



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS**

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE DOS POBLACIONES DE  
*ANOMALOCOSMOECUS ILLIESI* PROVENIENTES DE LOS VOLCANES  
COTOPAXI E ILLINIZAS**

**AUTORA**

**SAMANTHA BRIGITTE CUASAPAS ARCINIEGA**

**AÑO**

**2019**



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE DOS POBLACIONES DE  
*ANOMALOCOSMOECUS ILLIESI* PROVENIENTES DE LOS VOLCANES  
COTOPAXI E ILLINIZAS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

PhD María Isabel Ballesteros Redondo

Autora

Samantha Brigitte Cuasapas Arciniega

Año

2019

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Estudio de la diversidad genética entre dos poblaciones de *Anomalocosmoecus illiesi* provenientes de los volcanes Cotopaxi e Illinizas, a través de reuniones periódicas con la estudiante Samantha Brigitte Cuasapas Arciniega, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

María Isabel Ballesteros Redondo

Doctora en Biología

CC: 1757168610

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Estudio de la diversidad genética entre dos poblaciones de *Anomalocosmoecus illiesi* provenientes de los volcanes Cotopaxi e Illinizas, de la estudiante Samantha Brigitte Cuasapas Arciniega, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Blanca Rios Touma

Doctora en Estudios Avanzados en Ecología

CC: 1707113765

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

---

Samantha Brigitte Cuasapas Arciniega

CC: 0401629043

## **Agradecimientos**

Mi sincero agradecimiento a la PhD María Isabel Ballesteros, por darme su confianza, paciencia y conocimientos a lo largo del proceso de titulación.

A la PhD Blanca Ríos Touma, por darme la oportunidad de realizar esta investigación y haberme orientado durante el desarrollo de la misma.

A mi familia, por brindarme su apoyo, motivación, y consejos en cada momento.

A mis amigos, principalmente a David Fonseca y Jennifer Guamangate, por acompañarme y alentarme siempre.

## **Dedicatoria**

Principalmente a Dios, por haberme dado la sabiduría para culminar esta meta con éxito. A mis padres Antonio Cuasapas y Elvira Arciniega, por su amor incondicional y por ser un gran ejemplo en mi vida. A mi hermano Bryan y a mi sobrina Sophia, por alegrar mis días y por siempre brindarme su apoyo y amor.

## Resumen

*Anomalocosmoecus illiesi* es un insecto macroinvertebrado de agua dulce, correspondiente al orden Trichoptera. Las especies de este orden, incluyendo *A. illiesi*, son usados como bioindicadores para evaluar la calidad de los ecosistemas acuáticos. Ecuador es un país muy biodiverso, pero se conoce poco sobre las especies que se encuentran en su territorio. Encontrar nueva información, respecto a la diversidad genética de *Anomalocosmoecus illiesi*, ayudará a comprender mejor los patrones de diversidad de esta especie y quizá de otros insectos acuáticos. En este trabajo, se empleó el código de barras de ADN, una herramienta molecular muy útil en estudios de diversidad genética e historia evolutiva de otras especies de Trichoptera, para inferir la diversidad de genes entre las poblaciones de las cuencas del volcán Cotopaxi (PI) y del volcán Illinizas (SP). Para ello, se empleó el ADN mitocondrial (ADNmt) de la proteína citocromo c oxidasa subunidad I (COI) y el ADN ribosómico (ADNr) 28S; adicionalmente, se comparó a dichas poblaciones con dos grupos de individuos de *A. illiesi*, correspondientes al páramo de El Ángel (A) y al arenal del volcán Chimborazo (C). Los análisis se realizaron en 81 fragmentos del gen de ADNmt COI de 509 pb, ya que el gen 28S no mostró variabilidad y fue descartado para los análisis filogenéticos. La composición nucleotídica mostró un mayor contenido de adenina y timina, y un mayor número de transiciones que de transversiones, como es común en los genomas de insectos. La construcción del árbol filogenético, reflejó que existe una variación interpoblacional relativamente alta entre los individuos de C y PI ( $p=0.018$ ) y PI y SP ( $0.016$ ), que representan los valores de  $p$  más grandes de este estudio. Concluyendo que, puede existir una barrera geográfica entre las poblaciones que se encuentran en lados distintos de la cordillera andina, pero una facilidad de flujo de genes entre los ríos de cuencas cercanas, como el caso de C y SP, cuyo valor  $p$  es el más pequeño ( $p=0.002$ ).

**Palabras clave:** *Anomalocosmoecus illiesi*, código de barras de ADN, COI, diversidad genética, barrera geográfica.



## Abstract

*Anomalocosmoecus illiesi* is a macroinvertebrate fresh water insect, corresponding to the order Trichoptera. Species of this order, including *A. illiesi*, are used as bioindicators to assess the quality of aquatic ecosystems. Ecuador is a highly biodiverse country, but the knowledge about the species that are in its territory is really poor. Find new information, about the genetic diversity of *Anomalocosmoecus illiesi*, will help to better understand the diversity patterns of this specie and from other aquatic insects. In this work, we used the DNA barcode, a very useful molecular tool in genetic diversity studies of other Trichoptera species, to infer the evolutionary history among the populations of the Cotopaxi volcano (PI) and the Illinizas volcano (SP). For this purpose, the mitochondrial DNA (mtDNA) of the protein cytochrome c oxidase subunit I (COI) and the ribosomal DNA (rDNA) 28S were used; Additionally, a comparison with the populations of *A. illiesi*, corresponding to the paramo El Ángel (A) and to the Chimborazo volcano (C) was established. The analyzes were performed on 81 fragments of the 509 bp mtDNA COI gene, because the 28S rDNA showed no variability and was discarded for the phylogenetic analysis. The nucleotide composition showed a higher content of adenine and thymine, and a greater number of transitions than transversions, as is common in insect genomes. The construction of the phylogenetic tree, reflected that there is a relatively high interpopulation variation between C and PI ( $p = 0.018$ ), and PI and SP (0.016) populations, which represent the highest p values of the study. Concluding that, there may be a geographical barrier between the populations found in the different sides of the Andean mountain range, but a facility of gene flow between the rivers of nearby basins, as in the case of C and SP, whose p-value is the smaller ( $p = 0.002$ ).

**Key words:** *Anomalocosmoecus illiesi*, DNA barcode, COI, genetic diversity, geographical barrier

# ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Problemática .....	4
1.3. Objetivos .....	5
1.3.1. Objetivo general .....	6
1.3.2. Objetivos específicos .....	6
1.4. Justificación .....	6
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	8
2.1. Trichoptera.....	8
2.1.1. Generalidades .....	8
2.1.2. Morfología .....	9
2.1.3. Desarrollo y Hábitat .....	11
2.1.4. Importancia ambiental.....	13
2.1.5. <i>Trichoptera</i> en el Ecuador .....	14
2.1.6. <i>Anomalocosmoecus illiesi</i> .....	15
2.2. Identificación de especies .....	17
2.2.1. Análisis morfológicos.....	17
2.2.2. Análisis moleculares.....	18
2.3. Diversidad genética .....	23
2.4. Filogeografía.....	25
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	28
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS .....	29
4.1. Población.....	29
4.2. Extracción de ADN y cuantificación .....	32
4.3. PCR y secuenciación del ADN .....	33
4.4. Análisis filogenético .....	35
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
5.1. Extracción y amplificación .....	36

5.2. Secuenciación y alineamiento .....	39
5.3. Análisis filogenético .....	43
5.3.1. Análisis de secuencias.....	43
5.3.2. Variabilidad de COI.....	44
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	57
6.1. Conclusiones.....	57
6.2. Recomendaciones .....	57
REFERENCIAS .....	59
ANEXOS.....	75

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

Las zonas elevadas del norte de los Andes ecuatorianos abarcan una serie de ecosistemas únicos, diversos y poco estudiados. Esta área corresponde a una de las zonas tectónicas más activas en el continente sudamericano, y posee la topografía y climatología que benefician la biodiversidad de especies (Holzenthal y Ríos-Touma, 2012). Entre ellas, distintos tipos de frigáneas (Insecta: Trichoptera), insectos acuáticos muy biodiversos que ocupan la mayoría de hábitats y roles tróficos en los ecosistemas acuáticos (Holzenthal, Thomson y Ríos-Touma, 2015).

El orden Trichoptera forma parte de un grupo de insectos holometábolos, que dependen completamente de un hábitat acuático para su desarrollo larvario y de pupa (Springer, 2010). En cuanto al estadio larval de Trichoptera, algunas larvas construyen refugios utilizando seda, que les permite adaptarse a hábitats más diversos (Binti y Hamid, 2011). La pupa desarrolla mandíbulas, que emplea para romper el refugio construido por la larva (Springer, 2010). Finalmente, en su vida adulta, estos insectos parecen diminutas polillas, cuyas alas están revestidas de pelos en lugar de escamas (hay excepciones), particularidad que le dio el nombre al orden (*trichos*: pelos; *ptera*: alas) (Springer, 2010). Por otro lado, los individuos de Trichoptera en conjunto con los del orden Ephemeroptera y Plecoptera, conforman lo que se denomina una comunidad EPT, los individuos EPT, son ampliamente reconocidos por su utilidad ambiental como bioindicadores. Estudios señalan que los géneros pertenecientes a Trichoptera, son buenos bioindicadores de la calidad del agua dulce, porque la mayoría de estas especies son solo capaces de sobrevivir en ríos o arroyos con una calidad de agua óptima y sus distribuciones están establecidas por su tolerancia a un conjunto de factores ambientales (Chang et al., 2014).

*Anomalocosmoecus illiesi*, especie que se estudia en este trabajo, es un insecto macroinvertebrado del orden Trichoptera. En Ecuador, *A. illiesi*, se ubica principalmente en pequeños arroyos en los páramos altos de la zona andina, y corresponde a la única especie de la familia Limnephilidae que se ha reportado en el país (Ríos-Touma et al., 2017). En el año 2009, esta especie fue ingresada al Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS). Las etapas inmaduras de *A. illiesi* fueron descritas por Marlier (1963) (Holzenthal y Calor, 2017).

En base al estudio de Vörösmarty et al. (2010), la biodiversidad acuática es la más amenazada del planeta. La actividad humana y el cambio climático antropogénico, son temas que comprometen de manera importante la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos (Vörösmarty et al., 2010). La biodiversidad o diversidad biológica, abarca la cantidad y variabilidad de organismos que conforman los distintos ecosistemas y el estudio de los vínculos ecológicos que se da entre ellos (Altamirano y Yanez, 2016). La biodiversidad contempla la variedad de genes (diversidad genética), especies y ecosistemas (Jiménez, 2014; López et al., 2012) y, gracias al fuerte efecto antropogénico sobre todas estas categorías, es de relevancia mundial apresurar su descripción y conservación (Bickford et al., 2007). La determinación de la diversidad biológica de especies en base a distinciones morfológicas no puede ser aplicada en todos los organismos, ya que algunos no son distinguibles morfológicamente (especies crípticas); porque en estadios inmaduros pueden no ser distinguibles y solo pueden ser identificados dentro de un complejo usando herramientas moleculares como los Códigos de Barras de ADN (Crawford, Paz, y Gonzalez, 2011; Gill et al., 2016), que son sistemas de bancos genéticos disponibles en bibliotecas en línea para la caracterización rápida y precisa de especies en función de sus secuencias de ADN (Altamirano y Yanez, 2016). Esta herramienta emplea la información de una o varias regiones de ADN, cortas y estándar (400-800 pb), para la identificación rápida de todas las variedades biológicas, con el propósito de facilitar la preservación, comprensión y uso sustentable de la biodiversidad (Altamirano y Yanez, 2016).

Este mecanismo de identificación, no intenta suplantar la taxonomía alfa y la filogenia, sino más bien agilizar las labores de identificación, ofreciendo la posibilidad de identificar variedades incluso a partir de muestras biológicas incompletas, dañadas o en estado inmaduro (Gill et al., 2014).

Los métodos filogenéticos proporcionan herramientas poderosas para estudiar los patrones de biodiversidad y biogeografía, y para investigar sucesos evolutivos y demográficos dentro de especies y poblaciones (Shaw et al., 2009). La filogeografía se esfuerza por comprender los procesos que intervienen en la distribución de la variación genética dentro y entre las especies estrechamente relacionadas (Knowles, 2009). Las relaciones espaciales de tales genealogías pueden mostrarse geográficamente y analizarse para deducir la historia evolutiva de poblaciones, subespecies y especies (Emerson y Hewitt, 2005). Las técnicas para obtener información de la secuencia de ADN están avanzando rápidamente, y se está secuenciando el genoma completo en un número creciente de organismos. Esto ha permitido identificar y desarrollar marcadores para muchos tipos de investigaciones, algunos muy útiles en estudios filogeográficos (Emerson y Hewitt, 2005). En este aspecto, se ha realizado un esfuerzo considerable para encontrar marcadores genéticos apropiados para estudiar la historia evolutiva de Trichoptera (Kjer et al., 2014). Los Trichoptera, son tema de interés para los estudios filogeográficos, debido a su patrón de dispersión distinto y a la estructura lineal diferente de sus hábitats (Lehrian et al., 2010). Además, los ecólogos han encontrado que la riqueza de especies disminuye al aumentar la latitud para la mayoría de los grupos taxonómicos (Gill et al., 2016). Sin embargo, el estudio de Hamid y Rawi (2017), llevado a cabo en Malasia, señaló que los taxa de los órdenes Ephemeroptera, Plecoptera y Trichoptera (EPT) brindan notables excepciones a este patrón latitudinal general, pudiendo exhibir diferentes tendencias de riqueza a través de los gradientes de elevación (Hamid y Rawi, 2017). Teniendo en cuenta la importancia y la sensibilidad de la biota de estos macroinvertebrados de agua dulce a los cambios en el ambiente que se extienden a lo largo de la cuenca, se necesita

urgentemente un mayor conocimiento de su taxonomía y biología (Ríos-Touma et al., 2017).

## **1.2. Problemática**

Algunos factores como el cambio climático, la deforestación masiva, los patógenos emergentes, las especies invasoras, el uso inapropiado de la tierra, entre otros (Craft et al., 2010), han provocado la rápida pérdida de diversidad en todo el planeta, que ha impulsado a las entidades de manejo de los recursos naturales, acelerar el inventario y estudio de las especies (Smith et al., 2005). Se sabe, que los ecosistemas acuáticos se encuentran entre los más amenazados del mundo (Vörösmarty et al., 2010). La inversión de los países desarrollados en tecnología del agua les permite compensar los altos niveles de estrés sin remediar sus causas subyacentes, mientras que los ecosistemas acuáticos de las naciones menos desarrolladas siguen siendo vulnerables (Vörösmarty et al., 2010). En Ecuador, la deforestación, el aumento de la minería artesanal e industrial, el uso excesivo de pesticidas por parte de la agricultura, y la construcción de represas hidroeléctricas sin implementar flujos ambientales precisos, están afectando la calidad del agua, desencadenando en fuertes efectos sobre las comunidades de agua dulce y la consecuente pérdida de su biodiversidad (Ríos-Touma et al., 2017).

Aunque en los últimos años se hicieron muchos esfuerzos por incrementar el conocimiento sobre la biodiversidad del Ecuador, por ejemplo, mediante el “Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2015-2030” (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016), aun no se cuenta con inventarios biológicos detallados para todo el territorio (García, Parra, y Mena, 2014), por lo que existen muchas especies endémicas que no han sido descritas y mucho menos evaluadas en términos de diversidad. En Ecuador, la comprensión de la biota acuática es limitada y existe una gran necesidad de obtener datos de referencia sobre las especies que se encuentran en este país (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016). En el caso de Trichoptera, por ejemplo, se estima que solo se

conoce cerca del 30% de las variedades existentes de la zona andina norte (Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú) (Ríos-Touma et al., 2017). La poca información en estos temas, se debe en parte a la falta de exploración en ciertas áreas del Ecuador, a la insuficiencia de taxónomos y al problema que simboliza la identificación morfológica de algunos grupos biológicos, esencialmente debido a problemas afines con las diferencias ontogénicas, dimorfismos sexuales, plasticidad fenotípica, entre otros (Stillwell et al., 2010). Como resultado, se subvalora la riqueza de especies y se malinterpreta la percepción de las tendencias de diversidad en los ecosistemas andinos (Altamirano y Yanez, 2016).

A pesar de que en los últimos años se han descrito nuevas especies de Trichoptera en Ecuador (P.e: Camargos, Ríos, y Holzenthal, 2017; Holzenthal y Ríos, 2012; Rázuri, Holzenthal, y Ríos, 2017), el conocimiento sobre este orden en el país continúa siendo limitado, de hecho, se estima que solo se han descrito el 50% de las especies existentes para el Ecuador (Ríos-Touma et al., 2017). El impacto del cambio climático en las comunidades de agua dulce (incluido Trichoptera), se está investigando, los estudios indican que es probable que existan extinciones locales de especies (Brown, Hannah, y Milner, 2007). *Anomalocosmoecus illiesi*, organismo objeto de esta investigación, es un insecto del orden Trichoptera con un posible gran potencial biotecnológico ambiental a manera de bioindicador. Por tratarse de un grupo conocido en Ecuador, pero altamente sensible a los cambios ambientales (propensos a la extinción) (Ríos-Touma et al., 2017; Chang et al., 2014), es crucial el desarrollo de investigaciones que ayuden a determinar la diversidad biológica de esta especie en el país. Con el desarrollo de este trabajo, se pretende generar nuevos conocimientos sobre los patrones de diversidad genética de *A. illiesi*, promovidos por las diferencias geográficas sobre dos poblaciones provenientes de los volcanes Cotopaxi e Illinizas.

### **1.3. Objetivos**



### 1.3.1. Objetivo General

- Evaluar la diversidad genética entre dos poblaciones de *Anomalocosmoecus illiesi* provenientes de los volcanes Cotopaxi e Illinizas.

### 1.3.2. Objetivos Específicos

- Obtener las secuencias del gen citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y del gen 28S de *Anomalocosmoecus illiesi* provenientes de los volcanes Cotopaxi e Illinizas.
- Determinar filogenéticamente la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de estudio de *Anomalocosmoecus illiesi*.

## 1.4. Justificación

En los últimos años, las entidades mundiales de manejo de los recursos naturales, han incrementado sus esfuerzos para conservar la diversidad biológica del planeta (Smith et al., 2005). El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) mediante el convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) resalta que, “la conservación de la biodiversidad es interés común de toda la humanidad” (Glowka et al., 1996), pues, su preservación y uso sostenible son primordiales para garantizar la calidad de vida de las generaciones presentes y futuras (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015). Los análisis de diversidad genética y distribución de especies son críticos para comprender las pautas mundiales de diversidad biológica. (Altamirano y Yanez, 2016). Por tanto, las investigaciones enfocadas al estudio de la diversidad genética de la flora y fauna de Ecuador, son cada vez más necesarias, conforme el número de organismos de los distintos ecosistemas del país se ven afectados por la actividad humana.

Por otra parte, las estadísticas actuales posicionan a Ecuador como uno de los países con mayor diversidad a nivel mundial, que pese a ser un país muy

pequeño en superficie, posee mayor cantidad de especies por kilómetro cuadrado (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016), y alberga dos de los ecosistemas con mayor biodiversidad del planeta, el Chocó y la cuenca del Amazonas (Myers et al., 2000). Actualmente, el gobierno nacional lleva a cabo una política de fomento de la investigación, ciencia y tecnología, concediendo un rol importante a la biodiversidad y al patrimonio genético (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015). Es así, que el Ministerio de Medio Ambiente de Ecuador, entidad que en los últimos años ha hecho grandes esfuerzos por incrementar el conocimiento sobre la biodiversidad de especies y sus distribuciones, emprendió un nuevo proceso de planificación para el manejo de la biodiversidad en el período 2015-2030 (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016), con el fin de “tomar medidas efectivas y urgentes para frenar la pérdida de diversidad biológica”. Teniendo en cuenta la importancia y la sensibilidad de la biota de invertebrados acuáticos a los cambios ambientales, se requiere urgentemente un mayor conocimiento de su taxonomía y biología (Ríos-Touma et al., 2017).

El orden Trichoptera es uno de los grupos acuáticos más conocidos de los Andes del Ecuador, con algunos catálogos de especies disponibles y sus distribuciones (Holzenthall y Calor, 2017). Este orden también posee un gran interés ambiental, ya que al ser muy intolerables a cualquier presencia de contaminantes en los cuerpos de agua (Tszedel, Markowski, Majecki, Błońska, y Zieliński, 2015), pueden ser empleados como bioindicadores para comprobar el estado de contaminación de los ríos (Prommi, Laudee, y Chareonviriyaphap, 2014). La investigación propuesta brindará datos importantes acerca de la divergencia genética, en este caso, de *Anomalocosmoecus illiesi*, como parte de estos esfuerzos por acrecentar el conocimiento básico de la diversidad de los organismos nativos de Ecuador e integrar su uso en el desarrollo sostenible de la humanidad. *A. Illiesi*, es un tricóptero que se encuentra restringido altitudinalmente sobre los 3000 msnm, lo que la convierte en una especie ideal para estudios de biodiversidad y biogeografía (Holzenthall y Calor, 2017). Este estudio es el primero en el país en abordar la diversidad genética de

*Anomalocosmoecus illiesi* provenientes de los Volcanes Cotopaxi e Illinizas. De este modo, la incorporación del código de barras de ADN, el trabajo de campo, y la investigación científica son indispensables para lograr grandes progresos en la generación de conocimiento de las tendencias de diversidad de macroinvertebrados acuáticos de Ecuador.

## **2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Trichoptera**

#### **2.1.1. Generalidades**

Los tricópteros, o frigáneas, en inglés llamados *caddisfly*, son un orden de insectos acuáticos holometábolos que adquieren estados de huevo, larva y pupa (Holzenthall y Calor, 2017). El nombre del orden fue establecido por primera vez por Kirby (1813) (Holzenthall et al., 2007). Estos insectos son ampliamente diversos en el neotrópico y ocupan una gran variedad de hábitats de agua dulce, principalmente ríos y arroyos, donde su diversidad es muy elevada (Ríos-Touma et al., 2017; Holzenthall y Calor, 2017). El crecimiento, reproducción y supervivencia de las especies del orden Trichoptera en los ecosistemas acuáticos, están fuertemente influenciados por la temperatura del agua, los tipos de sustrato, la velocidad de las corrientes, la luz y el oxígeno disuelto (Binti y Hamid, 2011).

Este orden comprende aproximadamente 15.000 especies descritas alrededor de mundo, pero se estima que pueden existir hasta 50,000 especies (Holzenthall y Calor, 2017). El orden se encuentra distribuido en unas 47 familias y 610 géneros, siendo el segundo grupo más diverso de animales acuáticos después del orden Díptera (Morse, 2011). El orden Trichoptera en la región neotropical incluye 3.262 nombres de especies válidos actualmente, reconocidos en 25 familias y 155 géneros existentes (Holzenthall y Calor, 2017). Las zonas consideradas en el estudio del que derivan estos datos incluyen todo

México, América Central, el Caribe y América del Sur. La región neotropical, corresponde a la tercera en albergar la mayor cantidad de estos insectos, después de la región Oriental y Paleártica (De Moor y Ivanov, 2008). Alrededor del 70% de los especímenes que se encuentran en el Neotrópico son endémicos de la región, con 115 géneros endémicos descritos, siendo la segunda región en términos de diversidad endémica (Ríos- Touma et al., 2017).

La diversificación de los linajes existentes de Trichoptera se remonta aproximadamente al Jurásico medio. Por tanto, este orden constituye una rama sustancial en el árbol de la vida, cuya distribución actual y biogeografía muestran aquellos acontecimientos pasados que han afectado la distribución y diversificación de toda la biota de agua dulce de la tierra (Holzenthall et al., 2007).

### **2.1.2. Morfología**

La forma general del cuerpo de las larvas de Trichoptera es alargada y cilíndrica (Holzenthall, Thomson y Ríos-Touma, 2015). Las larvas poseen una cabeza, tórax y abdomen diferenciados (Holzenthall et al., 2007). La cápsula de la cabeza siempre está bien desarrollada y esclerotizada, aunque la cápsula ventral puede estar algo menos esclerotizada y menos pigmentada que la cabeza dorsal. Los ojos larvales, compuestos de varios tallos individuales, aparecen lateralmente en la cápsula de la cabeza (Holzenthall, Thomson y Ríos-Touma, 2015). Las piezas bucales larvarias están bien formadas, constan de una serie de dientes apicales redondeados o más puntiagudos, un par de maxilas cortas y compactas, y un labio, la abertura de la glándula de seda se encuentra en el vértice del labio (Holzenthall et al., 2007). Todas las larvas de caddisfly tienen un par de antenas (cortas y de un solo segmento), estas se encuentran entre el ojo y la base de la unión mandibular en las esquinas anterolaterales de la cápsula de la cabeza (Holzenthall, Thomson y Ríos-Touma, 2015). Cada segmento torácico es distinto y tiene un par de piernas

segmentadas, generalmente las patas delanteras son las más cortas y las patas traseras las más largas. Las patas no están modificadas en la mayoría de las especies, pero en algunos grupos las patas traseras son largas y delgadas y tienen hileras de largos pelos que nadan. En todas las familias, el protórax lleva un par de placas pronotales fuertemente esclerotizadas, separadas muy estrechamente a lo largo de la línea media por una sutura (Holzenthal et al., 2007). El abdomen consta de 10 segmentos y es casi totalmente membranoso, carece de protuberancias, excepto por unas pocas setas dispersas y un par de prolongaciones anales terminales, cada una con una garra anal fuerte (Holzenthal, Thomson y Ríos-Touma, 2015; Waringer et al., 2016).

Las pupas de *Trichoptera* poseen mandíbulas bien desarrolladas en la mayoría de las familias, generalmente se cruzan apicalmente y apuntan hacia adelante. Las antenas se encuentran ventrolateralmente a lo largo del tórax y el abdomen (Holzenthal et al., 2007) . En especies con antenas largas, estas se enrollan alrededor del extremo del abdomen (Springer, 2010). El tórax no está modificado, pero las piernas torácicas a menudo tienen pelos nadadores. El abdomen tiene restos de las branquias larvales y termina en un par de conductos anales, que, junto con el número, la disposición y la morfología de las placas de gancho y la morfología de la mandíbula, ayudan a diagnosticar las diferentes familias. (Holzenthal et al., 2007).

La mayoría de tricópteros adultos son de "tamaño mediano", aproximadamente 10 mm de longitud corporal, pero ciertos géneros pueden llegar a medir hasta 4.5 cm (Holzenthal, Thomson y Ríos-Touma, 2015). Los *Trichoptera* tienen piezas bucales muy modificadas, gran parte de las especies tienen mandíbulas y maxilares reducidos (Holzenthal y Calor, 2017), a diferencia de las bien desarrolladas estructuras bucales de las pupas, por lo que ingieren líquidos como el néctar para su alimentación (Springer, 2010; Holzenthal et al., 2007). Los ojos compuestos se encuentran bien desarrollados y la cabeza puede o no tener ocelos. Las antenas son largas y filiformes en la mayoría de las especies. Poseen dos pares de alas, mismas que se disponen en forma de techo cuando

los tricópteros descansan (Binti y Hamid, 2011). Ambos pares de alas y el cuerpo, están recubiertos de pelos y ocasionalmente de escamas, particularidad que le da el nombre a este orden (*trichos*: pelo; *ptera*: alas) (Springer, 2010). Generalmente presentan colores opacos como el gris, marrón, amarillo, beige u otras combinaciones de colores, esto es posiblemente una adaptación que les permite esconderse durante el día en la vegetación. También pueden tener colores brillantes con pelos de colores como el rojo, verde, azul, naranja o amarillo. De cualquier modo, los diferentes patrones de pelos de distintos colores, en especial en las alas, a menudo permiten la identificación de la especie (Holzenthall et al., 2007).

### **2.1.3. Desarrollo y Hábitat**

Los tricópteros al ser insectos holometábolos adquieren estado de huevo, larva, pupa y adulto (solo esta etapa es terrestre) (Springer, 2010). El ciclo de vida de Trichoptera puede variar desde unos pocos meses hasta un par de años, y la etapa adulta es muy breve (Binti y Hamid, 2011). El ciclo comienza cuando los huevos se depositan a manera de masas pegajosas unidas a ramas o rocas en el agua (Binti y Hamid, 2011). Posteriormente tiene lugar el estado larvario, que puede tardar meses a años, según la especie y los factores ambientales (Springer, 2010). Una característica de las larvas de Trichoptera es su habilidad para elaborar llamativos y variados refugios, redes y casas, a partir de diversos materiales que incluyen, trozos de hojas, materia orgánica, ramas, entre otros. Las larvas de Trichoptera producen seda, que también emplean en la construcción de sus retiros y casas. Son los numerosos usos que los individuos de *Trichoptera* le dan a la seda, en la construcción de retiros y casas, las que son adaptaciones clave que explican la diversidad ecológica y el éxito del orden en general (Holzenthall et al., 2007). Las larvas de *Trichoptera* tienen distintos tipos de alimentación dependiendo del género. Algunos géneros son raspadores de perifiton (Hydroptilidae, Glossosomatidae y Xiphocentronidae); otros ingieren materia orgánica en descomposición (Calamoceratidae, Lepidostomatidae y Leptoceridae); también se encuentran las que construyen

redes en la corriente para filtrar materia orgánica fina (*Hydropsychidae*); finalmente, se encuentran algunas especies que se alimentan de organismos acuáticos (*Hydrobiosidae* y *Polycentropodidae*) (Springer, 2010).

El estadio de pupa dura alrededor de dos semanas y se desarrolla en el agua, dentro de un refugio fijado fuertemente al sustrato (Springer, 2010). En su estado de pupa, poseen mandíbulas funcionales, al menos en las familias neotropicales (Holzenthall y Calor, 2017). Las pupas emplean las mandíbulas para masticar y salir de los refugios (construidos por las larvas) cuando están listas para emerger como adultos. Una vez que emergen, sus mandíbulas se degeneran y dejan de funcionar (Binti y Hamid, 2011).

En contraste con las larvas, la ecología y el comportamiento de los Trichoptera adultos son poco conocidos. Son terrestres y se asemejan a diminutas polillas, con diferencias en la venación de sus alas y en las estructuras de las piezas bucales. Se suelen encontrar en grandes cantidades en las orillas de lagos o arroyos (Binti y Hamid, 2011; Springer, 2010). Son pequeños, usualmente poseen un color monótono, y comienzan a volar, en gran número, después de que se pone el sol, atraídos por las luces artificiales. Es esta etapa de la historia de vida la que tiene una importancia taxonómica primordial debido a que la taxonomía a nivel de especie del orden se basa principalmente en las estructuras de los genitales masculinos adultos (Holzenthall y Calor, 2017). Los adultos al carecer de mandíbulas se alimentan únicamente de líquidos, como el néctar (Springer, 2010).

En cuanto al hábitat, las especies del orden Trichoptera exhiben una amplia diversidad de adaptaciones tróficas y de microhábitats acuáticos (Holzenthall y Calor, 2017). Estos insectos frecuentan pequeñas cascadas y pequeños arroyos en áreas montañosas con bosques abundantes (Holzenthall y Flint 1995). En el Neotrópico, las larvas se pueden encontrar desde lo alto del páramo andino, hasta los ríos de flujo lento ubicados a menor altitud. Sin embargo, es en los arroyos de montaña de tamaño intermedio y boscoso

donde la fauna parece alcanzar su mayor diversidad (Holzenthal y Calor, 2017). También se encuentran las que frecuentan las aguas estancadas, pero esta fauna no es tan diversa como la de los lagos y lagunas. Otras especies habitan las zonas de rociado, salpicaduras de cascadas, y situaciones torrenciales similares. Se pueden encontrar muy pocas especies en aguas de origen térmico o que se han visto afectadas por la actividad volcánica (Holzenthal y Calor, 2017). Las larvas de *Trichoptera* intervienen en la dinámica de nutrientes y en el flujo de energía de los lagos, ríos y arroyos donde habitan (Holzenthal y Calor, 2017). Estos hábitats acuáticos de agua dulce y sus poblaciones están entre los más afectados y ambientalmente amenazados del mundo, principalmente debido a la contaminación de la industria, la minería y la agricultura; contaminación de aguas residuales; efectos como la sedimentación; lluvia ácida; y desvío de agua para usos agrícolas y metropolitanos (Holzenthal et al., 2007).

#### **2.1.4. Importancia ambiental**

Las larvas son participantes vitales en las redes alimentarias acuáticas y su presencia y abundancia relativa se utilizan en la evaluación biológica y el monitoreo de la calidad del agua (Holzenthal et al, 2007). Los tricópteros cumplen varios roles ecológicos fundamentales, por ejemplo, en el procesamiento de nutrientes y en el flujo de energía en los lagos y ríos; además, los miembros de este orden son importantes en la cadena trófica de los sitios donde habitan, ya que sirven como alimento para una variedad de depredadores acuáticos, como la trucha y otros peces (Holzenthal, Thomson y Ríos-Touma, 2015; Binti y Hamid, 2011).

Por otro lado, debido al gran incremento de contaminación de ríos y otros ambientes acuáticos con metales pesados, desechos industriales y pesticidas, se necesitan con prisa más investigaciones para la generación de nuevos sistemas de evaluación ambiental, por ejemplo, bioindicadores que permitan resguardar estos ecosistemas (Prommi et al., 2014). El uso de bioindicadores



permite evaluar la calidad del agua, mediante la aplicación de especies que responden de distinta forma a la presencia de elementos contaminantes específicos (Tszydel et al., 2015). La utilidad de los macroinvertebrados como organismos bioindicadores de los ecosistemas acuáticos ha sido reconocida durante mucho tiempo (Hamid, Salmah, y Rawi, 2017). Estos organismos se utilizan a menudo para complementar los análisis químicos, físicos y fisicoquímicos tradicionales en la valoración de la calidad de las aguas de los ecosistemas acuáticos (Hodkinson y Jackson, 2005).

La mayoría de los estudios sobre macroinvertebrados relacionados con el monitoreo de la calidad del agua han incluido análisis sobre la comunidad de Ephemeroptera, Plecoptera y Trichoptera (EPT) (Hamid et al., 2017). El análisis empleando EPT es relativamente fácil, la metodología está bien desarrollada y el equipo que se utiliza es simple (Bonada et al., 2006). Los miembros de Trichoptera, son ampliamente usados como indicadores biológicos de buena a excelente calidad del agua dulce, siendo la mayoría de estos organismos intolerantes a la perturbación humana y a muchas de las formas de contaminación en las aguas y corrientes dulces de todo el mundo (Ríos-Touma et al., 2017; Holzenthal y Calor, 2017). La evaluación de la calidad del agua utilizando comunidades de Trichoptera, es lo suficientemente decente y satisfactoriamente precisa, siendo una alternativa poco invasiva que no alterará de ninguna manera el ecosistema acuático analizado (Prommi et al., 2014).

#### **2.1.5. *Trichoptera* en el Ecuador**

La región neotropical, posee una rica diversidad de tricópteros (de Moor y Ivanov, 2008). Sin embargo, según los estimadores de especies, solo se tiene conocimiento de alrededor del 30% de las especies de Trichoptera de la región norte andina de América del Sur (Holzenthal y Calor, 2017). Los escasos estudios en la región neotropical, han limitado el conocimiento de la diversidad real de Trichoptera (Holzenthal et al, 2007).

Ecuador es considerado uno de los países con mayor biodiversidad del mundo (Ministerio del ambiente, 2016). Los Andes tropicales y Tumbes-Choco-Magdalena, por ejemplo, corresponden a dos de los puntos calientes de diversidad biológica (Myers et al, 2000). Según un estudio sobre la diversidad y distribución de Trichoptera en el Ecuador, se describen 310 especies en el país, distribuidas en 15 familias y 52 géneros (Ríos-Touma et al., 2017). Sin embargo, la riqueza estimada de Trichoptera en el país es de 578 especies, sugiriendo que solo se conoce el 54% de la fauna ecuatoriana de este orden. Pichincha, Napo y Pastaza son las provincias con mayor número de especies registradas. Por el contrario, gran parte de las provincias costeras están poco estudiadas, por ende, el número de especies en esta región es la menor de todo el país, algunas con menos de diez registros (Ríos-Touma et al., 2017). Siendo fundamental realizar nuevas recolecciones y encuestas, ya que es muy probable que en la zona costera se encuentren especies desconocidas (Ríos-Touma et al., 2017).

Dentro del orden Trichoptera se encuentran registradas 15 familias en el Ecuador, una de ellas es la familia Limnephilidae. Se trata de una familia numerosa y taxonómicamente diversa. Sin embargo, en el país solo se tiene registro de una especie, *Anomalocosmoecus illiesi*, localizada por primera vez en la provincia de Pichincha (Marlier, 1962) y presente también en la provincia del Napo, según los datos registrados en la base de datos BOLD Systems.

#### **2.1.6. *Anomalocosmoecus illiesi***

El género *Anomalocosmoecus*, endémico de Sur América, se conforma de cuatro especies y se estableció en un principio para *Anomalocosmoecus blancasi* (Schmid), del Lago Titicaca; una segunda especie, *Anomalocosmoecus illiesi* (Marlier), presente en las elevaciones de los Andes de Perú, Ecuador y el sur de Colombia; la tercera y cuarta especies, *Anomalocosmoecus argentinica* (Flint); y *Anomalocosmoecus subtropicalis* (Schmid), se conocen de Argentina y Perú, respectivamente (Holzenthall y Calor, 2017).

Las larvas de *Anomalocosmoecus illiesi* fueron descritas por primera vez por (Marlier, 1963) (Holzenthall y Calor, 2017). Basado en las larvas de este macroinvertebrado, las siguientes características son distintivas. La cabeza tiene una cresta lateral afilada, con setas dorsales primarias. Las mandíbulas tienen un ápice sin dientes, en forma de pala. Las tibiae de todas las piernas tienen pelos agrandados en los márgenes internos. El abdomen contiene epitelios de cloruro en el conducto de ventilación de los segmentos 2 o 3 a 7, y los prolongados anales no soportan ninguna hebra ventral (Flint, 1982). En la Figura 1, se puede ver una larva de *Anomalocosmoecus illiesi* a lado de su casa o refugio.



Figura 1. Larva de *Anomalocosmoecus illiesi*.

En el lado derecho, se encuentra la casa construida por *A. illiesi*.

## **2.2. Identificación de especies**

### **2.2.1. Análisis morfológicos**

Los métodos clásicos para identificar y clasificar especies se basan generalmente en caracteres morfológicos visibles. Sin embargo, existen limitaciones para confiar únicamente en los perfiles morfológicos cuando los individuos de una especie específica no varían significativamente en su morfología (Yi et al., 2017). La identificación morfológica de los individuos de Trichoptera, especialmente en sus etapas de vida inmaduras, es una tarea desafiante pero fundamental (Holzenthal et al., 2007).

Para que la identificación sea eficiente, el método que se use para la recolección de las muestras debe garantizar la integridad de las mismas, ya que esto facilitará el proceso de clasificación, convirtiéndolo en un paso clave en el proceso (Blahnik y Holzenthal, 2004). Blahnik y Holzenthal (2004), en su trabajo sobre recolección y curación de Trichoptera, detallan las técnicas más empleadas para la recolección de tricópteros. La mayoría de personas que trabaja con este orden recolectan y curan a los individuos adultos en alcohol, debido a la facilidad de manipulación de las partes para la observación, incluso se pueden observar verrugas cutáneas de la cabeza y el tórax. Otra técnica para la conservación de individuos de Trichoptera es mediante el anclaje de la muestra con alfileres entomológicos (Blahnik y Holzenthal, 2004).

Para la clasificación a nivel de familias y géneros, ciertas características son importantes: el color y el patrón de los pelos, la posición de la antena en relación con el ojo, la esclerotización torácica, la morfología branquial, la estructura mandibular, la morfología de la pierna y la estructura de las casas o refugios (Holzenthal et al., 2007; Blahnik y Holzenthal, 2004). Las setas en varias partes del cuerpo también pueden variar considerablemente en tamaño, longitud y textura. La pérdida de estas setas equivale a la pérdida de información taxonómica o filogenética (Blahnik y Holzenthal, 2004). La

taxonomía morfológica de Trichoptera para la descripción e identificación a nivel de especie, se basa principalmente en los caracteres de los genitales de los machos adultos en asociación con su larva (Naseh Maleki-Ravasan et al., 2017), y en los patrones de color en la cabeza y el tórax (Holzenthall et al., 2007). Los enfoques convencionales para la asociación de larvas usualmente implican la cría de larvas o la identificación morfológica de metamorfotipos, las dos perspectivas funcionan bien cuando se dispone de recursos y experiencia adecuados (Naseh Maleki-Ravasan et al., 2017). Para el sexaje de las muestras se debe mirar el vértice del abdomen bajo mediante un microscopio (Blahnik y Holzenthall, 2004). En la mayoría de las familias, los machos son más pequeños que las hembras, además, los genitales masculinos son más complejos que los genitales femeninos (Holzenthall, Thomson y Ríos-Touma, 2015). La identificación final, requiere que los genitales masculinos sean removidos y limpiados para su observación (Blahnik y Holzenthall, 2004).

### **2.2.2. Análisis moleculares**

El desarrollo de diversas técnicas moleculares, han permitido sobrepasar las barreras que representa la identificación de algunos organismos en base a su morfología, facilitando el reconocimiento de especies, subespecies y otros niveles taxonómicos (De Haro et al., 2005). Las herramientas moleculares existentes, ofrecen diferentes tipos de información en base a las características de la molécula o fragmento de molécula a estudiar (Jiménez y Collada, 2000). Las principales ventajas de las herramientas moleculares son, su sensibilidad y especificidad, independientemente de la etapa, tejido u órgano, vivo o muerto de la muestra (Naseh Maleki-Ravasan et al., 2017).

Los marcadores moleculares, son una de las herramientas moleculares más usadas en la identificación de especies, su uso es relativamente barato y brindan resultados rápidamente. (Arnold, Holman, y Zweifel, 2017). Mediante el uso de marcadores moleculares, se puede determinar relaciones filogenéticas y estudiar qué mecanismos de evolución (deriva génica,

migración, cuellos de botella, etc.) están sucediendo (Cruickshank, 2002). Existen dos grandes grupos de marcadores moleculares: los que se basan en proteínas, por ejemplo, el polimorfismo posicional de péptidos y el análisis isoenzimático, y aquellos basados en el análisis del ADN (Jiménez y Collada, 2000). Los marcadores basados en ADN, emplean regiones específicas de la molécula de ADN, estas regiones se seleccionan según el tipo de estudio y el objetivo de cada investigador, una ventaja que ofrecen este tipo de marcadores es que permiten estudiar la información que se expresa como la que no se expresa. Hay tres tipos de genes que son los más usados dentro de los marcadores de ADN, los genes mitocondriales (de origen monoparental), los genes ribosómicos nucleares (generalmente de origen biparental) y el ADN de cloroplasto (monoparental), estos son, los genes más utilizados para análisis de filogenia (Cruickshank, 2002; Jiménez y Collada, 2000).

Los genes mitocondriales se producen en grandes números en cada célula, lo que los hace, a diferencia de los genes nucleares (una sola copia), mucho más fáciles de trabajar y han sido especialmente útiles en estudios a nivel intraespecífico. Todas las copias de estos genes tienen la misma secuencia debido al cuello de botella poblacional por el que pasan las mitocondrias cuando se transmiten a la descendencia (Cruickshank, 2002). Los genes mitocondriales, han sido muy usados para identificar y clasificar especímenes a diferentes escalas taxonómicas, especialmente debido a características como, su herencia monoparental, su condición haploide, las altas tasas de mutación y la presencia de regiones conservadas y variables (Giraldo, Uribe, y López, 2011). Los genes mitocondriales se clasifican en dos grupos: genes ribosómicos (rDNA) y genes codificadores de proteínas. Dentro del grupo de los genes ribosómicos destacan el gen 16S y el gen 18S, estos genes no se encuentran separados por espaciadores transcritos internos (Cruickshank, 2002). El gen 16S está presente en la subunidad pequeña de los ribosomas procarióticos, así como en los ribosomas mitocondriales en eucariotas, mientras el gen 18S es la subunidad pequeña homóloga del gen 16S en eucariotas (Klindworth et al., 2013). Los genes codificadores de proteínas, por

ejemplo, el gen codificador del citocromo oxidasa subunidad I (COI). Al gen COI se le atribuyen ventajas como marcador para inferir variaciones genéticas y relaciones filogenéticas para un vasto grupo de organismos, este gen se ha utilizado extensamente para el análisis filogenético solo o en combinación con genes nucleares, y ha demostrado ser filogenéticamente altamente informativo en muchos grupos de insectos, incluidos los tricópteros (Maleki-Ravasan et al., 2017). Uno de los problemas potenciales con los genes mitocondriales es que los genes pueden transferirse de la mitocondria al núcleo. Estas copias nucleares de los genes mitocondriales o pseudogenes mitocondriales, pueden amplificarse y secuenciarse por error y esto puede conducir a filogenias erróneas (Cruickshank, 2002).

El incremento de secuencias de ADN y de marcadores moleculares para un sinnúmero de organismos en las bases de datos, ha alentado una nueva era en el descubrimiento y estudio de especies, por ejemplo, mediante los códigos de barras de ADN (*DNA barcoding*) (Bickford et al., 2007). Los códigos de barras de ADN son sistemas de bancos genéticos disponibles en bibliotecas digitales en línea para la caracterización rápida y precisa de especies en función de sus secuencias de ADN (Altamirano y Yanez, 2016). Esta herramienta usa la información de una o varias regiones génicas (marcadores moleculares), cortas y estándar (400-800 pb), a modo de etiqueta para la identificación y reconocimiento rápido de todas las variedades biológicas a una relación costo-eficiente relativamente baja (Altamirano y Yanez, 2016). La primera reunión internacional acerca del código de barras de ADN se dio en el "*Natural History Museum*" en Londres en el 2005. En esta conferencia intervinieron alrededor de 200 científicos para plantear un procedimiento en base a secuencias de ADN para la identificación de organismos vivos (Lanteri, 2007). La técnica de código de barras de ADN se planteó originalmente para la detección de animales en base a una secuencia del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) de alrededor de 648 pares de bases.

Los códigos de barras de ADN se pueden obtener de manera mecanizada (Hebert et al., 2004). Por lo tanto, no se requiere conocimiento de fondo para emplear esta herramienta molecular, tanto para identificaciones de rutina como para la detección de especies ocultas (Hebert, Ratnasingham, y de Waard, 2003). Es así, que los códigos de barras han sido muy usados, por ejemplo, para la identificación de especies (Maleki-Ravasan et al., 2017; Nielsen y Kristensen, 2011; Ninahuanca et al., 2013), ya que las divergencias de secuencia son generalmente mucho más bajas entre los individuos de una especie que entre las especies estrechamente relacionadas (Avisé et al., 1999). También es útil para revelar variabilidad genética dentro de una misma especie putativa, sugiriendo la existencia de especies crípticas, que son taxones morfológicamente indistinguibles que solo pueden ser separadas usando datos no morfológicos como los análisis de secuencia de ADN (Gelemanovic et al., 2016; Gill et al., 2016; Gill et al., 2014; Hebert et al., 2004; Pfenninger y Schwenk, 2007; Previšić et al., 2014, 2016; Sales et al., 2017). Finalmente, se ha visto que, la secuencia espaciadora ITS2 en conjunto con el gen COI, proporcionan una herramienta poderosa para estudios de variación intraespecífica y filogenias de especies estrechamente relacionadas (Cruickshank, 2002).

#### **2.2.2.1. Citocromo oxidasa subunidad 1 (COI)**

El gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) se encuentra entre los genes codificadores de proteínas más conservados en el genoma mitocondrial de los animales (Xia et al., 2012). La región COI ha sido muy eficiente en la identificación y en estudios de diversidad genética de insectos (Vuataz et al., 2013), mariposas (Morinière et al., 2017), metazoarios (Black et al., 1994), peces (Yi et al., 2017), moscas (Dallas et al., 2003), aves, anfibios y otros grupos de animales (Gill et al., 2014). El fragmento COI muestra una elevada tasa de sustitución entre especies del mismo género (Blaxter, 2004). Por lo tanto, las divergencias de secuencia en COI regularmente permiten la discriminación de especies estrechamente aliadas en todos los filos animales.



Según, Hebert et al (2003), la diversidad en las secuencias de aminoácidos codificadas por la sección 5' de este gen mitocondrial son suficientes para colocar de manera confiable a las especies en categorías taxonómicas más altas (desde los filos hasta las órdenes) (Hebert et al., 2003). Las principales objeciones sobre lo anteriormente mencionado, se han centrado en la preocupación de que las diferencias de secuencia de ADN entre especies estrechamente aliadas a menudo serán demasiado pequeñas para permitir su discriminación (Mallet y Willmott, 2003). El contenido de adenina y timina en el gen COI suele ser muy elevado y el número de mutaciones del tercer codón generalmente es mayor al del primer o segundo codón (Cruickshank, 2002), esto implica que el gen COI acumule más sustituciones en su secuencia en comparación con otros genes, facilitando la clasificación e identificación de especies a nivel molecular para algunos órdenes de insectos, entre ellos Trichoptera (Kjer et al., 2014). Un enfoque alternativo para un análisis de filogenia a un nivel más profundo usando el gen COI, consiste en eliminar las posiciones del tercer codón hipervariable del análisis, tal como lo hicieron, Söller et al. (2001), que utilizaron solo la primera y la segunda posición del codón de un fragmento de 408 pb de COI para investigar la filogenia de la *Parasitengona* (Arthropoda: ácaro); sin embargo, encontraron que incluso después de la eliminación de la tercera posición del codón seguía habiendo una variación considerable (Söller et al., 2001).

#### **2.2.2.2. 28S ribosomal**

Los ribosomas son ribonucleoproteínas grandes compuestas por unos pocos ARN ribosómicos no codificantes (ARNr) y muchas proteínas ribosómicas. Los ARNr actúan como ribozimas al catalizar los pasos importantes de la polimerización de aminoácidos durante la síntesis de proteínas (Locati et al., 2017). Los ribosomas están conformados por dos subunidades, la subunidad mayor (LSU), que comprende los rRNA 5S (120 pb), 5.8S (160 pb) y 28S (4200), y la subunidad menor (SSU), relacionada al gen 18S (1900 pb) (Gillespie et al., 2006). Las funciones principales de la SSU son organizar la

unión del ribosoma al ARN mensajero (ARNm), y monitorear la complementariedad del ARN de transferencia (ARNt) y el ARNm en la traducción. Las funciones principales de la LSU son vincular los aminoácidos y terminar la traducción. Las funciones de LSU se organizan en regiones conservadas evolutivamente del ARNr 28S (Locati et al., 2017). El gen 28S es parte de la región espaciadora transcrita interna del grupo de genes ribosómicos nucleares (ITS2), las secuencias ITS están bajo muy poca presión de selección. El gen 28S, se transcribe en RNA, pero no se traduce en proteínas (Cruickshank, 2002). El ARN ribosomal 28S es uno de los componentes básicos de todas las células eucarióticas, y siendo el gen homólogo nuclear del gen 16S mitocondrial (Locati et al., 2017). Todos los estudios moleculares realizados hasta ahora han utilizado la región de expansión D2 del ARN ribosomal 28S; ha habido poca información sobre la idoneidad de otras regiones genéticas para inferir relaciones filogenéticas o para definir límites de especies (Schmidt et al., 2006)

### **2.3. Diversidad genética**

La diversidad genética se refiere al número total de características genéticas dentro de una determinada especie; a mayor diversidad genética, las posibilidades que tienen los individuos de sobrevivir a los cambios del medio ambiente incrementan (Jiménez, 2014). La escala y la magnitud de la divergencia genética entre las poblaciones varía dentro y entre los taxones, ya que las características del ecosistema y los gradientes ambientales impiden el flujo de genes en algunas especies, pero no en otras (Addison, 2015). Es así, que muchas poblaciones de la misma especie, por encontrarse en una ubicación geográfica diferente o bajo condiciones ambientales distintas, pueden generar diversidad intraespecífica o dentro de una especie (Brown et al., 2004). Esta interviene en la respuesta de las poblaciones y las especies a los cambios ambientales y a los ecosistemas que los rodean (Albert et al., 2010). La variación intraespecífica puede ocurrir en tres niveles: variación genética entre individuos de una población determinada (diversidad intrapoblacional), entre

poblaciones diferentes de la misma especie (diversidad interpoblacional) y variación dentro del mismo individuo, como diferencias entre las hojas de la misma planta (Bowen, Nelson, y Avise, 1993). La presencia de variabilidad dentro de las especies se da por mutaciones del material genético, y es el requerimiento básico para que los organismos evolucionen y se adapten a diversas circunstancias, puesto que la selección no puede intervenir si no existen diversas alternativas (Jiménez y Collada, 2000). La variación interespecífica en cambio, se refiere a las diferencias que se producen entre los miembros de diferentes especies estrechamente relacionadas. Esta variación puede resultar en la fusión de grupos de genes, el flujo de genes entre especies (introgresión), la formación de nuevos complejos de genes (especiación) o el refuerzo de barreras reproductivas (Becklin y Galen, 2009; Giessler et al., 1999).

Los patrones de diversidad genética son clave para interpretar los mecanismos que impulsan los procesos evolutivos y ecológicos en insectos de agua dulce (Addison, 2015). Dos parámetros clave en modelos genéticos poblacionales simples que gobiernan la cantidad y distribución de la variación de la secuencia intraespecífica son el parámetro de mutación poblacional ( $4N_e$ ) y el parámetro de recombinación poblacional ( $4N_e r$ ) (Brown et al., 2004). Las estimaciones de mutación poblacional se pueden calcular fácilmente a partir de marcadores moleculares, tales como secuencias de ADN, incluso en conjuntos de datos relativamente pequeños. El ADN ribosomal (ADNr) y la subunidad I del citocromo oxidasa (COI) son las regiones más empleadas del genoma nuclear y mitocondrial, respectivamente, para inferir variaciones genéticas y relaciones filogenéticas para un amplio grupo de organismos. Entre los genes mitocondriales, el gen COI se ha utilizado ampliamente para el análisis filogenético solo o en combinación con genes nucleares, y ha demostrado ser filogenéticamente altamente informativo en muchos grupos de insectos, incluidos los tricópteros (Naseh Maleki-Ravasan et al., 2017). La estimación de Watterson de  $4N_e$  se basa en el número de sitios polimórficos en una muestra de secuencias extraídas al azar de una población y es independiente de las

frecuencias. Una segunda estimación de dicho parámetro es la diversidad de nucleótidos, que es el número promedio de diferencias de nucleótidos por pares entre secuencias en una muestra, depende tanto del número de sitios polimórficos como de su frecuencia (Brown et al., 2004).

#### **2.4. Filogeografía**

En la actualidad, los métodos filogenéticos desempeñan un papel fundamental en diferentes campos como, la epidemiología de enfermedades humanas, la genómica funcional y la biología de la conservación (Shaw et al., 2009). La filogenia es necesaria para establecer un rigor estadístico en estudios comparativos, porque revela la dependencia de los eventos evolutivos que están vinculados históricamente (Knowles, 2009). La presunta neutralidad de algunos marcadores moleculares, junto con los métodos filogenéticos, pueden ayudar a revelar la estructura de la población y la falta de cruzamiento entre dos grupos (Bickford et al., 2007). Los análisis filogenéticos de datos moleculares en relación con la información geográfica y ecológica se conocen como filogeografía (Shaw et al., 2009). La filogeografía surgió de las nuevas técnicas de la década de 1980 que permitieron determinar la variación de la secuencia de ADN de individuos a lo largo de un rango de especies, para reconstruir las genealogías genéticas (Emerson y Hewitt, 2005). El término filogeografía fue empleado por primera vez por John Avise (1987), en su trabajo *"Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics"*, en este estudio se aborda, de qué manera las condiciones geológicas, climáticas y ecológicas históricas intervinieron en la distribución actual de algunas especies (Avise et al., 1987). En particular, la accesibilidad de las secuencias de ADNmt en las especies animales encendió y alimentó este nuevo campo; hoy en día, una variedad de técnicas de ADN, combinadas con nuevos métodos analíticos y estudios paleoclimáticos y geológicos recientes, brindan información importante sobre la distribución de la diversidad genética en todo el mundo y su evolución (Shaw et al., 2009). La investigación filogeográfica ha tendido a concentrarse en Europa y América del Norte, y se sabe menos

sobre los continentes de África, Asia, Australia y América del Sur (Emerson y Hewitt, 2005).

La filogeografía es un campo joven y de rápido crecimiento (Emerson y Hewitt, 2005), que proporciona información detallada específica de las especies, sobre cómo los eventos geológicos, las influencias ambientales y los factores geográficos interactúan con los aspectos de la ecología de una especie y la historia natural en la configuración de su evolución (Knowles, 2009). Los desarrollos recientes han tratado de usar datos genéticos para estimar la historia demográfica de una población, ejemplos de tales inferencias demográficas incluyen: la ocurrencia de cuellos de botella históricos o expansiones de la población, el tamaño de las poblaciones ancestrales, la ubicación de las áreas de refugio, las fechas aproximadas de divergencia, la extensión de la migración y el flujo de genes, la extensión de la fragmentación y la secuencia de tales eventos para producir la distribución geográfica actual de genotipos (Shaw et al., 2009). Cuando se integra a la filogeografía con otros tipos de información (por ejemplo, datos fenotípicos), la información demográfica detallada extraída de los datos genéticos proporciona una información crítica, para una serie de preguntas evolutivas y ecológicas que no podrían abordarse sin una comprensión de la historia filogeográfica (Knowles, 2009). El estudio de Emerson y Hewitt (2005), es un ejemplo muy práctico para ilustrar los métodos y resultados de los estudios de filogeografía. En los períodos glaciares completos, las capas de hielo del norte cubrieron gran parte de Europa y América del Norte, las especies templadas de erizos y campañoles sobrevivieron al sur en refugios (según lo observado en los registros fósiles), pero durante los relativamente cortos períodos interglaciares cálidos sus poblaciones se volvieron a expandir hacia el norte y las poblaciones del sur se redujeron o eliminaron (Emerson y Hewitt, 2005). Algo similar ocurrió en el estudio de Pauls, Lumbsch, y Haase (2006) con el tricóptero *Drusus discolor* y en el trabajo de Previšić et al. (2009) en *Dinaric Drusus*, donde se evidenciaron procesos de contracción, extinción, expansión y dispersión en sus poblaciones, con efectos sobre la diversidad genética y la estructura de estas especies.

La facilidad cada vez mayor de obtener datos de secuencia de ADN para individuos en una variedad de especies ha fomentado el desarrollo de métodos analíticos y estadísticos para evaluar la historia demográfica y las relaciones evolutivas, facilitadas en gran medida por los cada vez más potentes y sofisticados softwares (Emerson y Hewitt, 2005). A medida que la filogeografía madura como un campo, también lo hace la gama de marcadores genéticos y las técnicas analíticas disponibles, la elección de uno o más marcadores genéticos apropiados, se da en función de la profundidad de la historia evolutiva de un grupo específico, al igual que la elección del método analítico, y hay una serie de enfoques que se pueden tomar (Knowles, 2009). El enfoque filogeográfico habitual consiste en construir un árbol filogenético utilizando la distancia, parsimonia, máxima verosimilitud y, más recientemente, métodos de inferencia bayesiana, y luego representar geográficamente los linajes (Emerson y Hewitt, 2005). Cuando las secuencias de una región de ADN particular, se combinan con los datos de la frecuencia de población y distribución geográfica, proporcionan una base sólida para inferencias sobre la historia evolutiva de los taxones (Emerson y Hewitt, 2005).

### 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL



Figura 2. Diagrama de diseño del plan experimental para el estudio de la diversidad genética entre las poblaciones de *Anomalocosmoecus illiesi* del volcán Cotopaxi y del volcán Illinizas.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

### 4.1. Población

Para estudiar la diversidad genética entre los individuos de *Anomalocosmoecus illiesi*, se evaluaron un total de 101 muestras de áreas geográficas distintas, que fueron proporcionadas por el grupo BIOMAS, como parte del proyecto "Diversidad y Distribución de Trichoptera de Ecuador" (código: AMB.BRT.17.005). Del total de las muestras, 39 individuos corresponden al río Pita del volcán Cotopaxi codificados como PI y obtenidos de tres puntos diferentes a: 3781 (PI1), 3818 (PI2) y 3888 (PI3) metros de altitud; y 40 muestras del volcán Illinizas del río San Pedro, codificadas como SP y localizadas a: 3582 (SP1), 3586 (SP2) y 3596 (SP3) metros de elevación. Paralelo a ello, se evaluaron 12 individuos correspondientes al páramo El Ángel en la provincia del Carchi (A) y 10 procedentes del arenal del volcán Chimborazo (C), con el propósito de establecer una comparación con las poblaciones de estudio (PI y SP). En la tabla 1, se muestra el número de individuos analizados, la elevación, la latitud y la longitud de cada sitio de muestreo. Los individuos se conservaron en etanol al 96% previo a los futuros análisis.

Tabla 1.

*Número de individuos analizados de cada punto del fragmento COI, para Anomalocosmoecus illiesi de Ecuador*

<b>Sitio</b>	<b>Código</b>	<b>Número de individuos</b>	<b>Altitud</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
<b>Volcán Cotopaxi (río Pita)</b>	PI1	3	3781	-0.59613	-78.67297
	PI2	24	3818	-0.6058	-78.404
	PI3	12	3888	-0.61969	-78.38311
	Total	39			
<b>Volcán Illinizas (río)</b>	SP1	5	3582	-0.60946	-78.67773
	SP2	20	3586	-0.58719	-78.67297



<b>San Pedro)</b>	SP3	15	3596	-0.61552	-78.67512
	Total	40			
<b>Carchi (Páramo el Ángel)</b>	A	12	4020	0.80203	-77.93546
<b>Arenal del Chimborazo</b>	C	10	4065	-1.551546	-78.523953

El número de individuos analizados no es homogéneo entre los sitios, debido a que en la colecta no se encontraron el mismo número de especímenes para cada punto. En la Figura 3, se muestra un mapa de Ecuador con los puntos de muestreo marcados en él, otra perspectiva de los puntos de muestreo se muestra en la Figura 4.

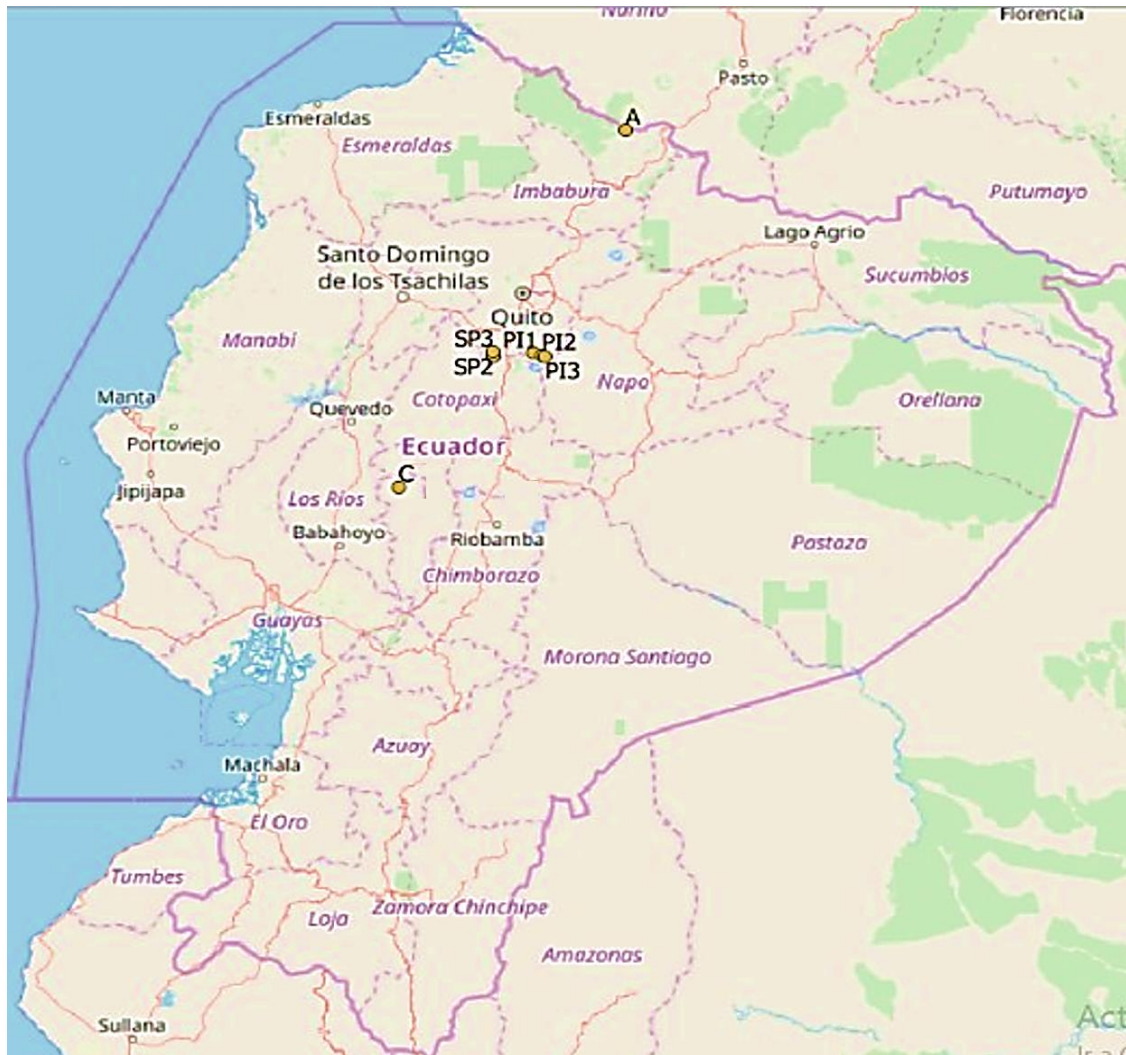


Figura 3. Puntos de recolecta de los especímenes de *Anomalocosmoecus illiesi*.

Adaptado de (Google Earth, 2018).

Los puntos amarillos representan cada sitio de muestreo. Los individuos se tomaron en cuatro poblaciones ubicadas en: el páramo El Ángel, en la provincia del Carchi (A); en el río San Pedro, en las cuencas del volcán Illinizas (SP); en el río Pita, en las cuencas del volcán Cotopaxi (PI) y en el arenal del Volcán Chimborazo (C).



Figura 4. Puntos de recolecta de los especímenes de *Anomalocosmoecus illiesi*.

Adaptado de (Google Earth, 2018).

#### 4.2. Extracción de ADN y cuantificación

La metodología de extracción de ADN se hizo en base al protocolo CTAB, descrito por (Granados y Díaz, 2013). Como material de partida se tomaron las patas de *Anomalocosmoecus illiesi* proporcionadas por el grupo BIOMAS y almacenadas en etanol. El primer paso para realizar la extracción fue la homogeneización de las muestras, para facilitar este proceso, se colocó en los tubos perlas de cerámica, luego se puso una pata de cada individuo y se dejó secar en la pared de los tubos para que se evaporara el etanol. Transcurrido un

minuto, aproximadamente, los tubos se colocaron en un homogeneizador (Precellys) y se añadieron 400 $\mu$ L de buffer de extracción compuesto por: Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 25mM pH 8 y NaCl 100mM. Una vez que la muestra estuvo bien homogeneizada se colocaron 40  $\mu$ L de SDS al 10% y se mezcló manualmente durante 2 minutos. Luego se agregaron 20  $\mu$ L de proteinasa K y se dejó incubar a 55°C por 1 hora. Posteriormente se colocaron 80  $\mu$ L de NaCl 5M, se mezcló durante 2 minutos y se añadieron 60  $\mu$ L de CTAB al 10%, que previamente se calentó, y se dejó incubar durante 10 minutos a 62°C. Para realizar la fenolización se agregaron 600 $\mu$ L de fenol, se mezcló bien durante 2 minutos y se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante extraído se colocó en un tubo eppendorf nuevo midiendo su volumen y se añadió la misma cantidad de cloroformo, luego se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos. Una vez más, midiendo el volumen, se extrajo el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y se añadió el mismo volumen de isopropanol, se dejó durante 10 minutos a -20°C y se centrifugó a 18000 rpm durante 10 minutos. Luego se tiró el sobrenadante y se colocaron 700 $\mu$ L de etanol 70% y se centrifugó a 18000 rpm por 5 minutos. Nuevamente se desechó el sobrenadante y se dejó secar los tubos boca abajo durante 3 horas. Una vez transcurrido ese periodo se diluyó el ADN en 40 $\mu$ L de agua milli Q y se cuantificó mediante un NanoDrop. El ADN obtenido se almacenó a -20°C antes de ser usado en la reacción de PCR.

#### **4.3. PCR y secuenciación del ADN**

Se amplificó un fragmento de 588 pb de la citocromo c oxidasa (COI) codificadora de proteínas, utilizando una mezcla de los cebadores Jerry y S20 (Pauls, Lumbsch, y Haase, 2006) que amplifican para la región 3' de dicho gen, para todos los taxones del conjunto de datos del volcán Cotopaxi (PI) e Illinizas (SP), además, se obtuvo los amplicones de 12 individuos provenientes del páramo El Ángel (A) y 10 individuos procedentes del arenal del Chimborazo (C). También se amplificó un fragmento de 500 pb del gen COI correspondiente a la región 5' de 5 individuos de PI y de 8 especímenes de SP, empleando los

oligos MT6 y Nancy (Simon et al., 1994). En cuanto a la amplificación del fragmento de ADNr 28S de 600 pb, se empleó los cebadores 28SFF y 28SDD (Monaghan et al., 2007), para 12 individuos de PI y 10 de SP. Los cebadores usados para la amplificación de los dos genes se muestran en la tabla 2. Todas las reacciones de PCR se establecieron en 20  $\mu$ L usando: 50-100 ng de ADN como molde, 0.4  $\mu$ L de cada cebador a 5 uM, 3.4  $\mu$ L de agua PCR y 10  $\mu$ L del mix Platinum II Taq Hot-Start DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) para la amplificación del gen COI, mientras que para el gen 28S se emplearon 10  $\mu$ L de la enzima GoTaq Green Master Mix (Promega). Como control positivo se usaron las muestras cuya amplificación era positiva, como control negativo se usó agua milliQ. Los programas de amplificación se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente. Finalmente, todos los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1,5% con SYBR Safe y se empleó un marcador de 100bp para estimar el tamaño de banda y la integridad del amplicón. Aquellas muestras cuya amplificación fue positiva fueron secuenciadas en ambas direcciones por el servicio de secuenciación de la UDLA.

Tabla 2.

*Detalles de los cebadores usados para la amplificación del ADN mitocondrial COI y del ADN nuclear 28S.*

<b>Gen</b>	<b>Cebadores</b>	<b>Secuencias</b>
<b>COI</b>	Forward (Jerry)	5' -CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3'
	Reverse (S20)	5' -GGGAAAAGGTTAAATTTACTCC-3'
<b>COI</b>	Forward (MT6)	5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC- 3'
	Reverse (Nancy)	5'-CCCGGTAAAATTAATAAATAAACTTC- 3'
<b>28S</b>	Forward (28SFF)	5' -TTACACACTCCTTAGCGGAT-3'
	Reverse (28SDD)	5' -GGGACCCGTCTTGAAACAC-3'

Tabla 3.

*Programa empleado en la amplificación del fragmento COI, usando la enzima Platinum II Taq Hot-Start (Invitrogen).*

	<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
	<b>Denaturación inicial</b>	94°C	2 minutos
<b>45 ciclos</b>	Denaturación	94°C	15 segundos
	Hibridación	45°C	15 segundos
	Extensión	68°C	15 segundos
	Extensión final	68°C	30 segundos

Tabla 4.

*Programa empleado en la amplificación del fragmento 28S, usando la enzima GoTaq Green Mater Mix (Promega).*

	<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
	<b>Denaturación inicial</b>	95°C	3 minutos
<b>45 ciclos</b>	Denaturación	95°C	40 segundos
	Hibridación	48°C	30 segundos
	Extensión	72°C	40 segundos
	Extensión final	72°C	4 minutos

#### 4.4. Análisis filogenético

Las secuencias se ensamblaron y editaron mediante el software MEGA7 (Kumar, Stecher, y Tamura, 2016). Los fragmentos obtenidos se compararon en GeneBank de NCBI por medio de BLAST para la confirmación de su identidad. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de secuencia utilizando la herramienta ClustalW implementado en MEGA7, con los parámetros de alineamiento establecidos por defecto en el programa (Kumar et al., 2016). Finalmente, se hizo la traducción de las secuencias obtenidas a proteínas mediante MEGA7, para verificar que las secuencias estaban correctas y que no hubiera codones de parada. Las estadísticas de secuencia

fueron calculadas utilizando; el software DNASP (versión 6) (Rozas et al., 2017), para estimar el número de sitios polimórficos y la diversidad nucleotídica ; y el software MEGA7, para determinar la composición nucleotídica y estimar el número de transiciones y transversiones. Para llevar a cabo el análisis filogenético primero, se estimó el mejor modelo para el grupo de datos mediante MEGA 7 (Anexo 1). Las distancias genéticas (p), dentro y entre las poblaciones, se cuantificaron utilizando el modelo de distancia de tres parámetros de Tamura (Tamura, 1992), los análisis se realizaron en 81 secuencias de nucleótidos (509 pb), con un valor de *bootstrap* de 500 repeticiones. Finalmente las distancias (p), se mostraron gráficamente en un árbol *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou y Nei, 1987), construido con Mega7 y con un valor del *bootstrap* de 500, el análisis involucró 82 secuencias de nucleótidos, ya que se colocó otro taxón (*Drusus vernonensis*), se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes.

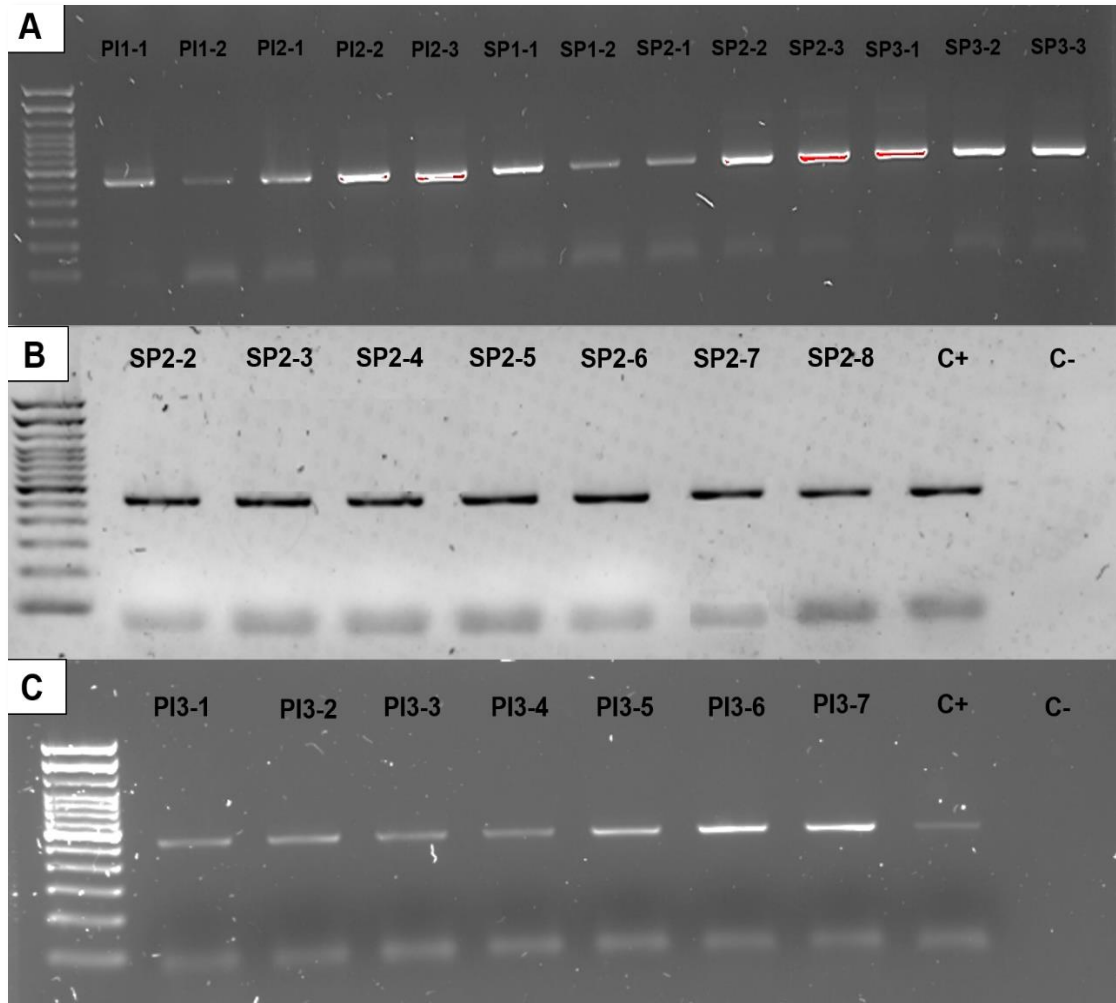
## 5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Extracción y amplificación

Se extrajo el ADN de un total de 101 individuos (Tabla 1), de ellos, la amplificación de la región 3' del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) fue positiva para 29 muestras del volcán Cotopaxi (PI) y 30 muestras del volcán Illinizas (SP); adicionalmente, se analizaron 12 individuos provenientes del páramo El Ángel (A) y 10 especímenes del volcán Chimborazo (C). Respecto a la región 5' del gen COI, se obtuvieron 5 fragmentos de individuos de PI y 8 fragmentos de especímenes de SP. En la figura 5, se puede ver que el tamaño de la banda de los fragmentos COI amplificados es, aproximadamente, 550 pb para la región 5' (A) y 588 pb para la región 3' (B y C), tal como se esperaba. Mary et al. (2017), señalan que la presencia de una banda mayor a las 500 pb del gen COI, puede proveer la información necesaria acerca del nivel de divergencia genética entre poblaciones de una especie. Por lo tanto, el tamaño de las bandas obtenidas, fue el adecuado para estimar la variabilidad



interespecífica de *A. illiesi*. En su trabajo Hebert et al. (2003), establecieron que la sección 5' de gen COI es suficiente para determinar el orden taxonómico de distintos tipos de especies; sin embargo, nuestros resultados con esta región del gen COI, no reflejaron tanta variabilidad como la encontrada en la región 3', como se evidenciará luego.



**Figura 5.** Geles de electroforesis de las regiones 5' y 3' del gen COI.

- A) Gel de electroforesis de la amplificación del fragmento 5' del gen COI de individuos de *Anomalocosmoecus illiesi* procedentes del volcán Cotopaxi (PI) e Illinizas (SP).
- B) Gel de electroforesis de la amplificación del fragmento 3' del gen COI de individuos provenientes del volcán Illinizas (SP).
- C) Gel de electroforesis de la amplificación del fragmento 3' del gen COI de individuos del volcán Cotopaxi (PI).



En el caso de la amplificación del fragmento del ADNr 28S, únicamente se evaluaron 12 fragmentos de individuos del volcán Cotopaxi (PI) y 10 del volcán Illinizas (SP). Aunque lo ideal para determinar la diversidad interpoblacional de una especie, sería trabajar con dos o más marcadores genéticos (Addison, 2015), no se amplificaron los fragmentos de este gen, para el páramo del Ángel (A) y para el arenal del Chimborazo (C), debido a que no se observaron variaciones dentro y entre las poblaciones de SP y PI. La nula variabilidad entre las secuencias del gen 28S para las poblaciones de *A. illiesi*, demuestran que el marcador mitocondrial COI podría ser más efectivo en comparación al fragmento del gen 28S amplificado para evaluar la diversidad genética de esta especie. Esto se pudo deber a que la divergencia genética de las especies es mucho mayor y conservada en el ADN mitocondrial (Hebert et al., 2003). Además, el gen COI puede servir para determinar la variación genética en secuencias más cortas de hasta 648 pb, a diferencia de los marcadores nucleares que abarcan la información taxonómica en secuencias mucho más extensas y que pueden ser hiperconservadas (Chao et al., 2014), como sucedió en este estudio. En la figura 6, se puede apreciar que el tamaño de la banda de los fragmentos 28S, es de aproximadamente 650 pb, como se esperaba.

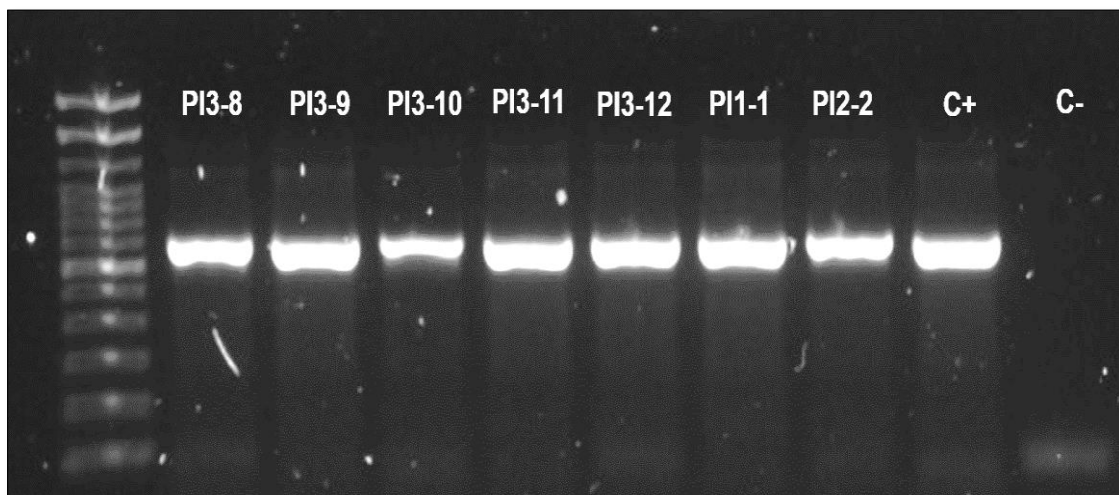


Figura 6. Gel de electroforesis de la amplificación del ADNr 28S de individuos de *Anomalocosmoecus illiesi* provenientes del volcán Cotopaxi (PI).



El segmento secuenciado 3' de 509 pb (Tabla 5), arrojó un porcentaje de identidad mediante BLAST, del 87% con el genoma mitocondrial del tricóptero *Drusus vernonensis*, con número de acceso KC881524. Esto se debe, a que no existen reportes del genoma de *Anomalocosmoecus illiesi* de la región 3' del gen COI amplificada en este estudio y la secuencia con mayor homología corresponde a la especie antes mencionada, perteneciente al orden Trichoptera. En la figura 8, se puede observar un ejemplo del alineamiento con las secuencias obtenidas del gen COI región 3'. El alineamiento completo se encuentra en el Anexo 2.

Tabla 5.

*Número de muestras por sitio empleadas en el alineamiento del fragmento COI de la región 3' de individuos provenientes del volcán Cotopaxi (PI), volcán Illinizas (SP), del páramo el Ángel (A) y del arenal del Chimborazo (C).*

<b>Sitio</b>	<b>Código</b>	<b>Número de secuencias</b>	<b>Tamaño del fragmento secuenciado región 3' (pb)</b>
<b>Volcán Cotopaxi (río Pita)</b>	PI1	3	509
	PI2	14	509
	PI3	12	509
	Total	29	509
<b>Volcán Illinizas (río San Pedro)</b>	SP1	5	509
	SP2	11	509
	SP3	14	509
	Total	30	509
<b>Páramo el Ángel</b>	A	10	509
<b>Páramo del Chimborazo</b>	C	10	509







### 5.3. Análisis filogenético

Este estudio se centró en la identificación del nivel de variación interpoblacional de *Anomalocosmoecus illiesi* de poblaciones procedentes del volcán Cotopaxi (PI) y del volcán Illinizas (SP); adicionalmente, se estableció una comparación con especímenes provenientes del páramo del Carchi (A) y del páramo del Chimborazo (C). Se analizaron un total de 81 secuencias de nucleótidos de 509 pb y se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes.

#### 5.3.1. Análisis de secuencias

Las frecuencias de nucleótidos del gen COI región 3' de individuos de *Anomalocosmoecus illiesi* provenientes de las cuatro poblaciones (A, SP, PI y C) (Tabla 6), mostraron una mayor cantidad de adenina y timina con un promedio de 30,8% y 36,4%, respectivamente, con respecto a la cantidad de citosina y guanina que se encuentran en un promedio de 18,1% y 14,8%, respectivamente. Este patrón en la composición de bases concuerda con lo observado en la mayoría de los genomas mitocondriales de insectos, que suelen mostrar un alto contenido de adenina y timina (Giraldo et al., 2011; Mardulyn y Whitfield, 1999). En cuanto a la estimación de las sustituciones nucleotídicas, se encontró un mayor número de transiciones (95.62%), que de transversiones (4.38%), estos datos se pueden observar en la tabla 7. Las tasas de diferentes sustituciones de transición se muestran en **negrita** y las de las sustituciones transversiones se muestran en *cursiva*. Cada número, muestra la probabilidad de sustitución (r) de una base (fila) a otra base (columna). Para simplificar, la suma de los valores de r se hace igual a 100. Las estimaciones de sustitución de nucleótidos, podrían estar asociados con un fuerte sesgo de base por el alto contenido de adeninas y timinas que se tiene en las secuencias, especialmente para las transiciones (Pauls, Lumbsc, y Haase, 2006).

Tabla 6.

*Composición nucleotídica de Anomalocosmoecus illiesi procedentes de los Andes del Ecuador.*

	<b>T(U)</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>
<b>Páramo El Ángel (A)</b>	36.7	17.7	31.2	14.3
<b>Volcán Illinizas (SP)</b>	36.3	18.1	30.6	14.9
<b>Volcán Cotopaxi (PI)</b>	36.1	18.3	30.8	14.7
<b>Arenal del Chimborazo (C)</b>	36.5	18.1	30.5	14.9
<b>Promedio</b>	36.4	18.1	30.8	14.8

Tabla 7.

*Estimación de la probabilidad máxima del patrón de sustitución de nucleótidos en Anomalocosmoecus illiesi procedentes de los Andes del Ecuador.*

	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
<b>A</b>	-	0.79	0.41	<b>16.46</b>
<b>T</b>	0.67	-	<b>14.91</b>	0.32
<b>C</b>	0.67	<b>29.97</b>	-	0.32
<b>G</b>	<b>34.28</b>	0.79	0.41	-

### 5.3.2. Variabilidad de COI

El segmento secuenciado fue de 509 pares de bases, de las cuales, 496 sitios fueron conservados y 13 sitios corresponden a polimorfismos. Dentro de las poblaciones existen cero sitios polimórficos; pero entre ellas, existe un total de 13 mutaciones, con una diversidad nucleotídica menor al 1%, las estadísticas de la diversidad de nucleótidos se muestran en la Tabla 8. Todas las poblaciones presentan un haplotipo (h), a excepción de las secuencias provenientes de los individuos del páramo del volcán Chimborazo, que tienen dos haplotipos, los detalles de la diversidad nucleotídica de los individuos procedentes de las cuencas del volcán Chimborazo se presentan en la Tabla 9.

La desviación estándar de la diversidad haplotípica (Hd), tiene un valor de 0,025.

Tabla 8

*Diversidad nucleotídica del gen COI de Anomalocosmoecus illiesi de los Andes del Ecuador.*

	COI
<b>Sitios polimórficos</b>	13
<b>Números de haplotipos (h)</b>	5
<b>Diversidad haplotípica (Hd)</b>	0.709
<b>Diversidad nucleotídica (Pi)</b>	0.00962
<b>Promedio de diferencias nucleotídicas (K)</b>	4,897

Tabla 9.

*Diversidad nucleotídica del gen COI de Anomalocosmoecus illiesi de la población procedente del páramo del Chimborazo*

	COI
<b>Números de haplotipos (h)</b>	2
<b>Número de sitios segregantes (s)</b>	1
<b>Diversidad haplotípica (Hd)</b>	0,2000
<b>Diversidad nucleotídica (Pi)</b>	0.00039

Respecto a la estimación de distancias genéticas ( $p$ ) en base a la región 3' del gen COI, se encontraron valores entre el (0,002-0,018), (tabla 10). Estos resultados concuerdan con los valores establecidos para definir una variación intraespecífica (Lanteri, 2007). Las poblaciones con menor divergencia genética corresponden a los individuos procedentes del volcán Chimborazo (C) y los especímenes del volcán Illinizas (SP) con un valor de  $p$  igual a 0,002. Por el contrario, la mayor distancia genética se da entre la población del volcán Chimborazo (C) con la del volcán Cotopaxi (PI), con un valor de  $p$  de 0.018;



seguido de las poblaciones procedentes del volcán Cotopaxi (PI) e Illinizas (SP), y del volcán Chimborazo (C) con el páramo El Ángel (A), el valor de  $p$  en los dos casos es de 0.016. Al estimar las distancias genéticas dentro de las poblaciones, se obtuvo un valor de  $p$  igual a 0, excepto para la población ubicada en los páramos del volcán Chimborazo, cuyo valor  $p$  fue 0,0003935 (0.03%).

Los resultados obtenidos son similares a los encontrados a nivel intraespecífico en algunas especies de polillas con un promedio específico de 0.0025, valores similares se obtuvieron en aves, con divergencias intraespecíficas que promedian 0.0027 (Avisé et al., 1999). En lo que respecta a la relación entre niveles de divergencia genética y su significación taxonómica, los defensores del «DNA barcode» han propuesto valores estimativos del 0.01-0.02 (1- 2%) de divergencia en el ADNmt para la variación intraespecífica y valores mayores para separar especies (Lanteri, 2007). Estos porcentajes, calculados sobre la base de COI, no pueden generalizarse a todos los grupos taxonómicos, pues no cabría esperar que fueran constantes. Por ejemplo, en anfibios se encontraron divergencias intraespecíficas muy elevadas del 0.70-0.14 (7-14%), debidas probablemente a una marcada estructuración filogeográfica de las especies, con haplotipos característicos de las distintas subpoblaciones (Lanteri, 2007). Sin embargo, el código de barras de ADN permite identificar especies con bastante precisión, en base a los parámetros definidos para «DNA barcode», en ciertos grupos taxonómicos, por ejemplo, peces (Ward et al., 2005), aves (Hebert et al., 2004; Kerr et al., 2007) y lepidópteros (Hajibabaei et al., 2006) (Lanteri, 2007). Otro estudio de Molina et al. (2017), empleó las secuencias del gen citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), para asociar el estadio larvario con sus respectivos adultos (hembra y macho), para una especie de Ephemeroptera (*Meridialaris tintinnabula*), dos especies de Plecoptera (*Anacroneuria vagante*, *Claudioperla tigrina*) y una especie de Trichoptera (*Anomalocosmoecus illiesi*). Tras el análisis, encontraron una alta divergencia interespecífica genética entre muestras de diferentes familias y géneros, con un máximo de 0.20; mientras, las divergencias genéticas

intraespecíficas fueron menores entre las muestras de la misma especie (0.01-0.02). El estudio concluyó, que el gen COI mediante el código de barras de ADN, puede ser una herramienta eficaz para asociar etapas de la vida y acelerar la exploración de los patrones de biodiversidad de insectos acuáticos en la región del Alto Andino (Molina et al., 2017). En la tabla 10, también se muestra las distancias genéticas entre todas las poblaciones de estudio y una secuencia de otra especie, perteneciente a *Drusus vernonensis* (Trichoptera). Se sabe, que las divergencias de secuencia son generalmente mucho más bajas entre los individuos de la misma especie que entre las especies estrechamente relacionadas (Avice et al., 1999) y que valores de distancia evolutiva superiores al 0.02, en base al gen COI, pueden sugerir que se trata de especies distintas. Según las distancias que aplica el modelo de 3 parámetros de Tamura, los promedios de divergencia para géneros serían del 9.93%, para familias del 15.46%, para órdenes del 22.18% y para clases del 23.27% (Lanteri, 2007). Los valores de distancia genética entre las poblaciones (A, SP, PI y C) y la secuencia de *Drusus*, tienen valores entre (0.135-0.139), lo que sugiere, que se trata de otra especie, perteneciente a otro género de la misma familia. Estos datos son correctos, tal como se reporta en la bibliografía de su clasificación taxonómica (Waringer et al., 2016) y en las bases de datos genéticas.

Tabla 8.

*Distancias genéticas entre las poblaciones de Anomalocosmoecus illiesi de los Andes del Ecuador.*

	1	2	3	4	5
1 Drusus					
2 Carchi (A)	0.135				
3 Illinizas (SP)	0.137	0.014			
4 Cotopaxi (PI)	0.135	0.014	0.016		
5 Chimborazo (C)	0.139	0.016	0.002	0.018	

El árbol filogenético (Figura 10), se dibujó a escala y las longitudes de las ramas representan las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético y su historia evolutiva. Las distancias (Tabla 10), están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Los taxones asociados agrupados se muestran junto a cada rama, con una suma de longitud de la rama igual a 0.02.

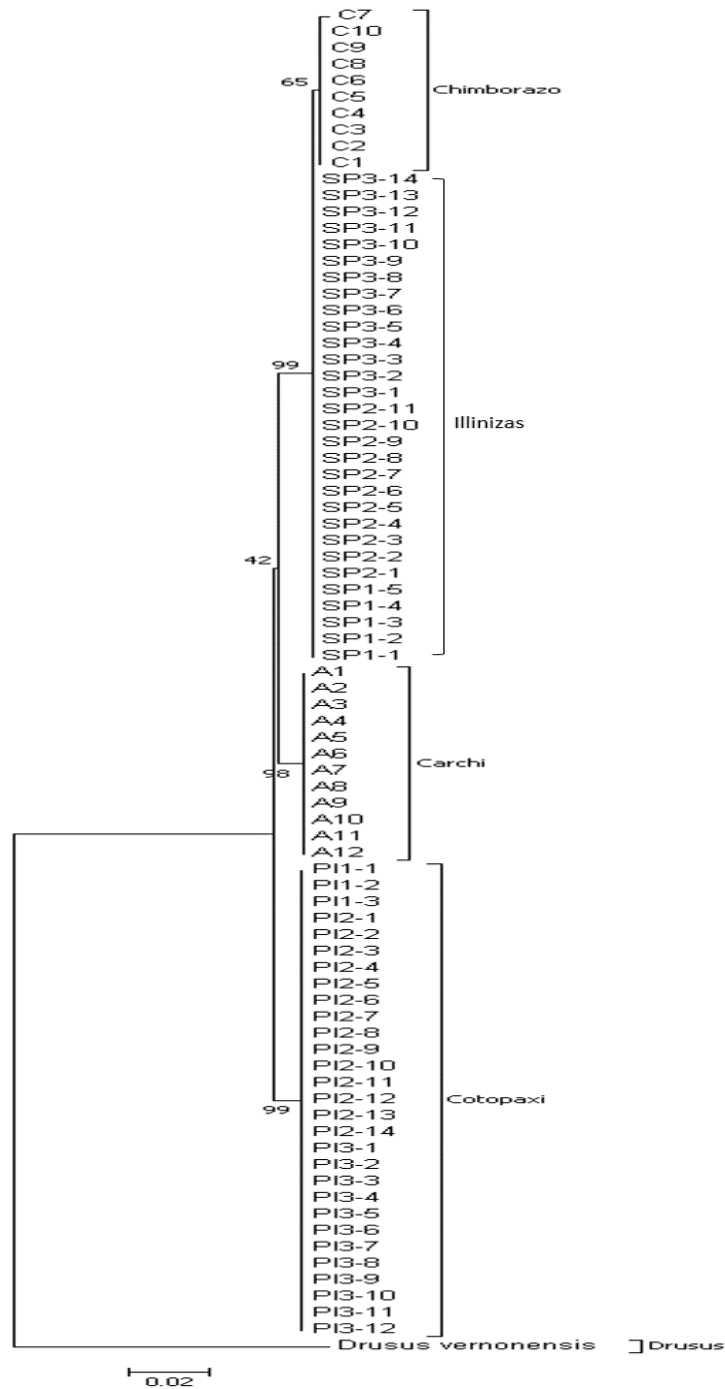


Figura 10. Relaciones evolutivas de *Anomalocosmoecus illiesi* de la región 3' del gen COI.

Las poblaciones evaluadas provienen: del páramo El Ángel en el Carchi (A), del río Pita en las cuencas del volcán Cotopaxi (PI), del río San Pedro en las cuencas del volcán Illinizas (SP) y del arenal del volcán Chimborazo (C). Los números junto a las ramas representan el soporte de bootstrap usado para inferir la filogenia de cada población.

El árbol *neighbor-joining* (NJ) (Figura 10), mostró que los individuos de *Anomalocosmoecus illiesi* se separaron claramente en 5 grupos, 4 de ellos correspondientes a las poblaciones de estudio (A, SP, PI y C), y, por tanto, el tamaño de la rama que los une es más corto (menor distancia evolutiva); en relación al tamaño de la rama con mayor longitud (mayor distancia evolutiva), que une a los individuos de las cuatro poblaciones con otra especie de Trichoptera (*Drusus vernonensis*). La mayor longitud de rama, se da entre las poblaciones de Cotopaxi (PI) y Chimborazo (C), seguida de Cotopaxi (PI) e Illinizas (SP), y Carchi y Chimborazo, por el contrario, la longitud de rama más pequeña corresponde a las poblaciones del volcán Illinizas (SP) y del volcán Chimborazo (C); por tanto, concuerdan con los valores de distancia p estimados (Tabla 10) y están dentro de los valores sugeridos para «DNA barcode» empleando genes mitocondriales como COI (Lanteri, 2007).

La variación genética dentro de la misma especie, puede resultar de una respuesta de los individuos a varios factores como: la contracción y expansión histórica de un hábitat, por ejemplo: de sus variables biofísicas (temperatura, precipitación, humedad, estacionalidad), de sus condiciones biogeográficas (geografía y pisos altitudinales), del cambio climático, de la capacidad de dispersión y conexión de las poblaciones, y de procesos genéticos (deriva génica aleatoria, cuellos de botella, etc.) (Lehrian et al., 2010; Addison, 2015). La escala y la magnitud de la divergencia genética entre las poblaciones varía dentro y entre los taxones, y las características del paisaje y los gradientes ambientales impiden el flujo de genes en algunas especies, pero no en otras (Lehrian et al., 2010).

La biogeografía del Ecuador y la variación climática que presenta son determinantes para explicar la diversidad biológica intraespecífica encontrada entre las poblaciones de este estudio (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016). Las distancias evolutivas, a menudo coinciden con algunas barreras geográficas importantes (Emerson y Hewitt, 2005). La alta diversidad encontrada en varios grupos taxonómicos del Ecuador, en insectos por

ejemplo, está influenciada en gran medida por factores como la ubicación geográfica del país en la zona ecuatorial, los efectos orográficos del levantamiento de la Cordillera de los Andes y de la Cordillera de la Costa, la circulación general atmosférica y la influencia de las corrientes de agua (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016; Neill y Jorgensen, 1999). En Ecuador, la emergencia de la Cordillera de los Andes constituyó la más importante barrera geográfica que generó el aislamiento de poblaciones, tanto entre los trópicos y subtrópicos de oriente y occidente, así como entre las zonas templadas y alto andinas, lo que facilitó procesos de especiación (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos., 2007).

Las condiciones biogeográficas y ambientales de los Andes ecuatorianos, son muy inestables debido a la actividad volcánica continua que presenta esta zona (Finn, Encalada, y Hampel, 2016), estas condiciones (específicas de cada montaña), podrían ser un factor clave que influya en la diversidad genética observada entre las distintas poblaciones de los tricópteros (Lehrian et al., 2010). La distancia genética ( $p$ ) encontrada entre las poblaciones del volcán Cotopaxi (PI) y del volcán Chimborazo (C) (0.018) (Tabla 10), corresponde al valor de  $p$  más alto del conjunto de datos. En el contexto volcánico, se sugiere que una historia de eventos catastróficos podría influir en los patrones genéticos de la población de prácticamente cualquier organismo de gran altitud de los Andes ecuatorianos, incluidos los macroinvertebrados acuáticos (Finn, Encalada, y Hampel, 2016). En este aspecto, las dos poblaciones (PI y C), son de origen volcánico y representan a dos de los volcanes más altos del Ecuador (Hall y Mothes, 2008). El volcán Cotopaxi está situado en la Cordillera oriental de los Andes ecuatorianos a 5897 msnm (Pistolesi et al., 2013), se encuentra rodeado por otros volcanes como el Rumiñahui de 4722 msnm, el Sincholagua de 4873 msnm y el volcán Quilindaña de 4876 msnm, además de un área de páramos de aproximadamente 3000 msnm (Instituto Geofísico EPN, 2017). El Cotopaxi presenta una frecuencia de erupciones alta, por lo que ha sido catalogado como uno de los volcanes más peligrosos del mundo (Instituto Geofísico EPN, 2017). Este volcán, está actualmente activo, con más de 50

erupciones en los últimos 200 años y la erupción violenta más reciente en 1904 (Hall y Mothes, 2008). Barberi et al (1995), reportaron que el intervalo de tiempo promedio entre dos erupciones en el volcán Cotopaxi es de  $117 \pm 70$  años (Barberi et al, 1995). Por otro lado, el volcán Chimborazo (6268 msnm), ubicado en la cordillera occidental, ha estado apagado por siglos, la última erupción de este volcán fue registrada alrededor de 550 D.C. (Hidalgo et al., 2012).

Sin embargo, la actividad volcánica constante de los Andes ecuatorianos, podría afectar a los ríos de todas las montañas cercanas al punto de erupción; por ejemplo, aunque el Chimborazo no ha sido volcánicamente activo en miles de años, es probable que eventos cercanos y evolutivos recientes hayan afectado sus ecosistemas (Finn, Encalada, y Hampel, 2016). El Quilotoa, por ejemplo, es un volcán a solo 67 km al norte de Chimborazo, en la cordillera occidental, que extiende cenizas y escombros a lo largo del norte de los Andes (Mothes y Hall, 2008). Por tanto, la inestabilidad demográfica de las poblaciones de *Anomalocosmoecus illiesi* en los Andes ecuatorianos podría ser un factor común y no constituir un elemento que intervenga de manera significativa en la divergencia genética de las poblaciones de estudio (PI, SP, A, y C). De hecho, un trabajo reciente de Finn, Encalada, y Hampel (2016), donde evaluaron los patrones genéticos poblacionales de la efímera *Andesiops peruvianus*, entre una población que habita ríos compuestos del agua generada en los glaciares de las montañas y otra cuyos ríos provienen de aguas subterráneas, ubicados en el volcán Cotopaxi, Chimborazo y Antisana. Se determinó que independientemente de la historia reciente de erupción volcánica de la montaña que ocupan, los Andes ecuatorianos parecen ser demográficamente muy inestables. Se sugirió que la dispersión y el flujo de genes en los ríos tropicales proceden de manera similar a los sistemas alpinos templados; es decir, existe un aislamiento reproductivo fuerte entre las cordilleras, pero una capacidad razonable para el flujo de genes entre los tipos de ríos de las montañas próximas. Los valores de distancia genética interpoblacional relativamente altos encontrados en *A. illiesi* entre la población

de PI y C, pueden deberse a que el flujo de genes entre estas dos poblaciones se ve dificultado al encontrarse en lados distintos de la cordillera de los Andes. Los resultados de Finn, Encalada, y Hampel (2016), también sugirieron que no existe un flujo genético contemporáneo entre los rangos este y oeste de los Andes ecuatorianos para el macroinvertebrado *Andesiops peruvianus*. Del mismo modo, las poblaciones del volcán Cotopaxi (PI) y del volcán Illinizas (SP), que son las poblaciones más cercanas en términos de distancia lineal (29km), pero con una variación interpoblacional considerable del 0,16 entre ellas (Tabla 10), se encuentran separadas por el volcán Rumiñahui (4722 msnm), que rodea al Cotopaxi por el Noroccidente y por otras roturas geológicas/ orográficas, que pueden influir en el flujo de genes, por encontrarse en lados opuestos de la cordillera Andina (Pistolesi et al., 2013) al igual que las poblaciones de PI y C. Esto evidencia que, aunque dos poblaciones de la misma especie se encuentren geográficamente muy cerca en términos de distancia lineal, no necesariamente diferirán menos en cuanto su distancia genética y evolutiva. Este mismo patrón se evidenció en un estudio sobre la filogeografía del tricóptero de montaña *Drusus discolor* (Pauls, Lumbsc, y Haase, 2006), que presentó una elevada distancia genética entre las poblaciones de los Alpes y sus cordilleras vecinas. Así mismo, Finn et al. (2016), determinaron que puede existir un aislamiento significativo entre las poblaciones de *A. peruvianus*, incluso entre las dos montañas que ocupan la cordillera oriental (Cotopaxi y Antisana).

La distancia genética entre las poblaciones del páramo El Ángel (A) y la del volcán Chimborazo (C), también es una de las más altas, con un valor de  $p$  igual a 0.16. Estas dos poblaciones se encuentran en la cordillera occidental, a una distancia lineal de 262 km, correspondiendo a las más lejanas en términos de distancia geográfica de entre todas las poblaciones evaluadas. Un valor de distancia genética interpoblacional un poco más bajo ( $p=0.14$ ), se observa para las poblaciones SP y A, ubicadas a una distancia lineal de 181 km en la cordillera occidental. Siendo muy probable, que la separación geográfica entre estos dos grupos de poblaciones sea la que dificulta el flujo genético y



estructure estas considerables divergencias genéticas observadas entre estas poblaciones. Sin embargo, las poblaciones de PI y A, que se encuentran a una distancia lineal de 174 km y que además están ubicadas en distintos lados de la cordillera andina, presentan una distancia genética igual a la encontrada entre las poblaciones de SP y C ubicadas en la cordillera occidental. Por lo tanto, podrían estar influyendo otros factores, además de la barrera geográfica que representa la cordillera de los Andes, en la variabilidad interpoblacional encontrada entre estas poblaciones. Para que estos resultados se ajusten más a la realidad, se tendría que incrementar el número de individuos y localidades analizados del páramo El Ángel (A), ya que la cantidad de individuos usados en este estudio podría no ser representativo para esta población. Esto permitirá inferir y establecer una comparación más confiable entre la población A con las poblaciones de PI, SP y C, que permita comprender mejor los patrones genéticos que gobiernan a *A. illiesi* provenientes de montañas que se encuentran ubicadas en lados de la cordillera andina distintos y que se encuentran lo suficientemente separadas geográficamente como en estos casos.

La distancia génica entre las poblaciones de *Anomalocosmoecus illiesi* procedentes del arenal del Chimborazo (C) y las del volcán Illinizas (SP), es la más baja de entre todas las poblaciones, con un valor de 0.002. La poca diversidad evolutiva entre C y SP, probablemente se debe a que las dos poblaciones además de encontrarse en el mismo lado de la cordillera (Occidental), están relativamente cerca en términos de distancia lineal (85 km), lo cual probablemente ha facilitado el flujo de genes entre estas dos poblaciones, resultando evolutivamente más similares. La etapa adulta de los insectos acuáticos a menudo se considera la etapa en la que puede ocurrir la dispersión principal entre arroyos, cuencas o en largas distancias (Lehrian et al., 2010). Por tanto, la dispersión ocasional de *Anomalocosmoecus illiesi* adultos no sería sorprendente entre estas dos poblaciones.

Además, en este estudio se encontró una nula variabilidad genética dentro de las poblaciones, excepto para la población del volcán Chimborazo, que exhibió dos haplotipos y una diversidad nucleotídica muy poco significativa del 0.039 entre ellos (Tabla 9). Emerson y Hewitt (2005), mencionan que la poca variabilidad encontrada en ciertos taxones de una misma población, podría significar que existe un largo aislamiento reproductivo causado, probablemente, por cuellos de botella recurrentes en poblaciones aisladas (Emerson y Hewitt, 2005). Finn, Encalada, y Hampel (2016), por ejemplo, obtuvieron evidencia significativa respecto a la presencia de cuellos de botella recientes entre las poblaciones del macroinvertebrado *Andesiops peruvianus* del volcán Chimborazo y del volcán Cotopaxi, especialmente para este último, se sugiere una expansión de la población muy reciente. Por lo tanto, es probable que, al igual que *A. peruvianus*, exista un aislamiento reproductivo de *A. illiesi* dentro de las montañas, pero un flujo genético entre los arroyos de montañas cercanas geográficamente,

Por otro lado, el uso de un solo marcador en el análisis, ya sea mitocondrial o nuclear, puede ser potencialmente engañoso, especialmente si se ha producido una hibridación histórica (Emerson y Hewitt, 2005; Finn et al., 2016). Para reconstruir la historia filogeográfica de una especie, lo ideal sería utilizar un rango de secuencias, incluyendo secuencias nucleares, citoplásmicas, ligadas al sexo, autosómicas, conservadas y neutrales, incluidos ejemplos con tasas de mutación altas y bajas (Emerson y Hewitt, 2005). Los estudios filogeográficos que utilizan datos genealógicos de varios loci independientes ayudarán a proporcionar una historia más completa y confiable de la especie (Addison, 2015). Zhou et al. (2007), por ejemplo, aprovecharon las propiedades del gen mitocondrial COI y la región D2 del rRNA nuclear de la subunidad grande 28S, sugiriendo que su uso es ideal para las asociaciones larvales de Hydropsychidae (Trichoptera). Maddison (2012), observó que la región D2 de las especies de Bembidion (*Coleoptera, Carabidae*) rastreadas con el rRNA mejoró el fragmento del código de barras, probablemente porque como miembro de una familia multigénica, el rRNA nuclear se homogeneiza con el

flujo de genes (Maddison, 2012). Sin embargo, en este estudio, el gen 28S no mostró variabilidad dentro y entre las poblaciones de SP y PI. Esto se puede deber a que, como se ha venido mencionando, el gen 28S parece evolucionar un poco más lento que el gen mitocondrial COI en algunos órdenes de insectos, incluido Trichoptera (Kjer et al., 2014). Por lo tanto, en este estudio, el uso de un solo marcador (COI) podría resultar insuficiente, pues evidencian sólo la mitad de la historia evolutiva de la especie, ya que se heredan uniparentalmente por vía materna (Lanteri, 2007). Por lo tanto, para establecer una relación evolutiva más completa de las poblaciones de *Anomalocosmoecus illiesi* de los Andes de Ecuador, sería conveniente trabajar con otra región del gen 28S o utilizar otros marcadores nucleares, que permitan investigar eventos de introgresión, hibridación y especiación incompleta (Lanteri, 2007).

Así mismo, la delimitación de las especies empleando códigos de barras de ADN, requiere de un adecuado muestreo, capaz de poner en evidencia la variación local y las conclusiones con respecto a la separación entre poblaciones y grupos de poblaciones. Si el muestreo es insuficiente, tanto los análisis basados en los datos morfológicos como aquéllos que emplean datos moleculares, suelen conducir a resultados erróneos. En estudios destinados a poner a prueba la eficiencia del código de barras para la delimitación de especies, se deben analizar al menos 10 individuos por muestra poblacional, para evaluar convenientemente la variación a nivel intraespecífico (Lanteri, 2007). Por lo tanto, la cantidad de individuos empleados en este estudio, podría ser suficiente para estimar la variación genética entre las poblaciones de estudio, pero dentro de las poblaciones, para los puntos PI1 del volcán Cotopaxi y SP1 del volcán Illinizas, se requerirían analizar más individuos para mejorar la congruencia de los datos.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

Se concluye que el gen mitocondrial COI es de gran utilidad para formular hipótesis y orientar futuras investigaciones en el campo de la estructura genética de las poblaciones de *Anomalocosmoecus illiesi* y sus diferencias, ya que muestra gran variabilidad en su secuencia; mientras el gen ribosómico 28S no mostró variabilidad genética entre las poblaciones evaluadas. Mediante la amplificación de la región 3' del gen COI, se determinó que existe un alto nivel de distancia genética entre las poblaciones de *A. illiesi* provenientes del volcán Cotopaxi (PI) y del volcán Illinizas (SP), con un valor de distancia genética igual a 0.016, pero la divergencia genética dentro de las poblaciones es prácticamente inexistente para el gen COI. Esto podría significar que existe un aislamiento reproductivo dentro de las montañas, pero el flujo de genes, principalmente entre los ríos de las cuencas geográficamente cercanas y en el mismo lado de la cordillera andina, se ve facilitado. Además, no todos los cambios encontrados entre las poblaciones (SP, PI, A y C), se podrían atribuir únicamente a una barrera geográfica, sobre todo, para los resultados obtenidos entre la población de PI y A, donde probablemente intervengan otros procesos genéticos, causados por los cambios ambientales extremos propios de cada montaña; sin embargo, el número de individuos muestreados para Carchi (A), puede ser insuficiente para confirmar este hallazgo. Por lo tanto, aunque este estudio brinda información importante acerca de los patrones genéticos que podrían influir en la diversidad genética de *A. illiesi*, aún se desconocen con exactitud los mecanismos biológicos que intervienen directamente en la diversidad genética de este tricóptero en los Andes ecuatorianos, sobre todo de aquellas poblaciones que están situadas en lados distintos de la cordillera y con una distancia geográfica razonable entre ellas.

### 6.2. Recomendaciones

Para futuros estudios, se recomienda emplear otra zona del gen 28S u otro marcador de ADN ribosómico (ADNr), ya que agregar otro marcador mejorará la congruencia de los datos.

Otro método para mejorar la precisión filogenética es agregar más individuos y localidades al grupo de estudio, sobre todo de las poblaciones de Carchi (A) y Chimborazo (C), cuyos individuos pudieron no ser suficientes para este estudio. De este modo, la diversidad genética entre las poblaciones tendrá un mayor soporte para inferir mejor la historia evolutiva de *Anomalocosmoecus illiesi*.

## REFERENCIAS

- Ab Hamid, S., y Md Rawi, C. S. (2017). *Application of Aquatic Insects (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera) in Water Quality Assessment of Malaysian Headwater*. *Tropical Life Sciences Research*, 28(2), 143–162. Recuperado el 8 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.21315/tlsr2017.28.2.11>
- Addison, J. A. (2015). *Small-scale genetic structure in a stream-dwelling caddisfly in eastern Canada*. *Marine and Freshwater Research*, 66(5), 90-113. Recuperado el 23 de Julio de 2018 de <https://doi.org/10.1071/MF13268>
- Albert, C. H., Thuiller, W., Yoccoz, N. G., Soudant, A., Boucher, F., Saccone, P., y Lavorel, S. (2010). *Intraspecific functional variability: extent, structure and sources of variation*. *Journal of Ecology*, 98(3), 604–613. Recuperado el 5 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01651.x>
- Altamirano, M., y Yanez, P. (2016). El código de barras de ADN (*barcoding*): una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en Ecuador. *La Granja*, 23(1). Recuperado el 19 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.17163/lgr.n23.2016.01>
- Arnold, M. L., Holman, D., y Zweifel, S. G. (2017). *Using Molecular Biology and Bioinformatics to Investigate the Prevalence of Mislabeled Fish Samples*. *The American Biology Teacher*, 79(9), 763–768. Recuperado el 16 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1525/abt.2017.79.9.763>
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., ... Saunders, N. C. (1987). *Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics*. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>
- Avise, J. C., Walker, D., Burns, J. M., Janzen, D. H., y Hallwachs, W. (1999).

- Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 992–995. Recuperado el 2 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.992>
- Barberi, F., Coltelli, M., Frullani, A., Rosi, M., y Almeida, E. (1995). *Chronology and dispersal characteristics of recently (last 5000 years) erupted tephra of Cotopaxi (Ecuador): implications for long-term eruptive forecasting. Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 69(3–4), 217–239. Recuperado el 8 de Octubre de 2018 de [https://doi.org/10.1016/0377-0273\(95\)00017-8](https://doi.org/10.1016/0377-0273(95)00017-8)
- Becklin, K. M., y Galen, C. (2008). *Intra-and Interspecific Variation in Mycorrhizal Associations across a Heterogeneous Habitat Gradient in Alpine Plant Communities. Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 41(2), 183-190. Recuperado el 14 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1657/1938-4246-41.2.183>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Das, I. (2007). *Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in Ecology y Evolution*, 22(3), 148–155. Recuperado el 12 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2006.11.004>
- Binti, S., y Hamid, A. B. (2011). *Abundance and diversity of ephemeroptera, plecoptera, trichoptera (insecta) in relation to environmental quality of upstream rivers in Kedah, Malaysia*. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018: <http://eprints.usm.my/id/eprint/42741>.
- Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., y Vrijenhoek, R. (1994). *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate. Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299 Recuperado el 17 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>.
- Blahnik, R., y Holzenthal, R. (2004). *Collection and curation of Trichoptera, with an emphasis on pinned material* and curation of Trichoptera, with an

- emphasis on pinned material. Nectopsyche, Neotropical Trichoptera Newsletter*, 1, 8–26. Recuperado el 20 de Noviembre de 2018 de [https://www.researchgate.net/publication/285699552\\_Collection\\_and\\_curation\\_of\\_Trichoptera\\_with\\_an\\_emphasis\\_on\\_pinned\\_material](https://www.researchgate.net/publication/285699552_Collection_and_curation_of_Trichoptera_with_an_emphasis_on_pinned_material)
- Blaxter, M. L. (2004). *The promise of a DNA taxonomy. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1444), 669–679. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1447>
- Bonada, N., Prat, N., Resh, V. H., y Statzner, B. (2006). *Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. Annual Review of Entomology*, 51(1), 495–523. Recuperado el 15 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151124>
- Bowen, B. W., Nelson, W. S., y Avise, J. C. (1993). *A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5574–5577. Recuperado el 22 de Junio de 2018 de <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5574>
- Brown, G. R., Gill, G. P., Kuntz, R. J., Langley, C. H., y Neale, D. B. (2004). *Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), 15255–15260. Recuperado el 12 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1073/pnas.0404231101>
- Brown, I. E., Hannah, D. M., y Milner, A. M. (2007). *Vulnerability of alpine stream biodiversity to shrinking glaciers and snowpacks. Global Change Biology*, 13(5), 958–966. Recuperado el 3 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01341.x>
- Camargos, L. M., Ríos-Touma, B., y Holzenthal, R. W. (2017). *New Cernotina caddisflies from the Ecuadorian Amazon (Trichoptera: Polycentropodidae). The Journal of Life and Environmental Sciences*. Recuperado el 9 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.7717/peerj.3960>.



- Cerda Granados, D., y Díaz, V. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. *Encuentro*, 0(94), 82-92. Recuperado el 22 de Junio de 2018 de <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i94.1089>.
- Chang, F.-H., Lawrence, J. E., Rios-Touma, B., y Resh, V. H. (2014). *Tolerance values of benthic macroinvertebrates for stream biomonitoring: assessment of assumptions underlying scoring systems worldwide*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(4), 2135–2149. Recuperado el 18 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3523-6>.
- Chao, Z., Liao, J., Liang, Z., Huang, S., Zhang, L., y Li, J. (2014). *Cytochrome C oxidase subunit I barcodes provide an efficient tool for Jinqian Baihua She (Bungarus parvus) authentication*. *Pharmacognosy Magazine*, 10(40), 449–457. Recuperado el 22 de Julio de 2018 de <https://doi.org/10.4103/0973-1296.141816>
- Craft, K. J., Pauls, S. U., Darrow, K., Miller, S. E., Hebert, P. D. N., Helgen, L. E., Weiblen, G. D. (2010). *Population genetics of ecological communities with DNA barcodes: an example from New Guinea Lepidoptera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 5041–5046. Recuperado el 22 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1073/pnas.0913084107>
- Crawford, A. J., Paz, A., y Gonzalez, M. (2011). *DNA Barcode of Life: An Introduction and Perspective*. *Acta biológica Colombiana*, 16(3), 161-173. Recuperado el 22 de Agosto de 2018 de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2011000300011](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2011000300011)
- Cruickshank, R. H. (2002). *Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks*. *Systematic and Applied Molecular Markers for the Phylogenetics of Mites and Ticksed Acarology*, 7(0), 3. Recuperado el 25 de Junio de 2018 de <https://doi.org/10.11158/saa.7.1.1>
- Dallas, J. F., Cruickshank, R. H., Linton, Y.M., Nolan, D. V., Patakakis, M., Braverman, Y., Mordue Luntz, A. J. (2003). *Phylogenetic status and*

- matrilineal structure of the biting midge, Culicoides imicola, in Portugal, Rhodes and Israel. Medical and Veterinary Entomology*, 17(4), 379–387. Recuperado el 5 de Agosto de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651651>
- David A. Neill and Peter M. Jørgensen. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. (P. Mooler-Jorgensen y y S. León, Eds.). Missouri, Estados Unidos: Missouri Botanical Garden Press.
- De Haro, A., Pagès, N., Sarto, V., y Monteys, I. (2005). Relaciones filogenéticas, según el gen citocromo oxidasa I (COI), entre la fauna Ibero-Marroquí de *Cataglyphis* grupo *albicans* (Hym. Formicidae). *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 29(2), 99–109.
- de Moor, F. C., y Ivanov, V. D. (2008). *Global diversity of caddisflies (Trichoptera: Insecta) in freshwater. Hydrobiologia*, 595(1), 393–407. Recuperado el 15 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9113-2>
- Emerson, B. C., y Hewitt, G. M. (2005). *Phylogeography. Current Biology*, 15(10), 367-71. Recuperado el 15 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.016>
- Finn, D. S., Encalada, A. C., y Hampel, H. (2016). *Genetic isolation among mountains but not between stream types in a tropical high-altitude mayfly, Freshwater Biology*, 61, 702–714. Recuperado el 14 de Enero de 2018 de <https://doi.org/10.1111/fwb.12740>
- Flint, O. S. (1982). *Studies of Neotropical Caddisflies, XXX: Larvae of the Genera of South American Limnephilidae (Trichoptera). Smithsonian contributions to zoology*, 355, 1–30. Recuperado el 10 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.5479/si.00810282.355>.
- García S., M. García S., Parra, D., y Mena, P. (2014). *El país de la biodiversidad: Ecuador (1ra. edición)*. Ministerio del Ambiente, EcoFondo y Jardín Botánico de Quito, 318, Recuperado el 3 de Agosto de 2018 de <https://searchworks.stanford.edu/view/11584520>.
- Gelemanovic, A., Urbanic, G., y Previšic, A. (2016). *Molecular Phylogenetics and Evolution Cryptic diversity in the Western Balkan endemic*

- copepod: Four species in one?. Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100, 124–134. Recuperado el 5 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.010>
- Giessler, S., Mader, E., y Schwenk, K. (1999). *Morphological evolution and genetic differentiation in Daphnia species complexes*. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(4), 710–723. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1999.00065.x>
- Gill, B. A., Harrington, R. A., Kondratieff, B. C., Zamudio, K. R., LeRoy Poff, N., y Chris Funk, W. (2014). *Morphological taxonomy, DNA barcoding, and species diversity in southern Rocky Mountain headwater streams*. *Freshwater Science*, 33(1), 288–301. Recuperado el 15 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1086/674526>
- Gill, B. A., Kondratieff, B. C., Casner, K. L., Encalada, A. C., Flecker, A. S., Gannon, D. G., Funk, W. C. (2016). *Cryptic species diversity reveals biogeographic support for the ‘mountain passes are higher in the tropics’ hypothesis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1832), 1-553. Recuperado el 01 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0553>
- Gillespie, J. J., Johnston, J. S., Cannone, J. J., y Gutell, R. R. (2006). *Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of Apis mellifera (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 657–686. Recuperado el 6 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00689.x>
- Giraldo, P., Uribe, S., y López, A. (2011). Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Colombiana de Entomología*, 273–278. Recuperado el 9 de Noviembre de 2018 de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882011000200020](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882011000200020)

- Glowka, L., Burhenne, F., y Synge, H. (1996). *Guía del Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Suiza: Centro de desarrollo ambiental de la UICN. 30, 1-192. Recuperado el 01 de Octubre de 2018 de <https://portals.iucn.org>.
- Google Earth. (2018). Puntos de recolecta de los especímenes de *Anomalocosmoecus illiesi*. Recuperado de <https://earth.google.com/web/>.
- Hall, M., y Mothes, P. (2008). *The rhyolitic–andesitic eruptive history of Cotopaxi volcano, Ecuador*. *Bulletin of Volcanology*, 70(6), 675–702. Recuperado el 15 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00445-007-0161-2>
- Hamid, S. A., Salmah, C., y Rawi, M. (2017). *Application of aquatic insects (Ephemeroptera, Plecoptera And Trichoptera) in water quality assessment of Malaysian headwater*. *Tropical Life Sciences Research*, 28(2), 143–162. Recuperado el 11 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.21315/tlsr2017.28.2.11>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., y de Waard, J. R. (2003). *Biological identifications through DNA barcodes*. *Proceedings Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. Recuperado el 21 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., y Hallwachs, W. (2004). *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (41) 14812-14817; Recuperado el 18 de Julio de 2018 de <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., y de Waard, J. R. (2003). *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1), 96-99. Recuperado el 5 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hidalgo, S., Gerbe, M. C., Martin, H., Samaniego, P., y Bourdon, E. (2012).

- Role of crustal and slab components in the Northern Volcanic Zone of the Andes (Ecuador) constrained by Sr–Nd–O isotopes. Lithos, 132–133, 180–192. Recuperado el 01 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/J.LITHOS.2011.11.019>*
- Hodkinson, I. D., y Jackson, J. K. (2005). *Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring, with Particular Reference to Mountain Ecosystems. Environmental Management, 35(5), 649–666. Recuperado el 11 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00267-004-0211-x>*
- Holzenthal, R., Thomson, R., Ríos-Touma, B. (2015). *Order Trichoptera. In Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Kansas, Estados Unidos: Academic Press.*
- Holzenthal, R. W., Blahnik, R. J., Prather, A. L., y Kjer, K. M. (2007). *Order Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta), Caddisflies\*. Zootaxa, 1668(1), 639–698. Recuperado el 22 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.29>*
- Holzenthal, R. W., y Calor, A. R. (2017). *Catalog of the Neotropical Trichoptera (Caddisflies). ZooKeys, (654), 1–566. Recuperado el 22 de Agosto de 2018 <https://doi.org/10.3897/zookeys.654.9516>*
- Holzenthal, R. W., y Ríos-Touma, B. (2012). *Contulma paluguillensis (Trichoptera:Anomalopsychidae), a new caddisfly from the high Andes of Ecuador, and its natural history. The Society for Freshwater Science, 31(2), 442–443. Recuperado el 25 de Agosto de 2018 <https://doi.org/10.1899/11-067.1>*
- Instituto Geofísico (EPN). (2017). Resumen de las observaciones efectuadas durante los vuelos a los volcanes Sangay, Tungurahua, Cayambe y Cotopaxi. Escuela Politécnica Nacional. 18(33), 1-8. Recuperado el 11 de Diciembre de 2018 de <https://www.igepn.edu.ec/servicios/noticias/1427-resumen-de-las-observaciones-efectuadas-durante-los-vuelos-a-los-volcanes-sangay-tungurahua-cayambe-y-cotopaxi>.
- Jiménez, P., y Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad

- genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 9(2), 237-248. Recuperado el 14 de Agosto de 2018 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=165055>
- Jiménez Vásquez (2014). Diversidad genética y relaciones filogenéticas de *Orthopterygium huacui* (A. Gray) Hemsley, una anacardiaceae endémica de la vertiente occidental de la Cordillera de los Andes. *Repositorio de Tesis - UNMSM*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2018 de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3863>
- Kjer, K. M., Zhou, X., Frandsen, P. B., Thomas, J. A., y Blahnik, R. J. (2014). *Moving toward species-level phylogeny using ribosomal DNA and COI barcodes: an example from the diverse caddisfly genus Chimarra (Trichoptera: Philopotamidae)*. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 72(3), 345-354. Recuperado el 11 de Octubre de 2018 de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.662.8994&rep=rep1&type=pdf>.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., y Glöckner, F. O. (2013). *Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies*. *Nucleic Acids Research*, 41(1). Recuperado el 01 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Knowles, L. (2009). *Statistical Phylogeography*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), 593–612. Recuperado el 11 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095702>
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets*. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. Recuperado el 15 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lanteri, A. A. (2007). *DNA barcoding and its possible applications to the field of Entomology*. *Rev. Soc. Entomol*, 66 (3-4), 15-25. Recuperado el 11 de Diciembre de 2018 de

<https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/31470>.

- Lehrian, S., Bálint, M., Haase, P., y Pauls, S. U. (2010). *Genetic population structure of an autumn-emerging caddisfly with inherently low dispersal capacity and insights into its phylogeography*. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(3), 1100–1118. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1899/09-100.1>
- Locati, M. D., Pagano, J. F. B., Girard, G., Ensink, W. A., van Olst, M., van Leeuwen, S., Breit, T. M. (2017). *Expression of distinct maternal and somatic 5.8S, 18S, and 28S rRNA types during zebrafish development*. *RNA Society*, 23(8), 1188–1199. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1261/rna.061515.117>
- Maddison, D. R. (2012). *Phylogeny of Bembidion and related ground beetles (Coleoptera: Carabidae: Trechinae: Bembidiini: Bembidiina)*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3), 533–576. Recuperado el 3 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.01.015>
- Maleki-Ravasan, N., Bahrami, A., Vatandoost, H., Shayeghi, M., Koosha, M., y Oshaghi, M. A. (2017). *Molecular Characterization and Phylogenetic Congruence of Hydropsyche sciligr (Tricoptera: Hydropsychidae) Using Mitochondrial and Nuclear Markers*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 11(1), 60–77. Recuperado el 2 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/2322-1984>
- Mallet, J., y Willmott, K. (2003). *Taxonomy: renaissance or Tower of Babel?* *Trends in Ecology y Evolution*, 18(2), 57–59. Recuperado el 5 de Diciembre de 2018 de [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00061-7)
- Mardulyn, P., y Whitfield, J. B. (1999). *Phylogenetic Signal in the COI, 16S, and 28S Genes for Inferring Relationships among Genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): Evidence of a High Diversification Rate in This Group of Parasitoids*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(3), 282–294. Recuperado el 13 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0618>
- Martín-López, B., González, J. A., y Vilardi, S. (2013). *Ciencias de la sostenibilidad*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos

- Alexander von Humboldt, 211, 1-147. Recuperado el 3 de Diciembre de 2018 de <http://hdl.handle.net/20.500.11761/32937>
- Mary, M.R., Mariana, B., Louisa, S., Marie, H., (2017). Explaining large mitochondrial sequence differences within a population sample. *Royal Society Open Science*, 4(11), 170730. Recuperado el 23 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1098/rsos.170730>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2015). Quinto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Quito, Ecuador: Indigo480.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2016). Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030, 345-360. Recuperado el 3 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/978-9942-22-081-3>
- Monaghan, M. T., Inward, D. J. G., Hunt, T., y Vogler, A. P. (2007). *A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles)*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(2), 674–692. Recuperado el 23 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.06.009>
- Morinière, J., Hendrich, L., Balke, M., Beermann, A. J., König, T., Hess, M., Haszprunar, G. (2017). *A DNA barcode library for Germany's mayflies, stoneflies and caddisflies (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera)*. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), 1293–1307. Recuperado el 5 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12683>
- Mothes, P. A., y Hall, M. L. (2008). The plinian fallout associated with Quilotoa's 800 yr BP eruption, Ecuadorian Andes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 176(1), 56–69. Recuperado el 6 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/J.JVOLGEORES.2008.05.018>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., y Kent, J. (2000). *Biodiversity hotspots for conservation priorities*. *Nature*, 403(6772), 853–858. Recuperado el 15 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Navajas, M. (1998). *Host plant associations in the spider mite Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae): insights from molecular phylogeography*. *Experimental and Applied Acarology*, 22(4), 201–



214. Recuperado el 23 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1023/A:1006062214318>
- Navajas, M., y Fenton, B. (2000). *The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. Experimental y Applied Acarology*, 24(10–11), 751–774. Recuperado el 3 de Noviembre de 2018 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006497906793>.
- Nielsen, S. A., y Kristensen, M. (2011). *Morphological and molecular identification of species of the Obsoletus group (Diptera: Ceratopogonidae) in Scandinavia. Parasitology Research*, 109(4), 1133–1141. Recuperado el 3 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2357-9>
- Ninahuanca, A; Arteaga, D; Luna, R. (2013). Identificación de tricópteros de altura de bolivia y Perú mediante el código de barras del ADN. *SciELO*, 24(2), 76–82. Recuperado el 15 de Diciembre de 2018 de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-62332013000300008](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-62332013000300008).
- Pauls, S. U., Lumbsch, H. T., y Haase, P. (2006). *Phylogeography of the montane caddisfly Drusus discolor: evidence for multiple refugia and periglacial survival. Molecular Ecology*, 15(8), 2153–2169. Recuperado el 22 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02916.x>
- Pfenninger, M., y Schwenk, K. (2007). *Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 121. Recuperado el 2 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-121>
- Pistolesi, M., Cioni, R., Rosi, M., Cashman, K. V., Rossotti, A., y Aguilera, E. (2013). *Evidence for lahar-triggering mechanisms in complex stratigraphic sequences: the post-twelfth century eruptive activity of Cotopaxi Volcano, Ecuador. Bulletin of Volcanology*, 75(3), 698. Recuperado el 12 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00445-013-0698-1>
- Previšić, A., Walton, C., Kučinić, M., Mitrikeski, P. T., y Kerovec, M. (2009).

- Pleistocene divergence of Dinaric Drusus endemics (Trichoptera, Limnephilidae) in multiple microrefugia within the Balkan Peninsula. Molecular Ecology*, 18(4), 634–647. Recuperado el 13 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04046.x>
- Previšić, A., Gelemanović, A., Urbanič, G., y Ternjej, I. (2016). *Cryptic diversity in the Western Balkan endemic copepod: Four species in one? Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100, 124–134. Recuperado el 5 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.010>
- Previšić, A., Graf, W., Vitecek, S., Kučinić, M., Bálint, M., Keresztes, L., Waringer, J. (2014). *Cryptic diversity of caddisflies in the Balkans: the curious case of Ecclisopteryx species (Trichoptera: Limnephilidae). Arthropod Systematics y Phylogeny*, 72(3), 309–329. Recuperado el 2 de Julio de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810791>.
- Prommi, T.-O., Laudee, P., y Chareonviriyaphap, T. (2014). *Biodiversity of Adult Trichoptera and Water Quality Variables in Streams, Northern Thailand. APCBEE Procedia*, 10, 292–298. Recuperado el 22 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/J.APCBEE.2014.10.055>
- Rázuri-Gonzales, E., Holzenthal, R. W., y Ríos-Touma, B. (2017). *Two new species of the rare Neotropical caddisfly genus Amphoropsyche Holzenthal (Trichoptera, Leptoceridae). ZooKeys*, (707), 63–72. Recuperado el 15 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.3897/zookeys.707.20759>
- Ríos-Touma, B., Holzenthal, R. W., Huisman, J., Thomson, R., y Rázuri-Gonzales, E. (2017b). *Diversity and distribution of the Caddisflies (Insecta: Trichoptera) of Ecuador. PeerJ*, 5, e2851. Recuperado el 22 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.7717/peerj.2851>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., y Sánchez-Gracia, A. (2017). *DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302. Recuperado el 5 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Saitou, N., y Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for*

- reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. Recuperado el 2 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sales, J. B. de L., Rodrigues-Filho, L. F. d. S., Ferreira, Y. do S., Carneiro, J., Asp, N. E., Shaw, P. W., Sampaio, I. (2017). *Divergence of cryptic species of *Doryteuthis plei* Blainville, 1823 (Loliginidae, Cephalopoda) in the Western Atlantic Ocean is associated with the formation of the Caribbean Sea. Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106, 44–54. Recuperado el 12 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.09.014>
- Schmidt, S., Driver, F., y De Barro, P. (2006). *The phylogenetic characteristics of three different 28S rRNA gene regions in Encarsia (Insecta, Hymenoptera, Aphelinidae). Organisms Diversity y Evolution*, 6(2), 127–139. Recuperado el 22 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/J.ODE.2005.07.002>
- Shaw, A. J., McDaniel, S. F., Werner, O., y Ros, R. M. (2009). *Phylogeography and Phylodemography. The Bryologist*, 5(202), 373-383. Recuperado el 9 de Octubre de 2018 de [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(2002\)105\[0373:PAP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(2002)105[0373:PAP]2.0.CO;2)
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., y Flook, P. (1994). *Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651–701. Recuperado el 18 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos., S. (2007). *Guía de campo de los Mamíferos del Ecuador. Mastozoología neotropical*. 14(2), 576. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018 de [https://www.researchgate.net/publication/322953093\\_Guia\\_de\\_campo\\_de\\_los\\_mamiferos\\_del\\_Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/322953093_Guia_de_campo_de_los_mamiferos_del_Ecuador).
- Söller, R., Wohltmann, A., Witte, H., y Blohm, D. (2001). *Phylogenetic Relationships within Terrestrial Mites (Acari: Prostigmata,*

- Parasitengona*) Inferred from Comparative DNA Sequence Analysis of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(1), 47–53. Recuperado el 22 de Agosto de <https://doi.org/10.1006/MPEV.2000.0855>
- Springer, M. (2010). Capítulo 7: Trichoptera. *Revista de Biología Tropical*, 58(4), 151-198. Recuperado el 2 de Agosto de 2018 de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442010000800007](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000800007)
- Stillwell, R. C., Blanckenhorn, W. U., Teder, T., Davidowitz, G., y Fox, C. W. (2010). Sex Differences in Phenotypic Plasticity Affect Variation in Sexual Size Dimorphism in Insects: From Physiology to Evolution. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 227–245. Recuperado el 5 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085500>
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678–687. Recuperado el 14 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
- Tszydel, M., Markowski, M., Majecki, J., Błońska, D., y Zieliński, M. (2015). Assessment of water quality in urban streams based on larvae of *Hydropsyche angustipennis* (Insecta, Trichoptera). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 14687–14701. Recuperado el 15 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4638-9>
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555–561. Recuperado el 13 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Vuataz, L., Sartori, M., Gattolliat, J. L., y Monaghan, M. T. (2013). Endemism and diversification in freshwater insects of Madagascar revealed by

- coalescent and phylogenetic analysis of museum and field collections. Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(3), 979–991. Recuperado el 3 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.12.003>
- Waringer, J., Previšić, A., Kučinić, M., Graf, W., Vitecek, S., Keresztes, L., Pauls, S. U. (2016). *Larval morphology of the Western Balkans endemic caddisflies Drusus krusniki Malicky 1981, D. vernonensis Malicky 1989, and D. vespertinus Marinković 1976 (Trichoptera, Limnephilidae, Drusinae)*. *Zootaxa*, 4083(4), 483–500. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4083.4.2>
- XIA, Y., GU, H.-F., PENG, R., CHEN, Q., ZHENG, Y.-C., MURPHY, R. W., y ZENG, X.-M. (2012). *COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae)*. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), 48–56. Recuperado el 22 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03055.x>
- Yi, S., Zhong, J., Huang, S., Wang, S., y Wang, W. (2017). *Morphological comparison and DNA barcoding of four closely related species in the genera Misgurnus and Paramisgurnus (Cypriniformes: Cobitidae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 70, 50–59. Recuperado el 2 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.10.019>
- Zhou, X., Kjer, K. M., y Morse, J. C. (2007). *Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta:Trichoptera) using DNA sequences*. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(4), 719–742. Recuperado el 19 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1899/06-089.1>

## **ANEXOS**

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+D)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)		
T92	161	3233.258	1845.598	-761.164	n/a	n/a	5.59	0.336	0.336	0.164	0.164	0.023	0.011	0.142	0.023	0.142	0.011	0.023	0.290	0.011	0.290	0.011	0.290	0.011	
T92+I	162	3243.885	1847.614	-761.164	0.00	n/a	5.59	0.336	0.336	0.164	0.164	0.023	0.011	0.142	0.023	0.142	0.011	0.023	0.290	0.011	0.290	0.011	0.290	0.011	
T92+G	162	3243.885	1847.614	-761.164	n/a	200.00	5.59	0.336	0.336	0.164	0.164	0.023	0.011	0.142	0.023	0.142	0.011	0.023	0.290	0.011	0.290	0.011	0.290	0.011	
HKY	163	3250.954	1846.071	-759.385	n/a	n/a	5.59	0.308	0.364	0.181	0.148	0.025	0.013	0.127	0.021	0.156	0.010	0.021	0.313	0.010	0.265	0.025	0.013	0.013	
T92+G+I	163	3254.512	1849.630	-761.164	0.00	200.00	5.59	0.336	0.336	0.164	0.164	0.023	0.011	0.142	0.023	0.142	0.011	0.023	0.290	0.011	0.290	0.011	0.290	0.011	
TN93	164	3260.739	1847.246	-758.964	n/a	n/a	5.59	0.308	0.364	0.181	0.148	0.025	0.012	0.166	0.021	0.117	0.010	0.021	0.235	0.010	0.347	0.025	0.012	0.012	
HKY+I	164	3261.580	1848.087	-759.385	0.00	n/a	5.59	0.308	0.364	0.181	0.148	0.025	0.013	0.127	0.021	0.156	0.010	0.021	0.313	0.010	0.265	0.025	0.013	0.013	
HKY+G	164	3261.581	1848.087	-759.385	n/a	200.00	5.59	0.308	0.364	0.181	0.148	0.025	0.013	0.127	0.021	0.156	0.010	0.021	0.313	0.010	0.265	0.025	0.013	0.013	
TN93+I	165	3271.366	1849.262	-758.964	0.00	n/a	5.59	0.308	0.364	0.181	0.148	0.025	0.012	0.166	0.021	0.117	0.010	0.021	0.235	0.010	0.347	0.025	0.012	0.012	
TN93+G	165	3271.366	1849.262	-758.964	n/a	200.00	5.59	0.308	0.364	0.181	0.148	0.025	0.012	0.166	0.021	0.117	0.010	0.021	0.235	0.010	0.347	0.025	0.012	0.012	
HKY+G+I	165	3272.207	1850.103	-759.385	0.00	200.00	5.59	0.308	0.364	0.181	0.148	0.025	0.013	0.127	0.021	0.156	0.010	0.021	0.313	0.010	0.265	0.025	0.013	0.013	
TN93+G+I	166	3281.993	1851.278	-758.964	0.00	200.00	5.59	0.308	0.364	0.181	0.148	0.025	0.012	0.166	0.021	0.117	0.010	0.021	0.235	0.010	0.347	0.025	0.012	0.012	
K2	160	3284.554	1905.505	-792.125	n/a	n/a	5.56	0.250	0.250	0.250	0.250	0.019	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.019
JC	159	3288.622	1918.184	-799.473	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR	167	3292.004	1852.679	-758.656	n/a	n/a	4.07	0.308	0.364	0.181	0.148	0.027	0.011	0.151	0.023	0.118	0.023	0.019	0.236	0.009	0.314	0.057	0.011	0.011	
K2+I	161	3295.181	1907.521	-792.125	0.00	n/a	5.56	0.250	0.250	0.250	0.250	0.019	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.019
K2+G	161	3295.181	1907.521	-792.126	n/a	200.00	5.56	0.250	0.250	0.250	0.250	0.019	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.212	0.019	0.019
JC+I	160	3299.249	1920.200	-799.473	0.00	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G	160	3299.250	1920.200	-799.473	n/a	200.00	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR+G	168	3302.437	1854.502	-758.559	n/a	200.00	4.25	0.308	0.364	0.181	0.148	0.027	0.009	0.153	0.023	0.118	0.023	0.016	0.236	0.008	0.319	0.057	0.009	0.009	

Anexo 1. Matriz con los mejores modelos de sustitución de nucleótidos para el conjunto de datos.

Se considera que los modelos con las puntuaciones BIC más bajas (Criterio de Información Bayesiana) describen mejor el patrón de sustitución. T92: Tamura de tres parámetros.

Activar Windows  
 Ir a Configuración para activar W





Anexo 2.. Alineamiento múltiple de los fragmentos del gen COI correspondientes a la región 3'. Se muestran tres muestras de cada población: Carchi (A), San Pedro (SP), Pita (PI) y Chimborazo (C).



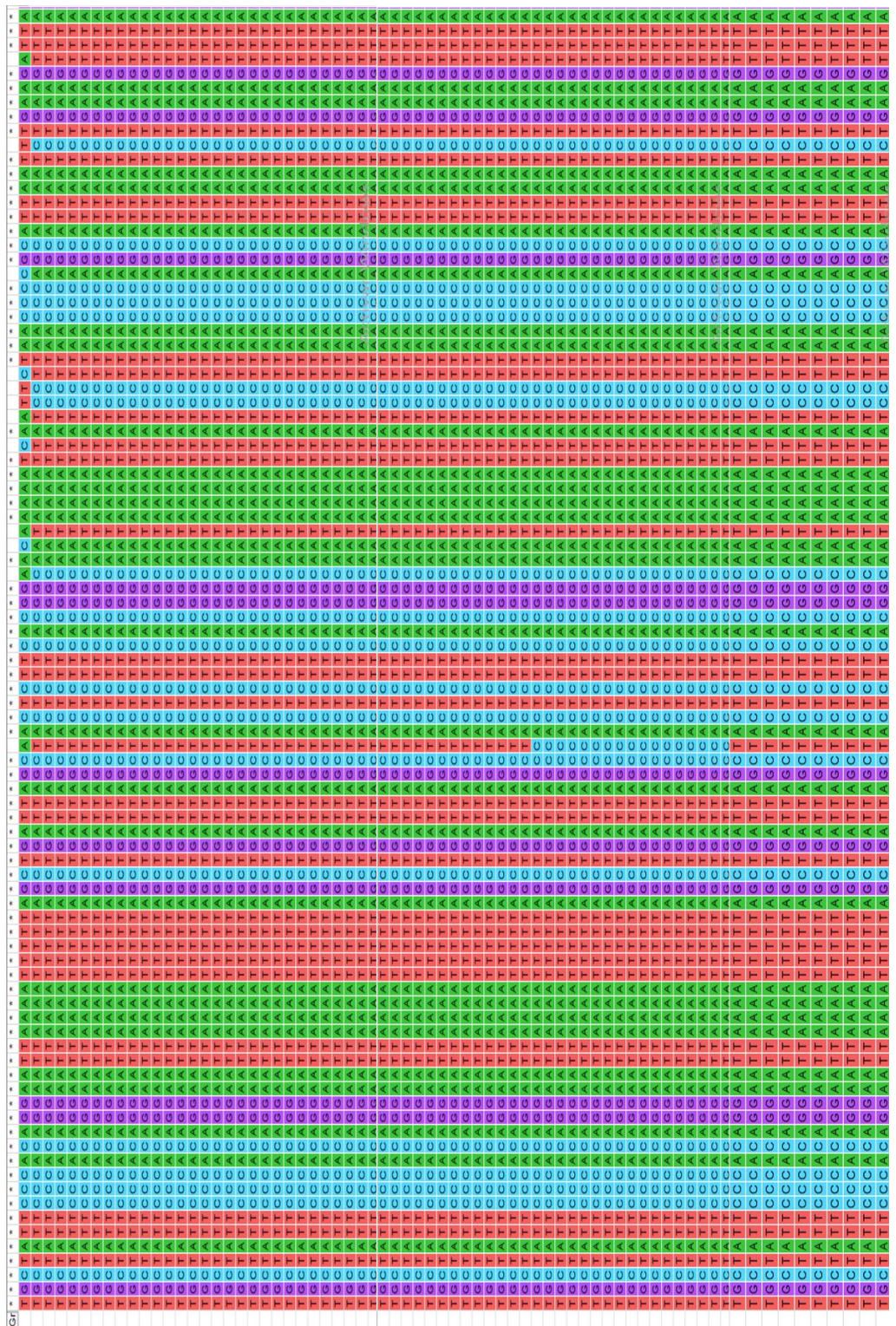
Species/Abby	Gr
1. Drusus_vermoneis	
2. A1	
3. A2	
4. A3	
5. CA	
6. A5	
7. A6	
8. A7	
9. A8	
10. A9	
11. A10	
12. A11	
13. A12	
14. SP1-1	
15. SP1-2	
16. SP1-3	
17. SP1-4	
18. SP1-5	
19. SP2-1	
20. SP2-2	
21. SP2-3	
22. SP2-4	
23. SP2-5	
24. SP2-6	
25. SP2-7	
26. SP2-8	
27. SP2-9	
28. SP2-10	
29. SP2-11	
30. SP3-1	
31. SP3-2	
32. SP3-3	
33. SP3-4	
34. SP3-5	
35. SP3-6	
36. SP3-7	
37. SP3-8	
38. SP3-9	
39. SP3-10	
40. SP3-11	
41. SP3-12	
42. SP3-13	
43. SP3-14	
44. P11-1	
45. P11-2	
46. P11-3	
47. P12-1	
48. P12-2	
49. P12-3	
50. P12-4	
51. P12-5	
52. P12-6	
53. P12-7	
54. P12-8	
55. P12-9	
56. P12-10	
57. P12-11	
58. P12-12	
59. P12-13	
60. P12-14	
74. C2	
75. C3	
76. C4	
77. C5	
78. C6	
79. C7	
80. C8	
81. C9	
82. C10	



Species/Abbrev	Gr
1. Drusus_venemonensis	
2. A1	
3. A2	
4. A3	
5. CA	
6. A5	
7. A6	
8. A7	
9. A8	
10. A9	
11. A10	
12. A11	
13. A12	
14. SP1-1	
15. SP1-2	
16. SP1-3	
17. SP1-4	
18. SP1-5	
19. SP2-1	
20. SP2-2	
21. SP2-3	
22. SP2-4	
23. SP2-5	
24. SP2-6	
25. SP2-7	
26. SP2-8	
27. SP2-9	
28. SP2-10	
29. SP2-11	
30. SP3-1	
31. SP3-2	
32. SP3-3	
33. SP3-4	
34. SP3-5	
35. SP3-6	
36. SP3-7	
37. SP3-8	
38. SP3-9	
39. SP3-10	
40. SP3-11	
41. SP3-12	
42. SP3-13	
43. SP3-14	
44. P11-1	
45. P11-2	
46. P12-1	
47. P12-2	
48. P12-3	
49. P12-4	
50. P12-5	
51. P12-6	
52. P12-7	
53. P12-8	
54. P12-9	
55. P12-10	
56. P12-11	
57. P12-12	
58. P12-13	
59. P12-14	
60. P12-15	
73. C1	
74. C2	
75. C3	
76. C4	
77. C5	
78. C6	
79. C7	
80. C8	
81. C9	
82. C10	



Species/Abbrv	Gr
1. <i>Drosus_vennonensis</i>	
2. A1	
3. A2	
4. A3	
5. CA	
6. A6	
7. A7	
8. A7	
9. A8	
10. A9	
11. A10	
12. A11	
13. A12	
14. SP1-1	
15. SP1-2	
16. SP1-3	
17. SP1-4	
18. SP1-5	
19. SP2-1	
20. SP2-2	
21. SP2-3	
22. SP2-4	
23. SP2-5	
24. SP2-6	
25. SP2-7	
26. SP2-8	
27. SP2-9	
28. SP2-10	
29. SP2-11	
30. SP3-1	
31. SP3-2	
32. SP3-3	
33. SP3-4	
34. SP3-5	
35. SP3-6	
36. SP3-7	
37. SP3-8	
38. SP3-9	
39. SP3-10	
40. SP3-11	
41. SP3-12	
42. SP3-13	
43. SP3-14	
44. P1-1	
45. P11-2	
46. P11-3	
47. P12-1	
48. P12-2	
49. P12-3	
50. P12-4	
51. P12-5	
52. P12-6	
53. P12-7	
54. P12-8	
55. P12-9	
56. P12-10	
57. P12-11	
58. P12-12	
59. P12-13	
60. P12-14	
73. C1	
74. C2	
75. C3	
76. C4	
77. C5	
78. C6	
79. C7	
80. C8	
81. C9	
82. C10	





Species/Abbrev	Gr
1. Dursus_venemensis	
2. A2	
3. A3	
4. A4	
5. A5	
6. A6	
7. A7	
8. A8	
9. A9	
10. A10	
11. A11	
12. A12	
13. A13	
14. SP1-1	
15. SP1-2	
16. SP1-3	
17. SP1-4	
18. SP2-1	
19. SP2-2	
20. SP2-3	
21. SP2-4	
22. SP2-5	
23. SP2-6	
24. SP2-7	
25. SP2-8	
26. SP2-9	
27. SP2-10	
28. SP2-11	
29. SP2-12	
30. SP2-13	
31. SP2-14	
32. SP2-15	
33. SP3-1	
34. SP3-2	
35. SP3-3	
36. SP3-4	
37. SP3-5	
38. SP3-6	
39. SP3-7	
40. SP3-8	
41. SP3-9	
42. SP3-10	
43. SP3-11	
44. SP3-12	
45. SP3-13	
46. SP3-14	
47. P1-1	
48. P1-2	
49. P1-3	
50. P1-4	
51. P1-5	
52. P1-6	
53. P1-7	
54. P1-8	
55. P1-9	
56. P1-10	
57. P1-11	
58. P1-12	
59. P1-13	
60. P1-14	
61. P1-15	
62. P1-16	
63. P1-17	
64. P1-18	
65. P1-19	
66. P1-20	
67. P1-21	
68. P1-22	
69. P1-23	
70. P1-24	
71. P1-25	
72. P1-26	
73. C1	
74. C2	
75. C3	
76. C4	
77. C5	
78. C6	
79. C7	
80. C8	
81. C9	
82. C10	

