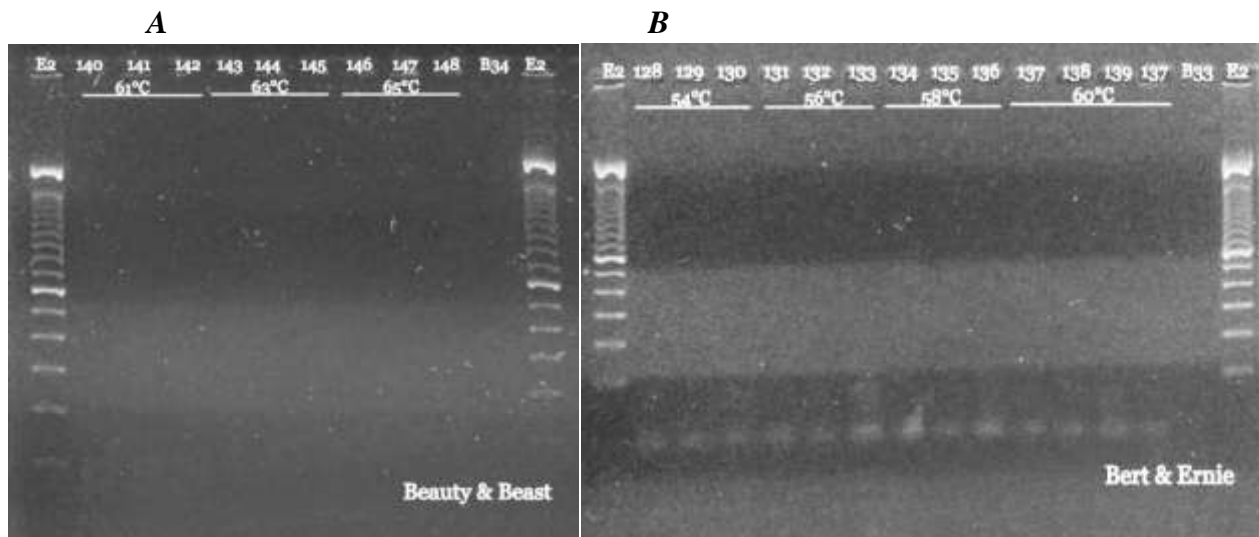
Anexo 5. Amplificación de los microsatélites Batman & Robin, Romeo & Juliet y Jean & Simone bajo las condiciones requeridas por la TaqPolimerasa aumentando el número de muestras.



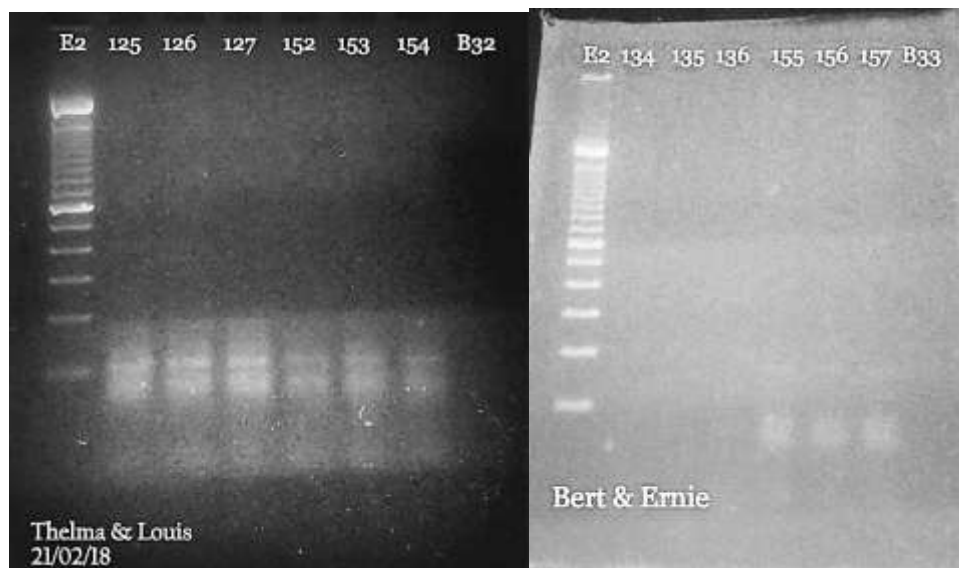
Anexo 6. Modificación de la concentración de cloruro de magnesio para el microsátélites Laurel & Hardy.



Anexo 7. Prueba de gradiente de temperatura A) Beauty & Beast, B) Bert & Ernie y C) Thelma & Louise.



Anexo 8. Amplificación de los microsatélites Thelma & Louise (63°C) y Bert & Ernie (58°C), aumentando el número de muestras.



Anexo 9. Análisis de Blast de las secuencias del gen COI de *P. buckelyi*.

Muestra	Especie	%cubierta de consulta	Valor-e	% identidad
CB-001	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-002	<i>P. hectus</i>	95	2e-175	84
CB-003	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-004	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-005	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	85
CB-006	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-007	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-008	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	85
CB-009	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	86
CB-010	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-011	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-012	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-016	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-017	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-018	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	85
CB-019	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-020	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-021	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-022	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	86
CB-023	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	86
CB-024	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86

CB-026	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-027	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-028	<i>P. jubatus</i>	96	0,0	86
CB-029	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-030	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-032	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-039	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	85
CB-041	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	85
CB-042	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	85
CB-043	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-046	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-047	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	86
CB-048	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-049	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	86
CB-051	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	86
CB-052	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-053	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-054	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-056	<i>P. jubatus</i>	92	0,0	86
CB-057	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	86
CB-058	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-061	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	85
CB-062	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	85
CB-063	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-064	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-065	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86
CB-066	<i>P. cf. mendax</i>	94	7e-160	83
CB-067	<i>P. jubatus</i>	93	0,0	86
CB-068	<i>P. cf. mendax</i>	94	7e-160	83
CB-069	<i>P. jubatus</i>	95	0,0	85
CB-070	<i>P. jubatus</i>	94	0,0	86