

APROXIMACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN DE ANUROS DEL COMPLEJO DE PÁRAMO
LA COCHA-PATASCOY UTILIZANDO CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN

JUAN ALEJANDRO GUERRERO CUPACÁN

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2017

APROXIMACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN DE ANUROS DEL COMPLEJO DE PÁRAMO
LA COCHA-PATASCOY UTILIZANDO CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN

PRESENTADO POR:
JUAN ALEJANDRO GUERRERO CUPACÁN

ASESORES:
SONIA YANETH MAHECHA VAHOS
M.Sc, Genética

MAILYN ADRIANA GONZÁLEZ HERRERA
Ph.D, Ecología, Evolución y Biodiversidad

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo
Modalidad Pasantía

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2017

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas de los autores”

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Sonia Yaneth Mahecha Vahos, M.Sc.
Firma del asesor de trabajo de grado

Mailyn Adriana González Herrera, Ph.D
Firma del asesor de la pasantía

Firma del jurado

Firma del jurado

San Juan de Pasto, Junio 15 de 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me ha permitido avanzar con motivación en este camino acompañado de logros y nuevos propósitos.

A mi familia y su apoyo incondicional que me impulso siempre a mejorar e hizo posible culminar esta etapa de mi vida.

A mi directora de pasantía, Doctora Mailyn Adriana González Herrera, Ph.D, por acogerme y permitirme desarrollar mi práctica profesional en el laboratorio de genética de la conservación del Instituto Alexander von Humboldt.

A mi asesora, Magíster Sonia Yaneth Mahecha Vahos, M.Sc, por su acompañamiento, enseñanzas y sugerencias en el desarrollo de mi pasantía e investigación. Además de ser parte de mi formación como Biólogo con motivación por la evolución y la biología molecular.

Al Grupo de Investigación en Biología de Páramos y Ecosistemas Andinos, de la Universidad de Nariño, liderado por la Doctora Maria Elena Solarte Cruz, Ph.D., por permitirme ser parte de sus líneas de investigación, en las cuales encontré apoyo incondicional durante el desarrollo de la investigación y por ser el vínculo con el Instituto Alexander von Humboldt durante el desarrollo de mi pasantía.

Al Grupo de Investigación de Herpetología de la Universidad de Nariño, liderado por Belisario Cepeda Quilindo, Ph.D (c) por la colaboración brindada en el acceso a la información y muestras utilizadas en el desarrollo de esta investigación.

A los profesionales y compañeros del laboratorio de genética de la conservación del Instituto Alexander von Humboldt, Eduardo Tovar por su supervisión y enseñanzas durante el desarrollo de mi pasantía, y a María Estefanía López por su apoyo.

A los laboratorios de biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por su colaboración en el préstamo de equipos.

A la Universidad de Nariño y en su representación a mis profesores que a lo largo de la carrera transmitieron sus conocimientos y motivaron mi formación como investigador.

Al instituto Alexander von Humboldt por permitirme complementar mi formación profesional en sus instalaciones junto a otros investigadores.

A mis compañeros de carrera y todas aquellas personas que hicieron parte de mi formación como biólogo, por todos los momentos vividos.

DEDICATORIA

A mis padres Liliana Cecilia Cupacán Lasso y Juan Ignacio Guerrero Benavides, quienes en su infinito amor me han apoyado incondicionalmente e impulsado a ser un mejor ser humano y profesional. Por su paciencia en la enseñanza de la vida y ejemplo, que me ha hecho admirarlos y amarlos, buscando impregnar lo mejor de cada uno en mi diario vivir. Por sus esfuerzos y confianza, mi entrega y mis triunfos también son suyos.

A mis hermanos, Daniela y Nicolás, quienes me han motivado a ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación. Por su amor y apoyo que han llenado mi vida de alegría.
Todo cuanto se sueña se puede lograr con voluntad y constancia.

A toda mi familia,

RESUMEN

Los procesos de extinción acelerados en grupos animales como los anfibios, aunados a los límites, reconocidos actualmente, de la taxonomía tradicional y la necesidad urgente de clasificar correctamente las especies en zonas estratégicas como los Páramos, donde la identificación de anuros, mediante morfología es compleja, evidencia un problema que debe ser considerado desde el punto de vista de otras disciplinas que complementen esta labor, con el fin de obtener información más clara y precisa de la riqueza en una determinada zona de estudio.

El presente trabajo trató esta problemática mediante la aplicación de una técnica molecular propuesta en 2003 conocida como códigos de barras de ADN, en anuros del complejo de Páramos La Cocha-Patascoy, con el fin de evaluar su aplicación en la identificación de las especies, como complemento a la taxonomía basada en morfología. La técnica se abordó desde la fase de extracción y amplificación de los genes COI y 16S rRNA, que representaron los códigos de barras de ADN de 12 especies de anuros distribuidos en tres complejos del distrito de Páramos Nariño-Putumayo. Se realizaron análisis de divergencia genética, relaciones filogenéticas y distribución geográfica, con los cuales se determinó el éxito de identificación de las especies.

Se obtuvo ADN de alta pureza con el protocolo de extracción empleado, con algunas excepciones por posible contaminación con reactivos y el porcentaje de amplificación fue del 87,3% y 98,7% de las muestras, para COI y 16S rRNA, respectivamente. Inicialmente, no se evidenció la presencia de un umbral o *barcode gap* general para la diferenciación de especies a partir de las distancias genéticas intraespecíficas e interespecíficas, por el solapamiento de las mismas en dos casos que involucraron a *Hypodactylus elassodiscus* e *H. sp* y *Pristimantis*

huicundo y *P. ortizi*, pero si se observan umbrales para especies independientemente. Se propone una hipótesis en cada caso sobre la asignación taxonómica *a priori* mediante morfología. Además, se plantea una hipótesis sobre la variabilidad intraespecífica con base en la distribución y la historia geológica de los andes.

Finalmente, se concluye que los códigos de barras de ADN son una herramienta útil y de gran valor taxonómico como complemento en inventarios de biodiversidad, por lo tanto se recomienda su implementación, particularmente en grupos animales de taxonomía compleja como los anuros de los Páramos.

Palabras clave: Anfibios, Nariño, Páramo, taxonomía.

ABSTRACT

Accelerated extinction processes in animal groups such as amphibians, coupled with the currently recognized limits of the traditional taxonomy and the urgent need to correctly classify the species in strategic areas such as the paramos, where the identification of anurans, through morphology is complex, as evidence of a problem that must be considered from the point of view of other disciplines that complement this work, with the purpose of obtaining clearer and more precise information of richness in a particular area.

The present work addressed this issue through the application of a molecular technique proposed in 2003 known as barcodes of DNA or *barcoding*, in anurans from La Cocha-Patascoy paramo complex, in order to assess its application in the identification of species, as a complement to the taxonomy based on morphology. The technique was addressed from the extraction and amplification phase of genes COI and 16S rRNA, which represented the barcodes of DNA of 12 frog species distributed in three complexes of the district of paramos from Nariño-Putumayo. Analyzes were undertaken of genetic divergence, phylogenetic relationships and geographical distribution, with which the success of identification of the species was determined.

High-purity DNA was obtained with the extraction protocol employed, with some exceptions for possible contamination with reagents and the percentage of amplification was 87.3% and 98.7% of the samples, for COI and 16S rRNA, respectively. Initially, the presence of a threshold or *barcode gap* for the differentiation of species from intraspecific and interspecific genetic distances was not evidenced by the overlapping of the same in two cases involving *Hypodactylus elassodiscus* and *H. sp* and *Pristimantis huicundo* and *P. ortizi*, but there were thresholds for

species independently. An hypothesis is proposed in each case on the *a priori* taxonomic allocation by morphology. In addition, an hypothesis was presented about intraspecific variability based on the distribution and geological history of the Andes.

Finally, it is concluded that the DNA barcodes are a useful tool with a great taxonomic value as a complement in biodiversity inventories, therefore its implementation is recommended, particularly in animal groups with taxonomic complexity such as the anurans of the paramos.

Key words: amphibians, Nariño, paramo, taxonomy.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	18
2.	JUSTIFICACIÓN	22
3.	MARCO TEÓRICO	26
3.1.	La clase amphibia (Linnaeus, 1758)	26
3.1.1.	El orden Anura (Fischer von Waldheim, 1813)	26
3.1.2.	Características generales de los anuros	27
3.1.3.	Los anuros de alta montaña	28
3.2.	La taxonomía tradicional, molecular e integrativa	29
3.3.	Marcadores moleculares	32
3.3.1.	Clasificación	33
3.3.2.	El ADN mitocondrial (ADNmt)	33
3.3.3.	Los códigos de barras de ADN (<i>Barcoding</i>)	36
3.3.3.1.	Marcadores moleculares de ADN mitocondrial para códigos de barras de ADN	39
3.3.3.2.	Marcador molecular Citocromo c Oxidasa subunidad 1 (COI)	40
3.3.3.3.	Marcador molecular 16S rRNA	41
3.4.	Estudios de <i>barcoding</i> en anfibios	42
4.	OBJETIVOS	52
4.1.	Objetivo general	52
4.2.	Objetivos específicos	52
5.	METODOLOGÍA	53
5.1.	Obtención de muestras	53
5.2.	Extracción de ADN	56
5.3.	Amplificación por PCR y secuenciación	57
5.4.	Procesamiento de los códigos de barras de ADN	60
5.5.	Análisis de divergencia genética	60
5.6.	Análisis de agrupamiento	61

	13
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
6.1. Extracción de ADN	63
6.2. Amplificación por PCR de los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA	64
6.3. Obtención de los códigos de barras de ADN	75
6.4. Análisis de códigos de barras de ADN	76
CONCLUSIONES	105
RECOMENDACIONES	108
BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXOS	129

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de especies por familia de anuros distribuidas en Colombia.	27
Tabla 2. Tamaño del ADNmt en diferentes organismos.	35
Tabla 3. Variación de las características del ADNmt entre diferentes taxa.	35
Tabla 4. Taxonomía de las especies de anuros consideradas para este estudio.	54
Tabla 5. Cebadores para la amplificación de los genes COI y 16S rRNA.	58
Tabla 6. Condiciones de termociclado para la amplificación de los genes COI y 16S rRNA.	58
Tabla 7. Mix de PCR para la amplificación de los genes COI y 16S rRNA.	59
Tabla 8. Condiciones de PCR para el gen COI modificadas de Rosli et al. 2011.	66
Tabla 9. Condiciones modificadas de PCR para el gen COI.	68
Tabla 10. Condiciones modificadas de PCR para el gen 16S rRNA.	72
Tabla 11. Numero de secuencias obtenidas para cada especie.	75
Tabla 12. Caracteres diagnósticos y parciales para género y especies obtenidos del lineamiento de los genes COI y 16S rRNA.	76
Tabla 13. Valores de divergencia intraespecífica e interespecífica para los genes COI y 16S rRNA.	77
Tabla 14. Comparación de la distancia intraespecífica máxima y promedio con la especie vecina más cercana obtenidas con el gen COI.	79
Tabla 15. Comparación de la distancia intraespecífica máxima y promedio con la especie vecina más cercana obtenidas con el gen 16S rRNA.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la disposición de la mayoría de genes que codifica el ADNmt en humanos.	34
Figura 2. Localización geográfica del departamento de Nariño y puntos de muestreo.	55
Figura 3. Productos de PCR para el gen COI en gel de agarosa 1,5%.	64
Figura 4. Productos de PCR para el gen COI en gel de agarosa 1,5% según los protocolos modificados.	66
Figura 5. Productos de PCR para el gen COI en gel de agarosa 1,5%.	67
Figura 6. Productos de PCR con las condiciones modificadas para el gen COI en gel de agarosa 1,5%.	69
Figura 7. Productos de PCR para el gen COI en gel de agarosa 1,5%.	69
Figura 8. Productos de PCR para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5% obtenidos con el protocolo de Cawthorn et al. (2012).	70
Figura 9. Productos de PCR para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5%.	71
Figura 10. Productos de PCR con las condiciones modificadas para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5%.	72
Figura 11. Productos de PCR para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5%.	73
Figura 12. Productos de PCR para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5%.	74
Figura 13. Gráfico de distribución de distancias obtenidas con el gen COI, para confirmar la existencia y magnitud de <i>Barcode gap</i> .	81
Figura 14. Gráfico de distribución de distancias obtenidas con el gen 16S rRNA, para confirmar la existencia y magnitud de <i>Barcode gap</i> .	82

Figura 15. Árbol <i>Neighbor Joining</i> (NJ) basado en las distancias genéticas de 69 secuencias del gen COI, mediante el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P).	83
Figura 16. Árbol <i>Neighbor Joining</i> (NJ) basado en las distancias genéticas de 78 secuencias del gen 16S rRNA mediante el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P).	85
Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud con base en la distancia genética de 69 secuencias de COI mediante el modelo de sustitución GTR+G+I.	88
Figura 18. Árbol de máxima verosimilitud con base en la distancia genética de 78 secuencias de 16S rRNA mediante el modelo de sustitución GTR+G+I.	89
Figura 19. Mapa de distribución de las especies del género <i>Hypodactylus</i> y <i>Pristimantis</i> en los complejos de Páramos.	98
Figura 20. Mapa de distribución de las especies del género <i>Pristimantis</i> en los complejos de Páramos.	99
Figura 21. Mapa de distribución de las especies del género <i>Pristimantis</i> en los complejos de Páramos.	100
Figura 22. Mapa de distribución de las especies del género <i>Pristimantis</i> en los complejos de Páramos.	101

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Buffers utilizados en la extracción de ADN.	129
Anexo B. Muestras de tejido utilizadas en este estudio.	130
Anexo C. Códigos en placa de las muestras utilizadas en este estudio.	133
Anexo D. Caracteres diagnósticos y parciales para género y especie obtenidos del alineamiento del gen COI.	134
Anexo E. Caracteres diagnósticos y parciales para género y especie obtenidos del alineamiento del gen 16S rRNA.	137
Anexo F. Matriz de distancias genéticas según el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P) para el gen COI.	140
Anexo G. Matriz de distancias genéticas según el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P) para el gen 16S rRNA.	143
Anexo H. Valor de probabilidad (-lnL) y número de parámetros (K) para la selección del modelo evolutivo GTR+G+I según el Criterio de Información de Akaike (AIC).	146

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, a nivel mundial, se ha reconocido la constante amenaza a la que está sometida la biodiversidad y el riesgo de extinción acelerada de las especies debido a fenómenos como la fragmentación y pérdida de hábitat, la sobreexplotación, la introducción de especies exóticas y el cambio climático (Brooks, y otros, 2002; Pimm, y otros, 2014; Pimm & Raven, 2000) sobre todo en Suramérica (Urban, 2015); por lo cual se ha fijado un especial interés por el conocimiento y protección de las diferentes formas de vida en el planeta, que ha obligado al desarrollo de metodologías para obtener información de manera rápida y confiable, sobre todo en la identificación de las especies, que además, de garantizar la buena calidad de los resultados y conclusiones, también permita agilizar la implementación de soluciones a problemas relacionados con la caracterización, buen manejo y protección de los recursos naturales, y que puedan figurar como precedentes de futuras investigaciones (Villareal, y otros, 2006).

Es así como, la taxonomía tradicional ha realizado un esfuerzo en reconocer y asignar, correctamente, una identidad a los organismos de estudio, basada en la identificación de caracteres morfológicos diagnósticos que definen y diferencian a una especie de otra (Carew, Pettigrove, & Hoffmann, 2005; Hubert & Hanner, 2015).

Sin embargo, la identificación tradicional tiene limitantes tales como la experticia por parte del investigador, la necesidad, en la mayoría de las veces, de rectificación o visto bueno de un especialista en el grupo animal, la falta de claves taxonómicas, subjetividad, presencia de grupos problemáticos, alta plasticidad fenotípica, especies crípticas, ejemplares en malas condiciones o en estadios de desarrollo tempranos como larvas y juveniles de difícil asignación a un semaforonte

de la misma especie (Meier, Wong, Srivathsan, & Foo, 2016; Paz & Crawford, 2012), requiriendo muestras en condiciones muy específicas que le den valor y respaldo a la información que de ellas se obtenga (Paz, Gonzalez, & Crawford, 2011).

Es así como, en grupos animales como los anfibios, dada la alta amenaza de extinción bajo la cual se están sus poblaciones (Alroy, 2015; Ficetola, 2015; McCallum, 2015; Pimm & Raven, 2000; Urban, 2015), debido a la destrucción y fragmentación del hábitat, la contaminación, el cambio climático, la introducción de especies exóticas, el tráfico ilegal y los patógenos emergentes (Meredith, VanBuren, & Antwis, 2016) aunados a los límites de la taxonomía tradicional y la necesidad urgente de clasificar correctamente las especies de este grupo en zonas estratégicas, ilustra la situación de Nariño, donde la identificación de anuros, mediante morfología, provenientes de ecosistemas como el Páramo es compleja; además, de contar con zonas inexploradas (González & Paz, 2013) y con el reto de investigar su riqueza biológica.

De acuerdo a lo anterior, en Nariño se encuentra el complejo paramuno La Cocha-Patascoy localizado al oriente del departamento, un ecosistema estratégico de gran importancia debido a la confluencia andina y amazónica entre Nariño y el Putumayo (Morales, y otros, 2007). Se ha detectado con anterioridad, apoyandose en la base de datos de anfibios de la colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad de Nariño, que de aproximadamente 2082 registros el 29,25% representa a especímenes que se distribuyen en el complejo de Páramo La Cocha-Patascoy, de los cuales solo el 75,20% han sido identificados hasta el nivel de especie, el 24,80% restante solo se han identificado hasta género o familia, especialmente en especímenes del género *Pristimantis* que ha sido reconocido con anterioridad

como un grupo altamente diverso y problemático taxonómicamente (Mendoza, Ospina, Cárdenas-Henao, & García-R, 2015; Padial, Grant, & Frost, 2014).

Lo anterior ejemplifica la dificultad de identificar la totalidad de los ejemplares provenientes de diferentes muestreos, haciendo uso de la taxonomía tradicional basada únicamente en caracteres morfológicos. Como consecuencia de ello se puede estar subestimando la riqueza real de una localidad específica, cuando a los ejemplares se les termina asignando identidades taxonómicas incompletas (e.g. *Pristimantis* sp1, sp2, sp3).

Es por ello, que con el fin de agilizar los procesos de identificación, actualmente se han propuesto otro tipo de sistemas, basados en la biología molecular para complementar y potencializar el objetivo principal de la taxonomía que es la clasificación de las especies (Hebert, Cywinska, Ball, & deWaard, 2003; Mallet & Willmott, 2003; Vernooy, y otros, 2010). Además, esta necesidad, de identificación rápida, es urgente en los anuros debido a problemas como los descritos anteriormente y por lo cual algunos países, incluido Colombia, han adoptado metodologías complementarias e integrativas, como la obtención de códigos de barras de ADN (Hebert, y otros, 2003; Paz, y otros, 2011), que permitan solucionar estas dificultades, sobretodo, con la urgencia de catalogar la biodiversidad. Sin embargo, este sistema apenas está comenzando a tomar impulso y reconocimiento en el país, donde se reconoce un sólo trabajo realizado por Guarnizo y otros (2015) y que está focalizado especialmente en el estudio de anuros en los Andes.

Actualmente, de los 533 registros públicos que tiene Colombia para el Orden Anura en la base de datos BOLD (<http://www.boldsystems.org/>), ninguno pertenece al Departamento de Nariño, y solo se conoce de un registro en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la especie *Rhaebo*

colomai, evidenciando la ausencia de investigaciones puntuales en una zona que cuenta con la representación de ecosistemas estratégicos en el pacífico, los andes y parte del amazonas (Delgado, Arévalo, Castillo, & Viles, 2008) y el llamado a la divulgación y utilización de esta metodología como un complemento en los procesos que regularmente se llevan a cabo en la curación de colecciones e inventarios biológicos.

2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, a nivel mundial, ha surgido la preocupación por la protección de la diversidad biológica y los recursos naturales y, por consiguiente, el interés de plantear proyectos que permitan contrarrestar o mitigar las consecuencias provocadas por la constante amenaza antrópica sobre la naturaleza (Pimm, y otros, 2014; Urban, 2015). Para llevar a cabo este tipo de estrategias es necesario contar con información correcta, confiable y de manera rápida de las especies para evitar subestimar o sobreestimar la riqueza real de un determinado lugar y por ende los alcances de los proyectos e iniciativas que velen por su integridad y la dinámica que resulta de la función que las mismas cumplen en el ecosistema (García-Robledo, Kress, Erwin, & Staines, 2015).

De acuerdo a lo anterior y como parte de las soluciones para abordar estos intereses, surgieron los códigos de barras de ADN como una metodología económica, efectiva, accesible y ampliamente aceptada desde su propuesta en 2003, que permite asignar especímenes a un rango taxonómico o identificarlos provisionalmente como especies candidatas para ser descritas como nuevas (trabajando de forma integral con la taxonomía tradicional, la ecología, entre otras) basados en un umbral obtenido de las divergencias genéticas intraespecíficas e interespecíficas.

Hasta el momento las secuencias empleadas provienen del ADN mitocondrial, que se caracterizan por ser cortas y estandarizadas (códigos de barras o *Barcodes*) dependiendo del grupo taxonómico de estudio. En este caso la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (COI) que es el marcador molecular utilizado en los códigos de barras de ADN para animales (Coissac, Hollingsworth, Lavergne, & Taberlet, 2016; Da Silva & Willows-Munro, 2016; Kekkonen &

Hebert, 2014; Vieites, y otros, 2009; Čandek & Kuntner, 2015), el cual es altamente conservado entre diferentes taxa pero tiene tasas de mutación más altas en comparación con otros marcadores moleculares como 16S rRNA (Vences, Thomas, Bonett, & Vieites, 2005a).

Adicionalmente, entre las ventajas de aplicar los códigos de barras de ADN, se encuentra la posibilidad de utilizar diferentes tipos de muestras permitiendo acelerar los inventarios de diversidad y ampliar rangos de distribución, analizar y evaluar procesos evolutivos y de divergencia, aportar secuencias de nuevos haplotipos o variantes geográficas (Hajibabaei, Singer, Hebert, & Hickey, 2007) en áreas estratégicas potenciales, dado que las secuencias de ADN son datos y/o información que puede ser compartida más fácilmente manejándola en diferentes contextos (Adamowicz & Steinke, 2015) teniendo en cuenta que el código genético es universal en contraste con la ausencia, en algunos casos, de caracteres morfológicos consenso para la comunidad taxonómica tradicional (Hubert & Hanner, 2015), lo que redunda positivamente en programas de conservación y/o monitoreo de poblaciones específicas (Che, Chen, & Jin, 2012; Guarnizo, y otros, 2015).

Además, es una herramienta en la tarea de describir y mapear la biodiversidad de las regiones para el beneficio de la conservación de zonas determinadas y tal trabajo es necesario ya que las políticas de conservación aun enfocan sus esfuerzos en especies de los listados de libros rojos de la IUCN y apéndices CITES (Alroy, 2015; Meredith et al., 2016).

Es tal la importancia que han ido adquiriendo los Códigos de Barras de ADN, que en 2015, como parte del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD), se considera que deben incluirse dentro de las necesidades científicas y técnicas claves relacionadas con la aplicación del plan estratégico para la diversidad biológica 2011-2020 e investigaciones relacionadas, adquiriendo una relevante importancia a nivel global y también como soporte a la Iniciativa Taxonómica Global (GTI) (Borisenko, 2015). Por lo tanto, adicionar un Programa de Código de Barras de ADN a un trabajo de diversidad representa una mejora sustancial en la calidad y profundidad del mismo, multiplicando enormemente el número de situaciones que requieren de trabajo taxonómico para su resolución (Padial & De la Riva, 2009).

Es así como, se resalta la importancia de trabajar con códigos de barras de ADN en anuros de Páramo debido a que: primero, es un grupo altamente amenazado y que debe ser tratado especialmente desde la taxonomía para catalogar y definir las especies correctamente (Vences, Nagy, Sonet, & Verheyen, 2012). Segundo, dado que por su distribución en zonas de altas tasas de evolución, como los ecosistemas de alta montaña, pueden llegar a ser morfológicamente similares pero tener marcadas diferencias genéticas (Vences, y otros, 2005a). Además, discriminar especies mediante herramientas basadas en ADN puede dar pie a resolver problemas con grupos de especies crípticas, con alta plasticidad fenotípica o en estados ontogenéticos que no son fáciles de trabajar con morfología (e.g. renacuajos). Tercero, son un grupo taxonómico relevante como parte de la iniciativa global para obtener los códigos de barras de ADN de anfibios y reptiles de todo el mundo (*Cold Code*: <http://coldcode.org/>) liderado por el Instituto de Zoología de Kunming (KIZ por su nombre en inglés) y la Academia China de Ciencias (Murphy, y otros, 2013). Cuarto, los códigos de barras de ADN son un campo relativamente temprano en anfibios (Vences, y otros, 2012) por lo que es necesario aportar a las bases de datos información de referencia.

Es por ello, que en Colombia para dar impulso a los trabajos con Código de Barras, se creó oficialmente en el 2010 el nodo Nacional de la red iBOL (*International Barcode of Life*) coordinado dentro de las líneas de investigación del Laboratorio de Genética de la Conservación del Instituto de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), que comenzó a desarrollar un proyecto para contar con una librería de códigos de barras de ADN de especies de flora y fauna amenazada o en peligro y que a su vez sean de importancia socio económica.

Dada la experiencia del IAvH, se hace necesario crear lazos de colaboración en este tipo de investigaciones, que permitan la capacitación de recurso humano en nuevas metodologías y la creación de espacios para compartir experiencias e intercambiar conocimiento con la posibilidad de establecer una red de apoyo científico continuo.

Teniendo en cuenta lo anterior, esta pasantía se desarrolló con el objetivo adquirir experiencia en la práctica de la profesión como futuro Biólogo en áreas como la biología molecular, mediante la evaluación del desempeño de una herramienta complementaria al papel de la taxonomía tradicional en la identificación de anuros provenientes de Páramo en el departamento de Nariño, estimulando las capacidades y competencias como estudiante, y adicionalmente la implementación de la biología molecular en los estudios de diversidad, que permita acelerar los procesos de identificación en grupos problemáticos y evitar subestimar o sobreestimar la riqueza de una zona geográfica, teniendo en cuenta la importancia de los Páramos ecológicamente y socialmente.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. La clase amphibia (Linnaeus, 1758)

Los anfibios han hecho parte de la historia de la tierra desde hace casi 400 millones de años y han evolucionado junto a ella (O'Shea & Halliday, 2002), se caracterizan principalmente por su ciclo de vida bifásico puesto que la mayoría poseen una etapa larval que depende del agua y otra etapa adulta que puede ser tanto acuática como terrestre. Además, poseen una piel que es altamente permeable, no tienen escamas, son ectotermos y los huevos no poseen una capa dura externa como en las aves (Angilletta Jr, y otros, 2006; Katzenberger, Tejedo, Duarte, Marangoni, & Beltrán, 2012; Navas, 2003; Urbina-Cardona, 2011; Vitt & Caldwell, 2014; Wells, 2007), lo que los diferencian del resto de vertebrados y definen como una clase aparte. Generalmente, cuando se habla de esta clase animal, según Castro-Herrera, Valencia y Villaquirán (2012) las personas lo asocian a las ranas y sapos, ignorando el hecho de que la clase anfibia se compone de tres órdenes: Anura (Ranas y sapos), Gymnophiona (Salamandras) y Caudata (Cecilias) (Angulo, Rueda-Almoacid, & Rodríguez-Mahecha, 2006; Hickman, Roberts, & Larson, 2001; Maffei & Ubaid, 2014; Stuart, y otros, 2008; Vitt & Caldwell, 2014).

3.1.1. El orden Anura (Fischer von Waldheim, 1813)

Es uno de los tres órdenes que componen la clase amphibia y en este se encuentran agrupados los animales conocidos como sapos y ranas (Maffei, y otros, 2014; Measey, y otros, 2009; Stuart, y otros, 2008; Vitt, y otros, 2014), se distribuyen ampliamente a nivel mundial con excepciones en los polos, la Antártica, desiertos y algunas islas oceánicas (Maffei, y otros,

2014; Stuart, y otros, 2008). En Colombia existen 747 especies que corresponden a 14 familias de las cuales Craugastoridae es la más diversa (Acosta Galvis & Cuentas, 2017) (Tabla 1).

Tabla 1

Número de especies por familia de anuros distribuidas en Colombia organizadas de mayor a menor diversidad (Acosta-Galvis, y otros, 2017)

Familia	No. Especies
Craugastoridae	251
Hylidae	125
Bufoidea	81
Dendrobatidae	79
Centrolenidae	75
Leptodactylidae	37
Hemiphractidae	29
Aromobatidae	19
Phyllomedusidae	17
Microhylidae	17
Eleutherodactylidae	7
Pipidae	5
Ranidae	3
Ceratophryidae	2

3.1.2. Características generales de los anuros

Los anuros son animales con un ciclo de reproducción y desarrollo complejo ya que son bifásicos, es decir, pasan por una fase larval conocida como renacuajo que es estrictamente acuática y otra fase adulta que puede estar tanto en agua como en tierra (Stuart, y otros, 2008; Vitt, y otros, 2014), sin embargo, esta condición tiene sus excepciones en algunas ranas que poseen desarrollo directo, es decir, no pasan por la etapa de renacuajo y son conocidas como Terraranas (Hedges, Duellman, & Heinicke, 2008; Heinicke, y otros, 2009; Padial, Grant, & Frost, 2014).

Las ranas están físicamente adaptadas para funciones como el salto con extremidades posteriores largas y no tienen cola (Wells, 2007), poseen ojos grandes y bocas amplias relacionadas con la captura y tamaño de presas (O'shea, y otros, 2002), osteológicamente poseen osificación fuerte y un hueso característico llamado urostilo (Hickman, y otros, 2001; Vitt, y otros, 2014), la musculatura bucal y de la lengua es especial, la respiración puede ser branquial, pulmonar y cutánea (Stuart, y otros, 2008; Wells, 2007), presentan reorganización de los arcos aórticos y el corazón es tricameral (Vitt, y otros, 2014).

Tienen comportamientos especiales en cuanto al cuidado parental (Stuart, y otros., 2008; Vitt, y otros, 2014) y la termorregulación es conductual (Wells, 2007), lo cual está ligado a que los anuros y, anfibios en general, son ectotermos, es decir, dependen del ambiente para regular su temperatura interna y son sumamente sensibles a los cambios que pueden presentarse en el mismo (Cadavid, Roman-Valencia y Gómez, 2005; Maffei, y otros, 2014; Stuart, y otros, 2008; Vitt, y otros, 2014; Wells, 2007).

3.1.3. Los anuros de alta montaña

La diversidad de anuros en los bosques altoandinos y Páramos se caracteriza por ser alta y endémica (Rangel-Ch, 2007), sin embargo, Navas (1999) explica que es de suponer que la diversidad disminuya conforme las condiciones del ambiente son más extremas, refiriéndose a los ecosistemas de alta montaña, donde los organismos han debido desarrollar adaptaciones contra variables como la radiación UV intensa, el clima frío, entre otras. En el caso de los anuros, debido a su sensibilidad, es de esperar que las condiciones ambientales definan aspectos como la distribución, comportamiento y variables relacionadas con su historia de

vida (Ortiz-Yusty, Páez, & Zapata, 2013; Zhang & Lu, 2012), debido a ello la gran mayoría de especies en ecosistemas como los bosques altoandinos y los Páramos son endémicas, aunque también vulnerables frente a los cambios ambientales que afectan a todo el medio (Navas, 1999; Rangel-Ch, 2007).

En cuanto a diversidad de anuros, en Colombia, gran parte de la riqueza se encuentra en los ecosistemas andinos y está representada por la familia Craugastoridae y dentro de ella el género *Pristimantis*, uno de los más diversos en el Neotrópico (Mendoza, y otros, 2015; Padial, y otros, 2014), aunque también se registran especies de las familias Bufonidae (géneros *Osornophryne* y *Atelopus*), Hylidae (géneros *Hyloscirtus* y *Gastrotheca*) y Centrolenidae (género *Centrolene*) (Rangel & López-Perilla, 2014).

3.2. La taxonomía tradicional, molecular e integrativa

Conceptual y brevemente la taxonomía se ha definido como “*la ciencia que clasifica las cosas vivas*” (Raven & Johnson, 2011). Por mucho tiempo ha permanecido el interés por detectar, describir y explicar la diversidad en el mundo biológico bajo un esfuerzo conocido como sistemática (Hillis, Moritz, & Mable, 1996), comenzando con Aristóteles, pasando por Teofrasto y el establecimiento del sistema de nomenclatura de Carl von Linné, seguido de la participación de Ernest Haeckel, Robert H. Whittaker y otros, se ha abordado la clasificación de animales, plantas, bacterias, hongos y demás organismos, asignándoles un rango jerárquico (e.g. reino, clase, orden, familia, género, especie) basándose principalmente en características morfológicas, fenotípicas, fisiológicas, de comportamiento, entre otras (Avise, 2004).

Inicialmente, los esfuerzos de los especialistas en distintos grupos animales se encaminaban en determinar y utilizar caracteres informativos (atributos compartidos) para la clasificación e inferencia de filogenias que permitieran reconstruir la historia evolutiva de los organismos y cuantificar la biodiversidad (Avice, 2004; Freeland, Kirk y Petersen, 2011; Hillis, y otros, 1996). Es así como, en los anuros, la clasificación ha venido basándose en características morfológicas diagnosticas tales como tubérculos, membranas, medidas relacionadas con el tamaño (morfometría), inclusive colores, entre otros, que diferencian a las familias, géneros y especies, y que actualmente aún se utilizan para asignar identidades taxonómicas y/o describir nuevas especies (Lynch & Duellman, 1997).

Sin embargo, con el desarrollo de la biología molecular desde la década de los 60s, la taxonomía y la sistemática lograron obtener otro punto de vista sobre las variaciones a nivel químico en los organismos, no obstante, evolutivamente el concepto no es más que la práctica tradicional en el estudio y clasificación de los sistemas naturales (Hewitt, Johnston y Young, 1991; Hillis, y otros, 1996).

Es así como, el campo de la taxonomía molecular permitió comenzar a clasificar los organismos basados en genes o regiones genéticas, conocidos también como marcadores moleculares, teniendo en cuenta sus características particulares (Hillis, y otros, 1996; Waterton, Ellis y Wynne, 2013). Actualmente, hace parte de estudios rutinarios de la taxonomía y filogenética, comparando secuencias universales de material genético (ADN y/o ARN nuclear, mitocondrial, plástido o en conjunto) para obtener información sobre parentesco, evolución y clasificación de los organismos (Sanz, 2005) implementando algoritmos de agrupamiento y modelos evolutivos que permiten inferir este tipo de relaciones

(Awise, 2004; Freeland, y otros, 2011; Hillis, y otros, 1996). Además, debido a la necesidad de agilizar los procesos de identificación de grupos animales amenazados, se justifica la gran acogida que ha tenido entre la comunidad científica (Lawson Handley, 2015).

Sin embargo, siempre ha existido controversia cuando se compara el uso de la morfología y la biología molecular con fines taxonómicos y/o sistemáticos, un debate argumentado en la debilidad, en algunos casos, de los marcadores moleculares y la subjetividad o naturaleza poco informativa de los caracteres morfológicos en la estimación filogenética (Hillis, y otros, 1996), además, estos mismos autores sugieren que este conflicto de evidencias ha sido exagerado, puesto que las aproximaciones moleculares y morfológicas pueden revelar información recíproca en los límites inherentes de cada disciplina.

De acuerdo a lo anterior, desde hace algunos años diferentes autores (DeSalle, Egan, & Siddall, 2005; Padial, Miralles, De la Riva, & Vences, 2010; Puillandre, y otros, 2012; Will, Mishler, & Wheeler, 2005) reconocen que la tarea de la taxonomía de clasificar los organismos y la estimación, cada vez más precisa, de la biodiversidad, resulta de la confluencia de varias subdisciplinas biológicas como la ecología, biología molecular, evolución, sistemática, conservación y otras ciencias de la biodiversidad (Barley & Thomson, 2016) y es lo que se conoce como taxonomía integrativa. Este término de integración aunado a la utilización de diferentes genes y estrategias de evaluación de las técnicas moleculares no están en contra de la taxonomía tradicional, ni mucho menos son un reemplazo (Hajibabaei, y otros, 2007; Vences, y otros, 2005a), sino un complemento en la medida en que la una necesite a la otra

puesto que promover la competencia resultaría contraproducente para comprender la vida (Ebach & Holdrege, 2005).

3.3. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias particulares de material genético que pueden variar en función del interés de estudio de quien los utiliza, siendo considerados de gran importancia debido a que pueden proveer información genealógica teniendo en cuenta la forma como se heredan (Freeland, y otros, 2011), además, han permitido la exploración del mundo biológico desde otro punto de vista, ampliando las posibilidades de investigación e innovación mediante el acceso a un *pool* de variabilidad genética casi ilimitado en combinación con otro tipo de datos (e.g. ecológicos, morfológicos, fisiológicos, entre otros), proporcionando una base de criterios comunes para medir la divergencia y facilitando las evaluaciones mecanicistas de la evolución (Avice, 2004).

Aunque la selección de un marcador molecular depende de varios factores como el tiempo, costo, precisión y conveniencia, principalmente se debe tener en cuenta el nivel de variabilidad esperado, puesto que algunas regiones de los genomas evolucionan más rápido que otras, sin embargo, la elección finalmente será determinada por el tipo de pregunta que se busca responder y la confluencia de los factores descritos anteriormente (Freeland, y otros, 2011).

3.3.1. Clasificación

Los marcadores moleculares se han clasificado generalmente como co-dominantes y dominantes, los primeros permiten detectar todos los alelos presentes en un locus y generalmente son más precisos que los segundos los cuales solo pueden identificar el alelo dominante (Freeland, y otros, 2011).

Dentro de los marcadores co-dominantes se encuentran las secuencias de ADN que pueden ser obtenidas de fragmentos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente secuenciados, en donde la ventaja principal es que las secuencias pueden ser comparadas permitiendo observar las diferencias exactas en la variación de las mismas (nucleótidos) entre individuos e inferir relaciones evolutivas. Sin embargo se debe tener en cuenta el genoma de procedencia de los marcadores debido a las diferencias que tienen, principalmente en cuanto a tasas de evolución y los mecanismos que las preceden (Avisé, 2004; Freeland, y otros, 2011).

3.3.2. El ADN mitocondrial (ADNmt)

En la mayoría de eucariotas el ADN mitocondrial (ADNmt) se caracteriza por ser una doble hélice circular (Figura 1) que codifica para ARN de transferencia, ARN ribosomales y enzimas involucradas en la respiración celular, además carece de proteínas cromosómicas, es de herencia materna, generalmente no posee intrones y es mucho más pequeño que el ADN de los cloroplastos (ADNcp) aunque puede variar ampliamente entre distintos organismos (Tabla 2). En los animales puede tener entre 16 a 18 kb (Klug, Cummings, Spencer, & Palladino,

2011). Cada mitocondria puede poseer entre 5 y 10 copias de ADNmt el cual está sujeto a mayores tasas de mutación en comparación con el ADN nuclear, siendo un indicador evolutivo más sensible (Solomon, Berg, & Martin, 2008). Aunque el tamaño, estructura y tasa de cambio del ADNmt varía mucho entre plantas, hongos y animales (Freeman & Herron, 2002) (Tabla 3).

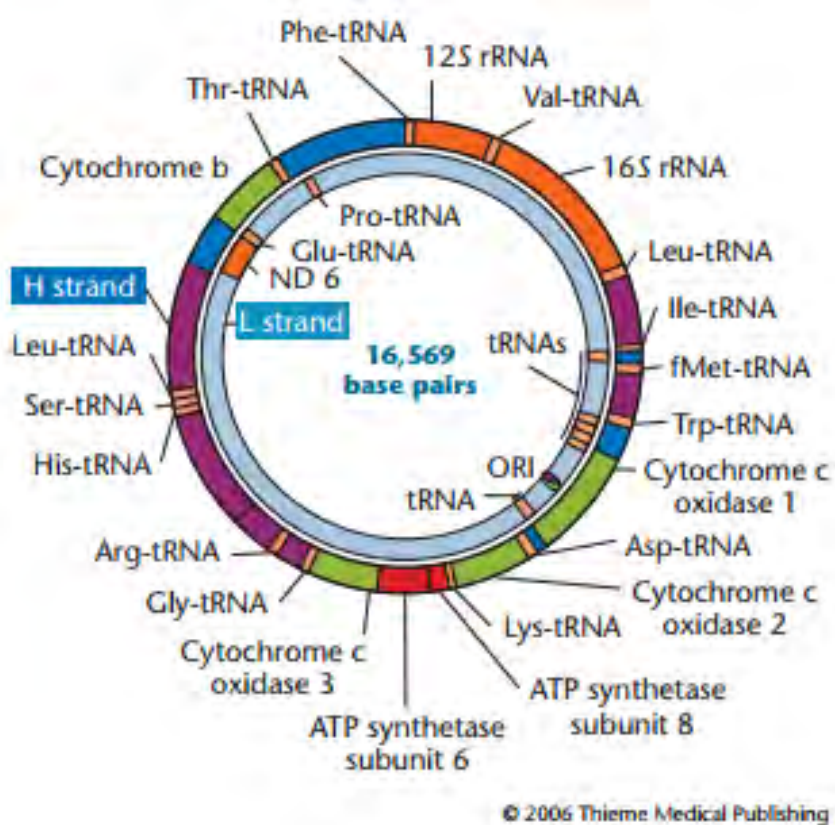


Figura 1. Diagrama de la disposición de la mayoría de genes que codifica el ADNmt en humanos (Tomado de Klug, y otros, 2011).

Tabla 2

Tamaño del ADNmt en diferentes organismos (Tomada de Klug, y otros, 2011)

Organismo	Tamaño (Kb)
<i>Homo sapiens</i>	16.6
<i>Mus musculus</i>	16.2
<i>Xenopus laevis</i>	18.4
<i>Drosophila melanogaster</i>	18.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75.0
<i>Pisum sativum</i>	110.0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	367.0

Tabla 3

Variación de las características del ADNmt entre diferentes taxa (Tomada de Freeman y Herron, 2002)

	PLANTAS	HONGOS	ANIMALES
Tamaño del genoma	Muy variable: solo en la familia del melón desde 300 kb a 2400 kb	Bastante variable: solo en ascomicetos filamentosos de 26,7 kb a 115 kb	Relativamente pequeño, relativamente poca variación entre especies; muchos alrededor de 16 kb
Estructura del cromosoma	Variable: Circular o lineal, a veces varias moléculas de ADN circulares	Circular	Todos circulares
Contenido en información	Conservado: ARNr, ARNt, proteínas ribosomales e implicadas en la respiración.		
Presencia de Intrones	No, pero hay abundantes secuencias no codificantes	Si	No, pocas secuencias no codificantes
Modificaciones del código genético universal	No	AUA para la metionina (no para la isoleucina) CUN para la treonina (no para la leucina) UGA para el triptófano (no de parada)	AUA para la metionina (no para la isoleucina) UGA para el triptófano (no de parada)

Modo de herencia	Variable, pero normalmente materna	De ambos padres	Materna
Recombinación	Frecuente	Frecuente	No o rara
Tasa de divergencia de secuencia respecto al ADN nuclear	Lenta	Puede ser similar	Rápida

3.3.3. Los códigos de barras de ADN (*Barcoding*)

Los estudios en biodiversidad han permitido reconocer que discriminar las millones de especies que existen en el planeta no ha sido un trabajo fácil, aún más si se tienen en cuenta las limitaciones inherentes de la identificación basada en morfología como la plasticidad fenotípica, diversidad críptica, experticia en el proceso de identificación, la falta de claves taxonómicas, subjetividad, presencia de grupos problemáticos, ejemplares en malas condiciones o en estadios de desarrollo tempranos como larvas y juveniles, que difícilmente asume la taxonomía tradicional, por lo que se ha hecho necesario proponer alternativas que puedan apropiarse de manera efectiva estos problemas y permitan abordarlos con mayor facilidad (Hebert, y otros, 2003; Meier, y otros, 2016).

Es así como surgió la iniciativa de los códigos de barras de ADN o *DNA Barcoding*, propuesta por Hebert y otros (2003) como una técnica que consiste en la obtención de secuencias de ADN, individuales, únicas y estándar, que identifican al organismo de donde provienen y que posteriormente pueden compararse con librerías de referencia para encontrar

secuencias homólogas de muestras conocidas y curadas basándose en un umbral que permite calcular la relación entre las muestras (Guarnizo, y otros, 2015; Hebert, y otros, 2003).

Esta técnica posee la ventaja de ser económica, efectiva, accesible y ha sido ampliamente aceptada desde su propuesta, permitiendo asignar especímenes a un rango taxonómico o identificarlos provisionalmente como especies candidatas, las que posteriormente pueden ser descritas como tal, con base en un umbral obtenido de las divergencias genéticas intraespecíficas e interespecíficas (*Barcode gap*) de secuencias de ADN mitocondrial cortas y estandarizadas (códigos de barras o *Barcodes*) que se han conservado dentro de un linaje por mucho tiempo (Guarnizo, y otros, 2015; Hebert, y otros, 2003).

Además, se ha considerado un camino rápido en la identificación de especies (Crawford, Alonso, Jaramillo, Sucre y Ibáñez, 2011; Guarnizo, y otros, 2015; Vences, y otros, 2005a; Vences, Thomas, Van der Meijden, Chiari y Vieites, 2005b); aunque, también presenta información respecto a la diversidad genética de una o varias poblaciones de interés, la estimación de la biodiversidad (riqueza de especies), la reconstrucción de genealogías, resolución de casos en ciencias forenses de vida silvestre, entre otras (Che, y otros, 2012).

Se han realizado estudios de Códigos de Barras de ADN a lo largo de varios taxa como aves, mamíferos, hongos, lepidópteros, arrecifes de coral, patógenos de plantas, protistas, peces, reptiles y anfibios (Murphy, y otros, 2013; Vences, y otros, 2005b), bajo muchas aplicaciones en genética de poblaciones, evolución, ecología, relaciones tróficas, identificación de especies amenazadas, identificación forense, especies invasoras, tráfico de

fauna silvestre, biogeografía, conservación y pruebas de autenticidad de alimentos (Pradhan, Kamble, Ladniya, & Mogul, 2015; Tahir & Akhtar, 2015).

Los datos (*barcodes*) obtenidos en cualquier estudio con esta técnica, generalmente, son analizados utilizando métodos comparativos como el alineamiento y modelos evolutivos para medir la distancia genética entre diferentes pares de secuencias como Kimura 2 parámetros (K2P), para determinar el grado de similitud entre una o varias secuencias contra una base de datos de referencia y posteriormente asignarles una identificación provisional o permanente, finalmente son publicados en bases de datos como la del sitio web del Barcode of Life Data Systems (BOLD, <http://www.barcodinglife.org>, <http://www.boldsystems.org>; (Ratnasingham & Hebert, 2007) GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) o en bases de datos específicas para un organismo (Murphy, y otros, 2013).

La importancia de almacenar los códigos de barras de ADN en una base de datos de referencia como BOLD radica en la continua construcción de una plataforma de información molecular con el objetivo específico de adquirir, guardar, analizar y publicar los registros de las secuencias junto con datos morfológicos y de distribución, que finalmente permitirán acceder de manera flexible a un conjunto de información integral que pueda ser aplicada con diferentes objetivos de investigación bajo referencias consenso, facilitando el intercambio y comparación de resultados (Ratnasingham, y otros, 2007).

Es así como, actualmente las perspectivas de los códigos de barras de ADN se mantienen en el objetivo principal de ser una herramienta costo-efectiva, rápida, accesible y confiable

para la asignación de especies e identificación de especies candidatas, además de formar parte de una librería de acceso público con los *barcodes*, no solo de anfibios sino también, de todos los organismos en el mundo, siendo promovido por diferentes institutos académicos y de investigación independiente, además de iBOL, con el fin de poder estimar la biodiversidad con la que contamos en el planeta, aun mas si tiene en cuenta la amenaza constante bajo la cual se encuentra.

Finalmente, Colombia como nodo Nacional de iBOL mantiene su participación en la iniciativa mundial mediante proyectos como “*DNA barcode library of Colombian endangered flora & fauna and species of socio-economic importance*” donde se incluyen anfibios, aves, mariposas, hongos, entre otros. La actividad del nodo Colombia es publicada en la página web <http://ibolcolombia.org/#> y es coordinada por el IAvH dentro de las líneas de investigación del Laboratorio de Genética de la Conservación, con la participación de varias instituciones académicas del país.

3.3.3.1. Marcadores moleculares de ADN mitocondrial para códigos de barras de ADN

En el caso de los códigos de barras de ADN los marcadores moleculares utilizados pueden variar en función del organismo de estudio y deben poseer características particulares como lo describen Vences y otros (2005b):

- a. En el grupo de estudio, debe ser lo suficientemente variable para permitir discriminar entre la mayoría de especies, pero también lo suficientemente conservado para ser menos variable dentro de las especies.
- b. Los sitios *priming* deben ser lo suficientemente conservados para permitir una amplificación sin el riesgo de obtener falsos negativos cuando el resultado proviene de una muestra donde los individuos no pueden ser separados (e.g. muestras ambientales).
- c. Los genes deben poseer la suficiente información filogenética para asignar especies a un taxa mayor.
- d. Su amplificación y secuenciación debe ser tan robusta como sea posible, bajo variables condiciones de laboratorio y protocolos.
- e. El alineamiento de las secuencias debe ser posible entre taxa distantemente relacionados.

Actualmente, los códigos de barras de ADN se basan en ADNmt y se han validado marcadores moleculares específicos para diferentes taxa, así: para animales es el gen de la Citocromo c Oxidasa subunidad 1 (COI), en plantas el gen de la Maturasa K (*matK*) y la Ribulosa-bifosfato Carboxilasa (*rbcL*) y en hongos espaciadores internos transcribibles o *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Ratnasingham, y otros, 2007; Waterton, y otros, 2013).

3.3.3.2. Marcador molecular Citocromo c Oxidasa subunidad 1 (COI)

La Citocromo c Oxidasa o complejo IV (EC 1.9.3.1) es importante en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, está encargada de catalizar la transferencia de

cuatro electrones desde el citocromo c hacia el Oxígeno molecular, que es el aceptor electrónico final para la formación de agua junto a un mecanismo de translocación de protones a través de la membrana. La COI está formada por 14 subunidades, sin embargo solo las subunidades I, II y III están involucradas en la funcionalidad del complejo, siendo la I el polipéptido mayor, además, se ha sugerido que algunos aminoácidos cargados están involucrados en la formación de un canal para el paso de protones (Dennerlein & Rehling, 2015; Devlin, 2004; Fernandez, 2010).

En 2003 Hebert y otros autores proponen como marcador molecular un segmento de 648 pb de la región 5' del gen Citocromo c Oxidasa subunidad 1 (también conocido como COI, COX1 o MT-CO1) debido a que es de tamaño corto, se encuentra a lo largo de varios taxa y puede ser secuenciado rápidamente a bajo costo, además, continua siendo lo suficientemente largo e informativo para identificar variaciones que son mucho más marcadas a nivel interespecífico que intraespecífico (Waterton, y otros, 2013).

3.3.3.3. Marcador molecular 16S rRNA

El genoma mitocondrial de los animales contiene dos genes de ARN reconocidos como la subunidad pequeña o 12S rRNA y la subunidad grande o 16S rRNA. Esta última puede llegar a tener una longitud de aproximadamente 1600 pb y se ubica contiguamente a la subunidad 12S (Figura 1). Estos dos segmentos de ARN se caracterizan por tener una gran heterogeneidad en las tasas de evolución entre sitios ya que poseen tramos de bases muy conservados conocidos como *stem regions* y otras secciones altamente variables conocidas como *loop regions*, características que los convierten en candidatos de interés para resolver

relaciones filogenéticas en eucariotas (Jennings, 2016). Recientemente, se ha propuesto implementar el uso del gen 16S rRNA, como complemento del gen COI en estudios de *barcoding*, puesto que en grupos animales como los anfibios se ha demostrado que proveen una valiosa información, incluso, en algunos casos, mejor que COI (Vences, y otros, 2005b).

3.4. Estudios de *barcoding* en anfibios

En anfibios, los códigos de barras de ADN han sido aplicados ampliamente en diversos estudios que han demostrado el éxito de esta metodología, principalmente, en la identificación de especies. Por ejemplo, en especies invasoras, Crawford y otros (2011), realizó un estudio utilizando los genes COI y 16S rRNA, confirmaron la presencia de *Eleutherodactylus planirostris* como especie invasora en Ciudad de Panamá. Posteriormente, en un estudio similar, Cedeño-Vázquez, González-Vázquez, Martínez-Arce y Canseco-Márquez (2014) registraron por primera vez la misma especie (*E. planirostris*) en el Caribe Mexicano mediante el análisis de datos morfológicos y moleculares, donde utilizaron el gen COI bajo el concepto de código de barras de ADN, realizando un alineamiento y agrupando mediante *Neighbor joining* (NJ) con muestras de individuos de Panamá y Cuba, análisis que confirmó la especie invasora con una distancia genética intraespecífica $p=1,4\%$, además, recomiendan la evaluación de su estado y los impactos ecológicos probables a futuro.

Dejean y otros (2012) obtuvieron códigos de barras de ADN ambiental para la detección de *Lithobates catesbeianus*, comúnmente conocida como rana toro, para ello compararon las metodologías moleculares con las tradicionales para muestrear en campo, como los inventarios basados en encuentros visuales; demostrando que las primeras son efectivas en la

identificación de esta especie invasiva, destacándose por ser altamente sensible e implicar menos esfuerzo de muestreo; además, sugieren que los muestreos tradicionales pueden estar subestimando considerablemente la distribución de este organismo.

Es así como, la identificación de especies ha sido uno de los usos principales de los códigos de barras de ADN, y es en este campo donde se han desarrollado la mayoría de estudios, con el fin de aportar información de referencia en bases de datos públicas y además evaluar el éxito de esta metodología en diferentes inventarios de riqueza, rescatando, entre otras cosas, la importancia de las investigaciones integrativas que hacen uso de información molecular y de historia de vida y morfología de los organismos, por ejemplo:

Vences y otros (2005a) realizaron un estudio de códigos de barras para descifrar la diversidad de anfibios empleando el gen COI de ranas de la familia Mantellidae y adicionalmente el gen 16S rRNA para efectos comparativos. En el desarrollo del estudio observaron dificultades en el uso de cebadores universales debido a la alta variabilidad de los sitios blanco en COI; además, discutieron que a pesar de la alta variabilidad del gen COI, en términos de tasa de sustituciones, este puede identificar correctamente especies, sin embargo es necesario considerar el uso del gen 16S rRNA. Por otra parte, indican que las divergencias intraespecíficas en anfibios son mucho más altas en comparación con aves e insectos y fenómenos como la introgresión y división incompleta del linaje, que pueden afectar el *barcoding*, son raros y poco frecuentes o estudiados. Finalmente concluyeron que los códigos de barras de ADN en anfibios son una herramienta muy útil para asignar de manera preliminar una identificación de una especie, lo que no reemplaza en ninguna forma la taxonomía o la filogenética, por lo contrario, las complementa.

Vences y otros (2005b) compararon los genes COI y 16S rRNA en anfibios, para ello utilizaron varios taxa y evaluaron el éxito de cada marcador en la recuperación de filogenias congruentes. Los resultados demostraron que el gen 16S rRNA es mucho más conservado entre vertebrados, incluidos anfibios, permitiéndoles rescatar los ocho clados de estudio, a diferencia de COI que es mucho más variable y que en el estudio solo permitió recuperar dos clados. Debido a estos resultados proponen considerar el gen 16S rRNA como código de barras de ADN y no solo COI como lo maneja actualmente la base de datos BOLD, dado que dos marcadores pueden brindar mayor información y complementarse para superar las falencias que tiene cada uno por separado.

Fouquet y otros (2007) analizaron el gen 16S rRNA, en 60 especies de ranas de la Amazonia, el cual indicó que hay una subestimación de la riqueza de anuros debido a que el marcador molecular identificó 129 especies candidatas lo que implica una probabilidad aproximada de 170 a 460 taxa de ranas no reconocidas en la Guyana amazónica.

Smith, Poyarkov y Hebert (2008) realizaron un estudio en códigos de barras en anfibios Holárticos con el fin de evaluar su efectividad en la identificación de especies y también el ajuste de varios pares de cebadores en la amplificación del gen COI, lo que les permitió identificar el 94% de las especies con un umbral del 2% que presento la variabilidad intraespecífica, adicionalmente recomiendan no hacer aproximaciones *a priori* en anfibios, puesto que los resultados pueden variar dentro del grupo animal.

Padial y De la riva (2009) en su estudio sobre *Pristimantis* de la Amazonia explican que los estudios integrativos en taxonomía permiten revelar especies cripticas, haciendo alusión a

la constante discusión entre estudios morfológicos y moleculares para la definición de especies.

Lotters, Schmitz, Reichle, Rodder y Quennet (2009) presentan un caso de diversidad criptica en ranas venenosas del género *Ameerega* (Dendrobatidae) y describen una nueva especie en Bolivia empleando el gen 16S rRNA, también observaron que *Ameerega boehmei* nov. sp está genéticamente más relacionada con *A. flavopicta* (distancia $p=2\%$) pero difieren en características como los llamados de advertencia.

Vieites y otros (2009) presentan un estudio sobre la biodiversidad de anfibios en Madagascar y evidenciaron una vasta subestimación mediante un inventario integrativo utilizando el gen 16S rRNA como marcador molecular con información de datos bioacústicos y geográficos, obtuvieron una proyección sobre la diversidad de especies de anfibios que va de 244 especies reconocidas hasta 373, con la probabilidad de alcanzar las 465.

Jansen, Bloch, Schulze y Pfenninger (2011) presentan un estudio integrativo para el inventario de la diversidad de anuros de tierras bajas en Bolivia, para lo cual emplearon el gen 16S rRNA como código de barras de ADN en la identificación de especies, además complementaron los datos moleculares con información sobre bioacústica y morfología de adultos y renacuajos.

Algunos de los autores mencionados anteriormente, detectaron dificultades con la amplificación del gen COI con cebadores universales para ciertos grupos, es por ello que Che y otros (2012) propusieron un par de cebadores universales para COI en anfibios, con los

cuales se obtuvieron los códigos de barras de 12 familias que incluían 36 géneros de anfibios (incluidos los tres órdenes) distribuidos en China por lo cual sugieren que los cebadores pueden amplificar las secuencias de COI de anfibios en otras partes del mundo.

Paz y Crawford (2012) realizaron una comparación de diferentes métodos de agrupamiento basados en los genes COI y 16S rRNA de anfibios, para ello utilizan ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*), FuzzyID (*Fuzzy-theory-based identification*), SAP (*Statistic Assignment Package*) y GMYC (*General Mixed Yule-Coalescent approach*) demostrando que, para muestras basadas en clados, GMYC es poco conservativo asignando especies y divide mucho más los grupos, FuzzyID detectó mucho más fácil *singletons* mientras que ABGD no lo hizo. En cuanto a las muestras basadas en geografía ABGD y FuzzyID permitieron obtener resultados congruentes con los análisis clásicos de *barcode gap*, en cambio GMYC dividió mucho más los grupos y SAP fue incapaz de asignar algunas muestras al nivel de especie. Aunque presentan varios métodos de agrupamiento útiles los autores concluyeron que ABGD es mucho más recomendado por ser amigable y rápido, aunado a los resultados descritos anteriormente en la identificación y agrupamiento de especies.

Vences y otros (2012) explican que los códigos de barras de ADN en anfibios y reptiles son un campo relativamente temprano hasta esa fecha, aunque actualmente lo sigue siendo, resaltando la utilidad en programas de conservación en grupos en estado de amenaza crítica como estos vertebrados, además, rescatan la importancia de su uso en la identificación de especies basados en individuos en etapas adultas y larvales. Adicionalmente, exponen los protocolos que se pueden seguir, desde la obtención de la muestra, el procesamiento y los análisis finales.

Dado que han surgido muchas iniciativas de códigos de barras de ADN para grupos en particular, como hongos, arrecifes de coral, lepidópteros, mamíferos, protistas, patógenos de plantas y más, Murphy y colaboradores (2013) publican el Cold Code, una iniciativa internacional de códigos de barras ADN para vertebrados de sangre fría (anfibios y reptiles), liderada por el Instituto de Zoología de Kunming (KIZ por su nombre en inglés) y la Academia China de Ciencias. Cuenta con un comité organizador y un sitio web (<http://coldcode.org/>).

De aquí en adelante se impulsó aún más la investigación con códigos de barras de ADN en anfibios, puesto los protocolos son cada vez más rigurosos y las iniciativas emergentes llaman la atención de los investigadores para que inviertan esfuerzos en este campo de estudio. Jeong y otros (2013) construyen una base de datos de referencia para códigos de barras de ADN de la herpetofauna de Corea con el objetivo de proveer una herramienta estandarizada para la identificación de especies en monitoreos, utilizando el gen COI como marcador para 103 individuos de 18 especies de anfibios, y otros como el gen 16S rRNA y citocromo b (*Cytb*) lo que les permitió observar la posible existencia de especies crípticas debido a la alta variación intraespecífica. En un estudio similar Perl y otros (2014) aplican los códigos de barras de ADN a la fauna anfibia de Madagascar utilizando el gen COI como marcador molecular.

Dang y otros (2015) utilizaron el gen COI para obtener los códigos de barras de ADN de 172 individuos pertenecientes a 37 especies incluidas en nueve géneros de ranas de la familia Rhacophoridae, además construyen las filogenias mediante inferencia Bayesiana y NJ logrando recuperar los nueve géneros como taxa monofiléticos, con una excepción en el género *Rhacophorus*, dos nuevas líneas para *Liuxalus* y el complejo de especies *Polypedabates leucomystax* que probablemente representan especies crípticas.

Jennings, Wogel, Bilate, Salles y Buckup (2015) utilizaron códigos de barras de ADN en poblaciones de ranas *Arcovomer passarellii* (Microhylidae) de dos localidades en un bosque Atlántico del sureste de Brasil, para lo cual emplearon el gen COI, logrando obtener un 13% de divergencia genética no corregida y 30,4% de distancia genética con el modelo TIM2 + I + Γ entre las poblaciones de Espírito Santo y Rio de Janeiro, sugiriendo que la población de la primera localidad es una especie distinta de *A. passarellii*.

Rockney, Ofori-Boateng, Porcino y Leaché (2015) compararon la efectividad de los genes COI y 16S rRNA como códigos de barras de ADN en ranas del Este de África empleando 134 especímenes provenientes de Ghana, que además es reconocido por ser un *hotspot* de biodiversidad. Lograron obtener que el éxito de amplificación por PCR para COI con cebadores específicos para anfibios incrementa casi en un 50% en comparación con cebadores universales, sin embargo, el éxito de secuenciación y amplificación con cebadores específicos es solo del 78% mientras que para 16S rRNA fue del 100%, aunque las comparaciones en términos de variación intraespecífica e interespecífica fueron muy similares.

Así mismo, se ha demostrado la efectividad de esta metodología en la identificación de especies en estados larvales. Por ejemplo, Grosjean, Bordoloi, Chuaynkern, Chakravarty y Ohler (2015) utilizaron el gen 16S rRNA como código de barras de ADN para los renacuajos de *Clinotarsus alticola* y compararon dos muestras obtenidas de diferentes localidades, una perteneciente a Assam, India y otra de Tailandia peninsular, basados en la variación genética; el análisis les permitió evidenciar que la muestra de Tailandia no pertenecía a *C. alticola*, por lo tanto asignan estos renacuajos a una nueva especie llamada *Clinotarsus penelope*.

Grosjean, Ohler, Chuaynkern, Cruaud y Hassanin (2015) presentan un caso de estudio, en el Sureste de Asia, sobre el uso de códigos de barras de ADN en renacuajos para el mejoramiento de la evaluación de la biodiversidad de anuros; utilizando como marcadores mitocondriales 16S rRNA y COI de 83 especies reconocidas que provenían de 65 sitios diferentes lograron demostrar el éxito y utilidad de la metodología en la asignación de especies, resaltando la importancia de tener en cuenta los estados larvales en la estimación de la riqueza de una localidad.

Evans y otros (2016) realizaron un estudio de cuantificación de la diversidad de especies de anfibios y peces a través de *metabarcoding* utilizando ADN ambiental y como marcadores moleculares los genes ribosomales 12s y 16S rRNA, lo que les permitió identificar todas las especies de anfibios presentes en la localidad.

Hawlitsek y otros (2016) presentan el primer estudio amplio de códigos de barras de ADN en herpetofauna de Alemania logrando obtener 248 secuencias de COI para las especies nativas y subespecies del país con un éxito próximo al 100%.

Otras investigaciones aplicadas a la conservación que utilizan los códigos de barras de ADN han demostrado su utilidad en este tipo de iniciativas, es así como Crawford, Lips y Bermingham (2010) presentan un estudio empleando el gen COI como código de barras de ADN para identificar los cambios en la abundancia y diversidad evolutiva en la comunidad de anfibios de El Copé, Panamá, después de una epidemia y evento de mortalidad en masa. Los resultados indicaron que efectivamente la enfermedad redujo la diversidad taxonómica, de

linajes y filogenética de 30 especies, incluidas cinco sin describir, lo que representa el 41% de diversidad total de anfibios en la localidad de El Copé.

Crawford y otros (2013) aplicaron los códigos de barras de ADN en programas de conservación *ex situ* de anfibios tropicales para revelar la diversidad críptica en poblaciones en cautiverio utilizando diez especies de ranas del género *Pristimantis*. Los análisis con los genes COI y 16S rRNA de poblaciones silvestres en comparación con poblaciones en cautiverio indicaron que tres de las diez especies albergaban una considerable diversidad genética críptica dentro de la zona de cautiverio y tres especies adicionales albergaban diversidad críptica entre poblaciones silvestres, pero no en cautiverio, resaltando que las iniciativas de conservación *ex situ* son vulnerables a contar con una taxonomía incompleta que puede conducir a la identificación incorrecta entre especies crípticas, por lo tanto, herramientas como los códigos de barras de ADN pueden proveer una ayuda adicional en la caracterización de la diversidad.

Otras aplicaciones que han tenido los códigos de barras de ADN de anfibios han sido expuestas por Pinto-Sánchez y otros (2012) quienes los emplearon para estudiar el intercambio de ranas del género *Pristimantis* entre Sur y Centro América concluyendo que el género es de origen Suramericano y se dispersó en varios eventos hacia Centroamérica. Así mismo, García-R y otros (2012) encuentran una alta diversidad empleando códigos de barras para estudiar la estructura genética de tres especies de *Pristimantis* de la cordillera occidental.

El estudio más reciente del tema en Colombia fue publicado por Guarnizo y otros (2015) en el cual abarcaron un muestreo amplio de anuros Colombianos de la cordillera oriental y se

obtuvieron los códigos de barras de ADN utilizando los genes COI (213 individuos) y 16S rRNA (237 individuos) para 52 especies, provenientes de diez localidades en ambos flancos de la cordillera oriental de Colombia, que posteriormente fueron identificadas mediante la comparación de dos algoritmos para códigos de barras de ADN: ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) que recuperó 47 grupos basado en 16S rRNA, 54 grupos con COI y 56 grupos con 16S rRNA y COI concatenados, y RESL (Refined Single Linkage Analysis) que recuperó 65 grupos basado en COI, y adicionalmente definieron un umbral del 6% de divergencia para la identificación de especies basados en la matriz concatenada de COI y 16S rRNA. Finalmente, concluyeron que, los códigos de barras de ADN son efectivos para el reconocimiento provisional de especies candidatas y ya descritas, que pueden apoyar otro tipo de datos como los morfológicos, sin embargo las diferencias de agrupación variaron en función del algoritmo utilizado, donde, RESL fue mucho más sensible que ABGD.

Por otra parte, el concepto de códigos de barras de ADN ha sido aplicado indirectamente en investigaciones que no están focalizadas particularmente en la metodología, sin embargo la emplean para cumplir sus objetivos, por ejemplo:

Lotters y otros (2011) evaluaron la filogenia molecular de las ranas del género *Atelopus* (Bufonidae), reconocidas por ser un grupo casi extinto de vertebrados, utilizando como marcadores moleculares los genes ribosomales 12s y 16S rRNA bajo el concepto de código de barras de ADN y Dos Santos, Ibáñez y Ron (2015) en su estudio sobre la sistemática del complejo *Rhinella margaritifera* utilizaron el gen 16S rRNA bajo el mismo concepto, además de los genes COI, 12s y Tyr, para comparar las distancias genéticas entre *R. alata* y *R. margaritifera*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Identificar las especies de anuros que se distribuyen en el complejo de Páramos La Cocha-Patascoy empleando códigos de barras de ADN.

4.2. Objetivos específicos

- Estandarizar los protocolos de extracción y amplificación de ADN para códigos de barras genéticos en anuros que se distribuyen en el complejo de Páramos La Cocha-Patascoy.
- Obtener los códigos de barras de ADN para las especies de anuros que se distribuyen en el complejo de Páramos La Cocha-Patascoy
- Evaluar las relaciones filogenéticas de las especies de anuros que se distribuyen en el complejo de Páramos La Cocha-Patascoy a través de los marcadores moleculares citocromo oxidasa I (COI) y 16S rRNA.
- Determinar el porcentaje de éxito en la identificación de anuros que se distribuyen en el complejo de Páramos La Cocha-Patascoy empleando códigos de barras de ADN.

5. METODOLOGÍA

5.1. Obtención de muestras

Se trabajó con muestras que fueron obtenidas previamente en el proyecto de “Estudio técnico, socioeconómico y ambiental de los complejos de Páramos Chiles-Cumbal, La Cocha-Patascoy y Doña Juana-Juanoy como insumo para su delimitación” adelantado por la Universidad de Nariño en conjunto con el Instituto de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH) y como resultado particular del esfuerzo del grupo de Herpetología coordinado por el Grupo de Investigación en Biología de Páramos y Ecosistemas Andinos.

Se procesaron 51 muestras provenientes del complejo de Páramos La Cocha-Patascoy (Figura 2) y adicionalmente se tuvieron en cuenta 28 muestras de los complejos de Páramos Doña Juana-Juanoy y Chiles-Cumbal, para un total de 79 tejidos pertenecientes a 13 especies de anuros (Tabla 4).

El método de muestreo se llevó a cabo en los tres complejos que comprende el distrito de Páramos Nariño-Putumayo (Figura 2) en los cuales se seleccionaron varios puntos de muestreo para anfibios realizando una inspección mediante encuentro visual azaroso y transectos de 50 x 4 m. Además, se tomaron datos referentes al microhábitat de los individuos como el sustrato, temperatura, posición vertical y generales como localidad, coordenadas, fecha, hora de encuentro, temperatura, humedad relativa, estado del clima, estado de desarrollo y sexo.

Posteriormente, se preservaron los ejemplares siguiendo el protocolo estándar para eutanasia, fijación y almacenaje de anfibios (Simmons, 1987). También se obtuvieron muestras de tejido como patas, musculo o dedos pediales que fueron almacenados en tubos eppendorf con alcohol al 96% y se almacenaron en la colección de tejidos de la Universidad de Nariño y del IAvH. Finalmente, los ejemplares fueron identificados por investigadores con experiencia en el campo de la Herpetología haciendo uso de claves taxonómicas y descripciones originales, y se almacenaron en la colección de Anfibios del museo de Historia Natural de la Universidad de Nariño (PSO-CZ) y la colección de Anfibios del IAvH.

Tabla 4

Taxonomía de las especies de anuros consideradas para este estudio. En la parte derecha se muestra la categoría de amenaza de cada especie según la lista de especies amenazadas de la IUCN (2016)

Familia	Género	Especie	IUCN
Craugastoridae	<i>Pristimantis</i>	<i>P. myersi</i>	LC
		<i>P. colonensis</i>	DD
	<i>Hypodactylus</i>	<i>P. chloronotus</i>	LC
		<i>P. ortizi</i>	DD
		<i>P. supernatis</i>	VU
		<i>P. buckleyi</i>	LC
		<i>P. huicundo</i>	DD
		<i>P. farisorum</i>	NE
		<i>P. unistrigatus</i>	LC
		<i>H. sp = H. AN01</i>	NE
<i>H. elassodiscus</i>	EN		
Centrolenidae	<i>Centrolene</i>	<i>C. buckleyi</i>	VU
Hemiphractidae	<i>Gastrotheca</i>	<i>G. orophylax</i>	EN

Nota: Abreviaturas, IUCN: International Union for Conservation Nature, LC: Least Concern, DD: Data Deficient, VU: Vulnerable, NE: Not Evaluated, EN: Endangered.

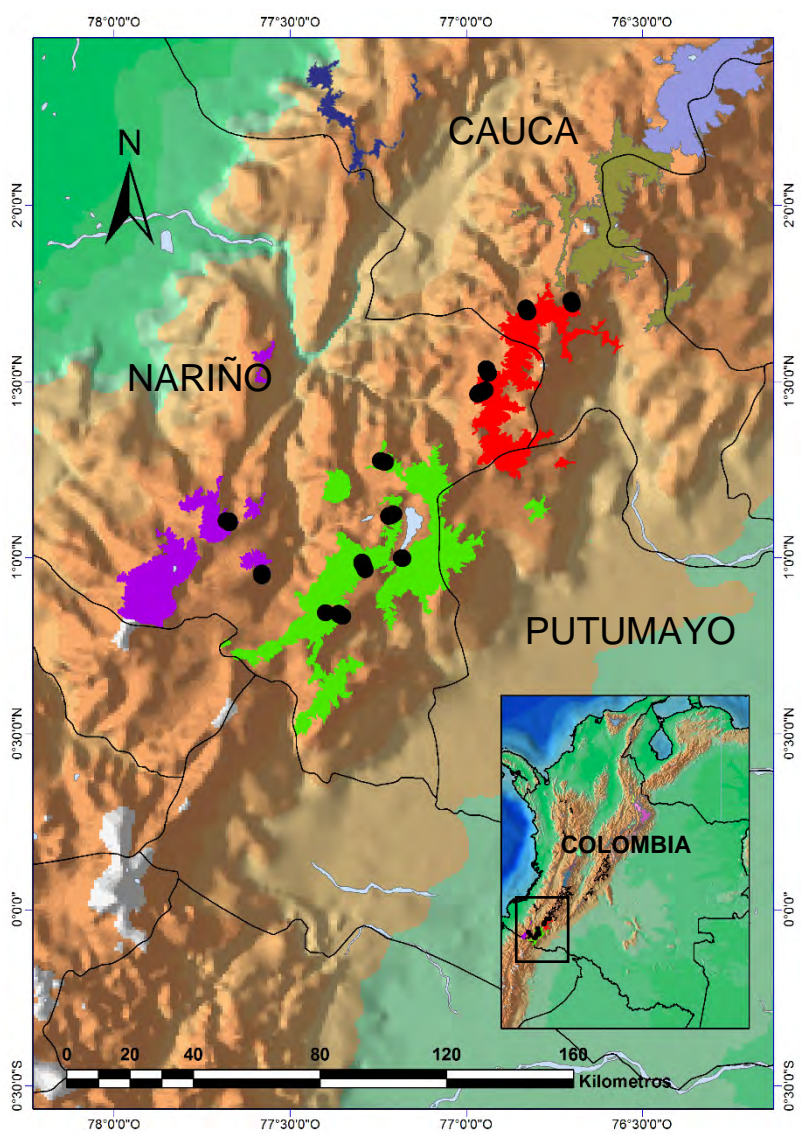


Figura 2. Localización geográfica del departamento de Nariño. Los círculos negros indican los puntos de muestreo en el complejo de Páramos La Cocha-Patascóy (Verde claro), Chiles-Cumbal (Purpura) y Doña Juana-Juanoy (Naranja). Cartografía páramos (IAVH, 2012). Datum: WGS84.

5.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN total se siguió el protocolo recomendado por el *Canadian Center for DNA Barcoding* (<http://www.ccdb.ca/resources.php>) (Ivanova, Dewaard, & Hebert, 2006) que se describe a continuación:

- En un tubo de 1,5 ml se adicionaron 45,5 µl de *Vertebrate Lysis Buffer* y 4,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml).
- Se tomó entre 2-3 mm³ del tejido preservado en etanol y se introdujo en el tubo con el mix anterior.
- Se incubó a 56°C por aproximadamente 15 horas (*overnight*) para permitir el proceso de digestión enzimática.
- Se centrifugó a 3000 rpm por 15 segundos.
- Se agregó 100 µl de *Binding Mix* a cada tubo y se agitó en vórtex por 15 segundos para centrifugar nuevamente a 3000 rpm por 20 segundos. Se transfirió el lisado (aproximadamente 150 µl) a una columna, se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos y se descartó el filtrado para pasar a los lavados. En este paso el ADN se adhiere a la fibra de vidrio de la columna.
- Primer lavado: se agregó 200 µl de *Protein Wash Buffer* a cada tubo, se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos y se descartó el filtrado.
- Segundo lavado: se agregó 750 µl de *Wash Buffer* a cada tubo, se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos y se descartó el filtrado.

- Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 3 minutos para remover el etanol de la membrana y se descartó el filtrado y tubo colector. Se pasó la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- Se agregó 50 µl de agua (grado bio. mol.), precalentada a 56°C, directamente sobre la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos para recuperar el ADN eluido.
- Se repitieron los anteriores dos pasos con, esta vez con 40 µl para recuperar una segunda elución de ADN.
- Las columnas se descartaron, se cuantificó y determinó la calidad del ADN mediante espectrofotometría en NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Finalmente, los extractos de ADN se almacenaron a corto plazo a 4°C y una vez terminados los análisis a -20°C.

En el Anexo A se indica la composición de los buffers *Verterate Lysis Buffer*, *Binding Mix*, *Protein Wash Buffer* y *Wash Buffer*.

5.3. Amplificación por PCR y secuenciación

Se amplificaron los genes de Citocromo c Oxidasa I (COI) y 16S rRNA los cuales han sido estandarizados y recomendados para *barcoding* (Hebert, y otros, 2003; Vences, y otros, 2005a; Vences, y otros, 2005b) a partir de los cebadores que se indican en la Tabla 5. Para el Mix de PCR y el programa de termociclado se siguió el protocolo propuesto por (Rosli, y

otros, 2011) para COI y los protocolos de (Cawthorn, Steinman, & Witthuhn, 2012; Mendoza, García-Ramírez, & Cárdenas-Henao, 2012) para 16S rRNA (Tablas 6 y 7).

Tabla 5

Cebadores para la amplificación de los genes COI y 16S rRNA

Gen	Cebador	Secuencia (5' – 3')	Dirección	Referencia
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	F	(Folmer, Black, Hoeh, Lutz, & Vrijenhoek, 1994)
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	R	
16S rRNA	16Sar-L	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	F	(Palumbi, y otros, 1991)
	16Sbr-H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	R	

Tabla 6

Condiciones de termociclado para la amplificación de los genes COI y 16S rRNA

Programa PCR	Gen								
	Referencia	16S rRNA			COI				
		Cawthorn y otros (2012)			Mendoza y otros (2012)			Rosli y otros (2011)	
	T	T°	Ciclos	T	T°	Ciclos	T	T°	Ciclos
Desnaturalización 1	2'	94°C	1	90"	94°C	1	4'	95°C	1
Desnaturalización 2	30"	93°C	30	45"	93°C	33	1'	95°C	30
Anillamiento	40"	55°C		45"	55°C		1'	51°C	
Extensión1	1'	72°C		90"	72°C		1'	72°C	
Extensión2	5'	72°C	1	5'	72°C	1	7'	72°C	1

Nota: T=Tiempo, T°=Temperatura

Tabla 7*Mix de PCR para la amplificación de los genes COI y 16S rRNA*

MIX PCR	Gen								
	16S rRNA						COI		
	Cawthorn y otros (2012)			Mendoza y otros (2012)			Rosli y otros (2011)		
Referencias	[0]	[1]	1Rx (μ l)	[0]	[1]	1Rx (μ l)	[0]	[1]	1Rx (μ l)
Cebadores	16Sa-L/16Sb-H			16Sa-L/16Sb-H			LCO1490/HCO2198		
ddH2O			13,95			12,65			13,3
Fcebador	10uM	0,12uM	0,3	10uM	0,3uM	0,75	10uM	0,2uM	0,5
RCebador	10uM	0,12uM	0,3	10uM	0,3uM	0,75	10uM	0,2uM	0,5
dNTPs	10mM	0,1mM	0,25	10mM	0,3mM	0,75	10mM	0,2mM	0,5
Buffer	10x	1x	2,5	10x	1x	2,5	10x	1x	2,5
Mg	25mM	2,5mM	2,5	25mM	2,5mM	2,5	25mM	2,5mM	2,5
TaqPol	5U/ul	1U	0,2	5U/ul	1U	0,1	5U/ul	1U	0,2
ADN	10ng/ul	50ng	5	10ng/ul	50ng	5	10ng/ul	50ng	5
Vol. Total			25			25			25

Nota: [0]= concentración inicial, [1]=concentración final, 1Rx=una reacción.

La evaluación del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con EZ-vision® en buffer TBE 1X, utilizando como referencia una escalera de peso molecular de 100 pb leader (Invitrogen), con una corrida a 90v por 40 minutos y se observó en un sistema de documentación de geles (uvisave) con transiluminador UV, cámara acoplada, monitor de visualización e impresora.

Los procesos de purificación y secuenciación de los productos de PCR se realizaron a través de la empresa Macrogen Inc., en Corea del Sur.

5.4. Procesamiento de los códigos de barras de ADN

La edición y empalme de las secuencias directamente obtenidas de los servicios de secuenciación automatizada se realizaron con el programa Geneious v.10.0.5 (<http://www.geneious.com>, Kearse y otros 2012) teniendo en cuenta la señal y la calidad (*Phred score*) en el cromatograma. Se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias *forward* y *reverse* de cada individuo en MUSCLE (Edgar, 2004), incorporado en el software anterior, el cual realiza un alineamiento progresivo con pasos posteriores de refinamiento iterativo permitiendo corregir agrupaciones iniciales erróneas (Pais, Ruy, Oliveira, & Coimbra, 2014), con el fin de obtener una secuencia consenso de alta calidad. También se utilizó el programa CODONCODE v.6.0.2 (CodonCode Corporation, www.codoncode.com) para eliminar los cebadores de los extremos de las secuencias.

Los datos de COI y 16S rRNA (*trace files*, secuencias consenso y metadatos) se cargaron en la base de datos de BOLD (www.boldsystems.org) en la cual se realizaron los análisis de *barcoding* que permite la interfaz en línea y se describen más adelante.

5.5. Análisis de divergencia genética

Se alinearon las secuencias *barcode compliant*, es decir, aquellas que poseen longitud mayor a 500 pb, secuenciación bidireccional y no poseen codones *stop*, de COI y 16S rRNA, por separado, con MUSCLE (Edgar, 2004) en la plataforma de BOLDSYSTEMS y se llevó a cabo el análisis de divergencia genética para cada gen con el modelo de distancia de Kimura 2 parámetros (K2P) que asume igual frecuencia de nucleótidos y distingue las tasas de sustitución entre transiciones y transversiones (Kimura, 1980); además, es el sugerido para

estudios de *barcoding* (Hebert, y otros, 2003; Guarnizo, y otros, 2015). También, se llevó a cabo un análisis de *Barcode gap* en la misma plataforma, con los mismos parámetros, el cual permite observar la existencia o no de un solapamiento entre la máxima distancia genética intraespecífica y la mínima distancia genética interespecífica.

5.6. Análisis de agrupamiento

Se realizó el agrupamiento de los individuos y especies en MEGA versión 7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016) utilizando los genes COI y 16S rRNA, aplicando el modelo de evolución K2P, mediante el método de distancias *Neighbor Joining* que basa su agrupamiento en la minimización de la longitud de las ramas al parear las muestras más cercanas, formando una red con los nodos inmediatamente más cercanos al emparejamiento previo (Saitou & Nei, 1987).

Posteriormente, se determinó el modelo de evolución al que se ajustan los datos, utilizando el programa jModelTest versión 2.1.10 (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012; Guidon & Gascuel, 2003; Posada, 2008), empleando el criterio de Información de Akaike (AIC por su nombre en inglés *Akaike Information Criterion*), el cual estima la cantidad de información que se pierde al utilizarse una determinada aproximación al proceso real de sustitución de nucleótidos (Posada & Buckley, 2004) y por lo tanto, permite obtener el modelo más probable.

Se utilizó el programa RAxMLGUI versión 1.5b1 (Silvestro & Michalak, 2012) para construir un nuevo agrupamiento mediante el método de máxima verosimilitud (ML por su nombre en inglés *Maximum Likelihood*), con el cual la probabilidad de las observaciones de

un grupo de datos dado para un determinado modelo de sustitución es maximizada por cada topología obtenida durante el remuestreo y la topología con la más alta probabilidad es seleccionada como árbol final (Nei & Kumar, 2000). El soporte de los nodos se evaluó con la prueba de *bootstrap* (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985) considerando representativos los valores superiores al 75%.

Finalmente, con base en la congruencia de los agrupamientos y la comparación entre la identificación realizada por taxonomía tradicional y la que proporcionara los códigos de barras se obtuvo el porcentaje de éxito en la asignación de la identidad taxonómica.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN (Ivanova, y otros, 2006) permitió recuperar distintas cantidades de ADN genómico de las 79 muestras de tejido diferentes, que tras evaluarse mediante espectrofotometría en NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) indicaron valores promedio de 140 ng/ μ l (18-387,5 ng/ μ l) en la primera elución y de 94 ng/ μ l (22,1-346,7 ng/ μ l) en la segunda elución (Anexo B). Se observó que la concentración de ADN obtenido varió ampliamente, resultados que pueden ser sobreestimados debido a las condiciones de la muestra, puesto que la espectrofotometría es sensible a factores como la contaminación con proteínas y/o reactivos que se emplean durante la extracción de ADN y el pH (Desjardins & Conklin, 2010).

Con el análisis de pureza se obtuvo una relación 260/280 = 1,9 (1,7-2,1) en la primera elución y una relación 260/280 = 1,9 (1,6-2,4) en la segunda elución. Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos tienen máxima absorbancia a 260 nm Barbas, Burton, Scott y Silverman (2007), Desjardins y otros (2010) y Gallagher y Desjardins (2007) indican que valores de relación 260/280 de ~1,8 a 1,9 son aceptados para muestras puras de ADN, lo cual se asemeja al valor promedio obtenido en este estudio, sin embargo, los rangos indican valores ligeramente inferiores y superiores que infieren la posible contaminación con reactivos utilizados durante la extracción como el fenol y la guanidina y/o con proteínas que absorben a longitudes de onda diferentes a 260 nm (e.g. 280 y 230 nm), o a la condición acida (valores bajos) o alcalina (valores altos) de la muestra (Barbas, y otros, 2007; Desjardins, y otros,

2010). Por lo tanto, la modificación de los pasos de lavado en el proceso de extracción puede resultar en mejoras de la calidad del ADN que se recupera.

Aunque, Ivanova y colaboradores (2006) no presentan resultados sobre la calidad del ADN obtenido, lo utilizan para PCR con el gen COI obteniendo un éxito en la amplificación >95%, de muestras diluidas 20 veces y >30% de muestras diluidas entre 100 y 1000 veces. De acuerdo a lo anterior, las muestras se diluyeron para obtener una concentración de 10 ng/μl que se utilizó como stock en el proceso de amplificación por PCR de los genes COI y 16S rRNA.

6.2. Amplificación por PCR de los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA

6.2.1. Protocolo para la amplificación del gen COI

Inicialmente, se evaluó la amplificación del gen con siete muestras (048, 049, 023, 003, 004, 005, 024), con el protocolo de PCR para COI (Rosli, y otros, 2011) descrito en las Tablas 6 y 7. La electroforesis permitió observar que se amplificaron solo tres muestras (Figura 3).

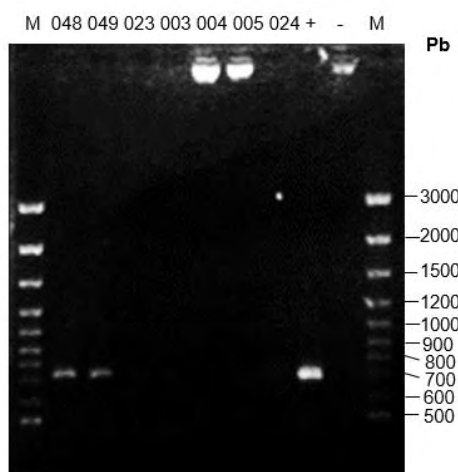


Figura 3. Productos de PCR para el gen COI en gel de agarosa 1,5%. **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras son los últimos dígitos del código BOLD relacionados en el Anexo B; +: control positivo (*Lonomia* sp); -: control negativo.

Aunque, Rosli y colaboradores (2011) optimizó las condiciones de PCR para COI en bovinos (*Bos gaurus*), utilizó los mismo cebadores universales de este estudio. Por lo tanto, se modificó el mix de PCR planteado por Rosli y otros (2011), trabajando con la mitad del volumen de ADN que se utilizó inicialmente y realizando dos pruebas más con aditivos: albúmina de suero bovino (BSA) y dimetilsulfóxido (DMSO), con los cuales se ha demostrado el incremento en la eficiencia de amplificación de ADN, incluyendo muestras con posibles inhibidores como compuestos fenólicos (Farell & Alexandre, 2012; Roux, 2009) (Tabla 8).

Además, se cambió el perfil de termociclado por el que plantea el *Canadian Centre for DNA Barcoding* (CCDB, <http://ccdb.ca/resources/>) y similar al propuesto por Hebert y colaboradores (2004) que consta de una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, 5 ciclos de 94°C por 30 s, 45°C por 40 s y 72°C por 60 s, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 51°C por 40 s y 72°C por 60 s, con una extensión final de 72°C por 5 min. Este programa, comparado con el primero, comienza siendo menos restrictivo en el anillamiento de los cebadores al tener una T_m baja en una primera fase, que pasa a ser más específica cuando se sube la T_m en una segunda fase. De esta manera se amplificaron todas las muestras puesto que en los geles se visualizó bandas con las dos pruebas (Figura 4).

Tabla 8

Condiciones de PCR para el gen COI modificadas de Rosli y otros (2011)

MIX PCR	Rosli modificado 1			Rosli modificado 2		
	[0]	[1]	1Rx (ul)	[0]	[1]	1Rx (ul)
ddH ₂ O			15,6			15,1
Cebadores	LCO1490/HCO2198			LCO1490/HCO2198		
FCebador	10uM	0,2uM	0,5	10uM	0,2uM	0,5
RCebador	10uM	0,2uM	0,5	10uM	0,2uM	0,5
DNTPs	10mM	0,2mM	0,5	10mM	0,2mM	0,5
Buffer	10x	1x	2,5	10x	1x	2,5
Mg	25mM	2,5mM	2,5	25mM	2,5mM	2,5
TaqPol	5U/ul	1U	0,2	5U/ul	1U	0,2
DMSO	-	-	-	100%	2%	0,5
BSA	50mg/ml	0,4mg/ml	0,2	50mg/ml	0,4mg/ml	0,2
ADN	10ng/ul	25ng	2,5	10ng/ul	25ng	2,5
Vol. Total			25			25

Nota: [0]= concentración inicial, [1]=concentración final, 1Rx=una reacción.

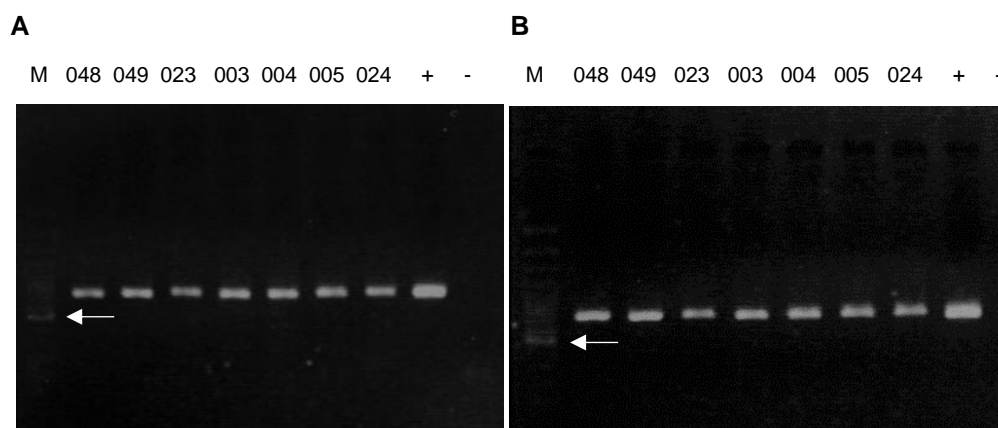


Figura 4. Productos de PCR para el gen COI en gel de agarosa 1,5% según los protocolos **A)** Rosli modificado 1 y **B)** Rosli modificado 2. **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras son los últimos dígitos del código BOLD relacionados en el Anexo B; +: control positivo (*Lonomia* sp); -: control negativo. Las flechas indican la banda de 500 pb.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y que tanto con la adición de BSA, como con BSA + DMSO, se obtuvieron los mismos resultados, se continuó utilizando el protocolo de Rosli modificado 1 y el programa de termociclado del CCDB, con el cual se procesaron 57 muestras más, de las cuales cinco (D1, H1, F2, D8, C9) no presentaron banda en los geles de agarosa y adicionalmente se observaron cinco bandas tenues (E1, A2, B2, C2, E8) (Figura 5).

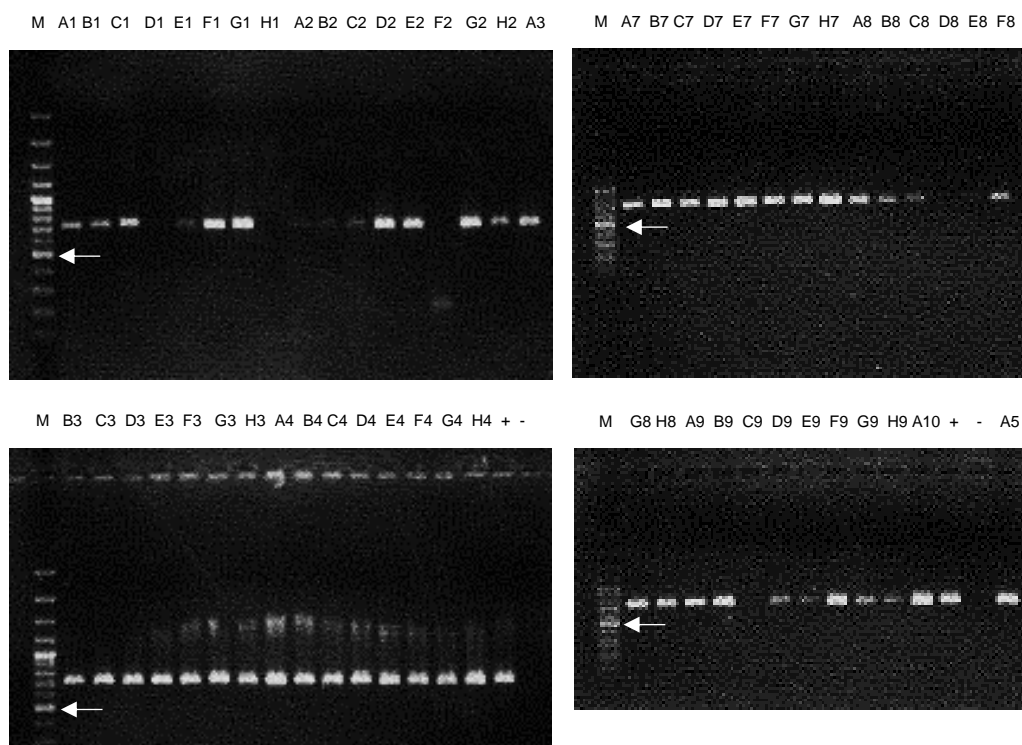


Figura 5. Productos de PCR para el gen COI en gel de agarosa 1,5%. **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras corresponden al número en placa Anexo C; +: control positivo (BAPN048-16); -: control negativo. Las flechas indican la banda de 500 pb.

Nuevamente, se realizaron pruebas adicionales modificando ligeramente las concentraciones de Magnesio (Mg) y TaqPolimerasa, que son recomendadas cuando se presentan problemas de amplificación debido a que la enzima se encarga de la replicación

utilizando como cofactor el Magnesio que al estar en bajas concentraciones disminuye el número de copias de ADN que se generan (Lorenz, 2012; Roux, 2009) y se puede evidenciar en la electroforesis como bandas tenues, además se adicionó DMSO (Tabla 9) con lo que se mejoró la resolución de algunas bandas: las cinco muestras tenues (E1, A2, B2, C2, E8) no presentaron mejora y dos (D8 y C9) de las cinco muestras que no amplificaron anteriormente presentaron una banda tenue (Figura 6).

Tabla 9

Condiciones modificadas de PCR para el gen COI

MIX PCR	[0]	[1]	1Rx
ddH2O			11,5
Cebadores	LCO1490/HCO2198		
FCebador	10uM	0,2uM	0,5
RCebador	10uM	0,2uM	0,5
dNTPs	10mM	0,2mM	0,5
Buffer	10x	1x	2,5
Mg	25mM	3mM	3
TaqPol	5U/ul	1,5U	0,3
DMSO	100%	4%	1
BSA	50mg/ml	0,4mg/ml	0,2
ADN	10ng/ul	50ng	5
Vol. Total			25

Nota: [0]= concentración inicial, [1]=concentración final, 1Rx=una reacción. En Negrilla se indican los valores modificados.

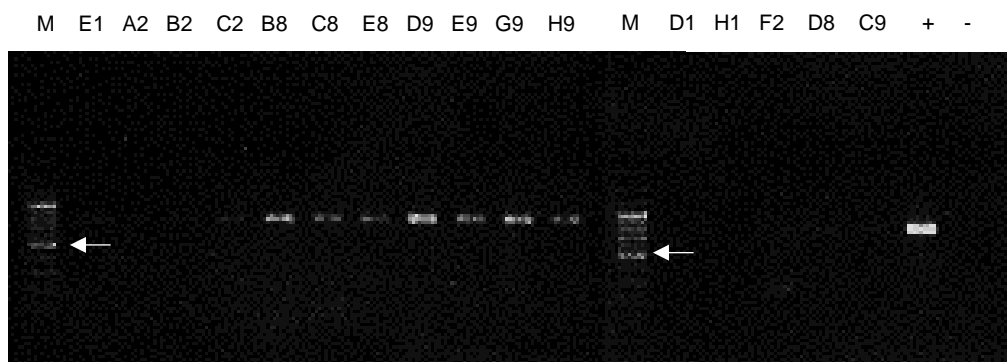


Figura 6. Productos de PCR con las condiciones modificadas para el gen COI en gel de agarosa 1,5%. **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras corresponden al número en placa Anexo C; +: control positivo (BAPN020-16); - : control negativo. Las flechas indican la banda de 500 pb.

Finalmente, se procesó un último lote de 15 muestras siguiendo las condiciones anteriores (Tabla 9). Se observó que cuatro muestras no amplificaron (001, 002, 61, 36) debido a que no se observaron bandas en el gel de agarosa y dos (033 y 034) presentaron bandas tenues (Figura 7).

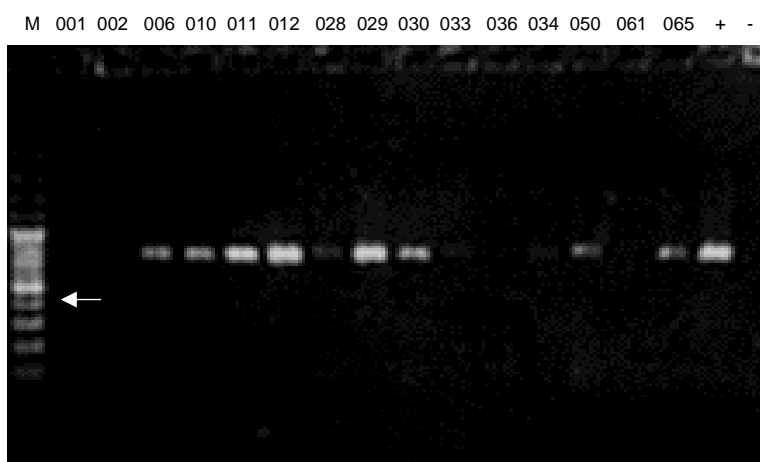


Figura 7. Productos de PCR para el gen COI en gel de agarosa 1,5%. **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras corresponden a los últimos dígitos del código BOLD relacionados en el Anexo B; +: control positivo (BAPN020-16); - : control negativo. La flecha indica la banda de 500 pb.

6.2.2. Protocolo para la amplificación del gen 16S rRNA

Inicialmente, se evaluó la amplificación del gen igual que como se llevó a cabo con COI, se procesaron las siete muestras (048, 049, 023, 003, 004, 005, 024), con los protocolos de PCR para 16S rRNA (Cawthorn, y otros, 2012; Mendoza, y otros, 2012) descritos en las Tablas 6 y 7. La electroforesis permitió observar que con el protocolo de Cawthorn y otros (2012), se amplificaron todas las muestras, aunque, la muestra 003 presentó una banda tenue, mientras que con el protocolo de Mendoza y otros (2012) no se observó ninguna banda en el gel debido a que las muestras se evaporaron durante la PCR (Figura 8).

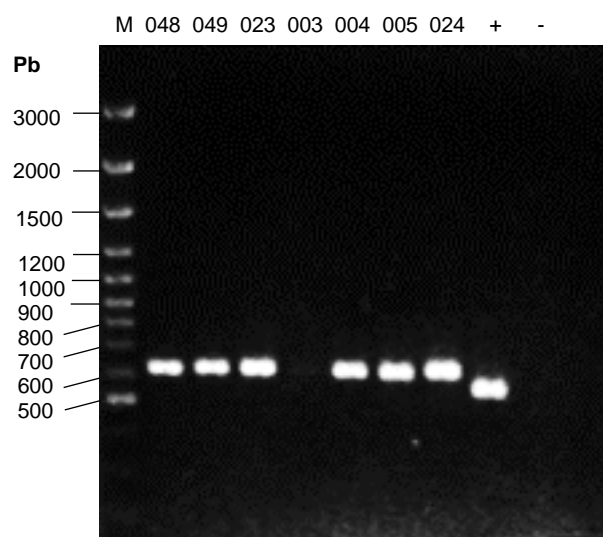


Figura 8. Productos de PCR para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5% obtenidos con el protocolo de Cawthorn y otros (2012). **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras son los últimos dígitos del código BOLD relacionados en el Anexo B; +: control positivo (*Lonomia* sp); -: control negativo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se continuó utilizando el protocolo de Cawthorn y colaboradores (2012) modificado con la adición de 0,2 µl de BSA (Farell, y otros, 2012), por reacción, al mix de PCR teniendo en cuenta que la muestra 003 presentó una banda tenue. Así, se repitió esta última muestra la cual presentó una banda más intensa y se amplificaron 57 muestras más de las cuales una (F2) indicó una banda tenue (Figura 9).

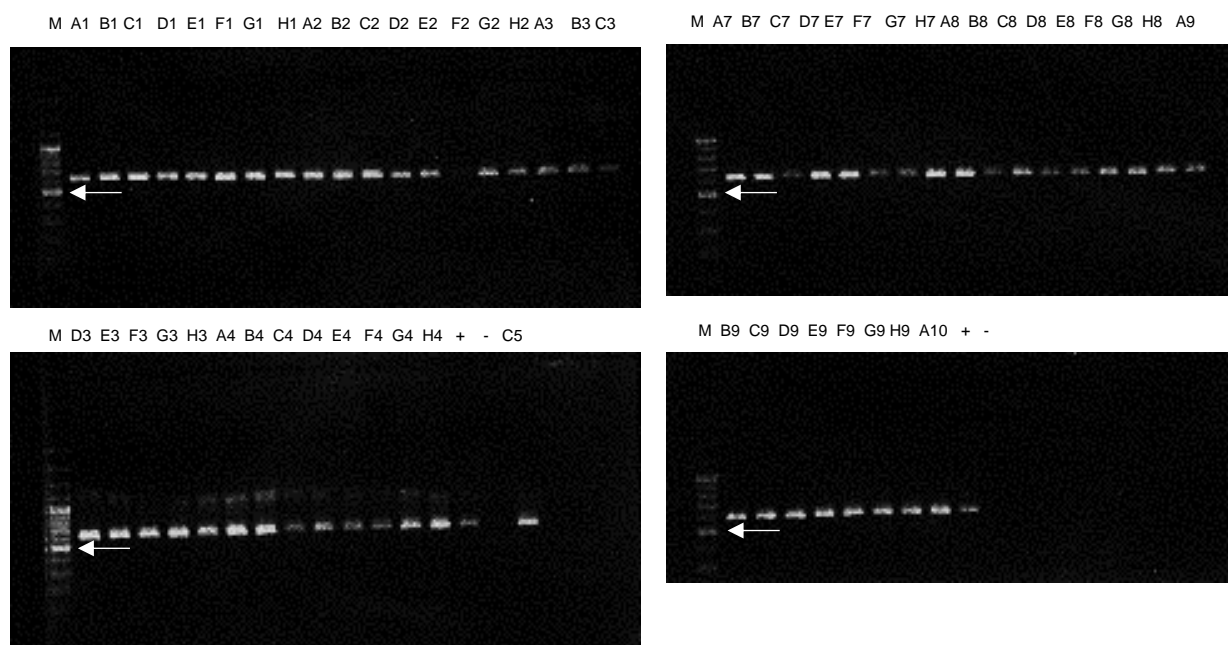


Figura 9. Productos de PCR para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5%. **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras corresponden al número en placa Anexo C; +: control positivo (BAPN048-16); -: control negativo. Las flechas indican la banda de 500 pb.

Al igual que con el gen COI, se realizaron pruebas adicionales modificando las concentraciones de Magnesio (Mg), TaqPolimerasa y DMSO (Tabla 10) para optimizar la amplificación de muestras tenues, sin embargo, se obtuvo el mismo resultado con la muestra F2 (Figura 10).

Tabla 10
Condiciones modificadas de PCR para el gen 16S rRNA

MIX PCR	[0]	[1]	1Rx
ddH₂O			12,15
Cebadores	16Sa-L/16Sb-H		
Fcebador	10uM	0,12uM	0,3
RCebador	10uM	0,12uM	0,3
dNTPs	10mM	0,1mM	0,25
Buffer	10x	1x	2,5
Mg	25mM	3mM	3
TaqPol	5U/ul	1,5U	0,3
DMSO	100%	4%	1
BSA	50mg/ml	0,4mg/ml	0,2
ADN	10ng/ul	50ng	5
Vol. Total			25

Nota: [0]= concentración inicial, [1]=concentración final, 1Rx=una reacción. En Negrilla se indican los valores modificados.

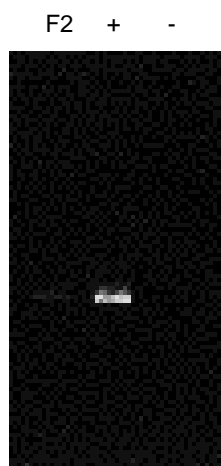


Figura 10. Productos de PCR con las condiciones modificadas para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5%. M: escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras corresponden al número en placa Anexo C; +: control positivo (BAPN020-16); -: control negativo.

Finalmente, se procesó un último lote de 15 muestras siguiendo las condiciones anteriores (Tabla 10) con las cuales la muestra 001 no amplificó (Figura 11).

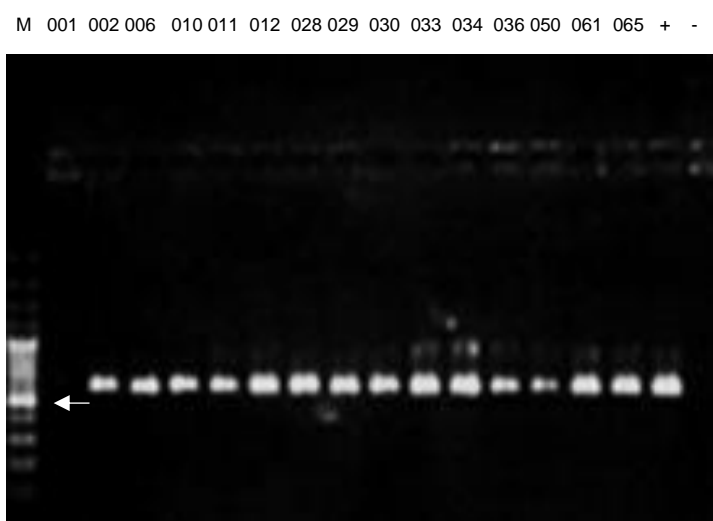


Figura 11. Productos de PCR para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5%. **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras corresponden a los últimos dígitos del código BOLD relacionados en el Anexo B; +: control positivo (BAPN020-16); -: control negativo. La flecha indica la banda de 500 pb.

Se realizó una última prueba tomando 1 μ l del primer producto de PCR de la muestra tenue (F2) y se reamplificó, se repitió el proceso con una dilución 1/10 con el fin de diluir posibles inhibidores de la PCR, con las mismas condiciones de mix y termociclado (Tabla 10). Se logró obtener mejor resolución de la banda en la electroforesis tanto en el ensayo con diluciones y sin ellas (Figura 12). Adicionalmente, se repitió la PCR para la muestra que no presentó banda (001) sin embargo se obtuvo el mismo resultado.

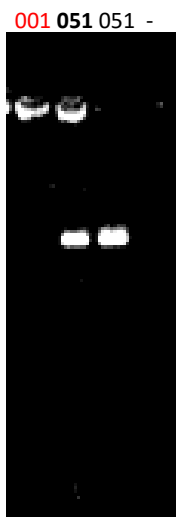


Figura 12. Productos de PCR para el gen 16S rRNA en gel de agarosa 1,5%. **M:** escalera de peso molecular 100 pb leader Invitrogen; los códigos de las muestras corresponden a los últimos dígitos del código BOLD relacionados en el Anexo B; - : control negativo. El número en **negrilla** indica la muestra diluida 1/10. El número en **rojo** corresponden a la muestra que se repitió con ADN total.

En total se obtuvo la amplificación de los genes COI y 16S rRNA para el 87,3% y 98,7% de las muestras, respectivamente. Esta diferencia se puede explicar con los resultados obtenidos por Vences y colaboradores (2005b) quienes compararon el desempeño de ambos genes en anfibios con los mismos cebadores utilizados en este estudio y demostraron que 16S rRNA es mucho más universal y los sitios *priming* en la secuencia son menos variables en comparación con COI, incluso en especies cercanamente relacionadas. Esto resultaría en problemas de amplificación con COI en el paso de anillamiento de los cebadores con la secuencia molde de ADN y puede ser el inconveniente observado en especies como *Centrolene buckleyi*, *Gastrotheca orophylax* y *Pristimantis ortizi*, el cual puede ser superado mediante el uso de cebadores degenerados como los propuestos por Geller, Meyer, Parker y Hawk (2013) y Meyer (2003) o específicos para anuros como los propuestos por Che y otros (2012) y Lyra, Haddad y Azeredo-Espin (2017) quienes han obtenido 100% de éxito en la amplificación.

6.3. Obtención de los códigos de barras de ADN

Se realizaron tres secuenciaciones de 147 muestras en total debido a que algunas de las secuencias obtenidas por primera vez presentaron valores de calidad bajos (menores al 10%) y se rectificó las muestras de alta calidad. De esta manera más del 89% de las secuencias fueron de alta calidad, menos del 5% presentaron calidad intermedia y entre el 1% y 4% fueron de calidad baja o secuenciación fallida debido a la baja concentración de la muestra y/o la formación de dímeros. La edición y empalme de los *trace files* permitió obtener los códigos de barras de ADN en forma de secuencias consenso que no presentaron codones *stop*. La Tabla 11 resume el número total de códigos de barras obtenidos con COI y 16S rRNA para cada especie. Aunque, se obtuvieron secuencias que no se consideraron *barcode compliant*, estas se tuvieron en cuenta para análisis filogenéticos posteriores.

Tabla 11.

Numero de secuencias obtenidas para cada especie. Para cada gen se indica el número de secuencias BC=Barcode compliant y NBC=No barcode compliant.

Especie	COI		16S rRNA		Total
	BC	NBC	BC	NBC	
<i>P. myersi</i>	11	1	10	3	25
<i>P. colonensis</i>	1	0	1	0	2
<i>P. chloronotus</i>	6	1	7	0	14
<i>P. ortizi</i>	1	0	4	0	5
<i>P. supernatis</i>	11	0	11	0	22
<i>P. buckleyi</i>	11	0	8	3	22
<i>P. huicundo</i>	9	3	15	0	27
<i>P. farisorum</i>	2	0	2	0	4
<i>P. unistrigatus</i>	4	0	4	0	8
<i>H. sp</i>	6	0	7	0	13
<i>H. elassodiscus</i>	2	0	2*	0	4
<i>C. buckleyi</i>	0	0	0	0	0
<i>G. orophylax</i>	0	0	1	0	1
Total	64	5	72	6	147

Nota: *Muestra BAPN010-16 con secuencias de baja calidad en ambos sentidos (Forward y Reverse)

La información (metadatos), *trace files* y códigos de barras de las especies de este estudio se publicaron en la base de datos de BOLDSYSTEMS v4 beta (<http://v4.boldsystems.org/index.php>, Ratnasingham, y otros, 2007) con el nombre de proyecto “Barcodes of amphibians from paramos of Nariño” y/o código de proyecto BAPN que puede ser consultado libremente.

6.4. Análisis de códigos de barras de ADN

6.4.1. Alineamientos y análisis de distancias genéticas

El alineamiento del gen COI indico 658 sitios alineados de los cuales 370 son conservados y 288 son variables, en el caso de 16S rRNA se alinearon 581 sitios de los cuales 350 se consideran conservados y 226 variables. La Tabla 12 indica el número de caracteres diagnósticos para género y especie con cada gen, los Anexos D y E indican con más detalle el tipo y posición de cada carácter.

Tabla 12

Caracteres diagnósticos y parciales para género y especies obtenidos del alineamiento de los genes COI y 16S rRNA

Gen Género	COI			16S rRNA		
	N	# Caracteres diagnósticos	# Caracteres Parciales	n	# Caracteres diagnósticos	# Caracteres parciales
<i>Hypodactylus</i>	8	15	184	9	30	118
<i>Pristimantis</i>	56	1	5	62	16	18
Especie						
<i>Hypodactylus AN01</i>	6	20	14	7	37	10
<i>Pristimantis buckleyi</i>	11	8	14	8	4	9
<i>Pristimantis chloronotus</i>	6	3	32	7	4	3
<i>Pristimantis huicundo</i>	9	2	6	15	0	0
<i>Pristimantis myersi</i>	11	2	8	10	3	1
<i>Pristimantis supernatis</i>	11	5	12	11	5	4
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	4	20	46	4	17	15

Con el fin de evidenciar la presencia de un umbral o *barcode gap* para la separación de especies se obtuvieron los valores promedio, mínimo y máximo de las distancias genéticas intraespecífica e interespecífica para los genes COI y 16S rRNA con K2P, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13

Valores de divergencia intraespecífica e interespecífica para los genes COI y 16S rRNA

Gen	Distancia	N	Taxa	Min Dist (%)	Prom Dist (%)	Max Dist (%)	SE Dist (%)
COI	Intraespecífica	62	9	0.00	4.17	15.24	0.38
	Interespecífica	64	2	0.17	23.09	30.90	0.00
16S rRNA	Intraespecífica	70	10	0.00	1.49	6.58	0.11
	Interespecífica	71	2	0.00	10.96	16.98	0.00

Algunos estudios de código de barras de ADN en anfibios han demostrado y propuesto diferentes valores umbrales para la diferenciación de especies, por ejemplo, del 10% para COI (Vences, y otros, 2005a) y entre el 3% y 5% para 16S rRNA (Fouquet, y otros, 2007; Vences, y otros, 2005b), también del 8% para COI y >2% para 16S rRNA según Crawford y otros (2010). Mas recientemente Guarnizo y colaboradores (2015) propone un valor del 6% con una matriz concatenada de COI y 16S rRNA y Lyra y otros (2017) sugiere valores del 6% para COI y 3% para 16S rRNA, para anfibios neotropicales. Incluso, se ha propuesto que una divergencia >5% representa una alta variación intraespecífica. En este estudio se obtuvieron promedios de variación intraespecífica máxima de 15,24% y 6,58% para COI y 16S rRNA, respectivamente, que superan los valores reportados en la literatura y que, además, se solapan con la distancia interespecífica mínima (valores en negrilla Tabla 13), sugiriendo que no existe un umbral a partir del cual se pueda delimitar una especie de otra. Por lo tanto, se realizó un

análisis de *barcode gap* en BOLD que especificó los casos en los cuales las distancias genéticas anteriormente mencionadas se solaparon (Tablas 14 y 15).

Tabla 14

Comparación de la distancia intraespecífica máxima y promedio con la especie vecina más cercana obtenidas con el gen COI.

Especies	Prom Intra-Sp	Max Intra-Sp	Especie más cercana	NN	Distancia a NN
<i>Hypodactylus AN01</i>	9.97	15.24	<i>Hypodactylus elassodiscus</i>	BAPN011-16	12.52
<i>Hypodactylus elassodiscus</i>	8.88	8.88	<i>Hypodactylus AN01</i>	BAPN003-16	12.52
<i>Pristimantis buckleyi</i>	2.65	4.46	<i>Pristimantis supernatis</i>	BAPN066-16	17.27
<i>Pristimantis chloronotus</i>	0.32	1.01	<i>Pristimantis huicundo</i>	BAPN041-16	13.44
<i>Pristimantis colonensis</i>	N/A	0	<i>Pristimantis huicundo</i>	BAPN033-16	9.92
<i>Pristimantis farisorum</i>	0	0	<i>Pristimantis huicundo</i>	BAPN033-16	21.34
<i>Pristimantis huicundo</i>	5.77	11.67	<i>Pristimantis ortizi</i>	BAPN064-16	0.17
<i>Pristimantis myersi</i>	5.43	13.13	<i>Pristimantis buckleyi</i>	BAPN022-16	17.97
<i>Pristimantis ortizi</i>	N/A	0	<i>Pristimantis huicundo</i>	BAPN039-16	0.17
<i>Pristimantis supernatis</i>	3.39	11.38	<i>Pristimantis buckleyi</i>	BAPN013-16	17.27
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	1.15	2.3	<i>Pristimantis myersi</i>	BAPN049-16	24.04

Nota: Los valores para especies con *singletons* se muestran como N/A. En **negrilla** se indican los casos en que la distancia a la especie vecina más cercana es menor que la máxima distancia intraespecífica o al 2%. NN=Nearest neighbour, Prom=promedio.

Tabla 15

Comparación de la distancia intraespecífica máxima y promedio con la especie vecina más cercana obtenidas con el gen 16S rRNA.

Especies	Prom Intra-Sp	Max Intra-Sp	Especie más cercana	NN	Distancia a NN
<i>Hypodactylus AN01</i>	3.3	5.02	<i>Hypodactylus elassodiscus</i>	BAPN011-16	3.86
<i>Hypodactylus elassodiscus</i>	1.35	1.35	<i>Hypodactylus AN01</i>	BAPN004-16	3.86
<i>Pristimantis buckleyi</i>	1.1	2.49	<i>Pristimantis supernatis</i>	BAPN066-16	5.61
<i>Pristimantis chloronotus</i>	0.15	0.54	<i>Pristimantis huicundo</i>	BAPN035-16	3.47
<i>Pristimantis colonensis</i>	N/A	0	<i>Pristimantis huicundo</i>	BAPN035-16	3.67
<i>Pristimantis farisorum</i>	0.18	0.18	<i>Pristimantis myersi</i>	BAPN060-16	11.1
<i>Pristimantis huicundo</i>	2.29	4.63	<i>Pristimantis ortizi</i>	BAPN064-16	0
<i>Pristimantis myersi</i>	2.62	6.58	<i>Pristimantis buckleyi</i>	BAPN022-16	5.97
<i>Pristimantis ortizi</i>	2.26	4.25	<i>Pristimantis huicundo</i>	BAPN039-16	0
<i>Pristimantis supernatis</i>	1.46	5.6	<i>Pristimantis buckleyi</i>	BAPN022-16	5.61
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	0.18	0.37	<i>Pristimantis myersi</i>	BAPN048-16	10.29
<i>Gastrotheca orophylax</i>	N/A	0	<i>Pristimantis buckleyi</i>	BAPN018-16	16.34

Nota: Los valores para especies con *singletons* se muestran como N/A. En **negrilla** se indican los casos en que la distancia a la especie vecina más cercana es menor que la máxima distancia intraespecífica o al 2%. NN=Nearest neighbour, Prom=promedio.

Se observó que los valores de diversidad genética son mucho más altos con COI en comparación con 16S rRNA, hecho que soporta la alta variabilidad de COI sobre 16S rRNA reportada en otros estudios (Hebert, y otros, 2003; Xia, y otros, 2011), sin embargo, con ambos genes se solapan la distancia intraespecífica máxima y/o promedio con la distancia a la especie vecina más cercana en dos casos con incongruencias de agrupamiento (basadas en la identificación *a priori* de las especies): *H. elassodiscus* + *H. AN01* y *P. huicundo* + *P. ortizi*, sugiriendo la ausencia de un umbral para la delimitación de estas especies. Adicionalmente, se obtuvo que para las especies *P. buckleyi* y *P. myersi* el gen 16S rRNA no permite discriminarlas, en comparación con COI. Este problema también puede representarse en un gráfico de distribución y serán los puntos bajo la pendiente en la cual la distancia intraespecífica máxima o promedio y la distancia a la especie vecina más cercana son iguales (Figuras 13 y 14).

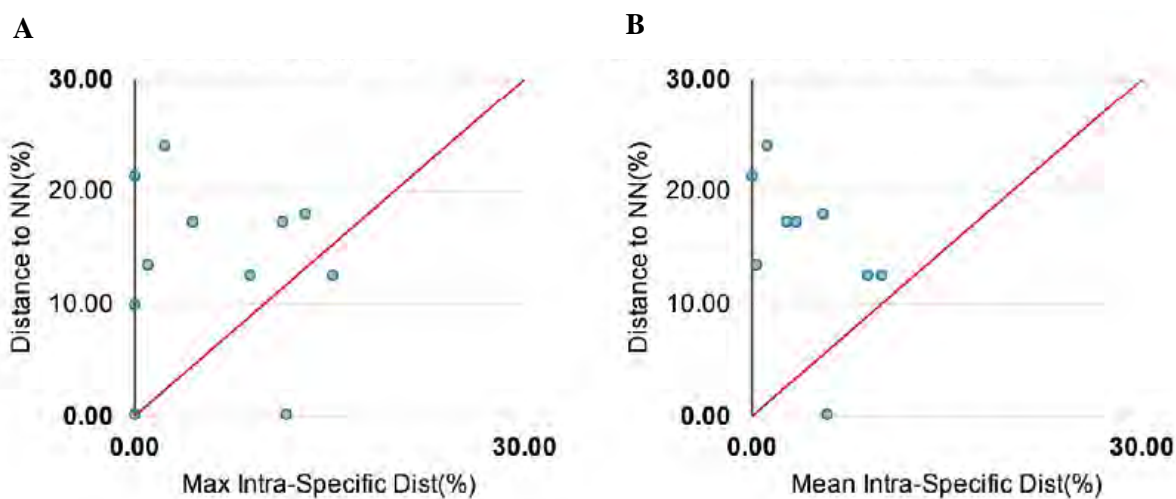


Figura 13. Gráfico de distribución de distancias obtenidas con el gen COI, para confirmar la existencia y magnitud de *Barcode gap*. Se muestra la distancia al vecino más cercano versus **A)** la distancia intraespecífica máxima y **B)** la distancia intraespecífica promedio.

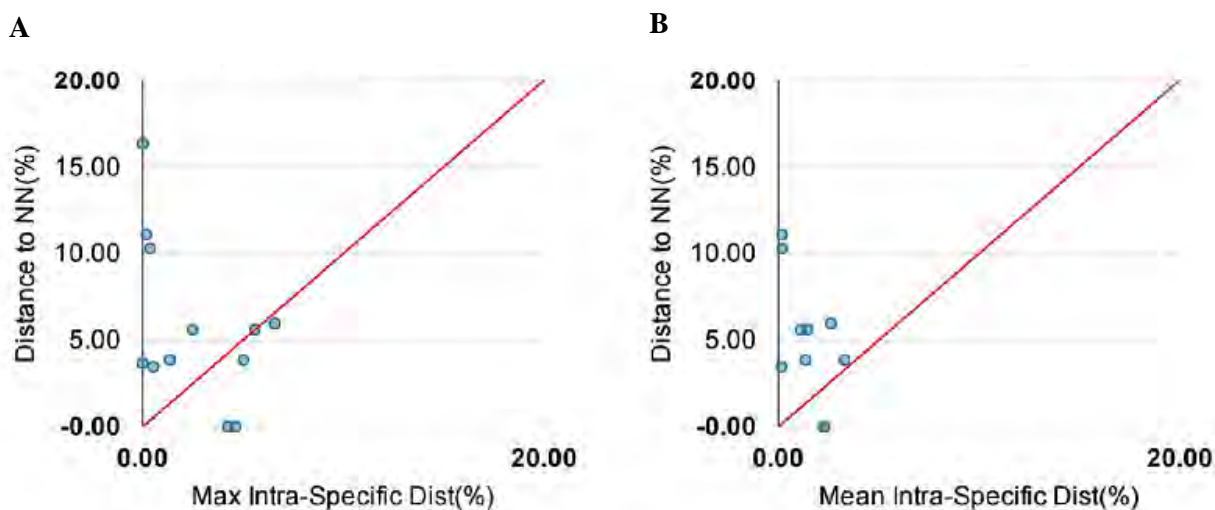


Figura 14. Gráfico de distribución de distancias obtenidas con el gen 16S rRNA, para confirmar la existencia y magnitud de *Barcode gap*. Se muestra la distancia al vecino más cercano versus **A)** la distancia intraespecífica máxima y **B)** la distancia intraespecífica promedio.

Por otra parte, al hacer el análisis a nivel de género se obtuvo una distancia interespecífica mínima de 0,234 y 0,189 con COI y 16S rRNA, respectivamente, entre *Hypodactylus* y *Pristimantis*, y una distancia interespecífica máxima dentro del género *Hypodactylus* de 0,165 y 0,048 con COI y 16S rRNA respectivamente, es decir, cualquier valor de divergencia por debajo del 16,5% (COI) o 4,8% (16S rRNA) pertenecerá a especies del género *Hypodactylus* y valores por encima del 23,4% (COI) o 18,9% (16S rRNA) serán asignados a especies del género *Pristimantis*.

Con el fin de evidenciar la cohesión de las especies, se realizó un análisis de agrupamiento, con los datos de divergencia obtenidos anteriormente, mediante *Neighbor Joining* y el modelo de sustitución K2P. Las figuras 15 y 16 muestran los resultados obtenidos tanto para COI como para 16S rRNA en donde se evidenció la monofilia de la mayoría de especies, incluso

de *P. myersi* y *P. buckleyi*, y con las excepciones de *Pristimantis ortizi* + *Pristimantis huicundo* (+ *Pristimantis colonensis* con 16S rRNA) e *Hypodactylus elassodiscus* + *H. AN01*, que se representaron como especies parafiléticas.

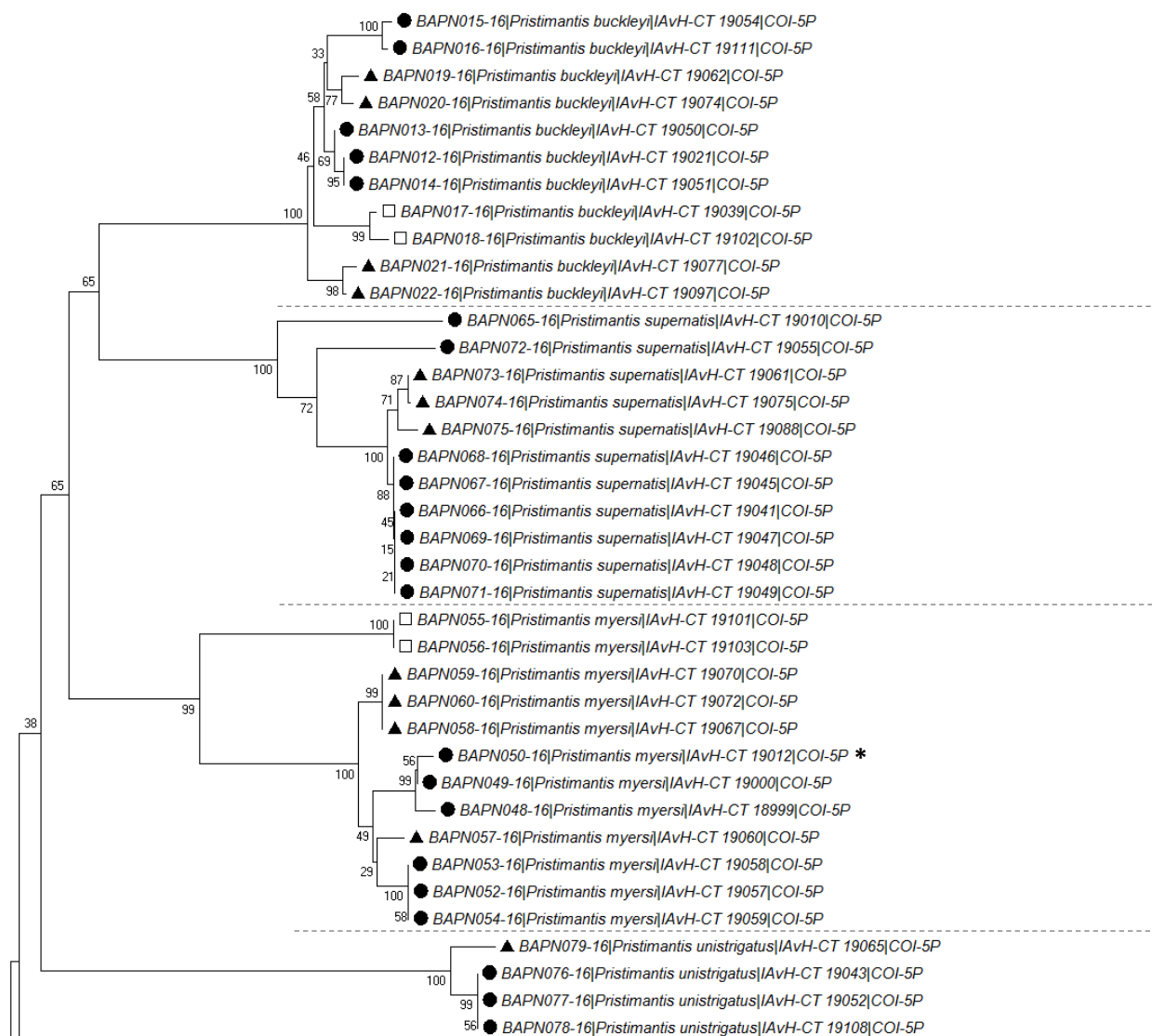


Figura 15. Árbol *Neighbor Joining* (NJ) basado en las distancias genéticas de 69 secuencias del gen COI, mediante el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P). Los valores en cada nodo indican el valor de *bootstrap* (1000 réplicas). Las líneas interrumpidas delimitan los grupos de especies identificadas *a priori*. Las flechas indican los nodos con problemas de agrupamiento evidenciado por el solapamiento de las distancias intraespecífica e interespecífica (Ver Tablas 14 y 15). Los asteriscos indican secuencias que no se consideran *Barcode compliant*. ● = La Cocha-Patascóy; ▲ = Doña Juana-Juanoy; □ = Chiles-Cumbal.

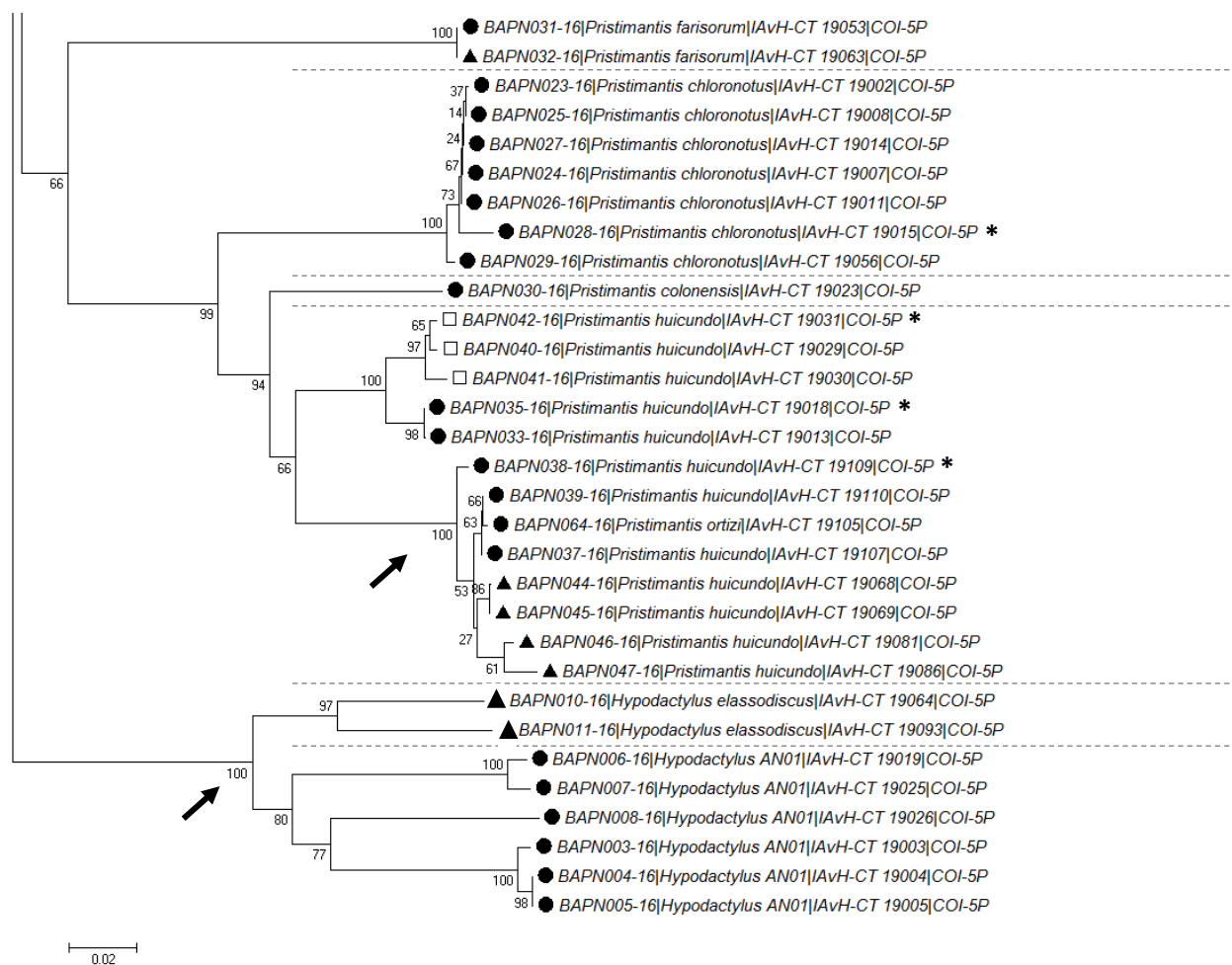


Figura 15. Árbol Neighbor Joining (NJ) basado en 69 secuencias del gen COI, continuación.

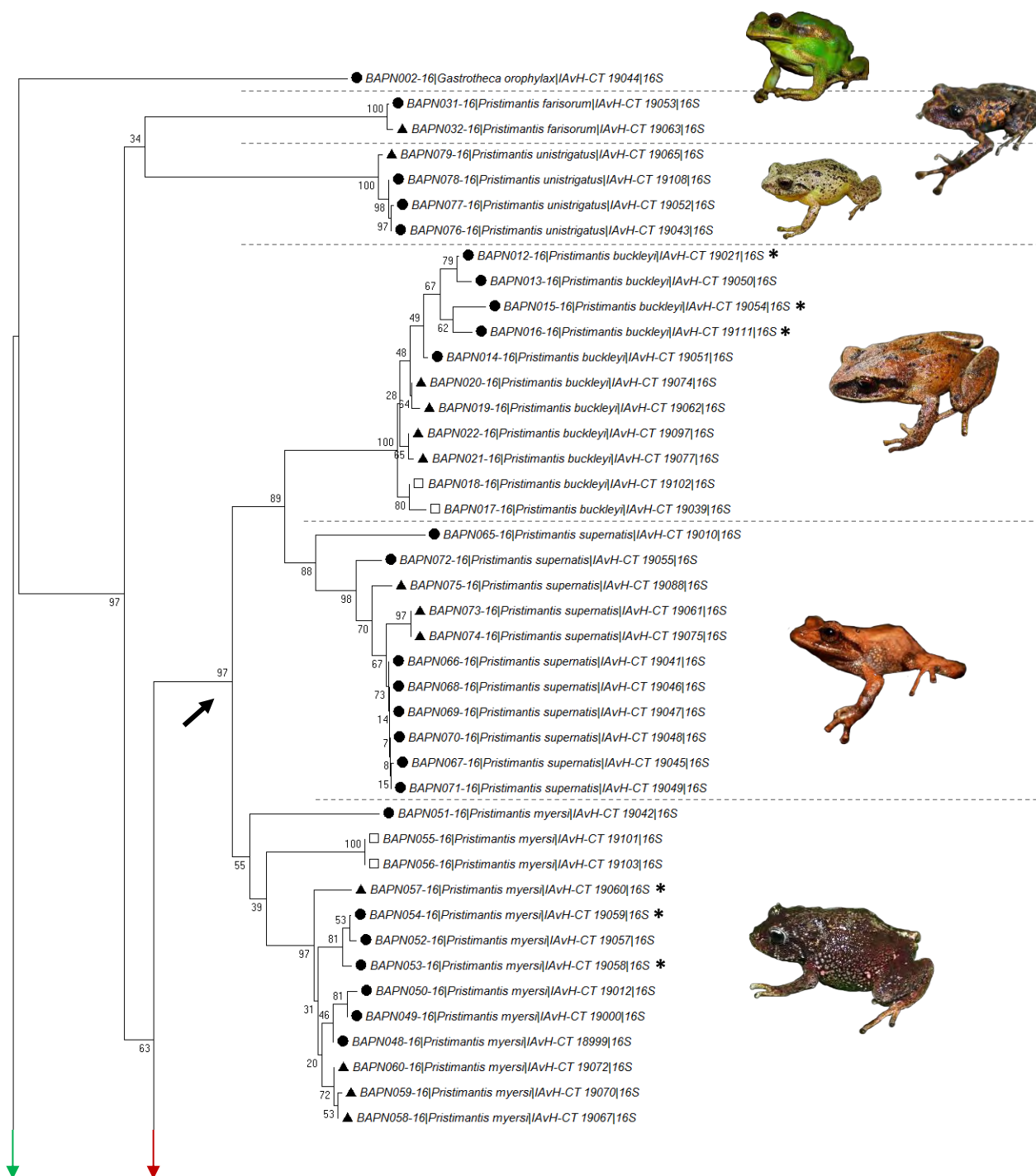


Figura 16. Árbol *Neighbor Joining* (NJ) basado en las distancias genéticas de 78 secuencias del gen 16S rRNA mediante el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P). Los valores en cada nodo indican el valor de *bootstrap* (1000 réplicas). Las líneas interrumpidas delimitan los grupos de especies identificadas *a priori*. Las flechas negras indican los nodos con problemas de agrupamiento evidenciado por el solapamiento de las distancias intraespecífica e interespecífica (Ver Tablas 14 y 15). Los asteriscos indican secuencias que no se consideran *Barcode compliant*. ● = La Cocha-Patascoy; ▲ = Doña Juana-Juanoy; □ = Chiles-Cumbal.

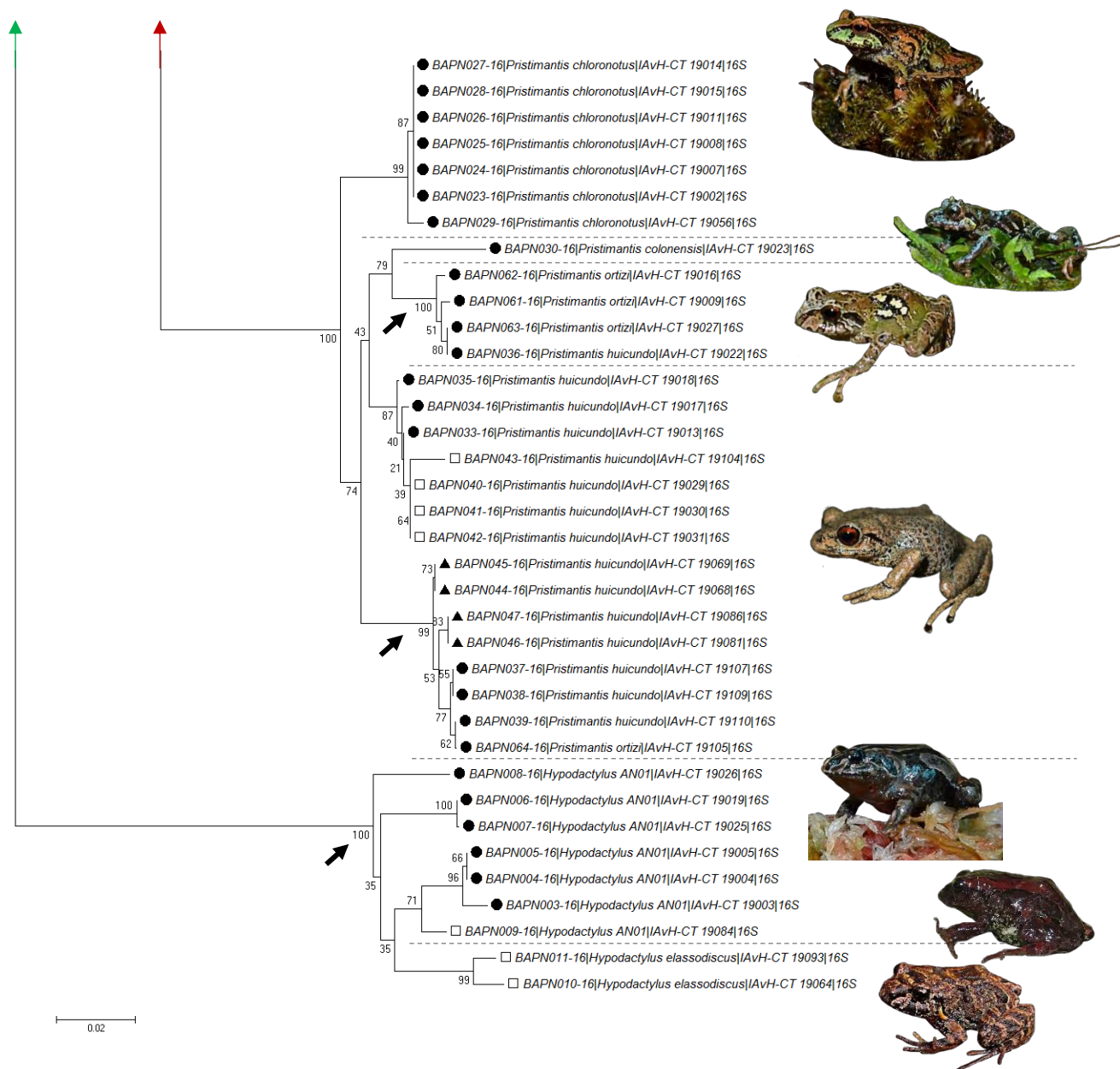


Figura 16. Árbol Neighbor Joining (NJ) basado en 78 secuencias del gen 16S rRNA, continuación.

El análisis de probabilidad de ajuste de los datos a un modelo evolutivo llevado a cabo en jModelTest, para ambos genes, propuso como modelo GTR+G+I, considerado como uno de los más complejos ya que asume diferentes frecuencias y seis tasas de sustitución nucleotídica, en diferentes sitios de la secuencia (distribución gamma) teniendo en cuenta una proporción

de sitios invariables (tasa de cambio = 0), y que además, ha demostrado ser consistente en la estimación de árboles filogenéticos mediante métodos de máxima verosimilitud (Felsenstein, 2003; Gatto, Catanzaro, & Milinkovitch, 2006) por lo que otros estudios en anfibios también lo han utilizado (Che, y otros, 2012; Guarnizo, y otros, 2015; Mendoza, y otros, 2015; Padial, y otros, 2014). Las figuras 17 y 18 muestran los resultados del análisis filogenético mediante máxima verosimilitud, para los genes COI y 16S rRNA, con el mejor modelo de evolución según el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Anexo H), en donde se observó un agrupamiento similar al obtenido mediante NJ con K2P debido a que se evidencia nuevamente la monofilia de la mayoría de especies, a excepción de *Pristimantis ortizi* + *Pristimantis huicundo* + *Pristimantis colonensis* e *Hypodactylus elassodiscus* + *H. AN01*, que se representaron como clados parafileticos.

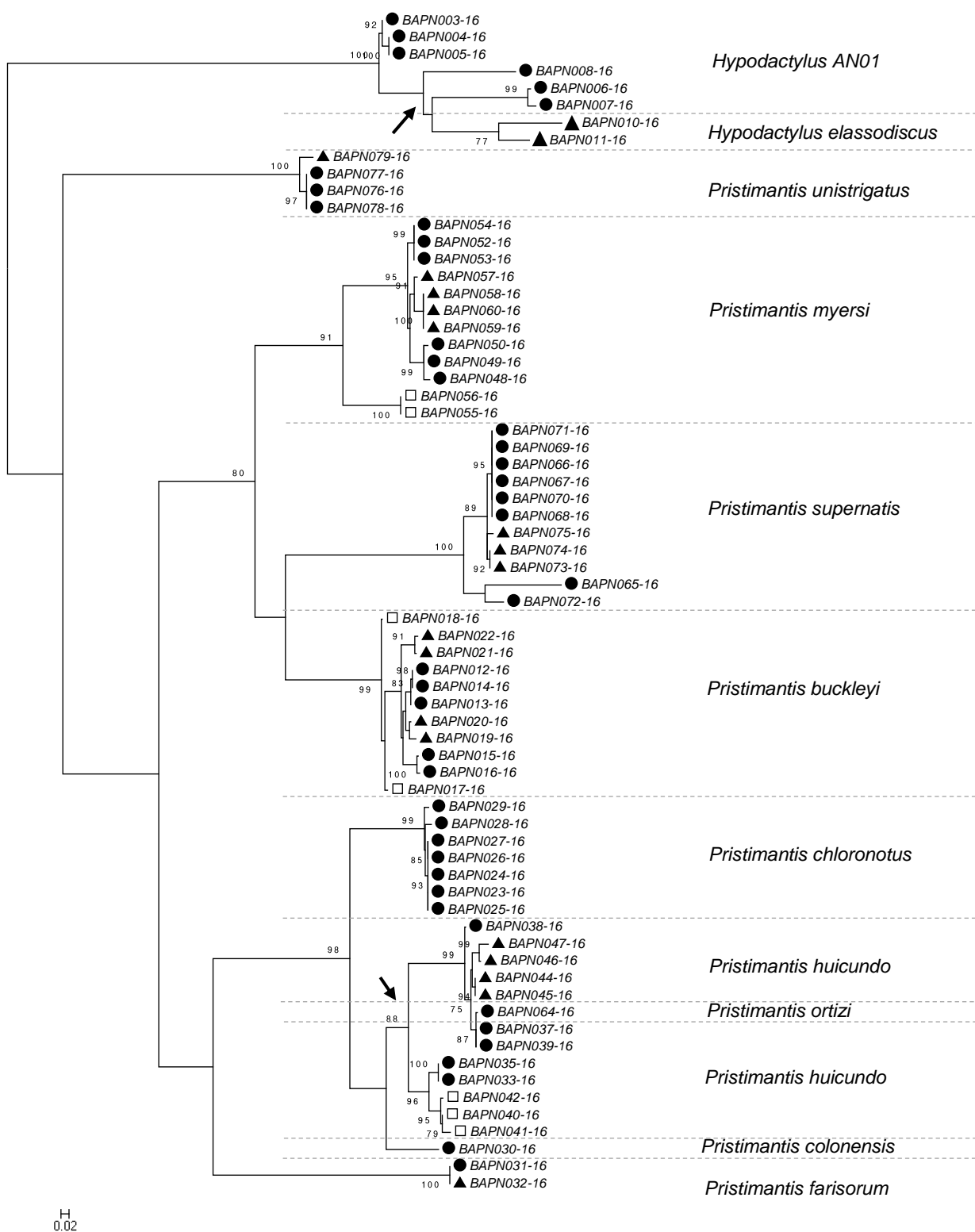


Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud con base en la distancia genética de 69 secuencias de COI mediante el modelo de sustitución GTR+G+I en RAxML (Silvestro y Michalak, 2011). *Bootstrap*=1000 réplicas (No se muestran valores inferiores al 75%). Las flechas señalan los nodos que representan incongruencias de agrupamiento. Las líneas interrumpidas delimitan los grupos de especies identificadas *a priori*, ● = La Cocha-Patascoy; ▲ = Doña Juana-Juanoy; □ = Chiles-Cumbal.

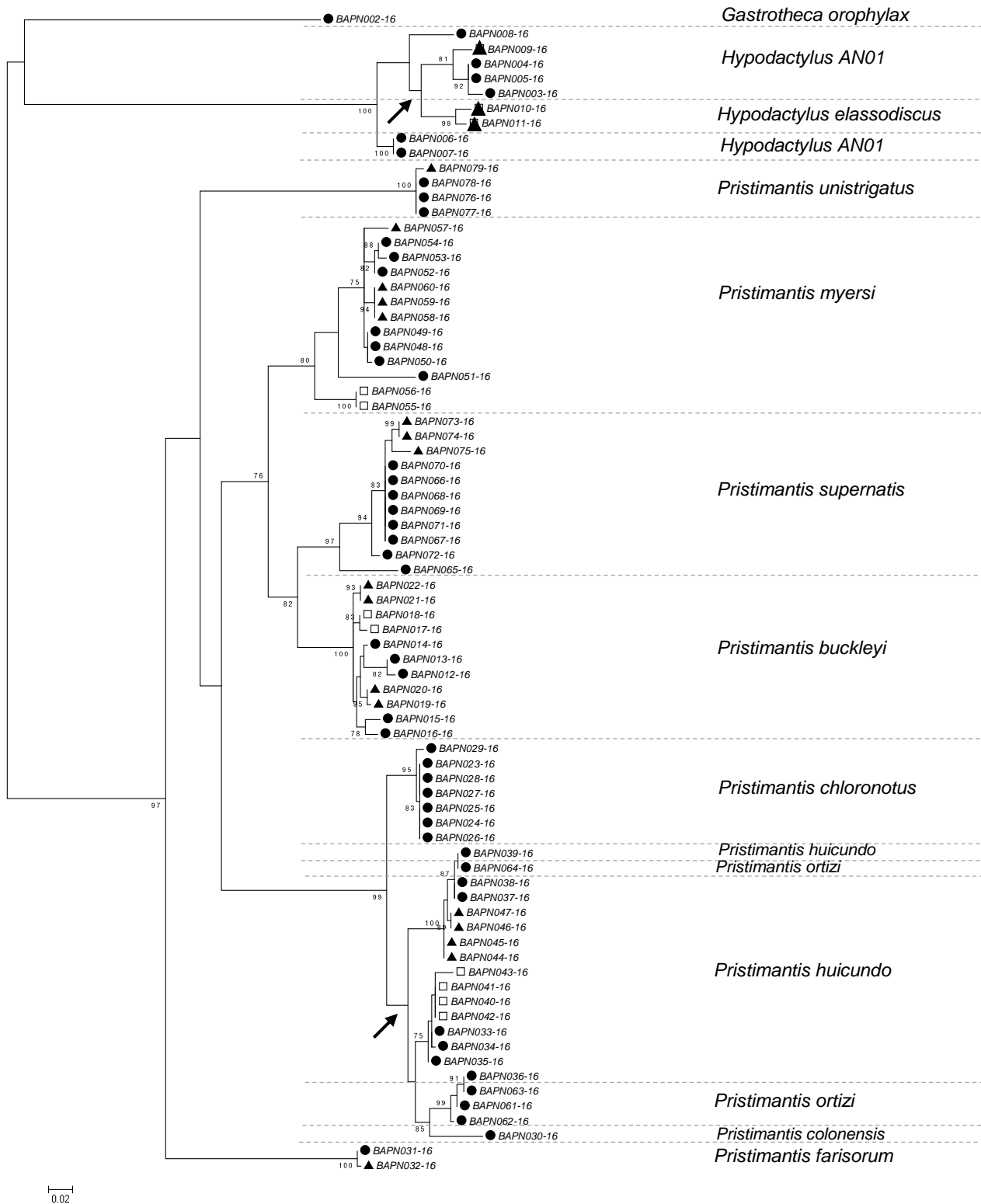


Figura 18. Árbol de máxima verosimilitud con base en la distancia genética de 78 secuencias de 16S rRNA mediante el modelo de sustitución GTR+G+I en RAxML (Silvestro y Michalak, 2011). Bootstrap=1000 réplicas. (No se muestran valores inferiores al 75%). Las flechas señalan los nodos que representan incongruencias de agrupamiento. Las líneas interrumpidas delimitan los grupos de especies identificadas *a priori* ● = La Cocha-Patascoy; ▲ = Doña Juana-Juanoy; □ = Chiles-Cumbal.

Según los análisis de divergencia genética, *barcode gap* y filogenéticos, en conjunto, se obtuvieron resultados correlacionados que soportan la congruencia de la identificación de las especies monofiléticas en los árboles (*P. chloronotus*, *P. farisorum*, *P. myersi*, *P. buckleyi*, *P. supernatis* y *P. unistrigatus*) y dos casos de parafilia con solapamiento de la distancia genética intraespecífica e interespecífica.

En el primer caso (*H. AN01* + *H. elassodiscus*), la distancia intraespecífica máxima de la primera especie (*H. AN01*) supera la distancia genética a la especie vecina más cercana BAPN011 (*H. elassodiscus*) (Tablas 14 y 15) y los agrupamientos NJ y ML obtenidos con COI y 16S rRNA bajo los modelos de sustitución K2P y GTR+G+I incluyen ambas especies en un clado único para el género, soportado con valores de *bootstrap* del 100%. Sin embargo, en general, la especie *H. elassodiscus* que proviene del complejo Doña Juana-Juanoy es afín con las muestras BAPN006, 007, 008 de *H. AN01* provenientes del complejo La Cocha-Patascoy según el gen COI, con valores de *bootstrap* del 100% con K2P, aunque menor al 75% con GTR+G+I. Por otra parte, según el gen 16S rRNA, las mismas muestras de *H. elassodiscus* son afines a las muestras BAPN009 de la misma localidad y BAPN003, 004, 005 del complejo La Cocha-Patascoy, aunque este agrupamiento esta soportado con valores de *bootstrap* menores al 75% en los nodos terminales.

La baja variabilidad interespecífica entre estas dos especies, en comparación con la variabilidad intraespecífica sugiere que se trata de una sola especie con alta variabilidad interna, distribuida en ambos complejos de Páramos. Con el fin de soportar esta hipótesis y considerando que los estudio de filogenia, en los que se incluye el género *Hypodactylus*, realizados por Padial y otros (2014) y Pyron y Wiens (2011) proponen a *H. brunneus* como

especie hermana de *H. elassodiscus*, y su distribución compartida en Nariño (Acosta-Galvis, y otros, 2017), se comparó con BLAST (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990) las secuencias de 16S rRNA de esta última especie, debido a que este gen está mejor representado para el género en la base de datos de GenBank (Clark, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell, & Sayers, 2016). El resultado indicó, con una cobertura del 100%, un porcentaje de identidad $\geq 95\%$ con *H. brunneus* y $\leq 94\%$ con otras secuencias de *H. elassodiscus*. Sin embargo, es necesario complementar estas observaciones con una revisión más a fondo de tipo morfológico que apoye esta hipótesis.

En el segundo caso (*P. huicundo* + *P. ortizi*) la distancia máxima intraespecífica de *P. huicundo* también superan la distancia genética a la especie vecina más cercana BAPN064 (*P. ortizi*) (Tablas 14 y 15). Aunque, *P. ortizi* está representada por una única secuencia COI, y por lo tanto un único valor de divergencia respecto a la secuencia más cercana, esto no influyó en el agrupamiento con 16S rRNA donde la misma especie está representada por cuatro secuencias. Los agrupamientos NJ y ML obtenidos con ambos genes bajo los modelos de sustitución K2P y GTR+G+I recuperaron la incongruencia así: La muestra BAPN064 de *P. ortizi* es más similar a las muestras BAPN037 y 039 según COI (*bootstrap* > 75% solo con GTR+G+I), igualmente lo demuestra 16S rRNA adicionando la muestra BAPN038 (*bootstrap* > 75%). Por otra parte, la muestra BAPN036 de la especie *P. huicundo* se agrupó con las muestras BAPN061, 062, 063 según el gen 16S rRNA (*bootstrap* > 95%). Todas las muestras provinieron del complejo La Cocha-Patascoy.

En el caso de la especie *Pristimantis colonensis* representada por una única secuencia de cada gen, se observó que según COI se agrupa como rama externa de todo el clado que

comprende a *P. huicundo* y *P. ortizi* (*bootstrap* > 75% con K2P) y como rama interna junto a la sección del clado (*P. ortizi* + *P. huicundo*) (*bootstrap* > 75%). La especie *Gastrotheca orophylax* que también estuvo representada por una única secuencia del gen 16S rRNA siempre se ubicó como rama externa de todo el agrupamiento.

Las tres especies de *Pristimantis* mencionadas anteriormente han sido descritas a lo largo de los últimos 13 años (Guayasamin, Almeida-Reinoso, & Nogales-Sornosa, 2004; Mueses-Cisneros, 2007) y los estudios filogenéticos realizados para el género, basados en caracteres moleculares, no las han tenido en cuenta (Hedges, y otros, 2008; Padial, y otros, 2014; Pyron, y otros, 2011) por lo tanto, la comparación con una base de datos de referencia como GenBank no fue posible, debido a la ausencia de registros previos de genes como COI y 16S rRNA.

Los datos que explican el agrupamiento de *P. huicundo* y *P. ortizi* sugieren que esto se debe a una identificación errónea de los ejemplares o la confusión en el proceso de etiquetado. La hipótesis anterior se soporta principalmente en cuatro observaciones: Primero, la baja variabilidad interespecífica obtenida con el gen 16S rRNA. Segundo, *P. ortizi* forma un clado fuertemente soportado (*bootstrap*=99%), en el cual se incluye una secuencia de *P. huicundo* en una rama terminal, igualmente soportada, proveniente de la misma localidad de las otras secuencias que forman el grupo. Igualmente sucede con el clado de *P. huicundo* en el que aparece la secuencia de *P. ortizi*. Tercero, durante la fase de PCR de los genes, no se amplificó el gen COI para las muestras de *P. ortizi*, siendo que la muestra BAPN064 representa la única muestra con éxito en la amplificación del gen para esta especie y la muestra BAPN036 de *P. huicundo* no amplificó el gen. Cuarto, según las descripciones morfológicas de las especies, estas se pueden diferenciar porque *P. ortizi* posee tubérculos en parpados, talones y tarsos más

pequeños que los de *P. huicundo* o están ausentes, y además, carece de la papila del hocico presente en *P. huicundo* (Guayasamin, Almeida-Reinoso, & Nogales-Sornosa, 2004). Por lo tanto, también es necesario realizar una revisión morfológica de los ejemplares para soportar esta hipótesis.

Teniendo en cuenta que *P. colonensis* está representada por un solo individuo, las aseveraciones sobre la relación con *P. huicundo* y *P. ortizi* serían inapropiadas, debido a que no se tiene información sobre la variación interna de la especie que pueda ser comparada con la distancia interespecífica respecto a las otras dos.

Finalmente, se presenta por primera vez el registro de los clados monofiléticos de las especies *P. chloronotus*, *P. farisorum*, *P. myersi*, *P. buckleyi*, *P. supernatis* y *P. unistrigatus*, para las cuales no existían, o eran escasos, los reportes de los genes COI y 16S rRNA en bases de datos públicas

6.4.2. Identificación de las especies de anuros empleando códigos de barras de ADN

Hebert y colaboradores (2003) concibieron la idea de utilizar secuencias estandarizadas de un gen como un código de barras de ADN para los organismos vivos, lo cual permitiría catalogarlos teniendo en cuenta el concepto básico de un código de barras que se asume como un identificador único para algo. No obstante, este concepto se extendió al nivel de ser utilizado para la identificación y delimitación de especies basados en las distancias genéticas intraespecíficas e interespecíficas expresadas por un determinado gen (Meyer y Paulay, 2005), en este caso COI y 16S rRNA.

Sin embargo, este proceso de identificación y/o delimitación de especies se ve permeado por varios factores como el tipo de gen, los modelos de evolución, los métodos de agrupamiento y el grupo animal, que pueden presentar resultados diferentes (Guarnizo, y otros, 2015; Hebert, y otros, 2003; Paz, y otros, 2012; Xia, y otros, 2011). Por ejemplo, el modelo de sustitución K2P ha sido designado como estándar para los análisis de distancias genéticas en *barcoding*, fue propuesto por Hebert y colaboradores (2003) quienes asumen la idea de que un modelo simple como este es aplicable cuando se trabaja con especies cercanamente relacionadas, sin embargo, Collins, Boykin, Cruickshank y Armstrong (2012) indican que K2P raramente se selecciona en análisis de probabilidad de ajuste y es pobre en estos términos, por lo tanto es necesario buscar un modelo alternativo que refleje la realidad de los datos que se manejan.

En este trabajo se utilizaron dos modelos de evolución, K2P con el fin de hacer comparativos los resultados sobre los umbrales y, GTR+G+I sugerido como el modelo más probable para los datos. Con los dos modelos se obtuvo similitud en el agrupamiento de las especies, incluso cuando se presentaron incongruencias. Esto puede indicar que las especies tienen una diferenciación clara a nivel interespecífico, a excepción de los clados incongruentes, sin embargo, este problema puede resolverse asumiendo las hipótesis de identificación anteriormente expuestas. Lo anterior también puede explicar la similitud entre los agrupamientos obtenidos mediante NJ y ML.

Igualmente, la utilización de los genes COI y 16S rRNA, abarcan diferentes rangos de variabilidad permitiendo observar la divergencia intraespecífica e interespecífica que aunque

fue más variable en COI, presentaron los mismos resultados de agrupamiento con los dos genes.

Otro aspecto clave en la identificación de especies es el concepto de especie en sí. Saraswati y Srinivasan (2016) explican que generalmente el concepto biológico de especie es definido como: “*grupos de poblaciones naturales actuales o potenciales que se cruzan y están aisladas reproductivamente de otros grupos*”, y además, indican que el concepto evolutivo de especies definido por Simpson (1961) se refiere a: “*grupos de individuos que intercambian información genética principalmente con otros miembros de grupos con los cuales comparten una historia evolutiva en común*”. Ambos conceptos coinciden en que una especie es una población de individuos que intercambian información genética, idea que puede complementarse desde el punto de vista de los códigos de barras de ADN, teniendo en cuenta el concepto de *barcoding gap* o umbral de identificación, que representa la distinción entre la distancia genética intraespecífica e interespecífica. Es decir, se asume que una especie está delimitada por la máxima variación intraespecífica, la cual, al no solaparse con la mínima variación interespecífica puede evidenciar la inexistencia de flujo genético. Esta discusión se hace con el fin de complementar los resultados obtenidos, puesto que en este caso una especie es diferente de otra cuando supera entre el 9% y 13% de variación intraespecífica con COI y entre el 3,4% y 6,5% con 16S rRNA. Sin embargo, se presentan los umbrales para cada especie dados por la máxima variación intraespecífica (Tablas 14 y 15).

Cabe resaltar que se ha demostrado que la identificación de anfibios es mejor soportada cuando se combinan datos basados en taxonomía tradicional, herramientas moleculares y

características ecológicas (Fouquet, y otros, 2007), con lo cual se concuerda teniendo en cuenta la discusión anterior.

Finalmente, se puede proponer que el éxito de identificación de anuros del complejo de Páramos La Cocha-Patascoy fue del 100% excluyendo los casos de incongruencia *H. elassodiscus* + *H. AN01* y *P. huicundo* + *P. ortizi*, debido a que esta identificación está basada únicamente en morfología y como plantea Rivera-Correa y Daza (2016) que la similitud morfológica en las especies no necesariamente refleja su historia evolutiva, por lo tanto se plantea una nueva revisión de los ejemplares.

6.4.3. Análisis de agrupamiento y distribución geográfica

Otro aspecto que se tiene en cuenta para la explicación de la divergencia entre especies es la distribución geográfica. Se ha demostrado que la compleja historia geológica de los Andes neotropicales ha tenido un papel importante en la limitación del flujo genético entre poblaciones, conllevando a procesos de especiación de tipo alopátrico en anfibios, por la aparición de barreras vicariantes (Castroviejo-Fisher, Guayasamin, Gonzalez-Voyer y Vilà, 2014; Lynch, 1999; Lynch, y otros, 1997; Mendoza, y otros, 2015).

Además, con la baja vagilidad de este grupo animal y alta filopatría (Fouquet, y otros, 2007), sumado a las altas tasas de evolución de las especies que se distribuyen en ecosistemas de alta montaña como los Páramos debido a la compleja topografía y diferencias en las condiciones ambientales como humedad y temperatura (Guarnizo, y otros, 2015; Hassanin,

Ropiquet, Couloux y Cruaud, 2009; Madriñan, Cortés y Richardson, 2013; Mendoza, y otros, 2015) se esperaría que las poblaciones de una misma especie en diferentes áreas geográficas separadas por barreras físicas, también sean distantes genéticamente. Esto se evidenciaría en los agrupamientos como subclados dentro de la especie, sin embargo esto difiere parcialmente con los resultados obtenidos en este trabajo, debido a que a las especies indicaron diferentes patrones de agrupamiento con COI y 16S rRNA. Por lo tanto, se realizaron los mapas de distribución de los individuos de cada especie con el fin de compararla con los patrones de agrupamiento (Figuras 19 a 22).

La especie *H. elassodiscus* del complejo Doña Juana-Juanoy siempre forma un grupo independiente de *H. AN01* (código Bold) de La Cocha-Patascoy. No obstante, la primera especie, se encuentra como una rama interna junto a individuos de la segunda especie, por lo tanto, no se observa una forma clara de formación de subgrupos, porque además, un individuo de *H. AN01* de Doña Juana-Juanoy se agrupa con individuos de la misma especie en La Cocha-Patascoy (Figura 19). Incluso, seguiría presentándose el mismo problema si se asume la hipótesis planteada anteriormente sobre la identidad taxonómica de este clado que puede ser una sola perteneciente a *H. brunneus* teniendo en cuenta la alta variación intraespecífica del grupo (COI=15,24%, 16S rRNA=5,02%).

En el caso de las especies *P. huicundo*, *P. ortizi* y *P. colonensis* se observó que existe un patrón de agrupamiento entre individuos provenientes de un solo complejo, sin embargo, están formando clados diferentes. Por ejemplo, *P. huicundo* forma un clado con individuos de La

Cocha-Patascoy y Chiles-Cumbal y también otro clado con individuos de La Cocha-Patascoy y Doña Juana-Juanoy.

En el caso de *P. ortizi*, los individuos de La Cocha-Patascoy forman un único grupo relacionado con las muestras de la misma localidad de *P. huicundo*, aunque no se puede observar una variación poblacional debido a que solo está representada esta localidad al igual que *P. colonensis* (Figura 19).

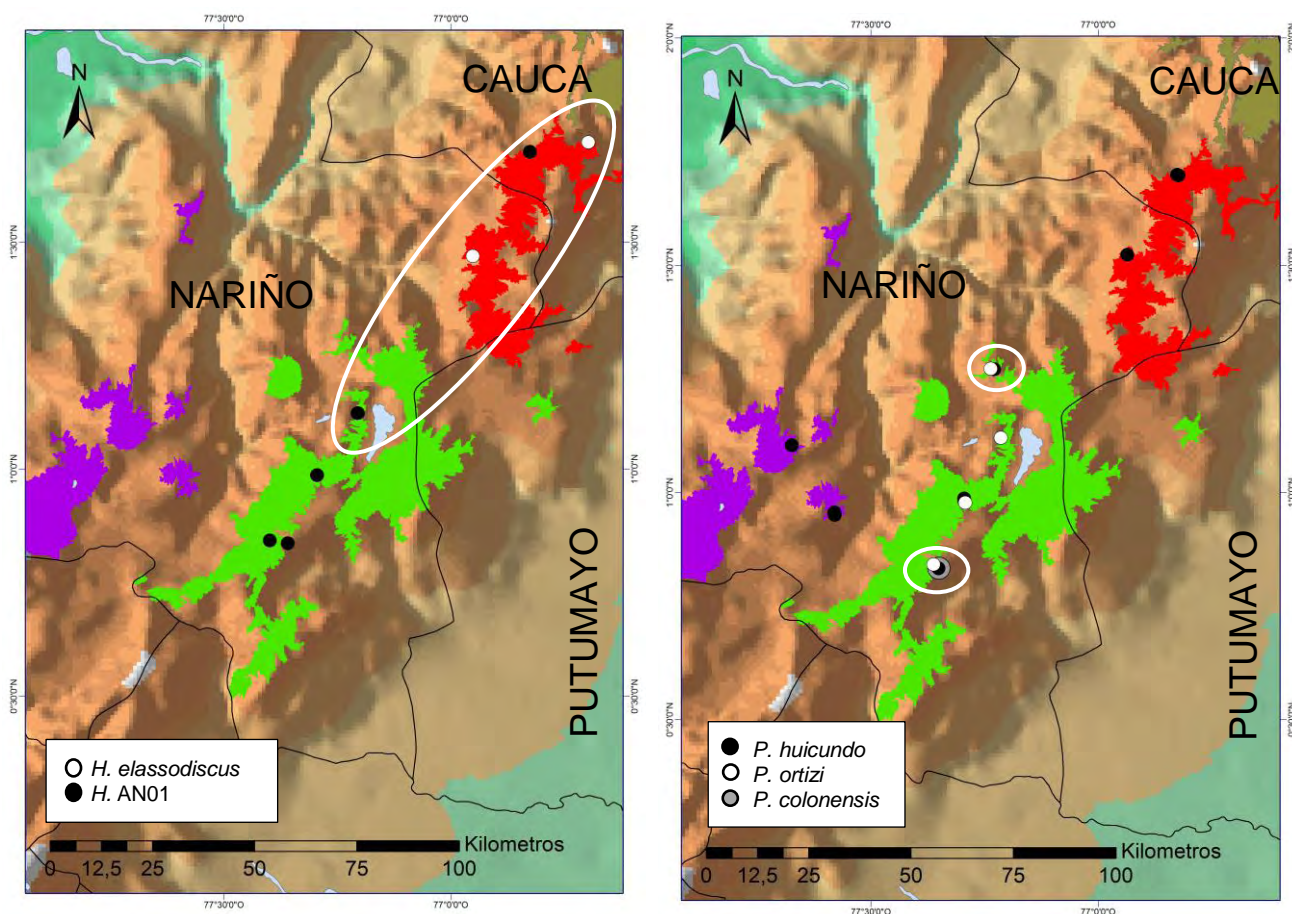


Figura 19. Mapa de distribución de las especies del género *Hypodactylus* y *Pristimantis* en los complejos de Páramos de La Cocha-Patascoy (Verde claro), Chiles-Cumbal (Purpura) y Doña Juana-Juanoy (Naranja). Las elipses blancas encierran los casos de incongruencia en el agrupamiento genético. Cartografía de los complejos obtenida de IAVH (2012). Mapas proyectados en ArcGIS 10.1, Datum: WGS84.

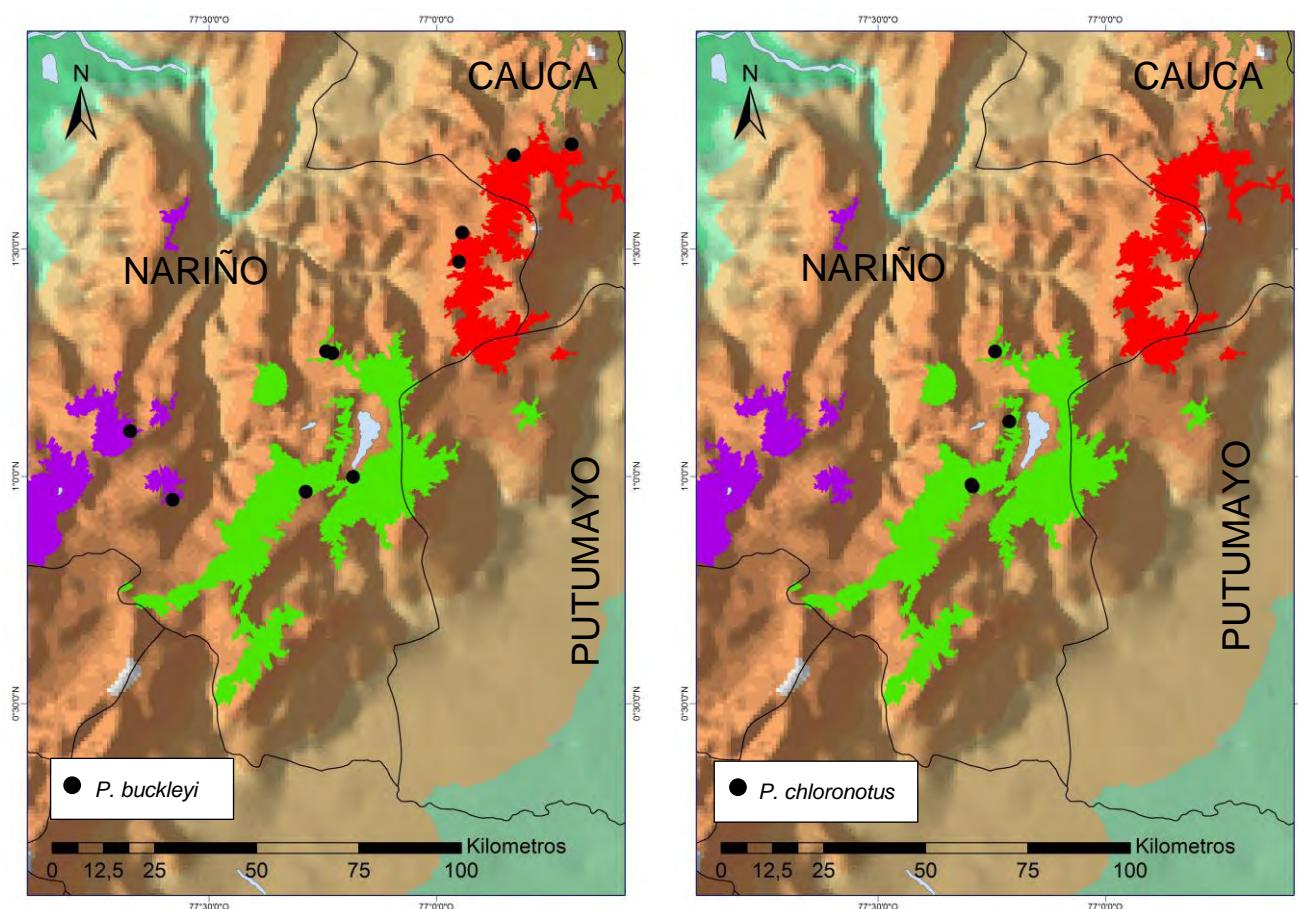


Figura 20. Mapa de distribución de las especies del género *Pristimantis* en los complejos de Páramos de La Cocha-Patascoy (Verde claro), Chiles-Cumbal (Purpura) y Doña Juana-Juanoy (Naranja). Cartografía de los complejos obtenida de IAVH (2012). Mapas proyectados en ArcGIS 10.1, Datum: WGS84.

Teniendo en cuenta la baja variación intraespecífica de *P. buckleyi* (COI=4,46%, 16S rRNA=12,49%) no se observó un patrón de subdivisión claro que evidencie la variación interpoblacional respecto a los tres complejos, los individuos provenientes de cada uno de ellos se agrupan a la vez con vecinos geográficos lejanos y cercanos (Figura 20).

En el caso de *P. chloronotus*, considerando que se encontraba representada únicamente por individuos del complejo La Cocha-Patascoy (Figura 20) no se observó variación

interpoblacional, aunque si una baja variabilidad intraespecífica (COI=1,01%, 16S rRNA=0,54%).

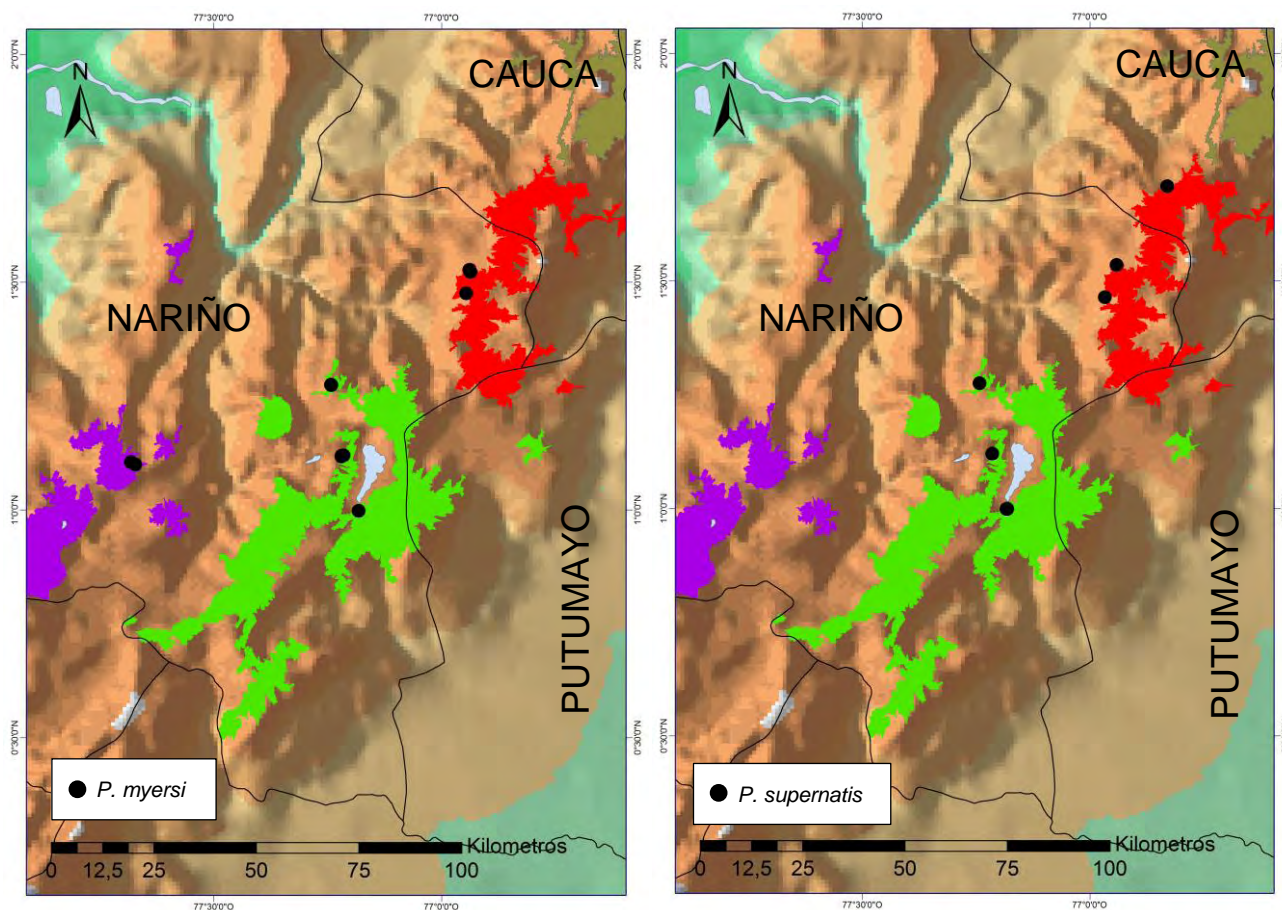


Figura 21. Mapa de distribución de las especies del género *Pristimantis* en los complejos de Páramos de La Cocha-Patascoy (Verde claro), Chiles-Cumbal (Purpura) y Doña Juana-Juanoy (Naranja). Cartografía de los complejos obtenida de IAVH (2012). Mapas proyectados en ArcGIS 10.1, Datum: WGS84.

Considerando la alta variabilidad intraespecífica de *P. myersi* (COI=13,13%, 16S rRNA=6,58%) se formó un subgrupo independiente, con individuos del complejo Chiles-Cumbal y otro subgrupo con individuos de los otros dos complejos. *Pristimantis supernatis* presento un patrón más claro de agrupamiento con los individuos más cercanos

geográficamente (Figura 21), aunque se demostró una alta variabilidad intraespecífica (COI=11,38%, 16S rRNA=5,6%).

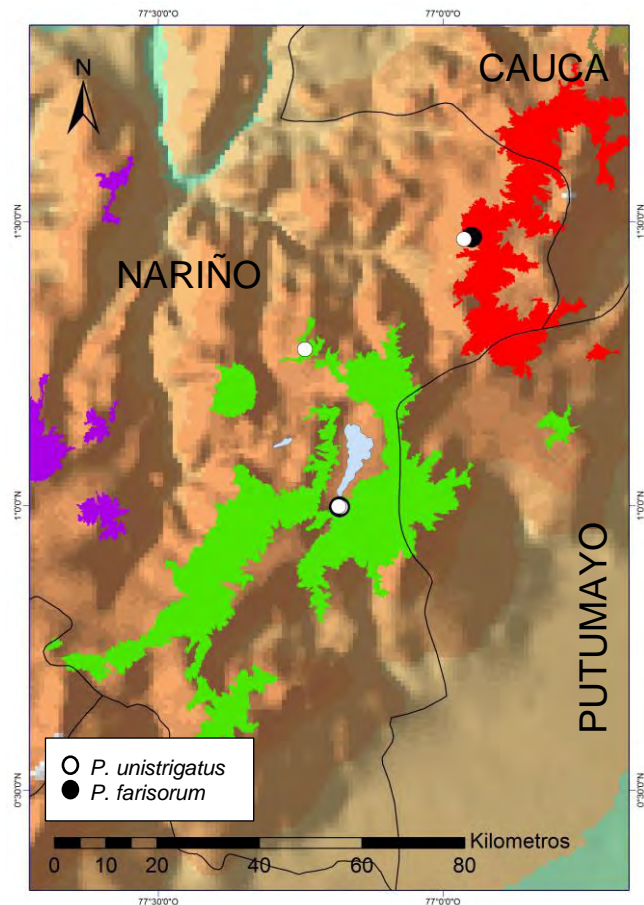


Figura 22. Mapa de distribución de las especies del género *Pristimantis* en los complejos de Páramos de La Cocha-Patascoy (Verde claro), Chiles-Cumbal (Purpura) y Doña Juana-Juanoy (Naranja). Cartografía de los complejos obtenida de IAVH (2012). Mapas proyectados en ArcGIS 10.1, Datum: WGS84.

Por último, *P. unistrigatus* y *P. farisorum* estuvieron representadas por menos de 5 muestras provenientes de los complejos La Cocha-Patascoy y Doña Juana-Juanoy (Figura 22), sin embargo los agrupamientos indican relaciones de los individuos más cercanos

geográficamente de *P. unistrigatus* mas no de *P. farisorum* que estuvo representada por una sola muestra de cada complejo.

En general, los resultados anteriores indican que las distancias genéticas intraespecificas pueden llegar a ser altas incluso dentro de cada población, hecho que fue evidente con el gen COI en comparación con 16S rRNA, y contrario a lo que se esperaba acerca de que la divergencia genética este directamente relacionada a la distancia geográfica (aislamiento) como se explicó anteriormente. Además, se observó que no existe un patrón de agrupamiento definido, basado en la distancia genética, que diferencie a cada población, teniendo en cuenta la influencia de barreras geográficas considerables como el cañón del rio Guaitara entre el complejo de Chiles-Cumbal y los otros dos, pero que sí parece definir las poblaciones de *P. myersi*.

Se esperaba encontrar marcadas diferencias genéticas entre poblaciones de los diferentes complejos de Páramo basados en la hipótesis de radiación del género *Pristimantis* propuesta por Mendoza y colaboradores (2015) quienes identifican la banda de elevación media (1000-3000 m.s.n.m) del Noroccidente de los Andes en Colombia y Ecuador como la región más importante para el origen y diversificación del género, debido a la alta diversidad β que puede marcar su rango ancestral. Los mismos autores consideran la zona de transición de la región Andina/Amazónica como centro rápido de cladogénesis e intensa diversificación desde ancestros provenientes de las tierras altas. Por lo tanto, especies de alta montaña como las abarcadas en el presente trabajo deberían exhibir una variabilidad más marcada, sin embargo, los valores de divergencia genética pueden estar influenciados por la cantidad de muestras involucradas.

Otro ejemplo que soporta el papel de las barreras geográficas en promover la divergencia genética es el estudio de Guarnizo y colaboradores (2015) quienes exploran el papel de la cordillera oriental como barrera geográfica en el incremento de la diversidad intraespecífica de especies nominales muestreadas en ambos flancos. Los autores proponen que tanto valles como cumbres son importantes en el aislamiento y divergencia genética de poblaciones de anuros andinos, complementando la idea de Weir (2009) quien explica que los valles son más importantes en promover vicarianza en comparación con las cumbres altas de los Andes, debido a que la actividad de levantamiento de estas últimas es muy reciente como para generar una fuerte diferenciación genética.

Esta última idea junto a lo propuesto por Van der Hammen y Cleef (1986) y citados por Lynch (1999) quienes plantean que durante los eventos glaciares los Páramos disminuyeron sus límites, lo que constituye un mecanismo importante para explicar cualquier patrón, y lo explicado anteriormente por Mendoza y otros (2015), pueden explicar mejor los resultados de este estudio, ya que si se considera como punto importante de diversificación la franja media de la montaña, se puede plantear la hipótesis de que los complejos de Páramos de La Cocha-Patascoy, Chiles-Cumbal y Doña Juana-Juanoy estuvieron en contacto en algún momento atrás en la historia y por lo tanto las especies consideradas aquí provienen de una población ancestral que también estuvo en contacto, la cual se separó cuando los límites del Páramo subieron. Cabe resaltar que estas especies de *Pristimantis* pueden encontrarse en el bosque alto andino subyacente al Páramo lo que facilitaría la conexión con poblaciones cercanas de otros complejos, por ejemplo, La Cocha-Patascoy y Doña Juana-Juanoy, lo que mantendría un flujo genético entre las poblaciones. Por otra parte, información sobre la vagilidad de estas

especies podrían apoyar esta idea, asumiendo que no existen barreras geográficas o antrópicas considerables y que pueden moverse por grandes distancias a través de corredores biológicos.

Finalmente, las altas distancias genéticas intraespecíficas de las especies pueden estar explicadas, además de los factores descritos anteriormente, por la historia de vida de las mismas, puesto que también se ha demostrado que influye en la diversificación y el cambio climático que puede generar adaptación evolutiva, desplazamiento o extinción (Albán, 2015). Por ejemplo, Funk, Cannatella y Ryan (2009) demuestran que la variación del llamado en *Engystomops petersi* promueve la divergencia genética y especiación. Esto indica que la información sobre la historia de vida de las especies incluidas en este trabajo puede complementar las ideas sobre alta y/o baja divergencia intraespecífica general y entre poblaciones.

CONCLUSIONES

El protocolo de extracción de ADN utilizado permitió obtener ADN genómico del total de las muestras. Los resultados de la espectrofotometría indicaron una alta pureza y concentración a pesar de que algunas muestras probablemente se contaminaron con proteínas y otros reactivos durante la extracción, lo cual puede solucionarse modificando los pasos de lavado en el protocolo.

Los protocolos de PCR para COI y 16S rRNA permitieron obtener la amplificación de los genes aunque fue necesario modificarlos, particularmente con COI, donde se demostró que el programa de termociclado, las concentraciones de Magnesio y Polimerasa, y aditivos como DMSO y BSA pueden ser claves para la obtención de amplificadas. En general el porcentaje de amplificación fue del 87,3% y 98,7% para COI y 16S rRNA, respectivamente.

Se obtuvieron 64 y 72 códigos de barras de ADN con COI y 16S rRNA, respectivamente, los cuales representan 11 y 12 especies en cada caso. Los análisis de estas secuencias permitieron observar, con los dos genes, una alta variación intraespecífica que en dos casos esta solapada con la mínima distancia interespecífica de especies vecinas (*H. elassodiscus* + *H. AN01* y *P. huicundo* + *P. ortizi*), sugiriendo la ausencia de un umbral de identificación de especie.

Los dos casos anteriores se correlacionaron con los resultados obtenidos en los agrupamientos donde la incongruencia (basados en la identificación *a priori*) siempre se

observó. Por lo tanto, se proponen dos hipótesis, una para cada caso. La primer hipótesis explica que las muestras de *H. elassodiscus* y *H. AN01* pertenecen a una misma especie dada por su alta variación solapada y que según los resultados de BLAST corresponde a *H. brunneus*. La segunda hipótesis sugiere la revisión morfológica de los ejemplares de *P. huicundo* y *P. ortizi* solapados según sus distancias genéticas y agrupados en un solo clado, debido a que pueden estar mal identificados o intercambiados.

Se presenta por primera vez el registro de los clados monofiléticos de las especies *P. chloronotus*, *P. farisorum*, *P. myersi*, *P. buckleyi*, *P. supernatis* y *P. unistrigatus*, para las cuales no existían, o eran escasos, los reportes de los genes COI y 16S rRNA en bases de datos públicas

El análisis de distribución geográfica y de agrupamiento sugiere la hipótesis de que cada especie pudo pertenecer a una sola población cuando los límites de los Páramos bajaron durante las glaciaciones y se dividieron una vez cambió el clima. Además, se plantea también incluir información de la historia de vida de estas especies, como la vagilidad, para tener una idea de la capacidad de desplazamiento de los individuos y si esto puede explicar el flujo genético entre las poblaciones de los complejos que se agruparon sin un patrón diferenciado.

Se plantean los umbrales del 9% y 13% para COI y 3,4% y 6,5% con 16S rRNA. El éxito de identificación de anuros del complejo de Páramos La Cocha-Patascoy fue del 100% excluyendo los casos de incongruencia *H. elassodiscus* + *H. AN01* y *P. huicundo* + *P. ortizi*,

debido a que esta identificación está basada únicamente en morfología y, por lo tanto, se plantea una nueva revisión de los ejemplares.

Finalmente, se recomienda la implementación de los códigos de barras de ADN como una estrategia complementaria en inventarios de biodiversidad, ya que ofrecen un punto de vista importante para el proceso de identificación y rectificación de especies.

RECOMENDACIONES

Modificar los pasos de lavado en el protocolo de extracción de ADN, con el fin de eliminar trazas de proteínas y otros reactivos que contaminaron algunas muestras, y que pudieron tener un efecto negativo durante la amplificación por PCR y/o secuenciación.

Teniendo en cuenta los resultados de la PCR para los genes COI y 16S rRNA, los cuales no se amplificaron en algunas muestras, se sugiere implementar otros cebadores universales y específicos para anfibios reportados en la literatura.

Este trabajo incluyó 12 especies de anuros del complejo de Páramo La Cocha-Patascoy que también se distribuyen en el complejo Chiles-Cumbal y Doña Juana-Juanoy, sin embargo, se recomienda, en lo posible, aumentar el número de individuos y especies para comprobar y complementar la información sobre la variabilidad genética intraespecífica e interespecífica de sus poblaciones, que además, aporten una visión más clara de su historia evolutiva en el contexto de la historia geológica de los Andes.

Para los problemas mencionados anteriormente sobre los agrupamientos incongruentes, se recomienda revisar nuevamente los ejemplares y apoyarse en los resultados sugeridos por este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Galvis, A. R., & Cuentas, D. (19 de Marzo de 2017). *Lista de los Anfibios de Colombia*, V.07.2017.0. Recuperado el 19 de Marzo de 2017, de <http://www.batrachia.com>
- Adamowicz, S. J., & Steinke, D. (2015). Increasing global participation in genetics research through DNA barcoding 1. *Genome*, 58(12), 519-526.
- Albán, F. (2015). *Impactos potenciales del Cambio Climático en la biodiversidad de ecosistemas de alta montaña o Páramo de Ecuador*. Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Alroy, J. (2015). Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(42), 13003-13008.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool.". *J. Mol. Biol*, 215, 403-410.
- Angilletta Jr, M. J., Bennett, A. F., Guderley, H., Navas, C. A., Seebacher, F., & Wilson, R. S. (2006). Coadaptation: A Unifying Principle in Evolutionary Thermal Biology*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(2), 282-294.
- Angulo, A., Rueda-Almoacid, J. V., & Rodríguez-Mahecha, E. (2006). Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina: Conservación Internacional. *Serie manuales de campo 2*.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. (2 ed.). Massachusetts: Sinauer Associates.

- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2007). Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*. doi:10.1101/pdb.prot4114
- Barley, A. J., & Thomson, R. C. (2016). Assessing the performance of DNA barcoding using posterior predictive simulations. *Molecular Ecology*, 25, 1944-1957.
doi:10.1111/mec.13590
- Bergsten, J., Bilton, D. T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M. T., Balke, M., . . . Vogler, A. P. (2012). The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. *Systematic Biology*, 61, 851-869.
- Borisenko, A. (2015). Endorsement by the Convention on Biological Diversity. *Barcode bull*, 6(4), 25.
- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Rylands, A. B., Konstant, W. R., . . . Hilton-Taylor, C. (2002). Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, 16(4), 909-923.
- Cadavid, J., Roman-Valencia, C., & Gómez, A. (2005). Composicion y estructura de anfibios anuros en un transecto altitudinal de los Andes Centrales de Colombia. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.*, 7(2), 103-118.
- Čandek, K., & Kuntner, M. (2015). DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), 268-277.
- Carew, M. E., Pettigrove, V., & Hoffmann, A. A. (2005). The utility of DNA markers in classical taxonomy: using cytochrome oxidase I markers to differentiate Australian

- Cladopelma (Diptera: Chironomidae) midges. *Annals of the Entomological Society of America*, 98(4), 587-594.
- Castro-Herrera, F., Valencia, A., & Villaquirán, D. (2012). *Diversidad de anfibios y reptiles del Parque Nacional Natural Isla Gorgona*. Cali, Colombia: Feriva impresores S.A.
- Castroviejo-Fisher, S., Guayasamin, J. M., Gonzalez-Voyer, A., & Vilà, C. (2014). Neotropical diversification seen through glassfrogs. *J. Biogeog*, 41, 66-80.
- Cawthorn, D. M., Steinman, H. A., & Witthuhn, R. C. (2012). Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South Africa. *Gene*, 491(1), 40-48.
- Cedeño-Vázquez, J. R., González-Vázquez, J., Martínez-Arce, A., & Canseco-Márquez, L. (2014). First record of the invasive greenhouse frog (*Eleutherodactylus planirostris*) in the Mexican Caribbean. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(2), 650-653.
- Che, J., Chen, H. M., & Jin, J. Q. (2012). Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12, 247-258.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D67-72.
- Coissac, E., Hollingsworth, P. M., Lavergne, S., & Taberlet, P. (2016). From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 25, 1423-1428.
- Collins, R. A., Boykin, L. M., Cruickshank, R. H., & Armstrong, K. F. (2012). Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(3), 457-465.

- Crawford, A. J., Alonso, R., Jaramillo, C. A., Sucre, S., & Ibáñez, R. (2011). DNA barcoding identifies a third invasive species of *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae) in Panama City, Panama. *Zootaxa*, 2890, 65-67.
- Crawford, A. J., Cruz, C., Griffith, E., Ross, H., Ibáñez, R., Lips, K. R., . . . Crump, P. (2013). DNA barcoding applied to ex situ tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. *Molecular ecology resources*, 13(6), 1005-1018.
- Crawford, A. J., Lips, K. R., & Bermingham, E. (2010). Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13777-13782.
- Da Silva, J. M., & Willows-Munro, S. (2016). A review of over a decade of DNA barcoding in South Africa: a faunal perspective. *African Zoology*, 1-12.
- Dang, N. X., Sun, F. H., Lv, Y. Y., Zhao, B. H., Wang, J. C., Murphy, R. W., . . . Li, J. T. (2015). DNA barcoding and the identification of tree frogs (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Mitochondrial DNA*, 1-11.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), 953-959.

- Delgado, A., Arévalo, L., Castillo, G., & Viles, N. (2008). *Plan de Acción en Biodiversidad del departamento de Nariño 2006 - 2030 - Propuesta Técnica*. Corponariño, Gobernación de Nariño - Secretaría de Agricultura, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales - UAESPNN - Territorial Surandina, Univers, Pasto, Colombia.
- Dennerlein, S., & Rehling, P. (2015). Human mitochondrial COX1 assembly into cytochrome c oxidase at a glance. *Journal of cell science*, 128(5), 833-837.
- DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1905-1916.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 45, e2565.
- Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica*. España: Reverté, S.A.
- Dos Santos, S. P., Ibáñez, R., & Ron, S. R. (2015). Systematics of the *Rhinella margaritifera* complex (Anura, Bufonidae) from western Ecuador and Panama with insights in the biogeography of *Rhinella alata*. *ZooKeys*, 501, 109.
- Ebach, M. C., & Holdrege, C. (2005). DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*, 434(7034), 697.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.

- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., . . . Lodge, D. M. (2016). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources*, *16*(1), 29-41.
- Farell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Research Notes*, *5*, 257. doi:<http://doi.org/10.1186/1756-0500-5-257>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*, 783-791.
- Felsenstein, J. (2003). *Inferring phylogenies*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
- Fernandez, D. (2010). *Aspectos bioquímicos y moleculares de las deficiencias de complejo I mitocondrial ligados al cromosoma X*. Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Ficetola, G. F. (2015). Habitat conservation research for amphibians: methodological improvements and thematic shifts. *Biodiversity and Conservation*, *24*(6), 1293-1310.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *3*, 294-299.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., & Gemmell, N. J. (2007). Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS one*, *2*(10), e1109.

Francis, C. M., Borisenko, A. V., Ivanova, N. V., Eger, J. L., Lim, B. K., Servent, A. G., . . .

Hebert, P. D. (2010). The Role of DNA Barcodes in Understanding and Conservation of Mammal Diversity in Southeast Asia. *Plos One*, 5, e12575.

Freeland, J. R., Kirk, H., & Petersen, S. (2011). *Molecular Ecology* (2 ed.). Wiley-Blackwell.

Freeman, S., & Herron, J. C. (2002). *Análisis evolutivo* (2 ed.). Madrid: Pearson Educación.

Funk, W., Cannatella, D., & Ryan, M. (2009). Genetic divergence is more tightly related to call variation than landscape features in the Amazonian frogs *Physalaemus petersi* and *P. freibergeri*. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 1839-1853.

Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2007). Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Human Genetics*, 53:3D:A.3D.1–A.3D.21.

García-Robledo, C., Kress, W. J., Erwin, T. L., & Staines, C. L. (2015). Modeling Plant Extinctions and Arthropod Coextinctions. *Barcode bull*, 6(4), 26-27.

Gatto, L., Catanzaro, D., & Milinkovitch, M. C. (2006). Assessing the Applicability of the GTR Nucleotide Substitution Model Through Simulations. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2, 145-155.

Geller, J., Meyer, C., Parker, M., & Hawk, H. (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular ecology resources*, 13(5), 851-861.

González, M., & Paz, A. (2013). iBOL Colombia advances: Barcoding life in a megadiverse country. *Barcode bull*, 4(2), 6.

- Grosjean, S., Bordoloi, S., Chuaynkern, Y., Chakravarty, P., & Ohler, A. (2015). When young are more conspicuous than adults: a new ranid species (Anura: Ranidae) revealed by its tadpole. *Zootaxa*, 4058(4), 471-498.
- Grosjean, S., Ohler, A., Chuaynkern, Y., Cruaud, C., & Hassanin, A. (2015). Improving biodiversity assessment of anuran amphibians using DNA barcoding of tadpoles. Case studies from Southeast Asia. *Comptes rendus biologies*, 338(5), 351-361.
- Guarnizo, C. E., Paz, A., Muñoz-Ortiz, A., Flechas, S. V., Méndez-Narváez, J., & Crawford, A. J. (2015). DNA Barcoding Survey of Anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the Impact of the Andes on Cryptic Diversity. *PloS one*, 10(5), e0127312.
- Guayasamin, J. M., Almeida-Reinoso, D., & Nogales-Sornosa, F. (2004). Two new species of frogs (Leptodactylidae: Eleutherodactylus) from the high Andes of northern Ecuador. *Herpetological Monographs*, 18, 127-141.
- Guidon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167-172.
- Hassanin, A., Ropiquet, A., Couloux, A., & Cruaud, C. (2009). Evolution of the mitochondrial genome in mammals living at high altitude: new insights from a study of the tribe Caprini (Bovidae, Antilopinae). *Journal of molecular evolution*, 68(4), 293-310.

- Hawlitschek, O., Morinière, J., Dunz, A., Franzen, M., Rödder, D., Glaw, F., & Haszprunar, G. (2016). Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany. *Molecular ecology resources*, *16*(1), 242-253.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313-321.
- 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., Trueb, L., Means, D. B., MacCulloch, R. D., & Hedges, S. B. (2009). A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa*, *2211*, 1-35.
- Hewitt, G. M., Johnston, A. W., & Young, J. P. (1991). *Molecular techniques in taxonomy* (Vol. 57). Springer Science y Business Media.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., & Larson, A. (2001). *Integrated principles of zoology* (11 ed.). McGrawHill.
- Hillis, D. M., Moritz, C., & Mable, B. K. (1996). *Molecular Systematics* (2 ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Hubert, N., & Hanner, R. (2015). DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. *DNA Barcodes*, *3*(1), 44-58.

- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. R. (2001). MrBayes 3: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, *17*, 754-755.
- IAVH. (2012). Identificación cartográfica de los Páramos de Colombia a escala 1:100.000 (versión a junio de 2012). *Proyecto: Actualización del Atlas de Páramos de Colombia. Convenio Interadministrativo de Asociación 11-103, Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt y Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible*. Bogotá, D.C, Colombia.
- IUCN. (2015). *The IUCN Red List of Threatened Species*, Version 2015-4. Recuperado el 20 de Abril de 2015, de <http://www.iucnredlist.org>.
- Ivanova, N. V., Dewaard, J. R., & Hebert, P. D. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, *6*, 998-1002.
- Jansen, M., Bloch, R., Schulze, A., & Pfenninger, M. (2011). Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. *Zoologica Scripta*, *40*(6), 567-583.
- Jennings, W. B. (2016). *Phylogenomic Data Acquisition: Principles and Practice*. CRC Press.
- Jennings, W. B., Wogel, H., Bilate, M., Salles, R. D., & Buckup, P. A. (2015). DNA barcoding reveals species level divergence between populations of the microhylid frog genus *Arcovomer* (Anura: Microhylidae) in the Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. *Mitochondrial DNA*, 1-8.
- Jeong, T. J., Jun, J., Han, S., Kim, H. T., Oh, K., & Kwak, M. (2013). DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. *Molecular ecology resources*, *13*(6), 1019-1032.

- Katzenberger, M., Tejado, M., Duarte, H., Marangoni, F., & Beltrán, J. F. (2012). Tolerância e sensibilidade térmica em anfíbios. *Revista da Biologia*, 8, 25-32.
- Kekkonen, M., & Hebert, P. D. (2014). DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. *Molecular ecology resources*, 14(4), 706-715.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2011). *Concepts of genetics* (10 ed.). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874.
- Lawson Handley, L. (2015). How will the 'molecular revolution' contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society*, 115(3), 750-766.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp.*, 63, e3998. doi:10.3791/3998
- Lötters, S., Schmitz, A., Reichle, S., Rödder, D., & Quennet, V. (2009). Another case of cryptic diversity in poison frogs (Dendrobatidae: Ameerega) - description of a new species from Bolivia. *Zootaxa*, 2028, 20-30.
- Lötters, S., Van der Meijden, A., Coloma, L. A., Boistel, R., Cloetens, P., Ernst, R., . . . Veith, M. (2011). Assessing the molecular phylogeny of a near extinct group of vertebrates: the

- Neotropical harlequin frogs (Bufonidae; Atelopus). *Systematics and Biodiversity*, 9(1), 45-57.
- Lynch, D. J. (1999). Ranas pequeñas, la geometría de evolución, y la especiación en los Andes colombianos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 23(86), 143-159.
- Lynch, D. J., & Duellman, W. E. (1997). Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in western Ecuador/ Systematics, ecology, and biogeography. *Univ. Kansas, Nat. Hist. Mus., Spec. Publ*, 23, iv + 236 pp.
- Lyra, M. L., Haddad, C. F., & de Azeredo-Espin, A. M. (2017). Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular ecology resources*. doi:10.1111/1755-0998.12648
- Madriñán, S., Cortés, A. J., & Richardson, J. E. (2013). Páramo is the world's fastest evolving and coolest biodiversity hotspot. *Frontiers in genetics*, 4, 1-7.
- Maffei, F., & Ubaid, F. K. (2014). *Amphibians*. Bauru, Sao Paulo, Brazil: Canal6.
- Mallet, J., & Willmott, K. (2003). Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? *Trends in Ecology y Evolution*, 18(2), 57-59.
- Mantilla, J. R. (2000). *Genética Molecular*. Manual de Laboratorio, Universidad Nacional de Colombia.
- McCallum, M. L. (2015). Vertebrate biodiversity losses point to a sixth mass extinction. *Biodiversity and Conservation*, 24(10), 2497-2519.

- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., & Ng, P. K. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, *55*, 715-728.
- Meier, R., Wong, W., Srivathsan, A., & Foo, M. (2016). \$1 DNA barcodes for reconstructing complex phenomes and finding rare species in specimen-rich samples. *Cladistics*, *32*(1), 100-110.
- Mendoza, A. M., García-Ramírez, J. C., & Cárdenas-Henao, H. (2012). Blood puncture as a nondestructive sampling tool to obtain. *Molecular Ecology Resources*, *12*, 470-475.
- Mendoza, A. M., Ospina, O. E., Cárdenas-Henao, H., & García-R, J. C. (2015). A likelihood inference of historical biogeography in the world's most diverse terrestrial vertebrate genus: Diversification of direct-developing frogs (Craugastoridae: Pristimantis) across the Neotropics. *Molecular phylogenetics and evolution*, *85*, 50-58.
- Meredith, H. M., VanBuren, C. S., & Antwis, R. E. (2016). Making amphibian conservation more effective. *Conservation Evidence*, *13*, 1-5.
- Meyer, C. (2003). Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. *Biological Journal of the Linnean Society*, *79*, 401-459.
- Morales, M., Otero, J., Van der Hammen, T., Torres, A., Cadena, C., Pedraza, C., . . . Cárdenas, L. (2007). *Atlas de Páramos de Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá. D.C.

- Mueses-Cisneros, J. J. (2007). Two new species of the genus *Eleutherodactylus* (Anura: Brachycephalidae) from Valle de Sibundoy, Putumayo, Colombia. *Zootaxa*, 1498, 35-43.
- Murphy, R. W., Crawford, A. J., Bauer, A. M., Che, J., Donnellan, S. C., Fritz, U., & Zhang, Y. P. (2013). Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 161-167.
- Navas, C. A. (1999). Biodiversidad de anfibios y reptiles en el Páramo: Una visión Eco-fisiológica. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 23, 465-474.
- Navas, C. A. (2003). Anfibios y lagartos de alta montaña: ecofisiología evolutiva y límites altitudinales. En F. Bozinovic (Ed.), *Fisiología Ecológica y Evolutiva*. Santiago, Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Ortiz-Yusty, C. E., Páez, V., & Zapata, F. A. (2013). Temperature and Precipitation as Predictors of Species Richness in Northern Andean Amphibians from Colombia. *Caldasia*, 35(1), 65-80.
- O'Shea, M., & Halliday, T. (2002). *Manual de identificación. Reptiles y anfibios*. Barcelona: Omega.
- Padial, J. M., & De la Riva, I. (2009). Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155(1), 97-122.

- Padial, J. M., Grant, T., & Frost, D. R. (2014). Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa*, 3825(1), 1-132.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, 7(1), 1.
- Pais, F. S., Ruy, P., Oliveira, G., & Coimbra, R. S. (2014). Assessing the efficiency of multiple sequence alignment programs. *Algorithms for Molecular Biology*, 9, 4.
doi:<http://doi.org/10.1186/1748-7188-9-4>
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W., Stice, L., & Grabowski, G. (1991). *The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0*. Publicación privada, Universidad de Hawaii.
- Paz, A., & Crawford, A. J. (2012). Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: a comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. *Journal of biosciences*, 37(5), 887-896.
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). Códigos de Barras de la Vida: Introducción y Perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161.
- Perl, R. B., Nagy, Z. T., Sonet, G., Glaw, F., Wollenberg, K. C., & Vences, M. (2014). DNA barcoding Madagascar's amphibian fauna. *Amphibia-Reptilia*, 35(2), 197-206.
- Pimm, S. L., & Raven, P. (2000). Biodiversity: extinction by numbers. *Nature*, 403(6772), 843-845.

- Pimm, S. L., Jenkins, C. N., Abell, R., Brooks, T. M., Gittleman, J. L., Joppa, L. N., . . . Sexton, J. O. (2014). The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science*, *344*(6187), 1246752.
- Posada , D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, *25*, 1253-1256.
- Posada, D., & Buckley, T. R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic biology*, *53*(5), 793-808.
- Pradhan, V., Kamble, Y., Ladniya, V., & Mogul, M. (2015). A overview of species identification by DNA barcoding. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, *4*, 127-140.
- Puillandre, N., Bouchet, P., Boisselier-Dubayle, M. C., Brisset, J., Buge, B., Castelin, M., . . . Lozouet, P. (2012). New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into the collection curation process. *Molecular Ecology Resources*, *12*(3), 396-402.
- Pyron, R. A., & Wiens, J. J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *61*(2), 543-583.
- Rangel, G. F., & López-Perilla, Y. R. (2014). Diversidad de anfibios y reptiles en la alta montaña del suroriente de la sabana de Bogotá, Colombia. *Herpetotropicos*, *10*(1).
- Rangel-Ch, J. O. (2007). Biodiversidad de Colombia. *Palimpsesto*, *5*, 292-304.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, *7*(3), 355-364.

- Raven, P. H., & Johnson, G. B. (2011). *Biology*. New York: McGraw-Hill.
- Rivera-Correa, M., & Daza, J. M. (2016). Molecular phylogenetics of the *Pristimantis lacrimosus* species group (Anura: Craugastoridae) with the description of a new species from Colombia. *Acta Herpetologica*, *11*(1), 31-45.
- Rockney, H. J., Ofori-Boateng, C., Porcino, N., & Leaché, A. D. (2015). A comparison of DNA barcoding markers in West African frogs. *African Journal of Herpetology*, *64*(2), 135-147.
- Rosli, M. K., Zamzuriada, A. S., Syed-Shabthar, S. M., Mahani, M. C., Abas-Mazni, O., & Md-Zain, B. M. (2011). Optimization of PCR conditions to amplify Cyt b, COI and 12S rRNA gene fragments of Malayan gaur (*Bos gaurus hubbacki*) mtDNA. *Genetics and Molecular Research*, *10*(4), 2554-2568.
- Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb Protoc.*
doi:10.1101/pdb.ip66
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406-425.
- Sambrook, J., & Russell, W. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 3). Cold spring harbor laboratory press.
- Sanz, M. M. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. *Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)*, *100*(1-4), 45-65.
- Saraswati, P. K., & Srinivasan, M. S. (2016). Morphology, Taxonomy and Concepts of Species. En *Micropaleontology* (págs. 53-65). Springer International Publishing.

- Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). raxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*. doi:10.1007/s13127-011-0056-0
- Simmons, J. E. (1987). Herpetological collecting and collections management. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Herpetological Circular (16)*. Texas.
- Simpson, G. G. (1961). *Principles of animal taxonomy*. USA: Columbia University Press.
- Smith, M., Poyarkov, N. A., & Hebert, P. D. (2008). DNA barcoding: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources*, 8(2), 235-246.
- Solomon, E. P., Berg, L. R., & Martin, D. W. (2008). *Biología*. México, D.F: McGraw-Hill.
- Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P., & Young, B. E. (2008). *Threatened amphibians of the world*. Barcelona (Lynx Edition), Gland (IUCN) y Arlington (Conservation International).
- Tahir, H., & Akhtar, S. (2015). Services of DNA barcoding in different fields. *Mitochondrial DNA*, 1-12.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-2729.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. (1997). The Clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*, 25, 4876-4882.
- Urban, M. C. (2015). Accelerating extinction risk from climate change. *Science*, 348(6234), 571-573.

- Urbina-Cardona, J. N. (2011). Gradientes andinos en la diversidad y patrones de endemismo en anfibios y reptiles de Colombia: Posibles respuestas al cambio climático. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 7(1), 74-91.
- Vaidya, G., Lohman, D. J., & Meier, R. (2010). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistic*(27), 171-180.
- Van der Hammen, T., & Cleef, A. M. (1986). Development of the high Andean paramo flora and vegetation. En F. Vuilleumier, & M. Monasterio (Edits.), *High Altitude Tropical Biogeography*. Oxford: Oxford University Press.
- Vences, M., Nagy, Z. T., Sonet, G., & Verheyen, E. (2012). DNA barcoding amphibians and reptiles. En W. J. Kress, & D. L. Erickson (Edits.), *DNA Barcodes: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Berlin, Alemania: Springer.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. M., & Vieites, D. R. (2005a). Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1859-1868.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005b). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(1), 5.
- Vernooy, R., Haribabu, E., Muller, M. R., Vogel, J. H., Hebert, P. D., Schindel, D. E., . . . Singer, G. A. (2010). Barcoding life to conserve biological diversity: beyond the taxonomic imperative. *PLoS Biol*, 8(7), e1000417.

- Vieites, D. R., Wollenberg, K. C., Andreone, F., Kohler, J., Glaw, F., & Vences, M. (2009). Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(20), 8267-8272.
- Villareal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., . . . Umaña, A. M. (2006). Manual De Métodos Para El Desarrollo De Inventarios De Biodiversidad. *Programa De Inventarios De Biodiversidad. Instituto De Investigación De Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt*. Bogotá, D.C, Colombia.
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2014). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic Press.
- Waterton, C., Ellis, R., & Wynne, B. (2013). *Barcoding nature: shifting cultures of taxonomy in an age of biodiversity loss*. Routledge.
- Weir, J. T. (2009). Implications of genetic differentiation in neotropical montane forest birds. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, *96*, 410-433.
- Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press.
- Will, K. W., Mishler, B. D., & Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic biology*, *54*(5), 844-851.
- Zhang, L., & Lu, X. I. (2012). Amphibians live longer at higher altitudes but not at higher latitudes. *Biological Journal of the Linnean Society*, *106*(3), 623-632.

ANEXOS

Anexo A. Buffers utilizados en la extracción de ADN. (Ivanova et al., 2006)

- ***Vertebrate lysis buffer (VLB):***

100 mm NaCl, 50 mm

Tris-HCl pH 8.0

10 mm EDTA pH 8.0

0.5% SDS.

- ***Binding buffer (BB):***

6 m GuSCN

20 mm EDTA pH 8.0

10 mm Tris-HCl pH 6.4

4% Triton X-100

*En caso de recristalización precalentar a 56°C para disolver previo a usarse.

- ***Binding mix (BM):***

50 mL de etanol (96%)

50 mL de BB

*Estable a temperatura ambiente durante una semana

- ***Protein wash buffer (PWB):***

70 mL de etanol (96%)

26 mL de BB

*Estable a temperatura ambiente durante una semana. Descartar si se observa cristalización.

- ***Wash buffer (WB):***

Etanol (60%)

50 mm NaCl

10 mm Tris-HCl pH 7.4

0.5 mm EDTA pH 8.0

*Mezclar bien y almacenar a -20°C

Anexo B. Muestras de tejido utilizadas en el proyecto. La Tabla indica el código en la colección de tejidos del IAvH, el código en la base de datos BOLD, nombre científico, cuantificación de ADN, cantidad y tipo de tejido empleado: D=Dedos pediales, P=Pata, H=Higado, M=Musculo.

IAvH	BOLD	Especie	1er Elución			2da Elución			Tejido	
			ng/ul	260/230	260/280	ng/ul	260/230	260/280	Cantidad (g)	Tipo
IAvH-CT 19040	BAPN001-16	<i>Centrolene buckleyi</i>	158,3	1,05	1,96	75,3	2,21	2,01	0,0001	D
IAvH-CT 19044	BAPN002-16	<i>Gastrotheca orophylax</i>	253,7	1,2	1,92	207,8	2,09	1,94		D
IAvH-CT 19003	BAPN004-16	<i>Hypodactylus</i>	94,2	0,2	2,07	94,3	0,2	1,97	0,0008	P
IAvH-CT 19004	BAPN005-16	<i>Hypodactylus</i>	128	0,23	1,97	64,4	0,68	1,87	0,0014	P
IAvH-CT 19005	BAPN006-16	<i>Hypodactylus</i>	122,8	0,28	1,93	97,3	0,86	1,68	0,0006	P
IAvH-CT 19019	BAPN007-16	<i>Hypodactylus</i>	21	0,13	2,09	26,5	0,88	2,22	0,00005	D
IAvH-CT 19025	BAPN009-16	<i>Hypodactylus</i>	105	0,22	1,91	66,3	0,63	1,86	0,00005	P
IAvH-CT 19026	BAPN008-16	<i>Hypodactylus</i>	40,5	0,09	1,87	158,5	1,05	1,94	0,00005	D
IAvH-CT 19084	BAPN003-16	<i>Hypodactylus</i>	116,3	0,26	2,01	65,1	0,56	2	0,0053	P
IAvH-CT 19064	BAPN010-16	<i>Hypodactylus elassodiscus</i>	225,6	1,47	2,03	216,5	1,86	2,08	0,0197	H
IAvH-CT 19093	BAPN011-16	<i>Hypodactylus elassodiscus</i>	87,4	0,55	1,96	179,4	1,43	2,01	0,0087	P
IAvH-CT 19021	BAPN016-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	53,4	0,24	2,04	39,5	1,97	2,08	0,00005	D
IAvH-CT 19050	BAPN012-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	88,9	0,21	1,95	54,2	1,45	2	0,001	D
IAvH-CT 19051	BAPN013-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	252,2	0,53	1,9	114,4	1,28	1,9	0,0019	D
IAvH-CT 19054	BAPN014-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	143,5	0,3	1,97	64,9	0,93	2,01	0,001	D
IAvH-CT 19111	BAPN015-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	195,7	0,35	1,89	77,8	0,64	1,99	0,0046	D
IAvH-CT 19039	BAPN017-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	196,5	0,41	1,99	204,5	1,84	1,96	0,002	H
IAvH-CT 19102	BAPN018-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	284,7	0,43	2,07	261,3	1,38	2,04	0,0045	P
IAvH-CT 19062	BAPN019-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	180,3	0,33	1,95	199,9	1,04	1,96	0,0042	P
IAvH-CT 19074	BAPN020-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	228,6	0,39	1,96	99,8	1,84	1,86	0,0019	P
IAvH-CT 19077	BAPN021-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	18	0,05	1,79	55	0,52	1,96	0,0042	P
IAvH-CT 19097	BAPN022-16	<i>Pristimantis buckleyi</i>	245,6	0,59	1,96	160,3	1,39	1,89	0,0058	P
IAvH-CT 19002	BAPN028-16	<i>Pristimantis chloronotus</i>	147,6	0,45	2,01	75	1,34	1,97	0,00005	P
IAvH-CT 19007	BAPN023-16	<i>Pristimantis chloronotus</i>	146	0,33	2,02	83,3	1,09	1,96	0,0007	D
IAvH-CT 19008	BAPN024-16	<i>Pristimantis chloronotus</i>	69,5	0,18	1,99	37,5	0,7	1,74	0,0025	M
IAvH-CT 19011	BAPN025-16	<i>Pristimantis chloronotus</i>	28,7	0,06	1,77	25	0,89	1,75	0,0034	M

IAvH-CT 19014	BAPN029-16	<i>Pristimantis chloronotus</i>	83	0,26	2,03	38,5	0,57	1,76	0,00005	P
IAvH-CT 19015	BAPN026-16	<i>Pristimantis chloronotus</i>	19	0,86	2,03	23,7	2,19	2,4	0,00005	D
IAvH-CT 19056	BAPN027-16	<i>Pristimantis chloronotus</i>	178,8	0,7	2,07	46,7	2,07	2,1	0,0004	P
IAvH-CT 19023	BAPN030-16	<i>Pristimantis colonensis</i>	24,1	0,43	1,89	22,9	2,07	2,32	0,00005	D
IAvH-CT 19053	BAPN032-16	<i>Pristimantis farisorum</i>	123,9	0,26	1,96	145,4	1,83	1,96	0,0015	D
IAvH-CT 19063	BAPN031-16	<i>Pristimantis farisorum</i>	282,3	0,48	1,98	346,7	0,9	2	0,0034	H
IAvH-CT 19013	BAPN040-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	64	1,31	1,97	41,9	1,63	2,01	0,00005	D
IAvH-CT 19017	BAPN047-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	93,4	1,21	2,02	64,4	1,9	2		D
IAvH-CT 19018	BAPN046-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	118,9	0,21	1,98	57,6	0,29	1,91	0,001	D
IAvH-CT 19022	BAPN045-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	21,7	0,59	2,15	23,5	2,22	2,49	0,00005	D
IAvH-CT 19107	BAPN044-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	150,4	0,27	1,95	56,6	0,33	2,02	0,0006	D
IAvH-CT 19109	BAPN043-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	170,3	0,42	1,95	55,3	0,86	1,95	0,0019	D
IAvH-CT 19110	BAPN042-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	93,4	0,19	2,05	178	1,29	2,02	0,0048	D
IAvH-CT 19029	BAPN041-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	177,1	0,46	2,08	70,6	0,58	1,75	0,0009	P
IAvH-CT 19030	BAPN039-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	152,3	0,27	2,02	93,3	1,69	2,11	0,0001	P
IAvH-CT 19031	BAPN038-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	92,4	0,16	2,03	117,9	1	1,98	0,00005	P
IAvH-CT 19104	BAPN037-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	211	0,4	2	98,9	1,47	1,97	0,0016	P
IAvH-CT 19068	BAPN036-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	122,4	0,23	1,96	91,5	1,4	1,98	0,001	P
IAvH-CT 19069	BAPN035-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	98,3	0,26	2	70,7	1,2	1,94	0,0012	P
IAvH-CT 19081	BAPN034-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	113,5	0,25	2,06	59,5	0,64	1,96	0,0042	P
IAvH-CT 19086	BAPN033-16	<i>Pristimantis huicundo</i>	69,5	0,21	2,01	55,4	1,7	1,91	0,0017	P
IAvH-CT 18999	BAPN060-16	<i>Pristimantis myersi</i>	236,9	0,72	1,99	95,6	1,62	1,97	0,001	P
IAvH-CT 19000	BAPN048-16	<i>Pristimantis myersi</i>	42,6	0,11	2,13	30	0,49	2,01	0,00005	P
IAvH-CT 19012	BAPN049-16	<i>Pristimantis myersi</i>	36,5	1,75	2,07	26,3	1,67	2,31	0,001	P
IAvH-CT 19042	BAPN050-16	<i>Pristimantis myersi</i>	117,2	0,29	1,97	53,3	0,49	1,95	0,0019	D
IAvH-CT 19057	BAPN051-16	<i>Pristimantis myersi</i>	50,5	0,17	1,92	22,1	0,69	1,98	0,0009	D
IAvH-CT 19058	BAPN052-16	<i>Pristimantis myersi</i>	52,4	0,19	1,98	43,5	1,63	2,08	0,0012	D
IAvH-CT 19059	BAPN053-16	<i>Pristimantis myersi</i>	104,5	0,19	2,01	40,6	0,36	2,03	0,0011	D
IAvH-CT 19101	BAPN054-16	<i>Pristimantis myersi</i>	121,1	0,24	2,05	84,1	1,79	2,09	0,0018	P
IAvH-CT 19103	BAPN055-16	<i>Pristimantis myersi</i>	162,1	0,28	2,07	55,1	0,34	1,98	0,0012	P
IAvH-CT 19060	BAPN056-16	<i>Pristimantis myersi</i>	56,6	0,11	2,06	38,6	0,39	1,98	0,0026	P
IAvH-CT 19067	BAPN057-16	<i>Pristimantis myersi</i>	47,8	0,11	2,02	47,6	0,88	2,06	0,002	P

IAvH-CT 19070	BAPN058-16	<i>Pristimantis myersi</i>	94,9	0,19	2,05	46,5	0,76	2,07	0,0018	P
IAvH-CT 19072	BAPN059-16	<i>Pristimantis myersi</i>	75,6	0,19	1,95	84,5	1,2	1,99	0,001	P
IAvH-CT 19009	BAPN063-16	<i>Pristimantis ortizi</i>	60,4	1,29	2,04	45	1,88	2,07	0,00005	D
IAvH-CT 19016	BAPN061-16	<i>Pristimantis ortizi</i>	138	0,26	1,91	170,5	2,05	1,94	0,001	D
IAvH-CT 19027	BAPN062-16	<i>Pristimantis ortizi</i>	92,1	0,27	2,07	112,4	1,62	2,01	0,00005	D
IAvH-CT 19105	BAPN064-16	<i>Pristimantis ortizi</i>	126,4	0,35	2,08	77,6	0,98	1,95	0,0046	P
IAvH-CT 19010	BAPN074-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	59	0,81	2,07	45,1	2,35	2,16	0,0005	D
IAvH-CT 19041	BAPN065-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	313,8	0,51	2	111,7	0,69	1,95	0,0019	D
IAvH-CT 19045	BAPN066-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	181,6	0,32	2	42	0,29	1,67	0,0002	D
IAvH-CT 19046	BAPN067-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	201,8	0,39	2,04	107,7	0,81	2,01	0,0019	D
IAvH-CT 19047	BAPN068-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	208,8	0,64	1,97	87,3	1,47	1,81	0,002	D
IAvH-CT 19048	BAPN069-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	317,3	0,51	2,03	124,3	0,5	1,91	0,0023	D
IAvH-CT 19049	BAPN070-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	336,6	0,62	1,93	161,1	1,64	1,92	0,0013	D
IAvH-CT 19055	BAPN071-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	208,2	0,58	2,02	76,7	1,25	1,85	0,0002	P
IAvH-CT 19061	BAPN072-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	157,2	0,34	2,06	130,6	0,81	1,99	0,0034	P
IAvH-CT 19075	BAPN073-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	132,3	0,24	2,02	69,9	0,33	1,9	0,0018	P
IAvH-CT 19088	BAPN075-16	<i>Pristimantis supernatis</i>	387,5	0,78	2,06	207,2	1,39	2,02	0,002	H
IAvH-CT 19043	BAPN078-16	<i>Pristimantis unistrigatus</i>	254,6	0,48	1,97	101,5	0,48	1,91	0,0005	D
IAvH-CT 19052	BAPN076-16	<i>Pristimantis unistrigatus</i>	238,1	0,71	2,01	83,7	1,84	1,92	0,008	D
IAvH-CT 19108	BAPN077-16	<i>Pristimantis unistrigatus</i>	115,3	0,31	2,04	103,5	1,62	1,97	0,004	P
IAvH-CT 19065	BAPN079-16	<i>Pristimantis unistrigatus</i>	241,6	0,61	2,05	342,2	1,91	2	0,0032	H

Anexo C. Códigos en placa de las muestras utilizadas en este estudio. El pozo indica el código que se utilizó para distinguir las muestras durante la electroforesis. + = Control positivo.

Pozo	Código muestra	Pozo	Código muestra
A1	IAvH-CT 19008	H4	IAvH-CT 19062
B1	IAvH-CT 19011	A5	IAvH-CT 18999 (+)
C1	IAvH-CT 19014	B5	Control negativo
D1	IAvH-CT 19016	C5	IAvH-CT 19003
E1	IAvH-CT 19018	A7	IAvH-CT 19063
F1	IAvH-CT 19025	B7	IAvH-CT 19065
G1	IAvH-CT 19026	C7	IAvH-CT 19067
H1	IAvH-CT 19027	D7	IAvH-CT 19068
A2	IAvH-CT 19029	E7	IAvH-CT 19069
B2	IAvH-CT 19030	F7	IAvH-CT 19070
C2	IAvH-CT 19031	G7	IAvH-CT 19072
D2	IAvH-CT 19039	H7	IAvH-CT 19074
E2	IAvH-CT 19041	A8	IAvH-CT 19075
F2	IAvH-CT 19042	B8	IAvH-CT 19077
G2	IAvH-CT 19043	C8	IAvH-CT 19081
H2	IAvH-CT 19045	D8	IAvH-CT 19084
A3	IAvH-CT 19046	E8	IAvH-CT 19086
B3	IAvH-CT 19047	F8	IAvH-CT 19088
C3	IAvH-CT 19048	G8	IAvH-CT 19097
D3	IAvH-CT 19049	H8	IAvH-CT 19102
E3	IAvH-CT 19050	A9	IAvH-CT 19101
F3	IAvH-CT 19051	B9	IAvH-CT 19103
G3	IAvH-CT 19052	C9	IAvH-CT 19104
H3	IAvH-CT 19053	D9	IAvH-CT 19105
A4	IAvH-CT 19054	E9	IAvH-CT 19107
B4	IAvH-CT 19055	F9	IAvH-CT 19108
C4	IAvH-CT 19057	G9	IAvH-CT 19109
D4	IAvH-CT 19058	H9	IAvH-CT 19110
E4	IAvH-CT 19059	A10	IAvH-CT 19111
F4	IAvH-CT 19060	B10	IAvH-CT 18999 (+)
G4	IAvH-CT 19061	C10	Control negativo

Anexo D. Caracteres diagnósticos (Rojo) y parciales (Naranja) para género y especie obtenidos del alineamiento del gen COI.

	Posición nucleótidos																		
Género	17	18	20	21	23	24	26	27	29	30	31	32	33	35	36	38	39	41	42
<i>Pristimantis</i>																			
<i>Hypodactylus</i>	T	T	G	G	G	C	T	G	G	C	C	A	G	A	T	G	T	G	G
Género	44	45	46	47	48	49	51	53	54	56	57	59	60	62	63	65	66	67	68
<i>Pristimantis</i>																			
<i>Hypodactylus</i>	G	C	T	G	C	C	T	A	G	C	T	C	T	A	T	C	G	A	A
Género	69	71	72	75	76	77	78	80	81	83	84	86	87	89	90	91	93	94	95
<i>Pristimantis</i>																			
<i>Hypodactylus</i>	C	G	A	T	A	A	C	C	A	C	C	G	G	G	C	C	T	T	C
Género	96	98	99	101	102	104	105	106	107	108	115	118	122	124	154	158	161	178	181
<i>Pristimantis</i>																A			
<i>Hypodactylus</i>	T	G	G	G	A	G	A	C	C	A	T	T	A	T	C	G	G	C	G
Género	187	190	193	199	206	208	211	212	214	220	232	244	247	256	259	262	271	273	277
<i>Pristimantis</i>																			
<i>Hypodactylus</i>	C	A	C	T	C	A	A	A	C	C	A	A	C	C	C	A	C	C	A
Género	278	281	283	287	290	293	295	299	301	302	304	305	310	311	312	319	328	331	334
<i>Pristimantis</i>	T		T												C				
<i>Hypodactylus</i>		T		C	C	G	T	G	C	G	A	G	A	G		C	C	A	A
Género	350	353	359	361	364	370	373	376	382	386	391	406	407	409	412	421	427	428	436
<i>Pristimantis</i>		G																	
<i>Hypodactylus</i>	G		C	C	C	C	C	C	A	C	A	C	T	A	T	C	C	C	A
Género	439	442	445	455	456	458	470	473	476	477	479	480	483	487	494	511	514	529	530
<i>Pristimantis</i>																			
<i>Hypodactylus</i>	T	T	T	A	T	C	C	C	T	C	C	T	C	A	A	G	T	T	G
Género	536	541	542	548	550	562	571	581	586	589	592	598	601	605	606	607	608	611	614
<i>Pristimantis</i>			C																
<i>Hypodactylus</i>	C	C		C	C	A	C	C	A	C	A	A	T	T	C	T	T	T	G
Género	615	617	618	620	621	623	624	626	627	628	629	630	631	632	633	635	636	637	638
<i>Pristimantis</i>																			
<i>Hypodactylus</i>	A	C	C	G	C	G	G	G	G	C	G	G	A	G	A	C	C	A	A
Género	639	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	653	654					
<i>Pristimantis</i>																			
<i>Hypodactylus</i>	T	C	T	T	T	A	C	C	A	A	C	A	C	T					

	Posición nucleótidos																												
Especies	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	19	22	25	28										
<i>Pristimantis buckleyi</i>																													
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	A	C	C	C	T	T	A	T	T	T	A	G	T	A	C	G	T	G											
<i>Hypodactylus AN01</i>																													
<i>Pristimantis huicundo</i>																													
<i>Pristimantis supernatis</i>																													
<i>Pristimantis myersi</i>																													
<i>Pristimantis chloronotus</i>																												A	
Especies	31	32	34	35	36	37	40	44	46	49	52	68	70	76	78	82	85	88	89										
<i>Pristimantis buckleyi</i>											A																		
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	T										T						G												
<i>Hypodactylus AN01</i>	C	A						G	T			A			C				G										
<i>Pristimantis huicundo</i>																													
<i>Pristimantis supernatis</i>																													
<i>Pristimantis myersi</i>							G										G												
<i>Pristimantis chloronotus</i>			G	G	C		T				T			T	C			C	G										
Especies	91	94	97	100	115	121	124	133	157	158	163	166	169	170	172	187	190	199	200										
<i>Pristimantis buckleyi</i>												G			A	C													
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	G	C		T					T	C		C		T			T	T											
<i>Hypodactylus AN01</i>	C						T	T			G																		
<i>Pristimantis huicundo</i>																			A										
<i>Pristimantis supernatis</i>																													
<i>Pristimantis myersi</i>			A	G	C	C																							
<i>Pristimantis chloronotus</i>				C		G	A				A		C						A										
Especies	205	206	208	211	214	220	223	229	235	238	241	244	250	280	281	287	289	292	293										
<i>Pristimantis buckleyi</i>									T									A											
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	A	T				T		A		A	A		T			T	G												
<i>Hypodactylus AN01</i>														A	T														
<i>Pristimantis huicundo</i>																			T										
<i>Pristimantis supernatis</i>							G				T																		
<i>Pristimantis myersi</i>													G																
<i>Pristimantis chloronotus</i>			G	G	G		T					C							C										
Especies	298	301	302	304	310	316	319	322	328	334	337	346	352	359	361	364	367	370	373										
<i>Pristimantis buckleyi</i>																T			A										
<i>Pristimantis unistrigatus</i>		A		G					G	G	T	C			C	T		C											
<i>Hypodactylus AN01</i>	A								C										C										
<i>Pristimantis huicundo</i>						A							C						A										
<i>Pristimantis supernatis</i>			A			G	T																						
<i>Pristimantis myersi</i>																													
<i>Pristimantis chloronotus</i>										G		A																	
Especies	376	391	394	400	403	412	415	418	421	424	430	433	436	439	445	451	454	455	458										
<i>Pristimantis buckleyi</i>				A			T	T											G										
<i>Pristimantis unistrigatus</i>						C			A	T		A	T	C	C														
<i>Hypodactylus AN01</i>			A	T									A				A		C										
<i>Pristimantis huicundo</i>							G																						
<i>Pristimantis supernatis</i>							C									T													
<i>Pristimantis myersi</i>												G				A													
<i>Pristimantis chloronotus</i>					C	A							G																

Species	460	463	469	475	478	479	484	490	493	495	499	502	505	508	511	514	520	530	532
<i>Pristimantis buckleyi</i>		T		T	C		T			T									
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	A			A		T		T			T	T	C	A					
<i>Hypodactylus AN01</i>															G				
<i>Pristimantis huicundo</i>																	C		
<i>Pristimantis supernatis</i>						A												A	
<i>Pristimantis myersi</i>																	C		
<i>Pristimantis chloronotus</i>			G						G					C					C

Species	535	544	553	556	557	562	568	574	583	586	589	596	598	607	619	622	628	631	634
<i>Pristimantis buckleyi</i>	A				T				G				T			G			
<i>Pristimantis unistrigatus</i>				C							T								
<i>Hypodactylus AN01</i>						A			C			T		T	A		C	A	C
<i>Pristimantis huicundo</i>							C												
<i>Pristimantis supernatis</i>							T										G	G	
<i>Pristimantis myersi</i>			A		A														
<i>Pristimantis chloronotus</i>		A						G		G						A			

Species	637	640	643	652
<i>Pristimantis buckleyi</i>				
<i>Pristimantis unistrigatus</i>				
<i>Hypodactylus AN01</i>	A		T	
<i>Pristimantis huicundo</i>				
<i>Pristimantis supernatis</i>		T	C	C
<i>Pristimantis myersi</i>				
<i>Pristimantis chloronotus</i>				

Anexo E. Caracteres diagnósticos (Rojo) y parciales (Naranja) para género y especie obtenidos del alineamiento del gen 16S rRNA.

		Posición nucleótidos																		
Género		29	30	31	32	42	43	45	50	65	76	92	98	99	100	101	107	112	121	126
<i>Pristimantis</i>		G	C	C	T	C									C					
<i>Hypodactylus</i>							C	C	C	C	G	C	T	T	T	T	A	T	A	T
Género		132	134	135	136	137	138	139	148	149	150	151	152	153	154	155	159	160	165	171
<i>Pristimantis</i>		G			T	A	A								A		G			
<i>Hypodactylus</i>		A	G	T	C	T		A	T	T	T	T	T	C	C		A	A	A	C
Género		172	175	182	188	190	191	194	195	196	197	198	201	216	217	226	229	231	232	233
<i>Pristimantis</i>			C	G	G								A						T	
<i>Hypodactylus</i>		T	T		A	G	A	A	A	C	C	T		T	A	T	A	A	C	A
Género		235	236	237	238	239	242	244	245	247	249	250	252	258	260	264	265	266	270	271
<i>Pristimantis</i>					C	A			C						T					
<i>Hypodactylus</i>		T	A	A	T		T	C	T	T	A	A	T	C		T	T	T	A	A
Género		276	279	286	288	289	290	293	296	297	299	301	302	303	304	310	318	319	321	324
<i>Pristimantis</i>								C	T	G				A			G			G
<i>Hypodactylus</i>		C	C	C	C	A	G			A	T	A	T		A	A	A	C	A	
Género		332	334	335	345	346	347	348	351	353	356	357	363	365	372	375	376	379	380	381
<i>Pristimantis</i>								A												
<i>Hypodactylus</i>		A	A	C	A	C	G	T	A	C	G	A	T	A	T	A	C	G	T	T
Género		385	390	393	395	396	398	399	401	403	405	408	409	410	411	414	420	422	423	425
<i>Pristimantis</i>													T						A	
<i>Hypodactylus</i>		A	A	A	T	C	A	T	A	T	G	C		C	C	T	A	T	T	C
Género		426	427	429	432	433	436	440	451	452	464	471	472	475	476	478	481	482	495	496
<i>Pristimantis</i>													C						G	
<i>Hypodactylus</i>		A	T	T	T	C	C	C	T	A	G	G		C	A	G	C	C		C
Género		500	504	522	523	525	527	528	531	533	547	548	549	550	551	552				
<i>Pristimantis</i>		C					A													
<i>Hypodactylus</i>		T	C	A	G	G		T	T	A	T	A	C	T	A	A				

Especies	366	370	372	375	376	379	393	395	399	408	414	423	425	426	427	436	451	464	471
<i>Pristimantis myersi</i>																			
<i>Pristimantis ortizi</i>																			
<i>Pristimantis buckleyi</i>		G		G				C											
<i>Hypodactylus AN01</i>	T		T		C		A		C		T	C		T					G
<i>Pristimantis unistrigatus</i>			G			A	C		A	C		A					T	C	A
<i>Pristimantis supernatis</i>																			
<i>Pristimantis huicundo</i>																			
<i>Pristimantis chloronotus</i>														T					

Especies	481	482	496	500	504	522	553
<i>Pristimantis myersi</i>							
<i>Pristimantis ortizi</i>							
<i>Pristimantis buckleyi</i>							
<i>Hypodactylus AN01</i>			C	T		A	G
<i>Pristimantis unistrigatus</i>		T			T		
<i>Pristimantis supernatis</i>	T						
<i>Pristimantis huicundo</i>							
<i>Pristimantis chloronotus</i>							

Anexo F. Matriz de distancias genéticas según el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P) para el gen COI.

	BAPN003-16	BAPN004-16	BAPN005-16	BAPN006-16	BAPN007-16	BAPN008-16	BAPN010-16	BAPN011-16	BAPN012-16	BAPN013-16	BAPN014-16	BAPN015-16	BAPN016-16	BAPN017-16	BAPN018-16	BAPN019-16	BAPN020-16	BAPN021-16	BAPN022-16	BAPN023-16	
BAPN003-16																					
BAPN004-16	0.008																				
BAPN005-16	0.008	0																			
BAPN006-16	0.133	0.139	0.135																		
BAPN007-16	0.129	0.135	0.132	0.012																	
BAPN008-16	0.119	0.123	0.121	0.148	0.152																
BAPN010-16	0.142	0.142	0.139	0.162	0.164	0.165															
BAPN011-16	0.125	0.133	0.13	0.146	0.152	0.159	0.089														
BAPN012-16	0.287	0.286	0.287	0.272	0.263	0.283	0.264	0.275													
BAPN013-16	0.282	0.282	0.282	0.273	0.263	0.278	0.26	0.276	0.002	0.002											
BAPN014-16	0.287	0.286	0.287	0.272	0.263	0.283	0.264	0.275	0	0.002											
BAPN015-16	0.299	0.296	0.299	0.284	0.274	0.29	0.28	0.291	0.028	0.023	0.028										
BAPN016-16	0.296	0.293	0.296	0.281	0.272	0.292	0.273	0.284	0.03	0.025	0.03	0.005									
BAPN017-16	0.283	0.283	0.283	0.276	0.266	0.283	0.246	0.27	0.03	0.032	0.03	0.039	0.041								
BAPN018-16	0.285	0.284	0.285	0.27	0.26	0.295	0.253	0.266	0.033	0.034	0.033	0.043	0.045	0.008							
BAPN019-16	0.289	0.289	0.289	0.282	0.272	0.29	0.276	0.287	0.014	0.013	0.014	0.03	0.031	0.032	0.038						
BAPN020-16	0.29	0.289	0.29	0.282	0.273	0.293	0.274	0.285	0.014	0.008	0.014	0.027	0.028	0.031	0.035	0.009					
BAPN021-16	0.292	0.292	0.292	0.276	0.271	0.287	0.273	0.277	0.031	0.025	0.031	0.035	0.037	0.036	0.04	0.028	0.021				
BAPN022-16	0.291	0.291	0.291	0.274	0.269	0.287	0.269	0.275	0.03	0.028	0.03	0.037	0.039	0.036	0.041	0.026	0.023	0.005			
BAPN023-16	0.317	0.314	0.314	0.295	0.297	0.302	0.303	0.282	0.243	0.232	0.243	0.261	0.269	0.246	0.251	0.241	0.243	0.246	0.236	0.236	0
BAPN024-16	0.312	0.309	0.309	0.289	0.291	0.292	0.296	0.284	0.243	0.234	0.243	0.262	0.269	0.247	0.25	0.238	0.239	0.247	0.247	0.237	0
BAPN025-16	0.312	0.311	0.311	0.288	0.291	0.292	0.296	0.284	0.246	0.234	0.246	0.262	0.27	0.247	0.253	0.243	0.244	0.248	0.237	0	0
BAPN026-16	0.305	0.309	0.304	0.283	0.289	0.292	0.281	0.24	0.234	0.24	0.261	0.268	0.247	0.248	0.236	0.237	0.248	0.237	0	0	0
BAPN027-16	0.307	0.309	0.304	0.285	0.287	0.289	0.292	0.28	0.24	0.234	0.24	0.261	0.268	0.247	0.248	0.236	0.237	0.247	0.237	0	0
BAPN028-16	0.307	0.305	0.305	0.304	0.304	0.3	0.301	0.308	0.247	0.241	0.247	0.265	0.273	0.255	0.244	0.247	0.245	0.247	0.245	0.011	0
BAPN029-16	0.298	0.302	0.298	0.286	0.288	0.292	0.286	0.284	0.245	0.239	0.245	0.264	0.271	0.244	0.245	0.24	0.241	0.25	0.239	0.01	0
BAPN030-16	0.268	0.278	0.277	0.288	0.291	0.277	0.269	0.261	0.222	0.21	0.222	0.24	0.238	0.225	0.236	0.227	0.223	0.221	0.21	0.145	0
BAPN031-16	0.28	0.287	0.289	0.281	0.284	0.273	0.281	0.294	0.243	0.243	0.243	0.264	0.257	0.257	0.26	0.257	0.26	0.259	0.267	0.231	0
BAPN032-16	0.283	0.287	0.29	0.284	0.287	0.275	0.282	0.294	0.243	0.243	0.243	0.266	0.259	0.257	0.259	0.257	0.26	0.258	0.267	0.231	0
BAPN033-16	0.266	0.27	0.27	0.272	0.277	0.278	0.255	0.256	0.222	0.219	0.222	0.239	0.232	0.231	0.234	0.229	0.225	0.221	0.221	0.142	0
BAPN035-16	0.263	0.267	0.267	0.269	0.274	0.275	0.252	0.253	0.221	0.219	0.221	0.238	0.231	0.231	0.233	0.229	0.226	0.222	0.222	0.142	0
BAPN037-16	0.266	0.27	0.27	0.287	0.285	0.288	0.272	0.281	0.218	0.218	0.218	0.232	0.225	0.248	0.252	0.23	0.225	0.228	0.229	0.148	0
BAPN038-16	0.254	0.257	0.257	0.285	0.288	0.284	0.261	0.256	0.215	0.212	0.215	0.229	0.22	0.243	0.249	0.226	0.22	0.22	0.22	0.156	0
BAPN039-16	0.277	0.278	0.281	0.298	0.296	0.304	0.286	0.297	0.228	0.218	0.228	0.241	0.235	0.248	0.26	0.237	0.233	0.239	0.23	0.149	0
BAPN040-16	0.274	0.281	0.278	0.28	0.282	0.29	0.261	0.269	0.228	0.218	0.228	0.246	0.239	0.235	0.244	0.237	0.233	0.227	0.218	0.141	0
BAPN041-16	0.257	0.256	0.256	0.264	0.267	0.271	0.235	0.241	0.219	0.217	0.219	0.233	0.225	0.233	0.233	0.23	0.223	0.218	0.218	0.142	0
BAPN042-16	0.241	0.243	0.243	0.264	0.267	0.261	0.234	0.244	0.237	0.234	0.237	0.249	0.243	0.255	0.249	0.243	0.243	0.232	0.239	0.144	0
BAPN044-16	0.266	0.273	0.277	0.291	0.289	0.289	0.274	0.285	0.223	0.218	0.223	0.241	0.234	0.247	0.255	0.232	0.228	0.238	0.235	0.154	0
BAPN045-16	0.275	0.277	0.277	0.301	0.299	0.3	0.283	0.289	0.228	0.22	0.228	0.244	0.237	0.251	0.261	0.239	0.237	0.24	0.235	0.154	0
BAPN046-16	0.279	0.282	0.282	0.302	0.299	0.298	0.283	0.287	0.233	0.229	0.233	0.253	0.245	0.25	0.263	0.245	0.248	0.255	0.24	0.163	0
BAPN047-16	0.267	0.272	0.272	0.281	0.279	0.267	0.268	0.275	0.226	0.23	0.226	0.247	0.24	0.25	0.255	0.235	0.236	0.244	0.24	0.157	0
BAPN048-16	0.285	0.285	0.285	0.292	0.297	0.282	0.286	0.276	0.204	0.209	0.204	0.216	0.214	0.207	0.197	0.209	0.214	0.21	0.21	0.274	0
BAPN049-16	0.276	0.277	0.276	0.28	0.285	0.27	0.275	0.273	0.2	0.205	0.2	0.216	0.213	0.203	0.194	0.203	0.205	0.205	0.203	0.264	0
BAPN050-16	0.277	0.279	0.277	0.281	0.286	0.271	0.276	0.274	0.206	0.211	0.206	0.219	0.217	0.21	0.208	0.211	0.211	0.211	0.21	0.271	0
BAPN052-16	0.284	0.282	0.283	0.294	0.299	0.268	0.278	0.28	0.196	0.2	0.196	0.207	0.205	0.196	0.19	0.198	0.201	0.198	0.199	0.268	0
BAPN053-16	0.284	0.283	0.283	0.294	0.299	0.263	0.277	0.28	0.198	0.2	0.198	0.206	0.204	0.196	0.191	0.2	0.203	0.198	0.199	0.268	0
BAPN054-16	0.284	0.282	0.283	0.294	0.299	0.268	0.278	0.28	0.196	0.2	0.196	0.207	0.205	0.196	0.19	0.198	0.201	0.198	0.199	0.268	0
BAPN055-16	0.287	0.286	0.286	0.283	0.287	0.293	0.286	0.279	0.192	0.193	0.192	0.198	0.196	0.193	0.186	0.194	0.19	0.182	0.18	0.236	0
BAPN056-16	0.287	0.286	0.286	0.283	0.287	0.293	0.286	0.279	0.192	0.193	0.192	0.198	0.196	0.193	0.186	0.194	0.19	0.182	0.18	0.236	0
BAPN057-16	0.28	0.279	0.28	0.289	0.289	0.273	0.277	0.282	0.196	0.2	0.196	0.211	0.209	0.198	0.19	0.194	0.197	0.199	0.199	0.265	0
BAPN058-16	0.271	0.27	0.271	0.277	0.273	0.273	0.268	0.275	0.194	0.198	0.194	0.205	0.203	0.196	0.188	0.192	0.195	0.204	0.201	0.252	0
BAPN059-16	0.271	0.27	0.271	0.277	0.273	0.273	0.268	0.275	0.194	0.198	0.194	0.205	0.203	0.196	0.188	0.192	0.195	0.204	0.201	0.252	0
BAPN060-16	0.271	0.27	0.271	0.277	0.273	0.273	0.268	0.275	0.194	0.198	0.194	0.205	0.203	0.196	0.188	0.192	0.195	0.204	0.201	0.252	0
BAPN064-16	0.276	0.278	0.278	0.306	0.303	0.31	0.287	0.286	0.229	0.219	0.229	0.24	0.236	0.25	0.264	0.241	0.239	0.24	0.23	0.153	0
BAPN065-16	0.319	0.318	0.318	0.296	0.3	0.32	0.285	0.293	0.194	0.188	0.194	0.205	0.207	0.186	0.195	0.192	0.197	0.188	0.188	0.255	0
BAPN066-16	0.3	0.297	0.3	0.289	0.293	0.3	0.289	0.303	0.187	0.173	0.187	0.211	0.208	0.189	0.205	0.193	0.194	0.184	0.185	0.233	0
BAPN067-16	0.299	0.297	0.3	0.288	0.293	0.303	0.272	0.275	0.187	0.173	0.187	0.211	0.208	0.189	0.205	0.193	0.194	0.183	0.185	0.233	0
BAPN068-16	0.299	0.297	0.298	0.288	0.293	0.301	0.269	0.272	0.186	0.173	0.186	0.207	0.205	0.189	0.203	0.192	0.193	0.183	0.185	0.233	0
BAPN069-16	0.301	0.297	0.3	0.29	0.295	0.303	0.271	0.274	0.187	0.173	0.187	0.211	0.208	0.189	0.205	0.193	0.194	0.183	0.185	0.233	0
BAPN070-16	0.301	0.297	0.3	0.29	0.295	0.303	0.271	0.274	0.187	0.173	0.187	0.211	0.208	0.189	0.20						

	BAPN024-16	BAPN025-16	BAPN026-16	BAPN027-16	BAPN028-16	BAPN029-16	BAPN030-16	BAPN031-16	BAPN032-16	BAPN033-16	BAPN035-16	BAPN037-16	BAPN038-16	BAPN039-16	BAPN040-16	BAPN041-16	BAPN042-16	BAPN044-16	BAPN045-16	BAPN046-16	
BAPN024-16																					
BAPN025-16	0																				
BAPN026-16	0	0																			
BAPN027-16	0	0	0																		
BAPN028-16	0.011	0.011	0.011	0.011																	
BAPN029-16	0.009	0.01	0.009	0.009	0.012																
BAPN030-16	0.141	0.143	0.142	0.143	0.15	0.142															
BAPN031-16	0.229	0.23	0.229	0.23	0.236	0.229	0.221														
BAPN032-16	0.229	0.232	0.232	0.232	0.236	0.232	0.224	0													
BAPN033-16	0.137	0.137	0.137	0.137	0.154	0.139	0.099	0.213	0.215												
BAPN035-16	0.138	0.137	0.137	0.138	0.155	0.14	0.1	0.212	0.214	0											
BAPN037-16	0.147	0.147	0.147	0.147	0.155	0.145	0.119	0.24	0.242	0.092	0.09										
BAPN038-16	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.154	0.108	0.241	0.241	0.085	0.085	0.01									
BAPN039-16	0.147	0.149	0.148	0.149	0.157	0.145	0.12	0.244	0.249	0.092	0.09	0	0.01								
BAPN040-16	0.137	0.137	0.136	0.137	0.157	0.14	0.1	0.221	0.224	0.025	0.025	0.093	0.09	0.102							
BAPN041-16	0.137	0.137	0.137	0.137	0.146	0.134	0.099	0.219	0.22	0.032	0.032	0.098	0.095	0.098	0.009						
BAPN042-16	0.139	0.138	0.138	0.139	0.146	0.133	0.101	0.21	0.211	0.023	0.023	0.097	0.094	0.097	0.004	0.01					
BAPN044-16	0.151	0.153	0.146	0.147	0.161	0.142	0.112	0.239	0.242	0.096	0.094	0.007	0.014	0.011	0.1	0.102	0.097				
BAPN045-16	0.153	0.155	0.153	0.153	0.161	0.149	0.113	0.245	0.245	0.098	0.097	0.007	0.014	0.006	0.1	0.105	0.1	0			
BAPN046-16	0.163	0.164	0.163	0.163	0.171	0.159	0.121	0.243	0.243	0.104	0.103	0.014	0.022	0.014	0.109	0.115	0.114	0.014	0.014		
BAPN047-16	0.156	0.155	0.155	0.156	0.17	0.158	0.125	0.24	0.241	0.103	0.103	0.021	0.029	0.021	0.105	0.117	0.111	0.021	0.022	0.022	0.012
BAPN048-16	0.274	0.274	0.274	0.274	0.271	0.271	0.273	0.25	0.25	0.265	0.264	0.257	0.27	0.27	0.281	0.28	0.274	0.27	0.27	0.27	0.259
BAPN049-16	0.262	0.269	0.262	0.261	0.265	0.26	0.263	0.246	0.242	0.257	0.256	0.251	0.264	0.262	0.268	0.268	0.261	0.257	0.26	0.26	0.249
BAPN050-16	0.269	0.276	0.27	0.269	0.273	0.267	0.264	0.255	0.254	0.262	0.261	0.256	0.27	0.262	0.272	0.274	0.267	0.262	0.265	0.265	0.254
BAPN052-16	0.263	0.269	0.265	0.264	0.269	0.263	0.266	0.251	0.247	0.253	0.249	0.249	0.262	0.262	0.264	0.263	0.258	0.257	0.26	0.26	0.249
BAPN053-16	0.263	0.269	0.264	0.263	0.269	0.262	0.261	0.249	0.248	0.253	0.249	0.249	0.262	0.256	0.261	0.263	0.258	0.256	0.26	0.26	0.249
BAPN054-16	0.263	0.269	0.265	0.264	0.269	0.263	0.266	0.251	0.247	0.253	0.249	0.249	0.262	0.262	0.264	0.263	0.258	0.257	0.26	0.26	0.249
BAPN055-16	0.231	0.235	0.23	0.229	0.244	0.233	0.25	0.236	0.234	0.248	0.247	0.263	0.277	0.267	0.252	0.243	0.246	0.262	0.268	0.262	0.262
BAPN056-16	0.231	0.235	0.23	0.229	0.244	0.233	0.25	0.236	0.234	0.248	0.247	0.263	0.277	0.267	0.252	0.243	0.246	0.262	0.268	0.262	0.262
BAPN057-16	0.258	0.263	0.259	0.259	0.266	0.257	0.261	0.256	0.254	0.244	0.246	0.248	0.265	0.261	0.259	0.256	0.248	0.256	0.263	0.252	0.252
BAPN058-16	0.246	0.251	0.248	0.248	0.253	0.246	0.259	0.261	0.258	0.232	0.234	0.231	0.244	0.245	0.247	0.248	0.239	0.242	0.248	0.234	0.234
BAPN059-16	0.246	0.251	0.248	0.248	0.253	0.246	0.259	0.261	0.258	0.232	0.234	0.231	0.244	0.245	0.247	0.248	0.239	0.242	0.248	0.234	0.234
BAPN060-16	0.246	0.251	0.248	0.248	0.253	0.246	0.259	0.261	0.258	0.232	0.234	0.231	0.244	0.245	0.247	0.248	0.239	0.242	0.248	0.234	0.234
BAPN064-16	0.153	0.153	0.153	0.153	0.157	0.149	0.117	0.252	0.252	0.094	0.092	0.002	0.01	0.002	0.099	0.103	0.103	0.008	0.008	0.015	0.015
BAPN065-16	0.256	0.256	0.258	0.257	0.261	0.252	0.262	0.285	0.281	0.263	0.265	0.268	0.273	0.282	0.275	0.276	0.283	0.275	0.277	0.288	0.288
BAPN066-16	0.233	0.231	0.235	0.235	0.233	0.233	0.244	0.26	0.257	0.24	0.241	0.238	0.238	0.254	0.258	0.261	0.253	0.244	0.247	0.251	0.251
BAPN067-16	0.233	0.231	0.235	0.235	0.233	0.233	0.243	0.26	0.257	0.24	0.241	0.237	0.238	0.253	0.257	0.26	0.253	0.244	0.247	0.251	0.251
BAPN068-16	0.233	0.232	0.233	0.232	0.233	0.232	0.244	0.26	0.259	0.241	0.242	0.239	0.238	0.25	0.259	0.262	0.245	0.242	0.247	0.251	0.251
BAPN069-16	0.233	0.232	0.236	0.235	0.233	0.234	0.245	0.261	0.257	0.241	0.242	0.239	0.238	0.254	0.259	0.262	0.255	0.245	0.247	0.251	0.251
BAPN070-16	0.233	0.232	0.236	0.235	0.233	0.234	0.245	0.261	0.257	0.241	0.242	0.239	0.238	0.254	0.259	0.262	0.255	0.245	0.247	0.251	0.251
BAPN071-16	0.233	0.232	0.236	0.235	0.233	0.234	0.245	0.261	0.257	0.241	0.242	0.239	0.238	0.254	0.259	0.262	0.255	0.245	0.247	0.251	0.251
BAPN072-16	0.263	0.264	0.264	0.263	0.259	0.244	0.244	0.243	0.268	0.259	0.278	0.274	0.278	0.278	0.274	0.278	0.282	0.278	0.281	0.277	0.277
BAPN073-16	0.236	0.233	0.236	0.236	0.233	0.232	0.25	0.262	0.262	0.25	0.251	0.247	0.244	0.258	0.267	0.269	0.262	0.253	0.257	0.261	0.261
BAPN074-16	0.235	0.234	0.24	0.239	0.233	0.236	0.253	0.263	0.259	0.251	0.252	0.248	0.244	0.266	0.268	0.27	0.264	0.256	0.257	0.261	0.261
BAPN075-16	0.238	0.237	0.243	0.242	0.235	0.236	0.254	0.265	0.262	0.251	0.252	0.249	0.244	0.266	0.268	0.265	0.261	0.256	0.257	0.262	0.262
BAPN076-16	0.258	0.262	0.262	0.262	0.269	0.263	0.243	0.252	0.251	0.265	0.266	0.294	0.299	0.295	0.275	0.273	0.279	0.29	0.293	0.308	0.308
BAPN077-16	0.258	0.261	0.26	0.26	0.269	0.261	0.241	0.251	0.251	0.264	0.266	0.294	0.299	0.293	0.272	0.272	0.278	0.288	0.293	0.308	0.308
BAPN078-16	0.258	0.261	0.262	0.262	0.269	0.262	0.242	0.251	0.251	0.264	0.266	0.294	0.299	0.295	0.274	0.272	0.278	0.289	0.293	0.308	0.308
BAPN079-16	0.268	0.272	0.272	0.272	0.274	0.273	0.256	0.271	0.271	0.278	0.28	0.304	0.295	0.307	0.288	0.291	0.297	0.302	0.302	0.308	0.308

	BAPN047-16	BAPN048-16	BAPN049-16	BAPN050-16	BAPN052-16	BAPN053-16	BAPN054-16	BAPN055-16	BAPN056-16	BAPN057-16	BAPN058-16	BAPN059-16	BAPN060-16	BAPN064-16	BAPN065-16
BAPN047-16															
BAPN048-16	0.256														
BAPN049-16	0.249	0.007													
BAPN050-16	0.254	0.012	0.005												
BAPN052-16	0.25	0.034	0.026	0.03											
BAPN053-16	0.25	0.034	0.025	0.03	0										
BAPN054-16	0.25	0.034	0.026	0.03	0	0									
BAPN055-16	0.268	0.126	0.123	0.127	0.118	0.117	0.118								
BAPN056-16	0.268	0.126	0.123	0.127	0.118	0.117	0.118	0							
BAPN057-16	0.244	0.028	0.023	0.027	0.019	0.019	0.019	0.122	0.122						
BAPN058-16	0.227	0.037	0.031	0.035	0.023	0.024	0.023	0.131	0.131	0.014					
BAPN059-16	0.227	0.037	0.031	0.035	0.023	0.024	0.023	0.131	0.131	0.014	0				
BAPN060-16	0.227	0.037	0.031	0.035	0.023	0.024	0.023	0.131	0.131	0.014	0	0			
BAPN064-16	0.025	0.27	0.263	0.268	0.263	0.263	0.263	0.268	0.268	0.266	0.248	0.248	0.248	0.248	
BAPN065-16	0.253	0.222	0.221	0.232	0.228	0.23	0.228	0.234	0.234	0.209	0.216	0.216	0.216	0.289	
BAPN066-16	0.223	0.241	0.238	0.248	0.232	0.23	0.232	0.234	0.234	0.234	0.227	0.227	0.227	0.25	0.114
BAPN067-16	0.223	0.241	0.238	0.247	0.232	0.23	0.232	0.234	0.234	0.234	0.227	0.227	0.227	0.25	0.114
BAPN068-16	0.224	0.241	0.239	0.246	0.232	0.229	0.232	0.232	0.232	0.235	0.229	0.229	0.229	0.25	0.113
BAPN069-16	0.224	0.241	0.237	0.246	0.231	0.229	0.231	0.233	0.233	0.234	0.227	0.227	0.227	0.25	0.113
BAPN070-16	0.224	0.241	0.237	0.246	0.231	0.229	0.231	0.233	0.233	0.234	0.227	0.227	0.227	0.25	0.113
BAPN071-16	0.224	0.241	0.237	0.246	0.231	0.229	0.231	0.233	0.233	0.234	0.227	0.227	0.227	0.25	0.113
BAPN072-16	0.26	0.215	0.217	0.224	0.212	0.212	0.212	0.231	0.231	0.216	0.213	0.213	0.213	0.28	0.085
BAPN073-16	0.233	0.241	0.242	0.249	0.233	0.233	0.233	0.235	0.235	0.235	0.228	0.228	0.228	0.26	0.112
BAPN074-16	0.234	0.241	0.239	0.248	0.233	0.231	0.233	0.237	0.237	0.236	0.229	0.229	0.229	0.26	0.111
BAPN075-16	0.234	0.236	0.235	0.244	0.238	0.236	0.238	0.242	0.242	0.236	0.234	0.234	0.234	0.26	0.112
BAPN076-16	0.296	0.256	0.244	0.242	0.244	0.245	0.244	0.253	0.253	0.243	0.248	0.248	0.248	0.309	0.241
BAPN077-16	0.295	0.256	0.246	0.243	0.246	0.246	0.246	0.255	0.255	0.244	0.249	0.249	0.249	0.309	0.242
BAPN078-16	0.295	0.256	0.246	0.243	0.246	0.246	0.246	0.254	0.254	0.243	0.248	0.248	0.248	0.309	0.242
BAPN079-16	0.3	0.256	0.24	0.238	0.243	0.243	0.243	0.267	0.267	0.241	0.246	0.246	0.246	0.309	0.251

	BAPN066-16	BAPN067-16	BAPN068-16	BAPN069-16	BAPN070-16	BAPN071-16	BAPN072-16	BAPN073-16	BAPN074-16	BAPN075-16	BAPN076-16	BAPN077-16	BAPN078-16	BAPN079-16
BAPN066-16														
BAPN067-16	0													
BAPN068-16	0	0												
BAPN069-16	0	0	0											
BAPN070-16	0	0	0	0										
BAPN071-16	0	0	0	0	0									
BAPN072-16	0.065	0.065	0.065	0.065	0.065	0.065								
BAPN073-16	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.065							
BAPN074-16	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.065	0						
BAPN075-16	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.069	0.009	0.009					
BAPN076-16	0.256	0.255	0.254	0.254	0.254	0.254	0.266	0.251	0.255	0.254				
BAPN077-16	0.256	0.256	0.255	0.256	0.256	0.256	0.268	0.251	0.257	0.256	0			
BAPN078-16	0.256	0.256	0.255	0.256	0.256	0.256	0.268	0.251	0.256	0.256	0	0		
BAPN079-16	0.259	0.259	0.258	0.259	0.259	0.259	0.271	0.256	0.262	0.259	0.023	0.023	0.023	

Anexo G. Matriz de distancias genéticas según el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P) para el gen 16S rRNA.

	BAPN002-16	BAPN003-16	BAPN004-16	BAPN005-16	BAPN006-16	BAPN007-16	BAPN008-16	BAPN009-16	BAPN010-16	BAPN011-16	BAPN012-16	BAPN013-16	BAPN014-16	BAPN015-16	BAPN016-16	BAPN017-16	BAPN018-16	BAPN019-16	BAPN020-16	BAPN021-16
BAPN002-16																				
BAPN003-16	0.214																			
BAPN004-16	0.21	0.007																		
BAPN005-16	0.21	0.007	0																	
BAPN006-16	0.186	0.05	0.043	0.043																
BAPN007-16	0.187	0.05	0.043	0.043	0															
BAPN008-16	0.202	0.042	0.041	0.041	0.042	0.042														
BAPN009-16	0.214	0.023	0.017	0.017	0.047	0.047	0.047													
BAPN010-16	0.203	0.039	0.044	0.044	0.044	0.044	0.046	0.048												
BAPN011-16	0.218	0.042	0.039	0.039	0.042	0.042	0.046	0.045	0.013											
BAPN012-16	0.218	0.261	0.255	0.255	0.243	0.246	0.249	0.247	0.246	0.252										
BAPN013-16	0.207	0.242	0.238	0.238	0.231	0.233	0.237	0.23	0.228	0.237	0.004									
BAPN014-16	0.194	0.234	0.23	0.23	0.224	0.226	0.229	0.216	0.233	0.227	0.006	0.013								
BAPN015-16	0.219	0.263	0.255	0.255	0.254	0.256	0.261	0.255	0.254	0.257	0.018	0.015	0.019							
BAPN016-16	0.219	0.246	0.241	0.241	0.232	0.234	0.238	0.235	0.232	0.241	0.018	0.017	0.017	0.014						
BAPN017-16	0.189	0.226	0.222	0.222	0.219	0.221	0.224	0.209	0.23	0.224	0.02	0.025	0.014	0.019	0.017					
BAPN018-16	0.183	0.227	0.222	0.222	0.217	0.219	0.225	0.209	0.23	0.222	0.015	0.021	0.011	0.013	0.012	0.004				
BAPN019-16	0.183	0.227	0.225	0.225	0.227	0.229	0.225	0.214	0.228	0.225	0.011	0.019	0.009	0.017	0.019	0.016	0.011			
BAPN020-16	0.181	0.228	0.227	0.227	0.226	0.227	0.226	0.216	0.232	0.228	0.009	0.017	0.007	0.015	0.017	0.014	0.009	0.002		
BAPN021-16	0.187	0.232	0.228	0.228	0.223	0.225	0.23	0.215	0.236	0.228	0.013	0.019	0.011	0.015	0.015	0.011	0.007	0.011	0.009	0.009
BAPN022-16	0.187	0.227	0.222	0.222	0.217	0.219	0.225	0.215	0.231	0.222	0.013	0.019	0.009	0.015	0.015	0.009	0.006	0.009	0.007	0
BAPN023-16	0.203	0.24	0.233	0.233	0.221	0.223	0.216	0.222	0.234	0.23	0.14	0.15	0.134	0.154	0.15	0.134	0.127	0.13	0.126	0.132
BAPN024-16	0.203	0.24	0.233	0.233	0.221	0.223	0.216	0.222	0.234	0.23	0.14	0.15	0.134	0.154	0.15	0.134	0.127	0.13	0.126	0.132
BAPN025-16	0.203	0.24	0.233	0.233	0.221	0.223	0.216	0.222	0.234	0.23	0.14	0.15	0.134	0.154	0.15	0.134	0.127	0.13	0.126	0.132
BAPN026-16	0.203	0.24	0.233	0.233	0.221	0.223	0.216	0.222	0.234	0.23	0.14	0.15	0.134	0.154	0.15	0.134	0.127	0.13	0.126	0.132
BAPN027-16	0.203	0.24	0.233	0.233	0.221	0.223	0.216	0.222	0.234	0.23	0.14	0.15	0.134	0.154	0.15	0.134	0.127	0.13	0.126	0.132
BAPN028-16	0.203	0.24	0.233	0.233	0.221	0.223	0.216	0.222	0.234	0.23	0.14	0.15	0.134	0.154	0.15	0.134	0.127	0.13	0.126	0.132
BAPN029-16	0.203	0.237	0.23	0.23	0.219	0.221	0.213	0.219	0.231	0.227	0.143	0.15	0.131	0.157	0.15	0.132	0.125	0.127	0.123	0.13
BAPN030-16	0.194	0.232	0.228	0.228	0.228	0.227	0.216	0.223	0.242	0.239	0.165	0.17	0.152	0.177	0.166	0.148	0.143	0.146	0.144	0.148
BAPN031-16	0.183	0.197	0.196	0.196	0.19	0.192	0.189	0.189	0.21	0.213	0.158	0.153	0.144	0.153	0.143	0.133	0.134	0.133	0.14	0.14
BAPN032-16	0.185	0.2	0.199	0.199	0.193	0.195	0.192	0.191	0.213	0.215	0.161	0.155	0.146	0.155	0.146	0.135	0.135	0.142	0.14	0.142
BAPN033-16	0.179	0.219	0.212	0.212	0.212	0.211	0.206	0.212	0.22	0.217	0.162	0.145	0.168	0.158	0.141	0.134	0.136	0.135	0.139	0.139
BAPN034-16	0.182	0.222	0.215	0.215	0.214	0.214	0.209	0.214	0.223	0.22	0.154	0.159	0.143	0.165	0.155	0.138	0.132	0.134	0.132	0.136
BAPN035-16	0.182	0.222	0.215	0.215	0.214	0.214	0.209	0.214	0.223	0.22	0.154	0.159	0.143	0.165	0.155	0.138	0.132	0.134	0.132	0.136
BAPN036-16	0.194	0.235	0.229	0.229	0.222	0.222	0.206	0.228	0.232	0.228	0.169	0.17	0.155	0.174	0.169	0.15	0.143	0.146	0.142	0.143
BAPN037-16	0.199	0.233	0.226	0.226	0.217	0.217	0.206	0.223	0.235	0.228	0.156	0.166	0.151	0.173	0.168	0.147	0.145	0.147	0.143	0.149
BAPN038-16	0.197	0.233	0.226	0.226	0.218	0.217	0.207	0.221	0.235	0.229	0.156	0.166	0.151	0.173	0.168	0.147	0.145	0.147	0.143	0.149
BAPN039-16	0.2	0.233	0.226	0.226	0.218	0.217	0.207	0.221	0.235	0.229	0.156	0.166	0.151	0.173	0.168	0.147	0.145	0.147	0.143	0.149
BAPN040-16	0.179	0.219	0.212	0.212	0.212	0.211	0.206	0.212	0.22	0.217	0.157	0.162	0.143	0.168	0.158	0.138	0.132	0.134	0.132	0.136
BAPN041-16	0.179	0.219	0.212	0.212	0.212	0.211	0.206	0.212	0.22	0.217	0.157	0.162	0.143	0.168	0.158	0.138	0.132	0.134	0.132	0.136
BAPN042-16	0.179	0.219	0.212	0.212	0.212	0.211	0.206	0.212	0.22	0.217	0.157	0.162	0.143	0.168	0.158	0.138	0.132	0.134	0.132	0.136
BAPN043-16	0.177	0.209	0.203	0.203	0.212	0.211	0.206	0.206	0.22	0.213	0.157	0.157	0.136	0.162	0.158	0.132	0.125	0.127	0.126	0.13
BAPN044-16	0.193	0.233	0.226	0.226	0.22	0.22	0.207	0.221	0.235	0.229	0.159	0.169	0.154	0.17	0.165	0.144	0.142	0.145	0.141	0.147
BAPN045-16	0.193	0.233	0.226	0.226	0.22	0.22	0.207	0.221	0.235	0.229	0.159	0.169	0.154	0.17	0.165	0.144	0.142	0.145	0.141	0.147
BAPN046-16	0.195	0.23	0.224	0.224	0.218	0.217	0.207	0.221	0.235	0.229	0.156	0.166	0.154	0.17	0.162	0.144	0.142	0.145	0.141	0.147
BAPN047-16	0.195	0.23	0.224	0.224	0.218	0.217	0.207	0.221	0.235	0.229	0.156	0.166	0.154	0.17	0.162	0.144	0.142	0.145	0.141	0.147
BAPN048-16	0.181	0.199	0.197	0.197	0.202	0.204	0.204	0.2	0.227	0.225	0.083	0.079	0.067	0.083	0.082	0.071	0.067	0.071	0.07	0.065
BAPN049-16	0.191	0.221	0.22	0.22	0.227	0.229	0.229	0.211	0.24	0.249	0.083	0.076	0.075	0.084	0.082	0.08	0.076	0.08	0.078	0.076
BAPN050-16	0.199	0.212	0.211	0.211	0.215	0.218	0.218	0.213	0.23	0.241	0.088	0.077	0.077	0.088	0.08	0.081	0.077	0.081	0.079	0.075
BAPN051-16	0.202	0.229	0.223	0.223	0.222	0.224	0.237	0.222	0.25	0.24	0.097	0.097	0.088	0.086	0.091	0.09	0.084	0.092	0.086	0.088
BAPN052-16	0.192	0.223	0.221	0.221	0.229	0.231	0.231	0.212	0.241	0.251	0.088	0.078	0.081	0.094	0.087	0.081	0.077	0.086	0.084	0.081
BAPN053-16	0.197	0.225	0.22	0.22	0.222	0.224	0.227	0.223	0.236	0.246	0.086	0.087	0.085	0.097	0.094	0.085	0.078	0.085	0.083	0.081
BAPN054-16	0.195	0.214	0.212	0.212	0.217	0.219	0.219	0.215	0.231	0.242	0.09	0.081	0.081	0.098	0.089	0.081	0.076	0.086	0.084	0.079
BAPN055-16	0.179	0.211	0.21	0.21	0.217	0.218	0.213	0.203	0.233	0.229	0.075	0.076	0.064	0.081	0.077	0.068	0.064	0.068	0.066	0.064
BAPN056-16	0.179	0.211	0.21	0.21	0.217	0.218	0.213	0.203	0.233	0.229	0.075	0.076	0.064	0.081	0.077	0.068	0.064	0.068	0.066	0.064
BAPN057-16	0.203	0.223	0.221	0.221	0.22	0.223	0.223	0.219	0.229	0.241	0.081	0.083	0.078	0.095	0.079	0.083	0.079	0.083	0.081	0.076
BAPN058-16	0.189	0.213	0.212	0.212	0.216	0.218	0.22	0.198	0.24	0.236	0.081	0.079	0.07	0.086	0.08	0.074	0.07	0.074	0.072	0.07
BAPN059-16	0.191	0.201	0.199	0.199	0.204	0.206	0.211	0.197	0.229	0.225	0.083	0.079	0.067	0.086	0.082	0.071	0.067	0.071	0.07	0.065
BAPN060-16	0.185	0.203	0.201	0.201	0.203	0.205	0.207	0.198	0.228	0.227	0.081	0.077	0.065	0.086	0.08	0.07	0.066	0.07	0.068	0.063
BAPN061-16	0.199	0.235	0.229	0.229	0.227	0.227	0.211	0.228	0.237	0.233	0.175	0.175	0.159	0.177	0.175	0.155	0.148	0.151	0.146	0.148
BAPN062-16	0.196	0.235	0.228	0.228	0.227	0.227	0.211	0.228	0.237	0.233	0.172	0.172	0.157	0.174	0.172	0.152	0.146	0.148	0.144	0.146
BAPN063-16	0.194																			

	BAPN022-16	BAPN023-16	BAPN024-16	BAPN025-16	BAPN026-16	BAPN027-16	BAPN028-16	BAPN029-16	BAPN030-16	BAPN031-16	BAPN032-16	BAPN033-16	BAPN034-16	BAPN035-16	BAPN036-16	BAPN037-16	BAPN038-16	BAPN039-16	BAPN040-16	BAPN041-16
BAPN022-16																				
BAPN023-16	0.129																			
BAPN024-16	0.129	0																		
BAPN025-16	0.129	0	0																	
BAPN026-16	0.129	0	0	0																
BAPN027-16	0.129	0	0	0	0															
BAPN028-16	0.129	0	0	0	0	0														
BAPN029-16	0.129	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005													
BAPN030-16	0.145	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.058												
BAPN031-16	0.133	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.14	0.156												
BAPN032-16	0.135	0.144	0.144	0.144	0.144	0.144	0.144	0.142	0.154	0.002										
BAPN033-16	0.136	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.038	0.039	0.144	0.146									
BAPN034-16	0.134	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.037	0.037	0.146	0.149	0.002								
BAPN035-16	0.134	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.037	0.037	0.142	0.144	0.002	0.004							
BAPN036-16	0.143	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.052	0.039	0.144	0.147	0.029	0.031	0.027						
BAPN037-16	0.145	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.046	0.054	0.158	0.16	0.035	0.037	0.033	0.039					
BAPN038-16	0.145	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.046	0.054	0.156	0.158	0.035	0.037	0.033	0.039	0				
BAPN039-16	0.145	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.046	0.054	0.153	0.156	0.035	0.037	0.033	0.039	0.002	0.002			
BAPN040-16	0.136	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.037	0.041	0.142	0.144	0.002	0.004	0.004	0.031	0.037	0.037	0.037	0.037
BAPN041-16	0.136	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.037	0.041	0.142	0.144	0.002	0.004	0.004	0.031	0.037	0.037	0.037	0
BAPN042-16	0.136	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.037	0.041	0.142	0.144	0.002	0.004	0.004	0.031	0.037	0.037	0.037	0	0
BAPN043-16	0.131	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.042	0.05	0.144	0.146	0.011	0.013	0.013	0.041	0.046	0.046	0.046	0.009	0.009
BAPN044-16	0.142	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.044	0.052	0.153	0.156	0.029	0.031	0.027	0.037	0.005	0.005	0.007	0.031	0.031
BAPN045-16	0.142	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.044	0.052	0.153	0.156	0.029	0.031	0.027	0.037	0.005	0.005	0.007	0.031	0.031
BAPN046-16	0.142	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.048	0.052	0.156	0.158	0.033	0.035	0.031	0.041	0.005	0.005	0.007	0.035	0.035
BAPN047-16	0.142	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.048	0.052	0.156	0.158	0.033	0.035	0.031	0.041	0.005	0.005	0.007	0.035	0.035
BAPN048-16	0.065	0.107	0.107	0.107	0.107	0.107	0.107	0.107	0.133	0.106	0.108	0.107	0.105	0.105	0.116	0.119	0.119	0.119	0.107	0.107
BAPN049-16	0.067	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.116	0.14	0.122	0.124	0.113	0.111	0.111	0.125	0.124	0.124	0.124	0.116	0.116
BAPN050-16	0.075	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.146	0.117	0.119	0.118	0.115	0.115	0.128	0.131	0.131	0.131	0.118	0.118
BAPN051-16	0.08	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.12	0.155	0.136	0.138	0.123	0.12	0.12	0.139	0.133	0.133	0.133	0.125	0.125
BAPN052-16	0.073	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.12	0.135	0.124	0.122	0.118	0.115	0.115	0.125	0.128	0.128	0.128	0.12	0.12
BAPN053-16	0.081	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.132	0.123	0.121	0.112	0.109	0.109	0.12	0.126	0.126	0.126	0.112	0.112
BAPN054-16	0.079	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.132	0.116	0.114	0.114	0.112	0.112	0.119	0.128	0.128	0.128	0.114	0.114
BAPN055-16	0.06	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.121	0.142	0.114	0.116	0.121	0.119	0.119	0.128	0.129	0.129	0.129	0.119	0.119
BAPN056-16	0.06	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.121	0.142	0.114	0.116	0.121	0.119	0.119	0.128	0.129	0.129	0.129	0.119	0.119
BAPN057-16	0.076	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.139	0.127	0.129	0.11	0.108	0.108	0.123	0.124	0.124	0.124	0.11	0.11
BAPN058-16	0.062	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.113	0.135	0.114	0.116	0.11	0.108	0.108	0.122	0.12	0.12	0.12	0.113	0.113
BAPN059-16	0.065	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.14	0.108	0.111	0.114	0.111	0.111	0.123	0.126	0.126	0.126	0.114	0.114
BAPN060-16	0.063	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.136	0.105	0.107	0.11	0.108	0.108	0.119	0.123	0.123	0.123	0.11	0.11
BAPN061-16	0.148	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.052	0.039	0.149	0.151	0.029	0.031	0.027	0.004	0.041	0.041	0.041	0.031	0.031
BAPN062-16	0.146	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.05	0.037	0.147	0.149	0.027	0.029	0.025	0.007	0.043	0.043	0.043	0.029
BAPN063-16	0.143	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.052	0.039	0.144	0.147	0.029	0.031	0.027	0	0.039	0.039	0.039	0.031	0.031
BAPN064-16	0.153	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.047	0.058	0.155	0.157	0.036	0.038	0.034	0.038	0.002	0.002	0	0.036	0.036
BAPN065-16	0.062	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.13	0.151	0.146	0.144	0.137	0.135	0.139	0.147	0.149	0.149	0.149	0.135	0.135
BAPN066-16	0.056	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.119	0.139	0.137	0.135	0.13	0.128	0.128	0.137	0.138	0.138	0.128	0.128
BAPN067-16	0.056	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.12	0.141	0.135	0.132	0.132	0.13	0.13	0.139	0.14	0.14	0.14	0.13	0.13
BAPN068-16	0.056	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.119	0.139	0.137	0.135	0.13	0.128	0.128	0.137	0.138	0.138	0.128	0.128
BAPN069-16	0.056	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.119	0.139	0.137	0.135	0.13	0.128	0.128	0.137	0.138	0.138	0.128	0.128
BAPN070-16	0.056	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.119	0.139	0.137	0.135	0.13	0.128	0.128	0.137	0.138	0.138	0.128	0.128
BAPN071-16	0.056	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.119	0.139	0.137	0.135	0.13	0.128	0.128	0.137	0.138	0.138	0.128	0.128
BAPN072-16	0.059	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.117	0.143	0.138	0.136	0.129	0.127	0.127	0.138	0.132	0.132	0.127	0.127
BAPN073-16	0.06	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.123	0.144	0.146	0.144	0.135	0.132	0.132	0.142	0.147	0.147	0.132	0.132
BAPN074-16	0.06	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.123	0.144	0.146	0.144	0.135	0.132	0.132	0.142	0.147	0.147	0.132	0.132
BAPN075-16	0.062	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.119	0.135	0.14	0.137	0.126	0.124	0.124	0.133	0.143	0.143	0.143	0.124
BAPN076-16	0.125	0.141	0.141	0.141	0.141	0.141	0.141	0.136	0.162	0.127	0.127	0.145	0.143	0.143	0.16	0.153	0.153	0.153	0.143	0.143
BAPN077-16	0.125	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.138	0.164	0.126	0.126	0.147	0.145	0.145	0.162	0.155	0.155	0.145	0.145
BAPN078-16	0.125	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.135	0.161	0.128	0.128	0.144	0.142	0.142	0.159	0.153	0.153	0.142	0.142
BAPN079-16	0.128	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.135	0.161	0.128	0.128	0.14	0.137	0.137	0.154	0.147	0.147	0.137	0.137

	BAPN042-16	BAPN043-16	BAPN044-16	BAPN045-16	BAPN046-16	BAPN047-16	BAPN048-16	BAPN049-16	BAPN050-16	BAPN051-16	BAPN052-16	BAPN053-16	BAPN054-16	BAPN055-16	BAPN056-16	BAPN057-16	BAPN058-16	BAPN059-16	BAPN060-16
BAPN042-16																			
BAPN043-16	0.009																		
BAPN044-16	0.031	0.041																	
BAPN045-16	0.031	0.041	0																
BAPN046-16	0.035	0.044	0.004	0.004															
BAPN047-16	0.035	0.044	0.004	0.004	0														
BAPN048-16	0.107	0.105	0.122	0.122	0.122	0.122													
BAPN049-16	0.116	0.113	0.126	0.126	0.128	0.128	0												
BAPN050-16	0.118	0.115	0.134	0.134	0.134	0.134	0.002	0.002											
BAPN051-16	0.125	0.122	0.133	0.133	0.135	0.135	0.043	0.044	0.046										
BAPN052-16	0.12	0.118	0.131	0.131	0.133	0.133	0.008	0.008	0.01	0.054									
BAPN053-16	0.112	0.117	0.128	0.128	0.128	0.128	0.014	0.014	0.017	0.06	0.006								
BAPN054-16	0.114	0.117	0.13	0.13	0.13	0.13	0.01	0.01	0.012	0.056	0.002	0.004							
BAPN055-16	0.119	0.117	0.131	0.131	0.134	0.134	0.039	0.045	0.044	0.066	0.05	0.053	0.048						
BAPN056-16	0.119	0.117	0.131	0.131	0.134	0.134	0.039	0.045	0.044	0.066	0.05	0.053	0.048	0					
BAPN057-16	0.11	0.115	0.126	0.126	0.126	0.126	0.014	0.014	0.017	0.065	0.019	0.021	0.017	0.049	0.049				
BAPN058-16	0.113	0.11	0.123	0.123	0.125	0.125	0.006	0.006	0.008	0.05	0.01	0.017	0.012	0.041	0.041	0.017			
BAPN059-16	0.114	0.109	0.129	0.129	0.129	0.129	0.008	0.008	0.01	0.05	0.012	0.019	0.014	0.037	0.037	0.019	0		
BAPN060-16	0.11	0.108	0.125	0.125	0.125	0.125	0.006	0.006	0.008	0.051	0.01	0.017	0.012	0.037	0.037	0.017	0	0	
BAPN061-16	0.031	0.041	0.039	0.039	0.043	0.043	0.116	0.125	0.128	0.139	0.125	0.12	0.119	0.133	0.133	0.123	0.122	0.123	0.119
BAPN062-16	0.029	0.039	0.037	0.037	0.041	0.041	0.119	0.128	0.13	0.136	0.127	0.122	0.122	0.135	0.135	0.125	0.124	0.125	0.122
BAPN063-16	0.031	0.041	0.037	0.037	0.041	0.041	0.116	0.125	0.128	0.139	0.125	0.12	0.119	0.128	0.128	0.123	0.122	0.123	0.119
BAPN064-16	0.036	0.043	0.008	0.008	0.006	0.006	0.126	0.126	0.131	0.142	0.131	0.126	0.128	0.133	0.133	0.124	0.129	0.131	0.129
BAPN065-16	0.135	0.132	0.145	0.145	0.149	0.149	0.09	0.096	0.097	0.093	0.093	0.098	0.094	0.073	0.073	0.106	0.092	0.092	0.09
BAPN066-16	0.128	0.13	0.135	0.135	0.14	0.14	0.083	0.094	0.089	0.087	0.086	0.088	0.084	0.073	0.073	0.099	0.087	0.085	0.081
BAPN067-16	0.13	0.132	0.137	0.137	0.142	0.142	0.083	0.095	0.089	0.088	0.087	0.088	0.084	0.074	0.074	0.099	0.089	0.085	0.081
BAPN068-16	0.128	0.13	0.135	0.135	0.14	0.14	0.083	0.094	0.089	0.087	0.086	0.088	0.084	0.073	0.073	0.099	0.087	0.085	0.081
BAPN069-16	0.128	0.13	0.135	0.135	0.14	0.14	0.083	0.094	0.089	0.087	0.086	0.088	0.084	0.073	0.073	0.099	0.087	0.085	0.081
BAPN070-16	0.128	0.13	0.135	0.135	0.14	0.14	0.083	0.094	0.089	0.087	0.086	0.088	0.084	0.073	0.073	0.099	0.087	0.085	0.081
BAPN071-16	0.128	0.13	0.135	0.135	0.14	0.14	0.083	0.094	0.089	0.087	0.086	0.088	0.084	0.073	0.073	0.099	0.087	0.085	0.081
BAPN072-16	0.127	0.129	0.132	0.132	0.136	0.136	0.079	0.088	0.088	0.083	0.085	0.087	0.085	0.069	0.069	0.094	0.082	0.081	0.078
BAPN073-16	0.132	0.134	0.145	0.145	0.149	0.149	0.087	0.098	0.094	0.091	0.091	0.093	0.089	0.081	0.081	0.104	0.092	0.089	0.086
BAPN074-16	0.132	0.134	0.145	0.145	0.149	0.149	0.087	0.098	0.094	0.091	0.091	0.093	0.089	0.081	0.081	0.104	0.092	0.089	0.086
BAPN075-16	0.124	0.126	0.14	0.14	0.145	0.145	0.083	0.093	0.089	0.087	0.088	0.09	0.086	0.077	0.077	0.099	0.087	0.085	0.081
BAPN076-16	0.143	0.145	0.151	0.151	0.153	0.153	0.114	0.126	0.125	0.119	0.135	0.135	0.133	0.122	0.122	0.141	0.126	0.123	0.121
BAPN077-16	0.145	0.147	0.153	0.153	0.155	0.155	0.114	0.127	0.125	0.12	0.137	0.135	0.133	0.123	0.123	0.141	0.128	0.123	0.121
BAPN078-16	0.142	0.144	0.15	0.15	0.153	0.153	0.114	0.125	0.125	0.118	0.135	0.135	0.133	0.121	0.121	0.141	0.126	0.123	0.121
BAPN079-16	0.137	0.139	0.145	0.145	0.147	0.147	0.11	0.121	0.121	0.114	0.13	0.13	0.128	0.12	0.12	0.136	0.122	0.119	0.117

	BAPN061-16	BAPN062-16	BAPN063-16	BAPN064-16	BAPN065-16	BAPN066-16	BAPN067-16	BAPN068-16	BAPN069-16	BAPN070-16	BAPN071-16	BAPN072-16	BAPN073-16	BAPN074-16	BAPN075-16	BAPN076-16	BAPN077-16	BAPN078-16	BAPN079-16
BAPN061-16																			
BAPN062-16	0.004																		
BAPN063-16	0.004	0.007																	
BAPN064-16	0.04	0.043	0.038																
BAPN065-16	0.151	0.151	0.147	0.158															
BAPN066-16	0.142	0.139	0.137	0.145	0.048														
BAPN067-16	0.144	0.141	0.139	0.145	0.049	0													
BAPN068-16	0.142	0.139	0.137	0.145	0.048	0	0												
BAPN069-16	0.142	0.139	0.137	0.145	0.048	0	0	0											
BAPN070-16	0.142	0.139	0.137	0.145	0.048	0	0	0	0										
BAPN071-16	0.142	0.139	0.137	0.145	0.048	0	0	0	0	0									
BAPN072-16	0.143	0.143	0.138	0.141	0.044	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011								
BAPN073-16	0.142	0.139	0.142	0.156	0.056	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.018							
BAPN074-16	0.142	0.139	0.142	0.156	0.056	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.018	0						
BAPN075-16	0.138	0.135	0.133	0.151	0.05	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.02	0.013	0.013					
BAPN076-16	0.16	0.157	0.16	0.159	0.13	0.125	0.126	0.125	0.125	0.125	0.125	0.128	0.134	0.134	0.13				
BAPN077-16	0.162	0.159	0.162	0.159	0.131	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.13	0.136	0.136	0.131	0			
BAPN078-16	0.159	0.156	0.159	0.159	0.129	0.124	0.126	0.124	0.124	0.124	0.124	0.128	0.134	0.134	0.129	0	0		
BAPN079-16	0.154	0.151	0.154	0.154	0.134	0.129	0.131	0.129	0.129	0.129	0.129	0.127	0.138	0.138	0.133	0.004	0.004	0.004	

Anexo H. Valor de probabilidad ($-\ln L$) y número de parámetros (K) para la selección del modelo evolutivo GTR+G+I según el Criterio de Información de Akaike (AIC).

Gen	Modelo	$-\ln L$	K	AIC
COI		5675.06406	146	11642.128120
16S	GTR+G+I	3559.25056	164	7446.501120