



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y LA FILOGEOGRAFÍA DEL
GÉNERO *POLYPEDILUM* EN UN GRADIENTE ALTITUDINAL.

Autora

Ana Mishell Bravo Castro

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y LA FILOGEOGRAFÍA DEL
GÉNERO *POLYPEDILUM* EN UN GRADIENTE ALTITUDINAL.

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

Profesora Guía
Dra. María Isabel Ballesteros Redondo

Autora
Ana Mishell Bravo Castro

Año
2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, "Análisis de la diversidad genética y la filogeografía del género *Polypedilum* en un gradiente altitudinal", a través de reuniones periódicas con el estudiante Ana Mishell Bravo Castro, 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 con mención en Genética

CI: 1757168610

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, "Análisis de la diversidad genética y la filogeografía del género *Polypedilum* en un gradiente altitudinal", de Ana Mishell Bravo Castro, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Christian Patricio Villamarín Flores

Doctor en Ecología Fundamental y Aplicada

CI: 1002339404

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”.

Ana Mishell Bravo Castro

CI: 1723535637

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Isabel Ballesteros por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por su apoyo y confianza en mi formación en el trabajo de laboratorio y área de investigación.

Al Docente Investigador Christian Villamarín por permitirme formar parte y desarrollar este proyecto.

A los empleados del área del Investigación de la UDLA por brindarme su apoyo en el trabajo de laboratorio.

DEDICATORIA

Para aquellos que ya no se encuentran entre los vivos y siempre confiaron en que lo lograría.

RESUMEN

El análisis de la diversidad genética y la filogeografía de un género permite identificar especies y determinar la distribución geográfica de las mismas, estos estudios se aplican sobre todo a poblaciones de interés como bioindicadores de la calidad del agua; donde los insectos son las poblaciones más usadas en este tipo de investigaciones. Los estudios previos en los ríos de la provincia de El Oro mostraron al género *Polypedilum* como el más común en casi todos los ríos de esta provincia, por ello en este estudio se planteó analizar la diversidad genética y la filogeografía de este género un gradiente altitudinal. En primer lugar, se obtuvo el material genético de 131 larvas de dicho género, la extracción con mayor rendimiento fue mediante trituración con pistilo, extracción con CTAB y purificación con Fenol-cloroformo. En segundo lugar, se obtuvieron secuencias de 464 pares de bases de la región 5' de la subunidad 1 de la Citocromo Oxidasa mediante una PCR anidada y un proceso de secuenciación con los cebadores MT6 y Nancy; del 52,67% de la población. En tercer lugar, se analizó la variabilidad genética del género a través del modelo de Kimura de 2 parámetros en el programa MEGA7 con lo que se determinó que la población tuvo un 13% de divergencia genética. Además, a nivel de gradiente, fue el rango altitudinal 2 el grupo con mayor diversidad genética (12,62%). Por otro lado, a nivel de los puntos de muestreo, el punto EOP020 correspondiente al río Ortega fue la localidad con mayor diversidad genética (13,22%), mientras que el punto EOP049 correspondiente al río Casacay fue el punto con menor diversidad (4,06%). A continuación, se determinaron 25 unidades taxonómicas experimentales (OTUs) para realizar el análisis filogenético, debido a la falta de información bioinformática de las especies del género *Polypedilum* del Ecuador mediante el programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) que usa el porcentaje de divergencia en las muestras para agruparlas en unidades taxonómicas operativas y con ellas se realizó el análisis filogenético, con el cual se concluyó que existen poblaciones distribuidas a lo largo de toda la provincia y otras poblaciones son específicas de un punto de muestreo. En conclusión, el género *Polypedilum* muestra una gran diversidad genética con lo que se

presume una gran variedad de especies y el análisis filogenético reflejó la posibilidad de que el gradiente altitudinal no es una barrera para el flujo genético de este género en la Provincia de El Oro, aunque existen OTUs que son específicos de rangos altitudinales altos o bajo y esto podría deberse a otras condiciones ecológicas como la cantidad de materia orgánica o contaminantes de los ríos en los cuales se recogieron las muestras.

Palabras clave: *Polypedilum*, *DNA barcodes*, COI, diversidad genética, filogeografía, El Oro, OTUs, gradiente altitudinal, Ecuador.

ABSTRACT

The analysis of genetic diversity and the phylogeography of a genus allows us to identify species and determine their geographical distribution; these studies are applied mainly to populations of interest as bioindicators of water quality; where insects are the most used populations in this type of research. Previous studies in the rivers of the province of El Oro showed the genus *Polypedilum* as the most common in almost all rivers in this province, so in this study it was proposed to analyze the genetic diversity and phylogeography of this genus an altitudinal gradient. First, the genetic material of 131 larvae of this genus was obtained, extraction with greater yield was by trituration with pistil, extraction with CTAB and purification with phenol-chloroform. Second, sequences of 464 base pairs from the 5' region of subunit 1 of Cytochrome Oxidase were obtained by nested PCR and a sequencing process with primers MT6 and Nancy; of 52.67% of the population. Third, the genetic variability of the genus was analyzed through the Kimura model of 2 parameters in the MEGA7 program, which determined that the population had a 13% genetic divergence. In addition, at the gradient level, the altitudinal range 2 was the group with the highest genetic diversity (12.62%). On the other hand, at the sampling point level, the EOP020 point corresponding to the Ortega River was the location with the greatest genetic diversity (13.22%), while the EOP049 point corresponding to the Casacay River was the point with the least diversity (4,06%). Then, 25 experimental taxonomic units (OTUs) were determined to carry out the phylogenetic analysis, due to the lack of bioinformatic information of the *Polypedilum* species of Ecuador through the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) program that uses the percentage of divergence in the samples to be grouped into operational taxonomic units and with them the phylogenetic analysis was carried out, with which it was concluded that there are populations distributed throughout the province and other populations are specific to a sampling point. In conclusion, the genus *Polypedilum* shows a great genetic diversity with what is presumed a great variety of species and the phylogenetic analysis reflected the possibility that the altitudinal gradient is not a barrier to the genetic flow of this genus in the Province of El Oro , although there are OTUs

that are specific to high or low altitudinal ranges and this could be due to other ecological conditions such as the amount of organic matter or pollutants of the rivers in which the samples were collected.

Key words: *Polypedilum*, DNA barcodes, COI, genetic diversity, phylogeography, El Oro, OTUs, altitudinal gradient, Ecuador.

ÍNDICE

1. Capítulo I: Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Problemática	4
1.3. Objetivo general.....	6
1.4. Objetivos específicos.....	6
1.5. Justificación	6
2. Capítulo II: Marco Teórico.....	9
2.1. Macroinvertebrados	9
2.1.1. Generalidades	9
2.2. Macroinvertebrados acuáticos	10
2.2.1. Bioindicadores.....	10
2.2.2. Hábitats de los macroinvertebrados acuáticos	11
2.2.2.1. Ríos y Riachuelos de los Andes	13
2.2.2.1.1. Ríos en la provincia de El Oro	17
2.3. Biogeografía	21
2.3.1. Altitud como limitante de las especies.....	24
2.4. Clasificación.....	24
2.4.1. Clasificación taxonómica	25
2.4.1.1. Clasificación taxonómica clásica.....	25
2.4.1.1.1. Clase Insecta.....	26
2.4.1.1.2. Orden Diptera (dípteros acuáticos).....	27
2.4.1.1.3. Familia Chironomidae.....	29
2.4.1.1.4. Género <i>Polypedilum</i>	31
2.4.1.2. Clasificación taxonómica molecular	34
2.4.1.3. Análisis genéticos	36
2.4.1.3.1 Técnica de Código de barras de ADN o <i>DNA barcoding</i>	36

2.4.1.3.2. Filogeografía.....	39
2.5. Quironómidos en el Ecuador	40
2.5.1. República del Ecuador	40
2.5.2. Identificación de Quironómidos en el Ecuador	42
3. Capítulo III: Procedimientos	42
3.1. Población y muestra	42
3.2. Lugar de muestreo.....	43
3.3. Materiales y métodos	46
3.3.1. Extracción de ADN	46
3.3.1.1. Lisis de las muestras	46
3.3.1.2. Método de Extracción de ADN.....	47
3.3.2. Análisis del ADN.....	50
3.3.2.1. Cuantificación de ADN.....	50
3.3.2.2. Visualización del ADN.....	50
3.3.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	50
3.3.3.1. Cebadores empleados en la PCR.....	50
3.3.3.2. Optimización de la Reacción en cadena de la Polimerasa.....	52
3.3.4. Visualización de los productos de amplificación.....	55
3.3.5. Secuenciación	55
3.3.6. Análisis Bioinformático	55
3.3.6.1. Análisis de la Variabilidad Genética.....	56
3.3.6.2. Determinación de Unidades Taxonómicas Operativas (OTUS) para el análisis filogenético	56
3.3.6.3. Análisis filogenético	58
4. Capítulo IV: Resultados y Discusión	58
4.1. Extracción de ADN	58
4.1.1. Lisis de las muestras	58

4.1.2. Elección del método de extracción	60
4.2. Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	62
4.3. Análisis Genético	67
4.3.1. Secuenciación	67
4.3.2. Identificación con <i>DNA barcodes</i>	68
4.3.3. Variabilidad genética del Género	70
4.3.3.1. Variabilidad genética según el Rango Altitudinal y según el punto de muestreo	72
4.3.3.1.1. Rango Altitudinal 1	72
4.3.3.1.1.1. Punto EOP049	73
4.3.3.1.1.2. Punto EOP050	74
4.3.3.1.2. Rango Altitudinal 2	75
4.3.3.1.2.1. Punto EOP001	76
4.3.3.1.2.2. Punto EOP020	77
4.3.3.1.3. Rango Altitudinal 3	78
4.3.3.1.3.1. Punto EOP004	79
4.3.3.1.3.2. Punto EOP017	80
4.3.4. Análisis de divergencia y similitud con muestras del género <i>Polypedilum</i> de otros países	82
4.3.5. Análisis de divergencia con el software <i>Automatic Barcode Gap Discovery</i> o <i>ABGD</i>	84
4.3.6. Análisis filogenético	85
5. Conclusiones y Recomendaciones	98
5.1. Conclusiones	98
5.2. Recomendaciones	99
REFERENCIAS	102
ANEXOS	118

1. Capítulo I: Introducción

1.1. Antecedentes

La biodiversidad es el término que refleja la diversidad de especies en un lugar determinado, dicha variedad es una variable dinámica que se ajusta a los cambios producidos por las condiciones ambientales, siendo las perturbaciones antropogénicas (actividad humana) las que producen uno de los mayores cambios en los ecosistemas; por ello los organismos están en constante evolución para sobrevivir a los cambios que sufre su hábitat (Al-Shami et al., 2010; Gill et al., 2016). La supervivencia de dichos organismos es importante para el funcionamiento de los ecosistemas, ya que estos cumplen funciones como: fotosintetizadores, formadores de suelos, fijadores de nutrientes, etc. Uno de los procesos más importantes es la fijación o recirculación de nutrientes en los ecosistemas, dicho proceso es realizado por macroinvertebrados en sistemas acuáticos; estos organismos son capaces de procesar grandes cantidades de materia orgánica en estadios jóvenes y luego como adultos son capaces de hacerlo en ecosistemas terrestres, es por esto que existe un gran interés en el estudio de las poblaciones de macroinvertebrados (Álvarez et al., 2013; Nieto et al., 2017). Gracias a dichas investigaciones se plantea la hipótesis del disturbio intermedio que predice que la diversidad biótica será mayor en las comunidades sujetas a un moderado nivel de disturbio o alteración, dependiendo de la heterogeneidad espacio-temporal resultante, la cual mantiene a la comunidad en un estado de mayor estabilidad (Al-Shami et al., 2010; GADPEO - INABIO, 2018; Gill et al., 2016; Nieto et al., 2016).

El grupo taxonómico Chironomidae es una familia de macroinvertebrados, considerada a nivel mundial como indicador biológico de importante valor diagnóstico de las condiciones ambientales (Bervoets et al., 1998; Groenendijk et al., 2002; Loayza-Muro et al., 2013; Walker et al., 2008). Además, son

dominantes en muchos ecosistemas especialmente aquellos con niveles de contaminación orgánica (Groenendijk et al., 2002; Medina and Paggi, 2004; Saether, 2016). Por otro lado, la familia Chironomidae es conocida por una alta diversidad de géneros y especies muy abundantes en distintos tipos de ambientes, siendo muchas veces los únicos representantes en ambientes contaminados y tienen la particularidad de ser la base de cadena trófica (Groenendijk et al., 2002; Walker et al., 2008; Villamarín, 2013; Saether, 2016).

Investigaciones previas reflejan que existen 15 000 especies de la familia de quironómidos alrededor del mundo y que dichas investigaciones de identificación de especies son mucho más realizadas en el hemisferio norte. Sin embargo, en América del Sur se han descrito casi el 50% del total de las especies estimadas y se conoce muy poco de su distribución y ecología (Paggi, 2004; Panatta et al., 2006; Tejerina and Molineri, 2007; Takahashi et al., 2008). Actualmente, los estudios de dicha familia han ido aumentando, aunque se usan técnicas de análisis molecular y ya no tanto taxonómicas por la rapidez, el costo y la efectividad de dichas pruebas, pero sobre todo porque dichos individuos son difíciles de diferenciar en fase larvaria a nivel de especie o en muchos casos aún a nivel de género (Marchese et al., 2004; Panatta et al., 2006; Walker et al., 2008; Al-Shami et al., 2010). También, con el análisis molecular se puede generar mucha información a la vez, por ejemplo: se puede identificar nuevas especies, analizar su distribución geográfica y sus interacciones ecológicas (Baranov et al., 2017; Holzenthal & Calor, 2017; Previšić et al., 2009).

Uno de los géneros más representativos de la familia de quironómidos es el género *Polypedilum* que ocupa un amplio rango de hábitats de agua dulce y comúnmente son los dípteros más abundantes en ríos y arroyos. Por estas características y porque son bioindicadores de contaminación orgánica en sistemas acuáticos, es que los investigadores muestran interés en el estudio de las poblaciones de este tipo de macroinvertebrados (Marchese et al., 2004; Walker et al., 2008; Prat et al., 2011; Sari et al., 2015). Es de suma importancia

entender que los individuos del género *Polypedilum* y de otros géneros de la familia de los quironómidos han sido capaces de sobrevivir gracias a cambios en sus ciclos biológicos, estrategias de reproducción, dinámica de poblaciones, entre otros (Medina & Paggi, 2004; Panatta et al., 2006; Takahashi et al., 2008; Tejerina & Molineri, 2007).

La falta de caracterización de las especies del género *Polypedilum* se ha producido porque son un grupo muy abundante con gran diversidad genética y por la falta de variabilidad morfológica en la fase larvaria (Al-Shami et al., 2010; Manaaki Whenua, 2013). Pero dichos problemas han sido solucionados con el análisis a nivel molecular que incluso permite detectar variaciones que no se reflejan a nivel morfológico en su fase adulta (Fuentes & Donato, 2014; Song et al., 2016).

Actualmente, gracias a las herramientas de biología molecular y bioinformáticas, también se puede definir la filogeografía de una especie, género o familia en un tiempo y espacio determinado. La filogeografía es la rama que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos. Esta disciplina plantea que los organismos exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la geografía (Asghar et al. 2015; Domínguez-Domínguez et al., 2009; Rodríguez-Correa et al., 2017).

Para este tipo de análisis se utilizan secuencias conservadas del genoma con las cuales se puede estimar la variabilidad de las poblaciones en diferentes ecosistemas. Una de las regiones más comunes para analizar macroinvertebrados es la región 5' de la subunidad 1 del gen Citocromo Oxidasa del genoma mitocondrial, dado que presenta una alta tasa de mutación, no recombinación y su herencia es casi exclusivamente materna (Fesl, 2002; Pauls et al., 2006; Prat et al., 2013).

El Ecuador es un país megadiverso que posee una infinidad de recursos genéticos aún por identificar, pero por la actividad del hombre muchos de estos

se pierden. Por ejemplo, el género *Polypedilum* refleja contaminación orgánica en ecosistemas acuícolas, donde, la pérdida de cobertura vegetal en sus hábitats es frecuente (GADPEO - INABIO, 2018). Se conoce que esto ocurre en los ríos de la provincia de El Oro y por ello se produce un deterioro de los ecosistemas acuáticos ya que la regulación hídrica, el balance energético y los factores fisicoquímicos se ven alterados con consecuencias graves para la biota acuática (Scheibler et al., 2008; Walker et al., 2008; Al-Shami et al., 2010; GADPEO INABIO, 2018).

1.2. Problemática

A nivel global, existen regiones en donde las investigaciones de la familia Chironomidae y su distribución ha sido muy estudiadas, pero también existen localidades en donde esta familia no ha sido estudiada, ni caracterizada. Las zonas con menor información sobre dicha familia son las neotropicales; aunque en los últimos años han incrementado los estudios de este grupo taxonómico en dichas regiones, los datos ecológicos de sus géneros y especies siguen siendo pocos en comparación con la información obtenida en otras regiones (Laurindo da Silva et al., 2018). Además, es muy común que los investigadores analicen otros grupos taxonómicos dejando de lado a los quironómidos debido a que otros grupos no son tan abundantes y poseen poca diversidad, con lo que se facilita su identificación y estudio. Algunos de estos grupos son: Ephemeroptera, Trichoptera, entre otros (Laurindo da Silva et al., 2018; Ninahuanca et al., 2013; N. Prat et al., 2013; Previšić et al., 2009).

En numerosas investigaciones acerca de las comunidades de ambientes lóticos ha quedado excluido el estudio de la diversidad y abundancia de la familia Chironomidae (Medina & Paggi, 2004; Ruiz et al., 2016) y es por esto que los estudios basados en la caracterización molecular de las especies especialmente

en el género *Polypedilum* de la familia Chironomidae son escasos alrededor del mundo y en el Ecuador son nulos, lo que produce un gran interés en llevar a cabo el análisis de este extenso género que comprende una gran cantidad de especies de mosquitos no mordedores (Duchet et al., 2015; Franklin, 2013; Sogame & Kikawada, 2017). En este tipo de análisis los investigadores utilizan zonas específicas del material genético, pero es la región 5' de la subunidad I del gen de la enzima Citocromo Oxidasa el fragmento más usado en estos casos, aunque existen aquellos científicos que realizan su investigación con la otra región de la subunidad I, es decir la región 3', lo que dificulta la comparación de los resultados con otras investigaciones a nivel global (Folmer et al., 1994; Pauls et al., 2006; Sari et al., 2015; Rodríguez-Correa et al., 2017).

Una de las grandes interrogantes es determinar si la biodiversidad del género *Polypedilum* es afectada por un gradiente altitudinal, al igual que en otros estudios donde se ha determinado que la altitud puede o no influir en la diversidad genética de un género (Pauls et al., 2006; N. Prat et al., 2013; Takahashi et al., 2008). En este caso la diversidad genética del género *Polypedilum* podría ser producida por la falla geográfica que atraviesa al Ecuador. Dicha falla, llamada Cordillera de los Andes hace posible que el país posea tres regiones: Costa, Sierra y Amazonía. Este factor demográfico produce que el país posea una gran variedad de especies tanto animales como vegetales (GADPEO - INABIO, 2018). Además, los estudios realizados para la identificación de las especies del Ecuador según su morfología no han aportado mayor información ya que la clasificación se quedó a nivel de familia y no de especie, esto produce que aún no sea posible generar información ecológica sobre este género en el país (Scheibler et al., 2008; Prat et al., 2011; Ruiz et al., 2016).

Finalmente, debido a la actividad antropogénica y a la falta de información sobre estos recursos genéticos, ciertas especies pueden extinguirse sin ser registradas y tampoco son aprovechados; por ejemplo; en el Ecuador no se ha usado al

género *Polypedilum* como bioindicador de contaminación orgánica. Este género es un recurso biológico con el cual se podría describir y monitorear la calidad del agua de los ecosistemas acuáticos, por ejemplo aquellos que usados por las comunidades rurales como fuente de agua para su consumo (Al-Shami et al., 2010; Walker et al., 2008).

1.3. Objetivo general

Analizar la diversidad genética y la filogeografía del género *Polypedilum* en hábitats con diferentes gradientes altitudinales.

1.4. Objetivos específicos

- Obtener las secuencias del gen citocromo oxidasa de las poblaciones del género *Polypedilum* en la provincia de El Oro.
- Analizar la variabilidad genética entre las poblaciones en relación al gradiente altitudinal.

1.5. Justificación

Esta investigación es importante para la generación de información sobre la diversidad genética y ecología del género *Polypedilum* en el Ecuador y también para incrementar la información del género en Sudamérica. Además, permite conocer la distribución geográfica de las especies de *Polypedilum* en el país. Por otro lado, esta investigación es de gran interés ya que la ecología de estos

individuos en los Andes no se conoce a pesar de ser comunidades muy abundantes en los ecosistemas acuáticos. Este estudio será la base para futuras investigaciones del género en el Ecuador a nivel taxonómico, molecular o ecológico, ya que, se realizó la validación y comparación de protocolos y métodos ya establecidos en otros estudios; es decir los procedimientos y métodos fueron adaptados para usarse con los individuos del país.

Realizar estudios taxonómicos y filogeográficos permite determinar la variabilidad genética de un ecosistema, en el Ecuador existen muy pocos registros de este tipo de estudios, en los cuales se pueden descubrir cualidades de los organismos que pueden ser de utilidad para el hombre, como, por ejemplo, se ha comprobado que la presencia del género *Polypedilum* refleja contaminación orgánica en los ecosistemas acuáticos (Cornette et al., 2017; Sogame & Kikawada, 2017). También, se ha determinado que en algunos casos solo se registra una especie de *Polypedilum* en una localidad específica porque dicha especie es la única capaz estar en un estado anhidrobiótico durante su etapa de larva, lo que le permite sobrevivir en dicha localidad (Al-Shami et al., 2010; Domínguez-Domínguez et al., 2009; Nieto et al., 2017).

El análisis de la diversidad genética del género *Polypedilum*, se usará para comparar los especímenes y evaluar si las altitudes de sus hábitats produjeron diferencias genéticas dentro del género, todo esto con el fin de definir los patrones de biodiversidad y determinar si la biodiversidad está dirigida por diferencias altitudinales (Sanseverino et al., 1998; Walker et al., 2008; Nieto et al., 2016; Ríos-Touma et al., 2017).

Dentro del análisis genético, en esta investigación al usar la región 5' el gen Citocromo Oxidasa se logrará comparar nuestros resultados con aquellos realizados en otros países, esto es esencial para comparar la situación y estrategias que se han usado en otras zonas para analizar sus ecosistemas dulce acuícolas y como han actuado evolutivamente debido a la contaminación

y su posición geográfica. Este gen y sus subunidades son muy usados ya que son una región conservada en animales y porque es una secuencia con alta tasa de mutaciones lo que nos indica diferencias genéticas probablemente producidas por las condiciones donde dichos organismos se desarrollan (Fesl, 2002; Folmer et al., 1994; Hernández et al., 2016; Pauls et al., 2006; Sari et al., 2015).

Otro factor importante es que los individuos del género de *Polypedilum* están presentes en casi todos los hábitats acuáticos en comparación a otros macroinvertebrados y también representan la población más abundante en dichas zonas, por lo que podrían ser usados como bioindicadores y además estas comunidades brindan más información ecológica que otros macroinvertebrados que han sido analizados, es por ello que se elige a este género para analizar la variabilidad genética en diferentes rangos altitudinales de la provincia de El Oro (Scheibler et al., 2008; Su & Aggi, 2003; Tejerina & Molineri, 2007; Walker et al., 2008).

La investigación se realiza con individuos recolectados en la provincia de El Oro porque posee la peculiaridad de tener una porción de territorio de las faldas de la Cordillera de los Andes y en su mayoría el territorio corresponde a la Región de la Costa, tiene un gradiente altitudinal que va desde el nivel del mar hasta 3900 metros sobre el nivel del mar, que genera una gran variedad de especies y sistemas ecológicos. Además, posee una gran cantidad de cuerpos de agua con mucha diversidad en las comunidades de macroinvertebrados a pesar de la presión generada por la actividad antropogénica (GADPEO - INABIO, 2018; Prefectura de El Oro, 2015).

2. Capítulo II: Marco Teórico

2.1. Macroinvertebrados

2.1.1. Generalidades

Los macroinvertebrados son animales invertebrados con simetría bilateral, patas articuladas y respiración traqueal. Su crecimiento es a través de mudas sucesivas de su tegumento compuesto por quitina y su cuerpo está dividido en segmentos donde en algunos casos dichos segmentos se articulan como apéndices (Jacobsen et al., 2008; Rojas Valencia, 2010). El término macroinvertebrados no representa una clasificación taxonómica específica, dicho término se usa para hacer referencia a insectos, moluscos y otros organismos (Figura 1) de al menos 0,5 μm de largo. Otros especialistas, consideran que todo organismo que se pueda capturar con una red de poros de 250 μm pueden ser llamados macroinvertebrados, otros plantean que estos organismos no vertebrados deben superar un milímetro de tamaño y otros lo usan para aquellos invertebrados que pueden ser vistos sin el uso de un microscopio (Fesl, 2002; Nieto et al., 2017; Prat et al., 2012; Rueda & Molina, 2014).

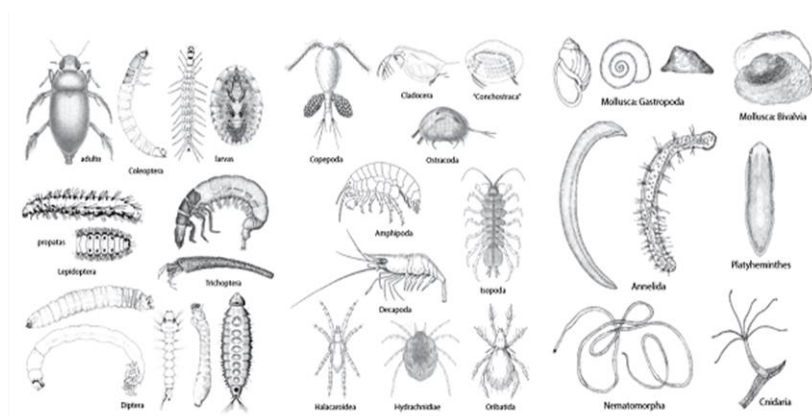


Figura 1. Ejemplares de macroinvertebrados.

Tomado de (Hanson, et al., 2010)

2.2. Macroinvertebrados acuáticos

Los macroinvertebrados acuáticos son organismos que presentan diferentes adaptaciones y diferencias entre sus ciclos de vida, dentro de este grupo existen organismos que pasan toda su vida en el agua y organismos que tienen vidas terrestres según su etapa de desarrollo; además son usados como bioindicadores. Dichos macroinvertebrados se pueden encontrar en ríos, lagos, arroyos y otros cuerpos de agua alrededor del mundo. Este tipo de invertebrados son el inicio de la cadena trófica y se ven afectados por cualquier variación en el medio donde se desarrollan, generalmente los grupos más estudiados son aquellas poblaciones que habitan alrededor o en cuerpos de agua lóticos o lénticos (Hanson, et al., 2010).

2.2.1. Bioindicadores

Un indicador biológico o bioindicador es un organismo o partes de él que ayudan a detectar acontecimientos ambientales que pueden o no ser detectables a simple vista o evidenciadas con pruebas fisicoquímicas (Boltovskoy, 1967; Su & Aggi, 2003). Los indicadores biológicos son usados porque son capaces de reflejar perturbaciones que ocurrieron en un tiempo más prolongado que las pruebas fisicoquímicas que comúnmente se realizan para analizar la calidad del agua que reflejan una característica específica del día y lugar en donde se realizó la prueba (Álvarez et al., 2013; Groenendijk et al., 2002; Loayza-Muro et al., 2013; Rioja, 2012; Rueda & Molina, 2014).

El uso de bioindicadores dependerá del tipo de perturbación: grandes, intermedias o ligeras. Se determina que las perturbaciones grandes e

intermedias afectan a todas las poblaciones de un ecosistema específico y el cambio es evidente; es decir el incremento o disminución poblacional es evidente por la perturbación que haya sufrido el ambiente; por ejemplo; contaminación por derrame o incremento de nutriente. Sin embargo, cuando se trata de perturbaciones ligeras se habla de aquella que no son tan perceptibles y que han provocado cambios específicos en los individuos para su supervivencia; por ejemplo; el incremento de sales en un hábitat donde no se registra variaciones en las poblaciones de dicho lugar pero metabólicamente han cambiado; es decir dichas perturbaciones no provocan cambios significativos (Liz et al., 2016; Narcís Prat et al., 2006; Rioja, 2012)

En la actualidad, las poblaciones de insectos son las más usadas para estudios de la calidad del agua de ecosistemas acuático debido a su abundancia y su fácil recolección. Esto se logra a partir de análisis de sensibilidad y tolerancia de los insectos en cada ambiente a factores como: minerales o contaminantes de algún tipo que pudieron incrementar o disminuir dichas poblaciones (Álvarez et al., 2013; Rioja, 2012).

2.2.2. Hábitats de los macroinvertebrados acuáticos

Los hábitats pueden clasificarse en base a diferentes aspectos, una de las clasificaciones más sencillas es identificar si dicho cuerpo de agua es lótico o léntico. Los ecosistemas lóticos son aquellos sistemas acuáticos donde existe o predomina una corriente de agua, por ejemplo: ríos, arroyos, manantiales, etc. Mientras que los ecosistemas lénticos son aquellos que no presentan una corriente continua, como: lagos, lagunas, pantanos, esteros, entre otros. Ambos tipos de ecosistemas están estrechamente relacionados y dependen de las condiciones climáticas, por ejemplo: un ecosistema léntico en época lluviosa puede incrementar su volumen hasta desbordar su área y crear una corriente,

convirtiéndolo en un ecosistema lótico. En el caso contrario un sistema lótico puede convertirse en léntico por el incremento de temperatura que produce una disminución en su corriente y esta a su vez va creando pequeños ecosistemas lénticos (García et al., 2016).



Figura 2. Ambientes lénticos y lóticos de México.

Tomado de (Martínez et al., 2012)

- a) Lago Alchihica
- b) Laguna Prieta
- c) Cascada de Puente de Dio
- d) Río Huichihuayan

2.2.2.1. Ríos y Riachuelos de los Andes

En la antigüedad el hombre no conocía ni estudiaba el funcionamiento de los sistemas acuáticos, aunque procuraba asentarse cerca de ellos para tener una fuente de agua. Sin embargo, existen registros en donde se indica que la antigua Grecia tenían conocimiento de la distribución de los cuerpos de agua con el fin de poder desplazarse de un lugar a otro sin morir de sed y también, se ha registrado que los Romanos cuidaban el manejo del agua (Fernández & Novoa, 2002; Freitas, 2012).

Con el paso de los años y los cambios climáticos que han producido cambios ambientales, se ha generado un interés científico en las funciones y el funcionamiento de dichos ecosistemas. Actualmente, se han generado protocolos y se han descubierto herramientas biológicas y químicas para el análisis y monitoreo de los cuerpos de agua (BBC Mundo, 2013; Encalada et al., 2011).

Comúnmente, los cuerpos de agua como ríos y riachuelos son ecosistemas de los cuales el hombre extrae agua para actividades como: agricultura, ganadería, consumo, etc. Por ello, muchos de estos recursos hídricos están deteriorados o su tamaño ha ido reduciendo con el paso de los años y esto es un problema ya que no solo afecta al hombre sino también todos los organismos que viven allí (Encalada et al., 2011).

En el Ecuador dichos cuerpos de agua nacen en la cordillera de los Andes gracias a los glaciares y la forma de las montañas que provoca un descenso del agua desde acuíferos subterráneos hasta lagos, lagunas, etc. Una peculiaridad de los ríos, riachuelos y arroyos es que el agua que atraviesa por ellos se adopta las características químicas del territorio por donde transitan, dicho territorios

pueden ser: páramos, bosques andinos montano alto y bosques andinos montano bajo (Encalada et al., 2011; Vannote et al., 1980).

Los páramos (Figura 3) tienen funciones como: proveer de nutrientes, materia orgánica y sedimentos a los ríos de zonas bajas, purificación del agua, prevención de la erosión, conservación del suelo, etc. Estos ecosistemas se hallan a partir de los 3000 metros sobre el nivel del mar (Encalada et al., 2011; Podwojewski, 1999). Aunque es un medio natural poco antropizado, existen estudios de estas zonas que determinan que el cambio climático y el aumento de la población pone en riesgo a los páramos, ya que afecta las condiciones ecológicas y por ello se recomienda realizar más estudios sobre los mecanismos de almacenamiento y regulación de agua en los suelos de dichas áreas (BBC Mundo, 2013; Podwojewski, 1999).



Figura 3. Páramos del Ecuador.

Tomado de (BBC Mundo, 2013)

Por otro lado, los bosques andinos montano alto se hallan en el rango altitudinal de 2500 a 3000 metros sobre el nivel del mar y los bosques andinos montano bajo se hallan en el rango altitudinal de 2000 a 2500 metros sobre el nivel del mar; aunque en los tres casos los ríos tienen una corriente fría, rápida y con una gran cantidad de oxígeno, como se muestra en la Figura 4 uno de los cuerpos de agua hallados en el parque Nacional Llanganates del Ecuador (Encalada et al., 2011).

Los bosques montanos poseen una alta biodiversidad aunque esta puede variar dependiendo de la zona del país en donde este factor sea evaluado, por ejemplo, se ha demostrado que los bosques en Loja al sur del país poseen mayor diversidad floral que algunos bosques ubicados al norte del país (Lozano, 2002).



Figura 4. Río del Parque Nacional Llanganates, Ecuador.

Tomado de (Ministerio del Ambiente, 1996)

Por otro lado, se ha comprobado que la velocidad de las corrientes en los ríos dependerá de factores como: cantidad de piedras, profundidad (Figura 5), presencia de basura o escombros (Figura 6), entre otros (Encalada et al., 2011).

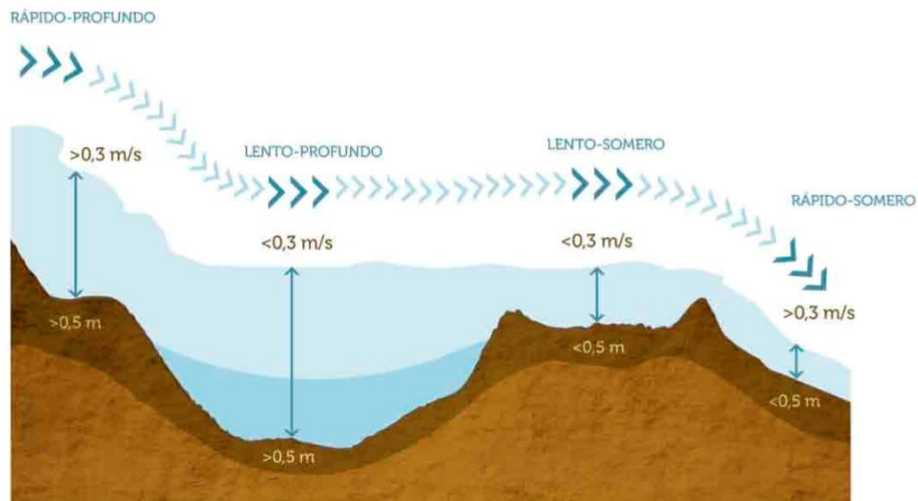


Figura 5. Velocidad de la corriente según la profundidad.

Tomado de (Encalada et al., 2011)



Figura 6. Río con presencia de basura y escombros.

Tomado de (Encalada et al., 2011)

Finalmente, es a través de los páramos y los bosques andinos por donde el agua circula en forma de los ríos y riachuelos que difieren en el caudal de agua que poseen; los ríos poseen un gran caudal que suele ser constante a pesar de la estación (invierno o verano), en cambio los riachuelos o arroyos son aquellos cuerpos de agua que poseen poco caudal y en algunos casos dependiendo de las condiciones ambientales estos pueden desaparecer o convertirse en un cuerpo de agua léntico (Monkhouse, 1978; Tariq et al., 2016).

2.2.2.1.1. Ríos en la provincia de El Oro

Según el Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO) del Ecuador, los cuerpos de agua son clasificados según su perfil altitudinal es decir la elevación (metros), características hidromorfológicas y su vegetación. En el caso de la Provincia de El Oro los cuerpos de agua han sido clasificados en tres grupos altitudinales que se describen a continuación:

Grupo altitudinal 1 (GA1): este grupo corresponde a los ríos entre los 16 y 300 metros sobre el nivel del mar (msnm); dichas áreas poseen formaciones de matorral seco y bosque deciduo. Dichos ríos poco torrentosos poseen alta sedimentación, poca pendiente, piedras, arena y caudales, como se muestra en la Figura 7 (GADPEO INABIO, 2018).



Figura 7. Ecosistemas pertenecientes al grupo altitudinal 1.

Tomado de (GADPEO INABIO, 2018)

Grupo altitudinal 2 (GA2): los ecosistemas de este grupo poseen vegetación más densa y se encuentran en un gradiente altitudinal de 301 a 1000 msnm, dichas zonas poseen caudales, piedras, poca arena y pendientes moderadas como se muestra en la Figura 8 (GADPEO INABIO, 2018).

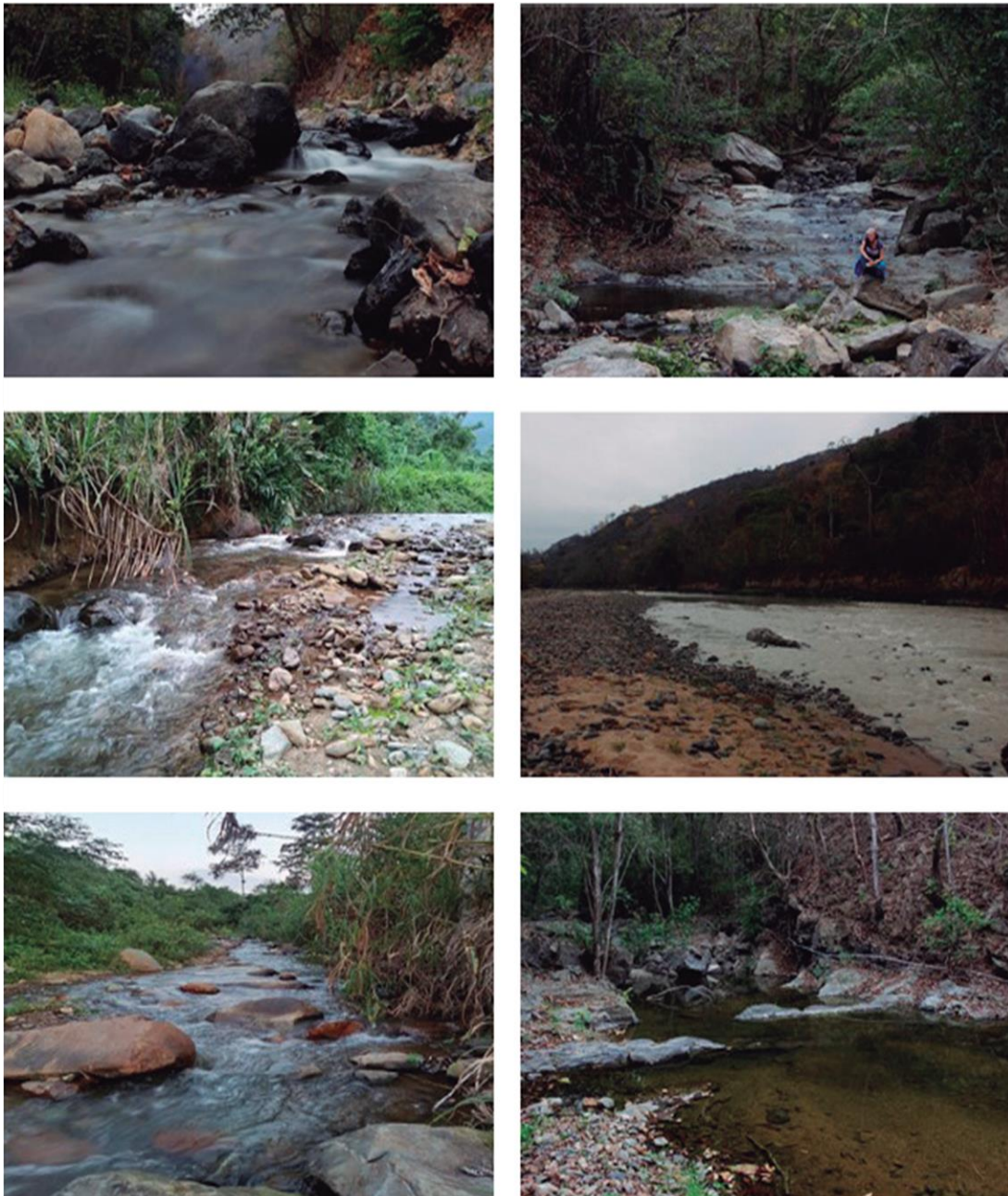


Figura 8. Ecosistemas del grupo altitudinal 2.

Tomado de (GADPEO INABIO, 2018)

Grupo altitudinal 3 (GA3): este grupo hace referencia a los hábitats de las zonas más altas de la provincia de El Oro, sus ríos se encuentran entre los 1.001 y los 3.285 msnm; dichas zonas poseen caudales medios y bajos con bloques, gravas y pendientes altas. Su vegetación es Bosque siempreverde montano bajo (1.300-1.800 msnm) y Bosque siempreverde montano alto (1.600-3.250 msnm), la vegetación es característica de zonas de sierra, como se muestra en la Figura 9 (GADPEO INABIO, 2018).



Figura 9. Ecosistemas del grado altitudinal 3.

Tomado de (GADPEO INABIO, 2018)

2.3. Biogeografía

La biogeografía es la ciencia que estudia la distribución geográfica de las especies (Figura 10), en un inicio fue el trabajo de los naturalistas en el siglo XIX, uno de los más conocidos fue Charles Darwin. En dicho siglo la biogeografía era netamente descriptiva y se basaba en la identificación de las especies y sus características morfológicas (Di Barba, 2016; D. Simon, 2008).



Figura 10. Distribución de algunas especies en América y los océanos.

Tomado de (Guzman, 2016)

En los años sesenta, gracias al desarrollo de las matemáticas, se empezó a emplear ecuaciones matemáticas para analizar la distribución geográfica de las especies y así también plantear modelos matemáticos sobre la extinción y migración de las especies (Mognaschi, 2017; D. Simon, 2008). Pero con el pasar de los años y los avances tecnológicos dichas ecuaciones y modelos matemáticos han sido acopladas para otro tipo de análisis como la distribución

de las especies usando su material genético. Por ejemplo, actualmente existen modelos matemáticos para predecir la distribución de individuos a nivel de especie, género o familia que proporciona una medida de la biodiversidad de un lugar específico (Guisan and Thuiller, 2005; Beres et al., 2008; Gobeyn et al., 2019).

Las especies se distribuyen según los factores ambientales en los que pueden sobrevivir (Figura 11), es decir, si una especie es específica de un lugar significa que ella es apta para desarrollarse en dicha localidad, esto debido a procesos evolutivos que le permiten sobrevivir según las condiciones de ese hábitat. Se conoce que existen organismos distribuidos por todo el mundo y también hay aquellos organismos específicos de un área (Wharton et al., 1983; Brown, 1984; García-Rodríguez et al., 2015).

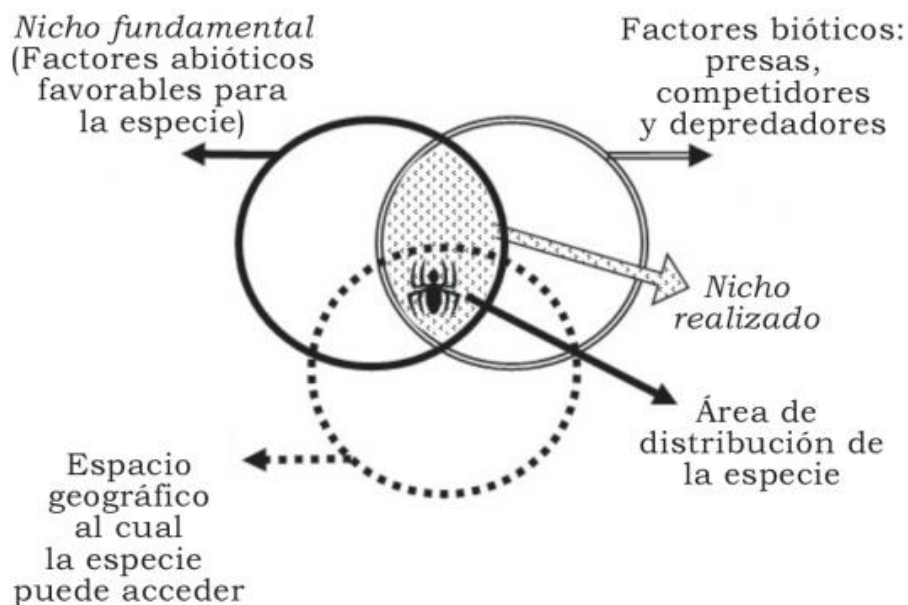


Figura 11. Diagrama que representa la interacción de los factores bióticos, abióticos y geográficos, relacionados con el área de distribución de las especies.

Tomado de (García-Rodríguez et al., 2015)

Los factores que afectan la distribución de las especies son: temperatura, humedad, patrones climáticos, ciclo de luz, selección natural, composición del sustrato, alimentos y nutrientes disponibles, la altitud, presión atmosférica, cantidad de oxígeno, precipitación, etc. Existen modelos de la distribución de las especies basados en varios factores biótico y abióticos como se muestra en la Figura 12 (Guisan & Thuiller, 2005; Saldaña & Villar, 2015).

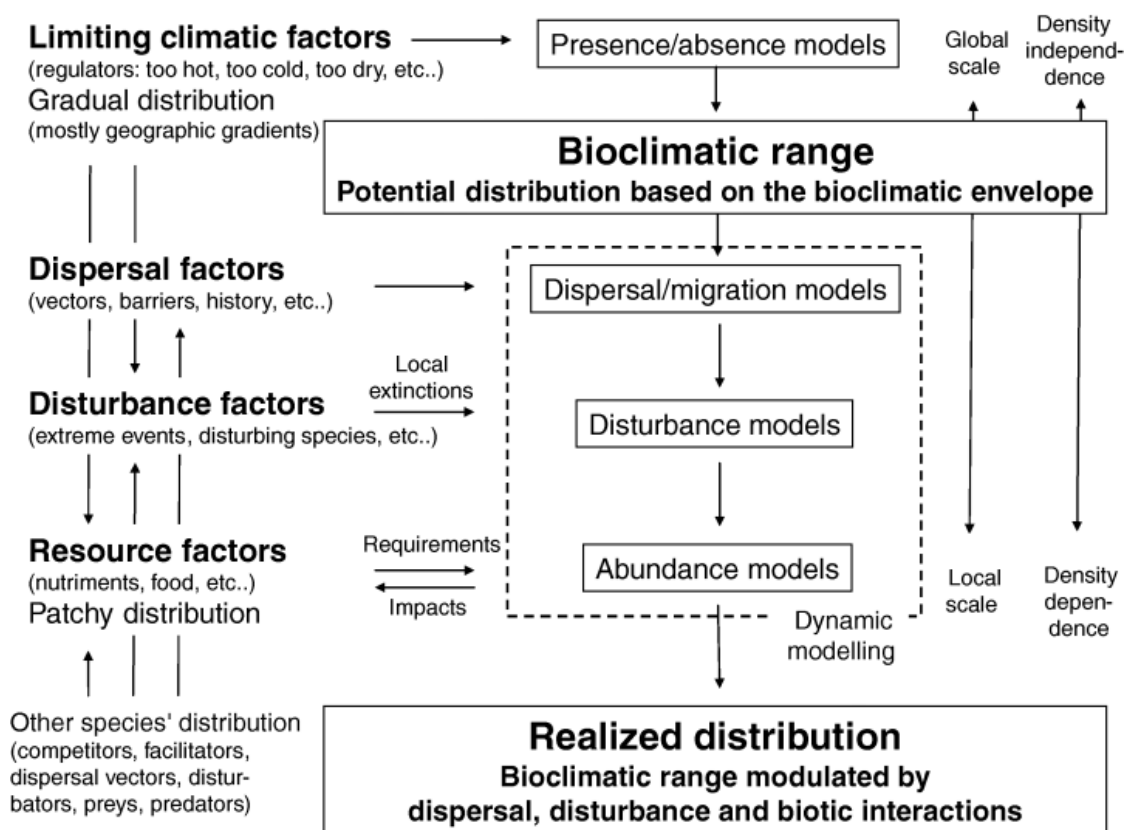


Figura 12. Marco general de modelado jerárquico que ilustra la manera de integrar la dinámica de perturbación, dispersión y población dentro de los modelos de distribución de especies.

Tomado de (Guisan & Thuiller, 2005)

2.3.1. Altitud como limitante de las especies

La altitud es un factor abiótico que influye o determina en las condiciones climáticas y por ende en las especies que se desarrollan en un sitio específico. La hipótesis de Variabilidad Climática o Variabilidad Estacional, plantea que para sobrevivir a mayores latitudes, los organismos deben ser capaces de soportar una mayor variabilidad de las condiciones climáticas, ya que a mayor altitud se registra un mayor variación en las condiciones ambientales (De La Vega & Schilman, 2015).

Los estudios de las especies y sus poblaciones han reflejado diferentes resultados en cuanto a cómo afecta la altitud en su desarrollo. En una investigación realizada a las aves ibéricas se concluyó que a mayor altitud sobre todo en el invierno las poblaciones de aves disminuye considerablemente y en los bosques a menor altitud las poblaciones aumentan, debido a la migración de las aves (Ramírez García, 2004).

Otro ejemplo, es aquel en donde se determinó que grandes altitudes combinadas con temperaturas alteradas producen efectos sobre la cantidad de oxígeno disponible para los organismos y se plantea que solo aquellas especies capaces de adaptarse a estas irregularidades en la cantidad de oxígeno serán capaces de sobrevivir y las que no sean capaces o mueren o de ser el caso se desplazan hacia zonas donde sobrevivirán. Otro factor a tomar en cuenta en dicho caso es que a mayor altitud menor oxígeno, por ello a grandes alturas se encuentran aquellas especies que fueron capaces de adaptar su metabolismo a esas condiciones (Rotvit & Jacobsen, 2013).

2.4. Clasificación

2.4.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica es una clasificación a partir de las características de los individuos que permite agruparlos dentro de un grupo taxonómico como: familia, género o especie.

2.4.1.1. Clasificación taxonómica clásica

Existen diferentes características que permiten la clasificación de los macroinvertebrados; sin embargo, una de las más notables es la presencia o ausencia de concha (Figura 13). Existen otros aspectos para su clasificación morfológica tanto en etapa joven como en etapa adulta, es mucho más fácil identificarlos morfológicamente en su adultez ya que la mayoría en fase larvaria presentan las mismas características fenotípicas. Otros los clasifican según su alimentación y su locomoción (Hanson et al., 2010; Palma, 2013).

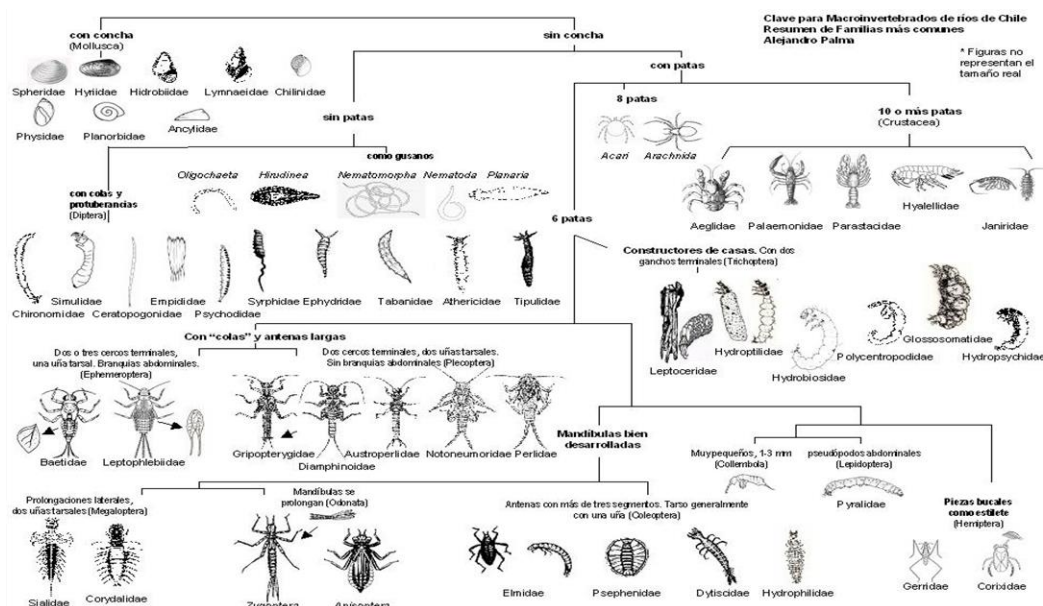


Figura 13. Clasificación de macroinvertebrados.

Tomado de (Palma, 2013)

Dentro de la clasificación taxonómica clásica de los insectos que viven en sistemas acuáticos y son usados para las investigaciones ambientales se determinó que pertenecen a los siguientes grupos taxonómicos con sus respectivas características morfológicas:

- Reino: Animalia
- Filo: Arthropoda
- Subfilo: Hexápoda
- Clase: Insecta

El orden, la familia, el género y la especie dependerán de condiciones ambientales específicas.

2.4.1.1.1. Clase Insecta

La clase Insecta se caracteriza por ser la más abundante y hace referencia a los insectos que en su estadio adulto están divididos en tres secciones: cabeza, tórax y abdomen (Figura 14). Algunos insectos pueden o no tener alas. Sin embargo, los insectos se caracterizan por tener ojos compuestos; antenas articuladas, tres pares de patas, abdomen con apéndice, aparato genital externo, respiración a través de espiráculos, sistema circulatorio abierto, entre otros (Rojas Valencia, 2010).

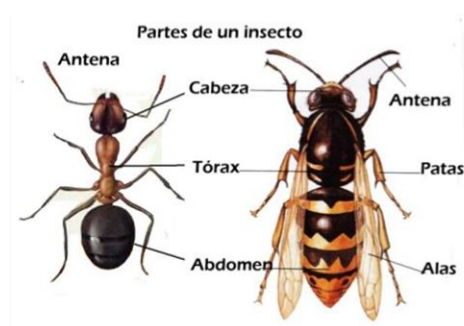


Figura 14. Partes de un Insecto.

Tomado de (Godoy Méndez, 2010)

La Clase Insecta se subdivide en distintos órdenes acuáticos y terrestres, algunos de ellos se muestran en la Figura 15, pero en esta investigación se trabaja con dípteros acuáticos.



Figura 15. Clasificación de Insectos.

Tomado de (Talk about Insects, 2011)

2.4.1.1.2. Orden Diptera (dípteros acuáticos)

En el orden Diptera se hallan los insectos más complejos, diversos y ampliamente distribuidos en el planeta en cuerpos de agua como: ríos, arroyos, lagos y quebradas. Este grupo taxonómico es conocido como el orden de las moscas verdaderas, con alrededor de 20 familias acuáticas (Encalada et al., 2011). Además, las hembras de los dípteros acuáticos se caracterizan por depositar sus huevos en rocas o vegetación debajo del agua, luego de algunos días las larvas de cuerpo blando emergen sin patas, pero con espinas apicales que permiten su locomoción y la respiración varía dependiendo de la familia o el género que se analice (Figura 16). En su etapa adulta poseen un solo par de alas que le permite volar mucho mejor que otros insectos con dos pares de alas (Rioja, 2012; Rojas Valencia, 2010).



Figura 16. Larvas del Orden Diptera.

Tomado de (Rioja, 2012)

Los dípteros acuáticos poseen cuatro etapas de desarrollo como se muestra en las Figuras 17 y 18. En las etapas de huevo y larva estos organismos viven dentro de un cuerpo de agua léntico o lótico; mientras que en la etapa de pupa y adulta vive en zonas aledañas a los cuerpos de agua, en especial en aquellas especies voladoras (Encalada et al., 2011; Medina & Paggi, 2004; Rojas Valencia, 2010).

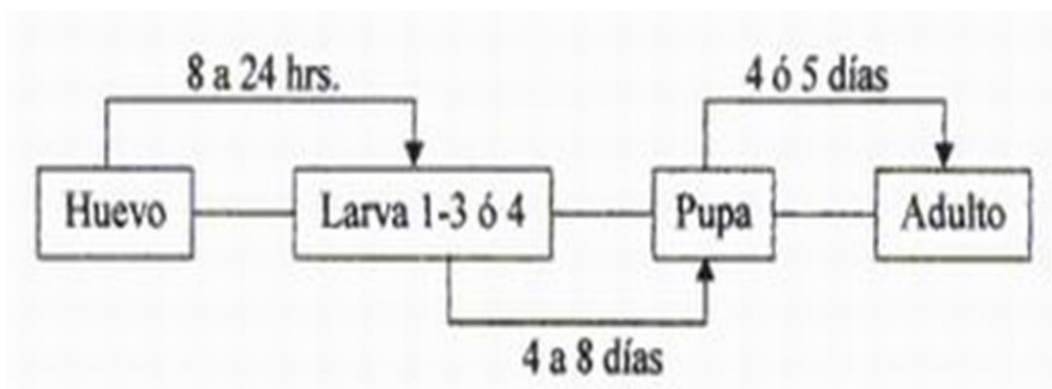


Figura 17. Etapas de desarrollo de los dípteros acuáticos.

Tomado de (Rojas Valencia, 2010)

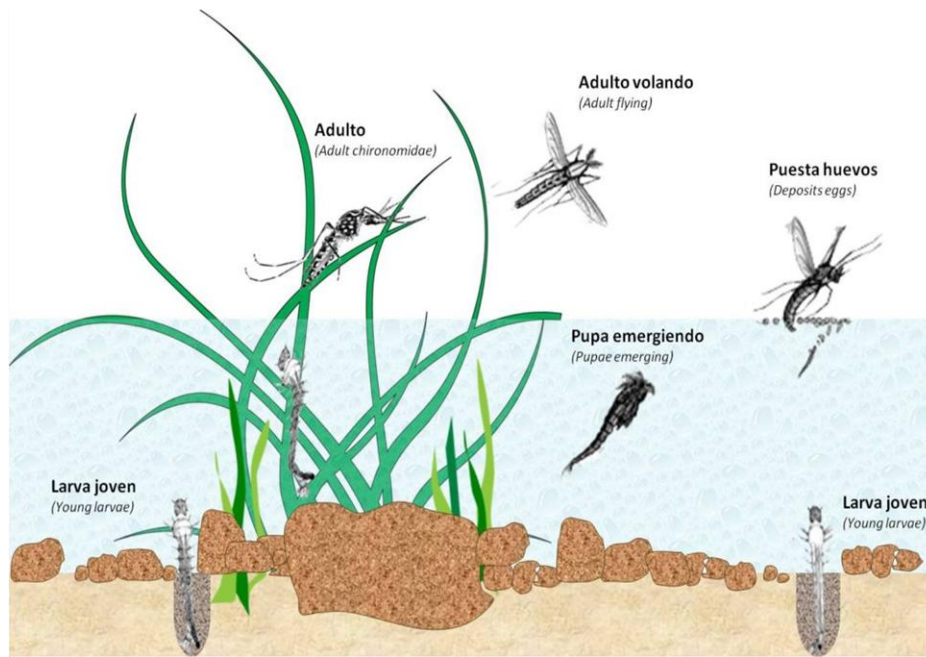


Figura 18. Etapas de desarrollo de los dípteros acuáticos.

Tomado de (PescataMinuta, 2007)

2.4.1.1.3. Familia Chironomidae

Los quironómidos son larvas de cuerpo angosto (Figura 19), en su fase adulta son moscos grises y pequeños, no picadores (Figura 20) de hasta 12mm de largo, con patas largas, alas cortas y estrechas (Encalada et al., 2011). También, son los organismos más abundantes en hábitats de agua dulce y son capaces de adaptarse a todo tipo de perturbaciones o trasladarse de un hábitat a otro para su supervivencia (Rojas Valencia, 2010; Tejerina & Molineri, 2007). En estado de huevo suelen ser alimento de peces, en su estado larvario suelen ser atacados por peces o algunas aves (Walker, 2001).

Una de las características morfológicas para identificar a los machos y las hembras es la peculiaridad en sus antenas; las hembras poseen antenas cortas

y sin pelo, mientras que las antenas de los machos son cortas y con pelo (PescataMinuta, 2007; Rojas Valencia, 2010). Además, son organismos indispensables para el medio ambiente ya que las larvas consumen materia orgánica particulada como: algas, restos de macroinvertebrados y tejidos animales (Ruiz et al., 2018).



Figura 19. Larvas de la familia Chironomidae.

Tomado de (Rioja, 2012)



Figura 20. Quironómido en etapa adulta.

Tomado de (PescataMinuta, 2007)

2.4.1.1.4. Género *Polypedilum*

El género *Polypedilum* es uno de los géneros más abundantes de la familia de quironómidos a nivel de especies, estos organismos pueden ser hallados en casi todos los hábitats incluso en lugares remotos como aguas estancadas o cuerpos de agua con corrientes fuertes. Una de sus principales funciones es alimentarse de materia orgánica o restos de otros organismos, es decir son un punto crítico en la cadena trófica de los ecosistemas en donde se desarrollan (Al-Shami et al., 2010; Prat et al., 2011; Manaaki Whenua, 2013).

Debido a la gran cantidad de especies este género se ha dividido en subgéneros basándose en características morfológicas de estos organismos en fase adulta, ya que en fase larvaria (Figura 21) o de pupa no hay diferencias significativas que permitan clasificar a nivel de especie o incluso de género (Fuentes & Donato, 2014).

Algunas de las especies de este género son rojas cuando están vivas, pero una vez que son conservadas se vuelven pálidas, sus ojos son separados por partes apenas perceptibles y según su alimentación han sido clasificados como recolectores (Narcís Prat et al., 2012; Ruiz et al., 2016).

Sin embargo, una de las características que facilita la identificación del género *Polypedilum* frente a otros géneros es la forma de su cabeza, es por esta razón que los expertos realizan un proceso de digestión para la identificación morfológica de las larvas del género *Polypedilum*. En dicho proceso se busca eliminar el cuerpo de la larva sin dañar la cabeza de la misma y finalmente realizar una identificación bajo microscopio (Prat et al., 2011; Manaaki Whenua, 2013; Fuentes and Donato, 2014).



Figura 21. Larva de *Polypedilum*. La sección a) muestra una larva completa y la sección b) muestra un acercamiento a la cabeza.

Por otro lado, en fase adulta presentan características morfológicas distintas que facilitan su clasificación, como se puede ver en la Figura 22 en el lado izquierdo se tiene una hembra de *Polypedilum nubiferum* y al lado derecho se muestra una hembra del género *Polypedilum* de una especie aún no identificada (Franklin, 2013).



Figura 22. Ejemplares del género *Polypedilum*.

Tomado de (Franklin, 2013)

Otro ejemplo de la variedad en las características adultas de estos insectos se muestra en la Figura 23 donde las imágenes A y B corresponden a la especie *Polypedilum vanderplanki* y las imágenes C y D corresponden a la especie de *Polypedilum pembai*. Incluso se puede observar que existen diferencias entre los machos y las hembras, en la Figura 14 las imágenes A y C corresponden a los machos y las imágenes B y D corresponden a las hembras de cada especie respectivamente (Cornette et al., 2017; Fuentes & Donato, 2014).

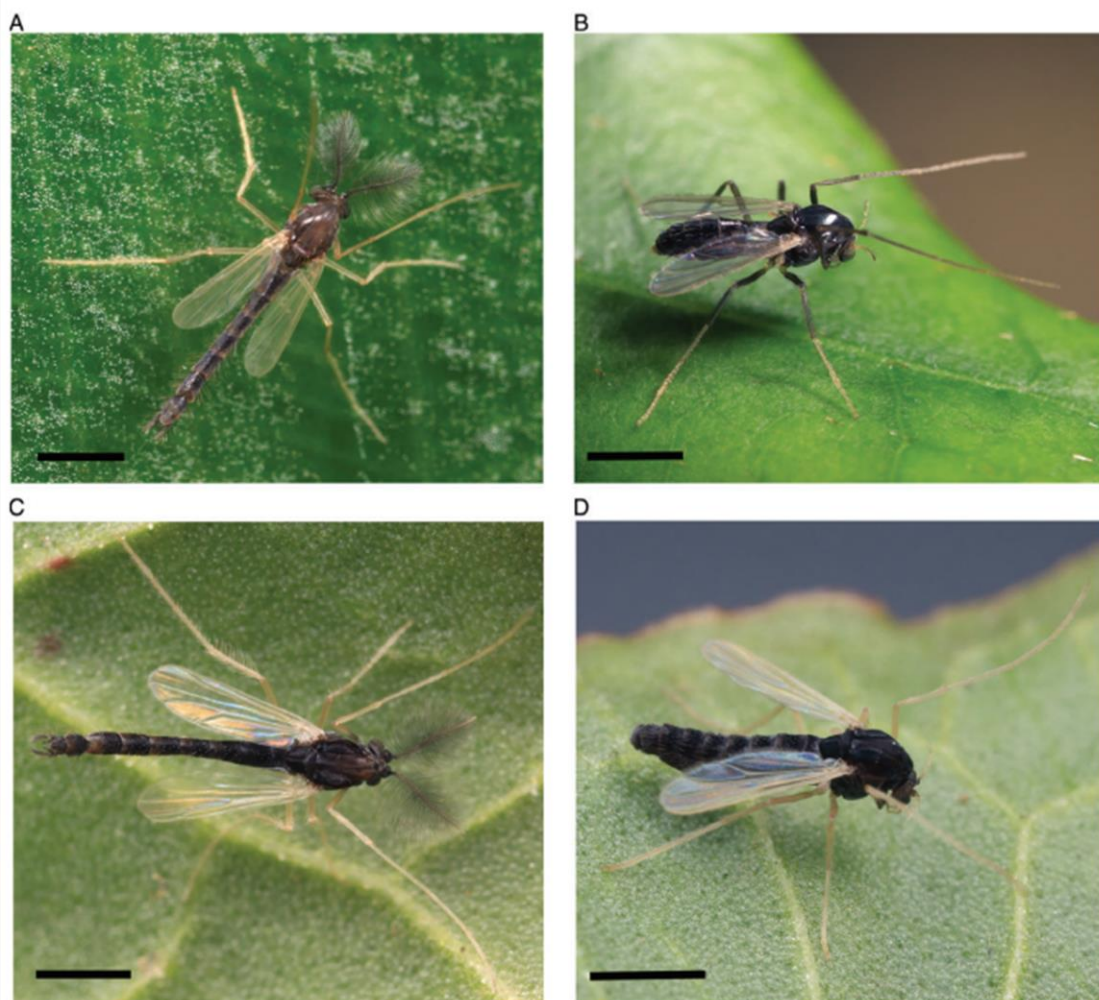


Figura 23. Ejemplares del género *Polypedilum*.

Tomado de (Cornette et al., 2017)

a) y b) individuos de la especie *Polypedilum vanderplanki*

c) y d) individuos de la especie de *Polypedilum pembai*.

Se debe tomar en cuenta que hay factores que afectan la distribución geográfica de estos macroinvertebrados en ríos y arroyos, dichos factores son: la temperatura y la velocidad de corriente, lo que indirectamente condiciona la disponibilidad de alimento y el tipo de sustrato (Scheibler et al., 2008).

2.4.1.2. Clasificación taxonómica molecular

Debido a la dificultad en la clasificación e identificación taxonómica a través de un análisis morfológico, generalmente realizado bajo un microscopio, se realizan análisis genéticos (Figura 24) que conllevan un proceso mucho más rápido, menos laborioso y costoso ya que muchos de los macroinvertebrados deben llegar a su etapa adulta para poder ser identificados taxonómicamente (Chatterjee, 2016).

Sin embargo, aunque en el análisis genético se pierde el individuo recolectado y a lo mucho se conserva su material genético durante cierto tiempo, en cambio en el análisis morfológico los individuos analizados generalmente son conservados sobre todo un ejemplar de cada grupo taxonómico identificado. Dicha conservación en ambos casos depende totalmente de los investigadores o especialistas que hayan recolectado las muestras y del propósito de la investigación (Kranzfelder et al., 2017).

En la figura 24 se muestra un ejemplo del análisis filogenético publicado por Nature donde se consideraron 62 genes codificantes de proteínas y se determinó que los insectos terrestres están más relacionados con los crustáceos que con los cienpiés (Regier, 2010)

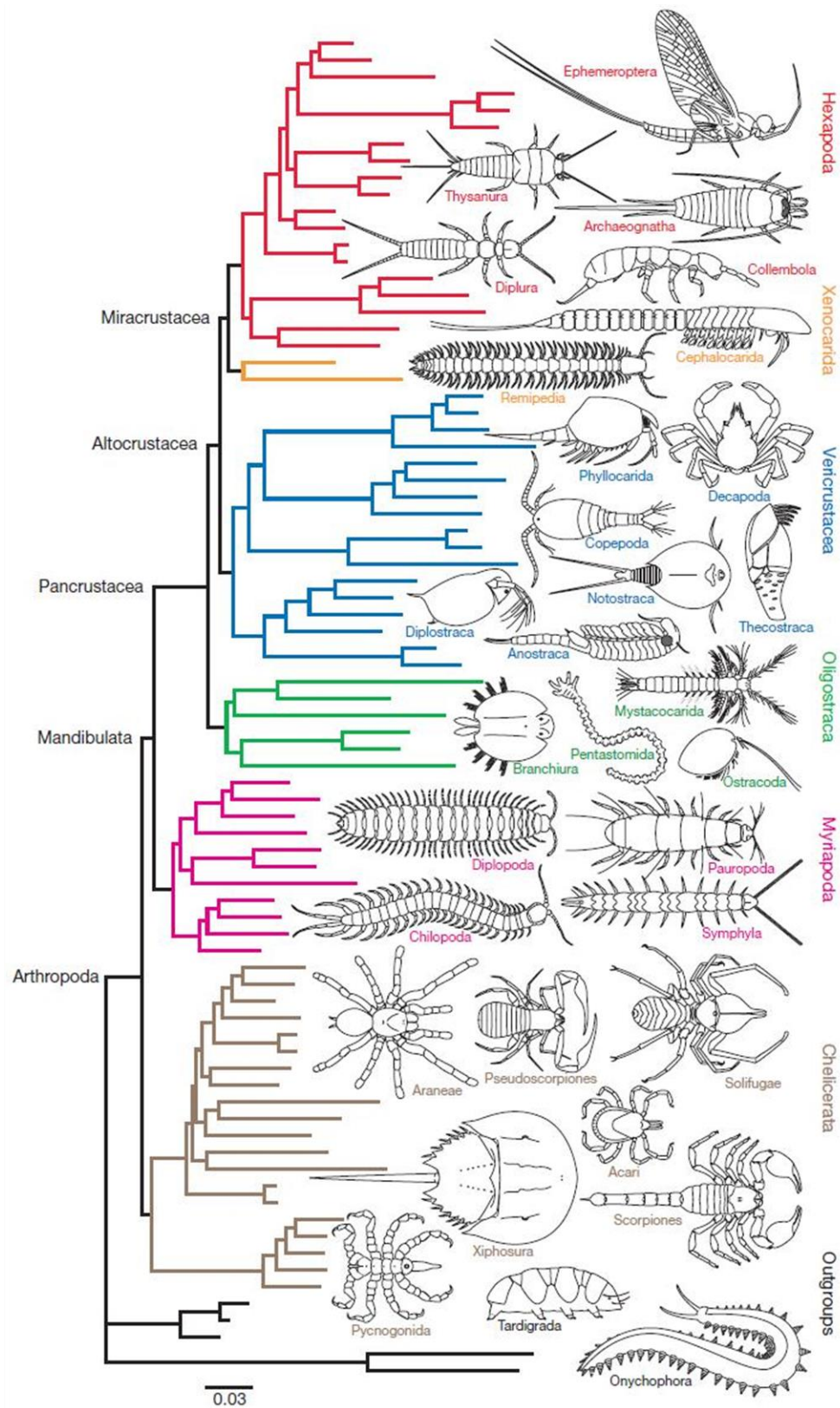


Figura 24. Filogenia de los Artrópodos.

Tomado de (Giribet et al., 2001)

Gracias al avance tecnológico en áreas como la biología molecular se pueden identificar especies que morfológicamente son iguales, pero a nivel molecular poseen diferencias poco perceptibles; por ello en la actualidad se realizan estudios con fragmentos del material genético o ADN (Chatterjee, 2016).

Uno de los estudios más amplios es la genética de poblaciones que ayuda a reconocer todas las especies o la variedad de estas en un lugar específico (Eguiarte et al., 2013). La genética de poblaciones o ecología molecular es considerada una ciencia biológica que estudia la composición genética de una población gracias a herramientas matemáticas que permiten analizar las variaciones de los genes en los individuos (Cabrero et al., 1998; Vera et al., 2012; Rodríguez-Correa et al., 2017).

Estos estudios facilitan el estudio de los procesos que han ocurrido y producido la variabilidad genética de una población, es decir de la evolución a través de procesos de adaptación (Eguiarte et al., 2013). Algunas de las técnicas de análisis genético son: hibridación de fragmentos de ADN, análisis del ADN ribosómico, hibridación con sondas específicas, análisis de los polimorfismos, reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), secuenciación, código de barras de ADN, entre otros (Palacios et al., 2009; Palomino and González, 2014).

2.4.1.3. Análisis genéticos

2.4.1.3.1 Técnica de Código de barras de ADN o *DNA barcoding*

En esta técnica es común usar secuencias de fragmentos de ADN susceptibles a cambios por variaciones ambientales. Dichas secuencias cortas son llamadas *DNA barcodes* y se pueden obtener mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los *DNA barcodes* deben poseer baja variabilidad específica y alta variabilidad interespecífica para que la identificación sea precisa, también

son conocidos como marcadores genéticos. Básicamente, estas secuencias deben hallarse en todos los taxones que se desean analizar y deben mostrar variaciones que permitan identificar a sus especies (Vera et al., 2012; Eguiarte et al., 2013; Hernández et al., 2016).

Cuando el propósito es identificar una especie se realiza una extracción del material genético del individuo, luego se realiza una amplificación de una región de un *DNA barcode*, después dicho amplicón es secuenciado y finalmente esta secuencia es comparada con librerías de ADN que reflejarán a que especie pertenece el individuo evaluado (Hebert et al., 2004; Vera et al., 2012). Con este tipo de estudios se han logrado identificar muchas más especies que a través de la identificación morfológica, por ejemplo, en el año 1775 se identificó a la mariposa *Astrartes fulgerato* pero luego del análisis molecular con *DNA barcoding* se identificaron 10 especies de mariposas que aunque en su adultez se ven iguales en su fase de oruga poseen diferencias en su alimentación que producen diferencias genéticas convirtiéndolas en especies distintas (Hebert et al., 2004).

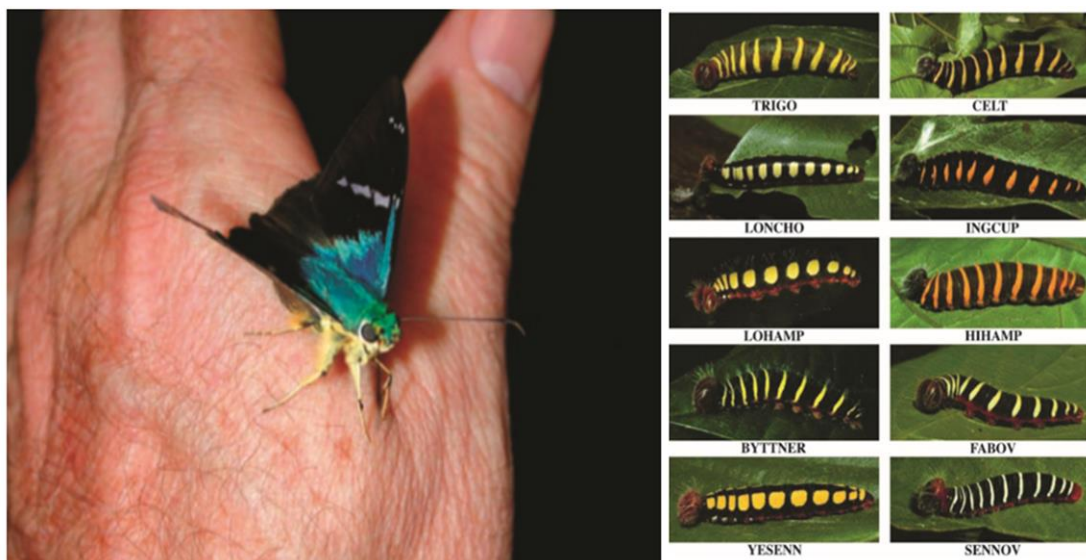


Figura 25. Individuos evaluados en el estudio con *DNA barcodes*.

Tomado de (Hebert et al., 2004)

Las secuencias usadas como *DNA barcode* pueden proceder del ADN nuclear, del ADN de los cloroplastos o del ADN mitocondrial, dependiendo del individuo que se analice (Hernández et al., 2016). Uno de los genes más usados para los estudios en animales es el gen conocido como COI o COX se muestra en la Figura 26 de color verde, que codifica para la enzima citocromo-oxidasa I y se encuentra en el ADN mitocondrial (Navarro et al., 2015). En un inicio se usaba un fragmento de 650 pares de bases de este gen y luego se determinó que en algunos casos solo se necesita 100 pares de bases de este gen para la identificación de especies ya que tiene alta tasa de mutación, la actividad de su gen ha sido muy estudiada, su estructura y tamaño, posee zonas muy conservadas y otras muy variables; las zonas conservadas facilitan la reacción en cadena de la polimerasa y las zonas variables facilitan la diferenciación entre especies (Simon et al., 1994; Kjer et al., 2002; Saldamando and Marquez, 2012; Ninahuanca et al., 2013; Chatterjee, 2016; Previšić et al., 2016).

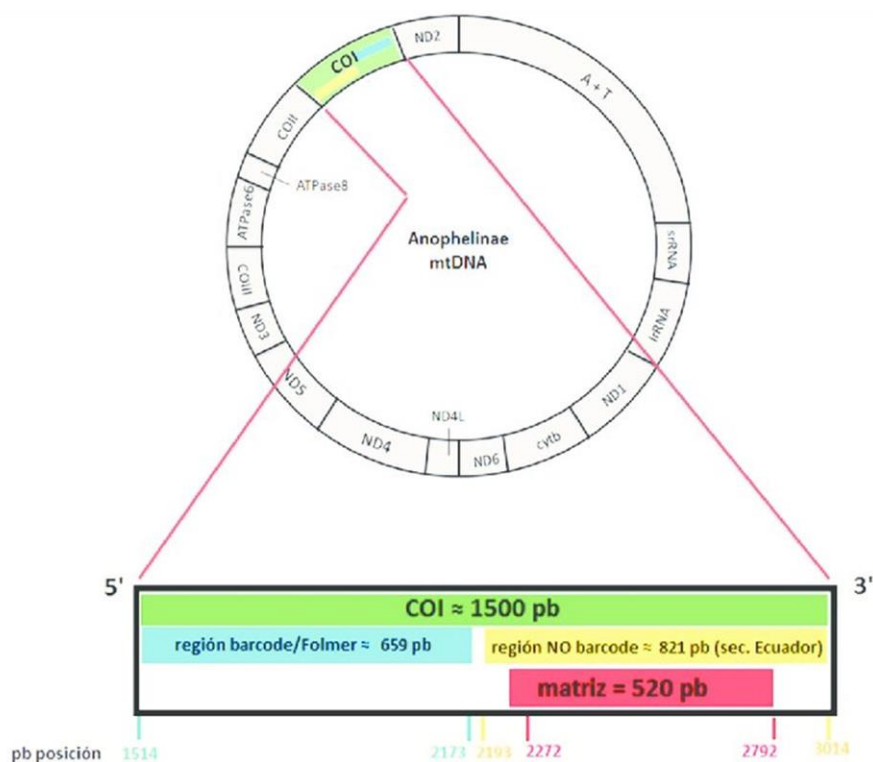


Figura 26. Genoma mitocondrial de *Anophelinae*.

Tomado de (Navarro et al., 2015)

2.4.1.3.2. Filogeografía

La diversidad geográfica de las poblaciones se estudia con el fin de generar información sobre la distribución de las especies, la idea de la filogeografía plantea que la genética de las especies está asociada con la zona geográfica donde se desarrollan (Domínguez-Domínguez et al., 2009; Peck, 2001). Otros autores definen a la filogeografía como el estudio geográfico de los linajes de los genes a nivel sobre todo intraespecífico. Además, Los estudios filogeográficos también pueden ser usados para inferir procesos demográficos como el flujo genético, tamaño poblacional, secuencias de colonización, cuellos de botella y para determinar fronteras entre especies como se puede observar en la Figura 27 (Rodríguez-Correa et al., 2017).

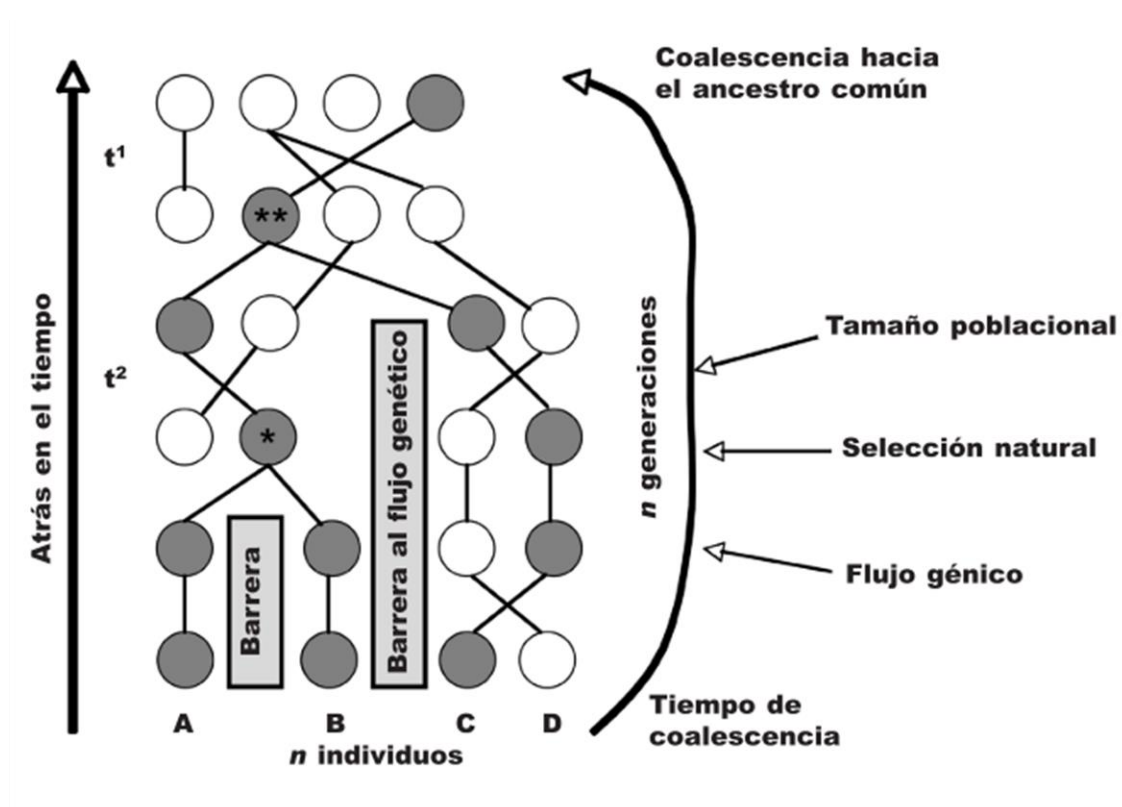


Figura 27. Relación evolutiva de 4 individuos dentro de una población.

Tomado de (Domínguez-Domínguez et al., 2009)

Actualmente, se usan *DNA barcodes* para realizar estudios filogeográficos, específicamente secuencias del ADN mitocondrial. Aunque, también es usado en estudios taxonómicos para la clasificación biológica donde incluso si no se identifican especies se puede determinar el número de unidades taxonómicas operativas (OTU) presentes en un lugar específico y la distancia genética que hay entre ellas, a través de un análisis de variabilidad genética (Song et al., 2016). Una unidad Taxonómica operativa (OTU) es una unidad de clasificación que permite a los investigadores determinar grupos de cualquier nivel taxonómico para su clasificación u otros estudios como la elaboración de árboles filogenéticos (Camacho et al., 2008).

Los árboles filogenéticos o cladogramas son esquemas mediante los cuales se representan las relaciones evolutivas entre varios individuos del mismo o de diferentes grados taxonómicos, debe tenerse en cuenta que este tipo de árboles son hipótesis y no hechos definitivos y que pueden variar dependiendo del software y algoritmo matemático que se use para generarlos. Los métodos más usados son: Cladística, Máxima parsimonia, Inferencia Bayesiana y Neighbor-Joining (Barriga & Salazar, 2007).

2.5. Quironómidos en el Ecuador

2.5.1. República del Ecuador

La República del Ecuador está ubicada en América del Sur, su territorio comprende alrededor de 283 mil kilómetros cuadrados y está dividido en tres regiones por la cordillera de los Andes, dichas regiones son: Costa, Sierra y Oriente. Este país limita al norte con Colombia, al Sur y al este con Perú y al

oeste con el Océano Pacífico, donde a 1000 kilómetros se hallan las Islas Galápagos que conforman una cuarta región de este país. Gracias a su posición geográfica y otras cualidades ambientales es considerado uno de los países con mayor diversidad en el mundo, donde muchas de sus especies no han sido identificadas y por ello no se puede establecer el número exacto de especies por kilómetro cuadrado (Chaves et al., 2007; Sanchez et al., 2006; Yáñez-Muñoz, 2005).



Figura 28. Mapa del Ecuador.

Tomado de (AnnaMapa, 2017)

2.5.2. Identificación de Quironómidos en el Ecuador

En el Ecuador se han realizado algunos estudios en donde se han recolectado muestras de macroinvertebrados, con los cuales se ha identificado la presencia de la familia Chironomidae en casi cualquier tipo de ecosistema acuático e incluso la presencia del género *Polypedilum* en algunos casos (Encalada et al., 2011).

Con los resultados de dichas investigaciones se han creado guías para la identificación morfológica de las familias y géneros de macroinvertebrados hasta la fecha, dichas guías facilitan la identificación de los individuos y el desarrollo de otro tipo de investigaciones (Encalada et al., 2011; Narcís Prat et al., 2012; Ruiz et al., 2016).

Otras investigaciones realizadas han reflejado que las poblaciones de macroinvertebrados más abundantes en los ecosistemas acuáticos son los quironómidos y es por esto que se plantea como la población por excelencia para estudios ecológicos; sin embargo, sus especies aún no están totalmente identificadas o descritas a nivel morfológico y genético (Prat et al., 2011; Prat et al., 2013).

3. Capítulo III: Procedimientos

3.1. Población y muestra

Se analizaron 131 larvas pertenecientes al género *Polypedilum* recolectadas entre los años 2007 y 2008 por el INABIO en diferentes ríos de la Provincia de El Oro dentro del proyecto AMB.ChV.17.03 del Investigador Christian Villamarín.

Los muestreos se realizaron usando una red tipo Surber (Hauer and Lamberti, 1996; Springer et al., 2010). Tras la recolección, las muestras fueron clasificadas y conservadas en etanol al 96%, (Figura 24). Las larvas no fueron de tamaño homogéneo y en algunos casos se observó descomposición debido a su largo periodo de conservación.



Figura 24. Ejemplares de las larvas usadas para el análisis molecular.

3.2. Lugar de muestreo

En el presente trabajo se definieron tres rangos altitudinales en base a la clasificación mencionada en el punto 2.2.2.1.1. (Ríos en la provincia de El Oro). Dichos rangos altitudinales se denominaron como: alto (G1), medio (G2) y bajo (G3). Además, de cada rango altitudinal se evaluaron dos puntos de muestro que fueron seleccionados en base a la altitud requerida en cada rango altitudinal como se muestra a continuación:

- Alto (G1): 16 a 300 m.s.n.m.
- Medio (G2): 301 a 1000 m.s.n.m.
- Bajo (G3): 1001 a 3285 m.s.n.m.

La población analizada según el rango altitudinal y según el punto de muestreo se muestra en la en la Figura 25 y en la Tabla 1.

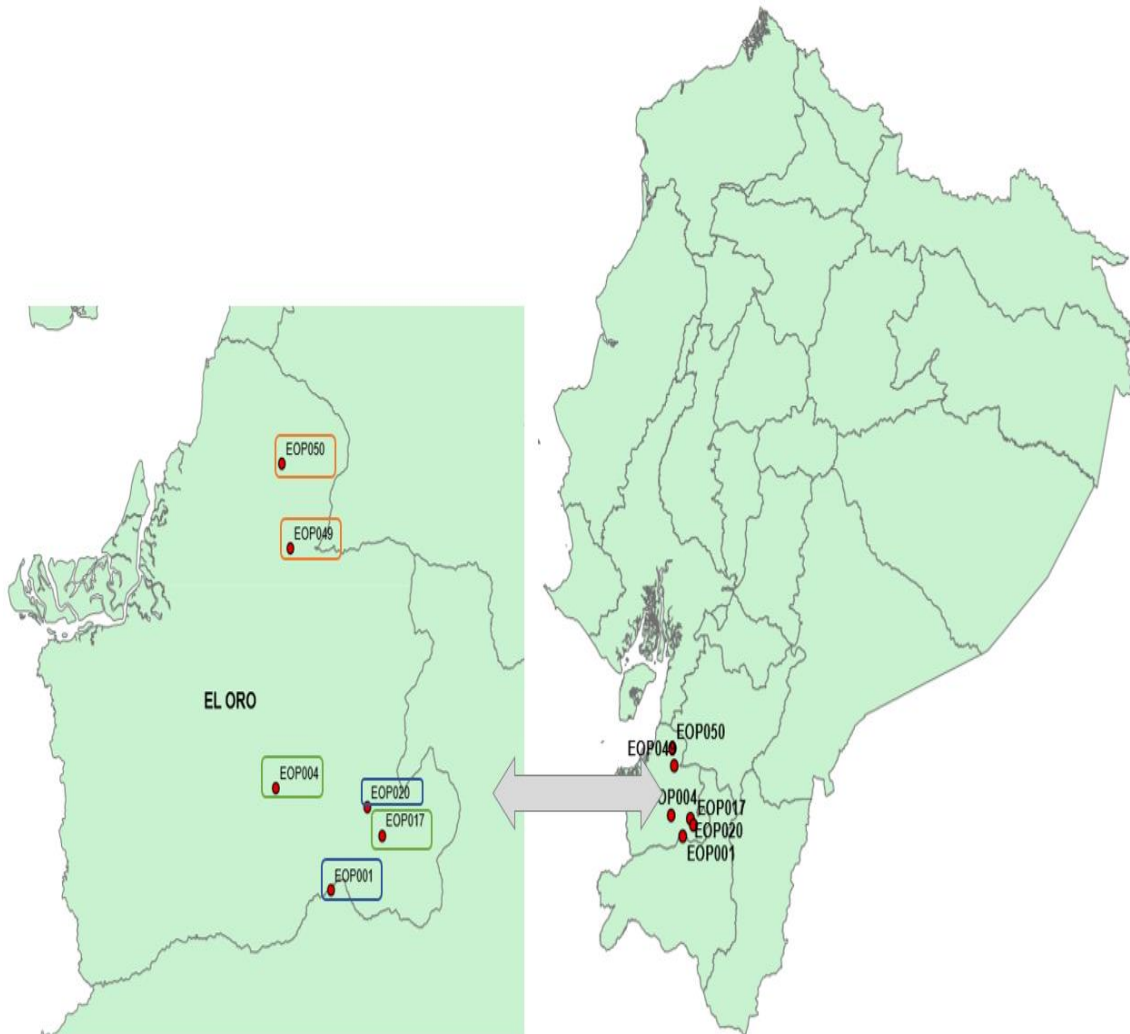


Figura 25. Muestra la posición de los puntos de muestreo ubicados en la provincia de El Oro. Los puntos enmarcados en color naranja corresponden al rango altitudinal 1 (G1), los enmarcados en color azul son del rango altitudinal 2 (G2) y los enmarcados en verde corresponden al rango altitudinal 3 (G3).

Tabla 1.

Individuos evaluados y los datos de su punto de muestreo

Rango Altitudinal	Altitud (m)	Punto de muestreo	Cantón	Río	Ubicación geográfica	Individuos
G1	121	EOP049	Cantón Pasaje, Casacay	Río Casacay	17M UTM 642268- 9632738	15
G1	205	EOP050	Cantón El Guabo, El Guabo	Río Colorado	17M UTM 640334-9644898	12
G2	529	EOP001	Piñas Moromo-ro	Riachuelo s/n	17M UTM 651598-9583795	25
G2	991	EOP020	Cantón Zamora, Savias	Río Ortega	17M 660014-9595684	27
G3	1015	EOP004	Piñas Moromo-ro	Río Buenaventura	17M UTM 638934-9598359	23
G3	1923	EOP017	Cantón Zaruma, Guizhguña	Q s/n Vía San Luis	17M 663410-9591554	29

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Extracción de ADN

3.3.1.1. Lisis de las muestras

En primer lugar, se optimizó el proceso de lisis de las muestras en una solución tampón para extracción de ADN:

1. Trituración con pistilo

Las muestras fueron colocadas con pinzas en tubos eppendorf de modo que se evapore el etanol a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 400 µL de la solución tampón para extracción y con un pistilo estéril la muestra fue triturada hasta que el tejido estuvo homogeneizado.

2. Trituración con Nitrógeno líquido, perlas y homogeneizador

Las muestras fueron colocadas con pinzas en tubos con rosca y perlas de modo que se evapore el etanol a temperatura ambiente, luego los tubos fueron sellados y sumergidos en Nitrógeno líquido durante 2 minutos; después se colocaron en el homogeneizador a 6500rpm 2 veces /15 segundos y finalmente se añadieron 400 µL de la solución tampón para extracción en cada tubo.

Para seleccionar el método con mayor rendimiento se realizaron dos análisis al material genético obtenidos después de la extracción: donde se analizó la cantidad y la calidad de ADN.

3.3.1.2. Método de Extracción de ADN

En segundo lugar, se optimizó el método de extracción de ADN probando varias metodologías:

1. Extracción con Kit QIAGEN (QIAGEN, 2006):

- A las muestras trituradas se añadieron 20 μ L de Proteinasa K (20 mg/ml) y se hizo un vórtex,
- Luego se incubaron durante una hora y media a 56°C en el termobloque, las muestras fueron volteadas de vez en cuando.
- Después, se añadieron 200 μ L de *Buffer AL* y se realizó un vórtex durante un par de segundos.
- Se añadieron 200 μ L de Etanol al 96%, vórtex y a continuación, se extrajo el fluido.
- Se añadió la solución de lisis en una columna de extracción, se centrifugó a 8000 rpm durante un minuto, se desechó el tubo 2 y su fluido.
- Luego se realizaron los lavados con 500 μ L de los *Buffers AW1* y *AW2*.
- Se añadieron 100 μ L de *Buffer AL* para eluir el ADN de la columna, se colocó la columna sobre un tubo de 1,5mL.
- Los tubos con las columnas se incubaron durante un minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 8000 rpm durante un minuto.
- Finalmente, la fase líquida con ADN en el tubo de 1,5mL fue almacenada 4°C.

2. Extracción Rápida con Solución Tamponante (Edwards et al., 1991):

En esta extracción se usó un Tampón de Homogenización a base de: Tris-HCl (200mM) a pH 8, Cloruro de Sodio (250mM), EDTA (25mM) y SDS (0,5%).

- A las muestras trituradas se añadieron 400 μ L del tampón de homogenización, se agitaron los tubos y se centrifugaron a máxima velocidad durante 3 segundos.
- Luego, se añadieron 8 μ L de Proteinasa K (20 mg/ml).
- Las muestras se incubaron durante dos horas a 56°C.
- A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante diez minutos, se extrajo el sobrenadante en tubos nuevos.
- A dicho tubos se añadieron 300 μ L de Isopropanol, se mezcló volteando los tubos y las muestras se dejaron reposar dos minutos en refrigeración.
- Después, se centrifugó a 13 000 rpm durante diez minutos, se desechó el sobrenadante y se añadieron 500 μ L de Etanol (70%).
- Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm durante cinco minutos.
- Luego, se eliminó el etanol invirtiendo el tubo y en dicha posición se dejó evaporar los restos de etanol a temperatura ambiente.
- Finalmente, se resuspendió el ADN en 50 μ L de Agua Milli-Q; las muestras fueron almacenadas a 4°C.

3. Extracción con Kit (Invitrogen, 2013):

- A las muestras previamente trituradas se les añadieron 180 μ L de *Buffer* de extracción y 40 μ L de Proteinasa K (20 mg/ml).
- Se realizó un vórtex y un spin durante un par de segundos.
- Se incubaron las muestras durante dos horas a 56°C.
- Se añadieron 20 μ L de *RNAase A* y se mezcló manualmente.
- Las muestras se dejaron reposar durante dos minutos y se centrifugó a 10 000 rpm durante tres minutos, se extrajo el sobrenadante conociendo el volumen y dicha cantidad fue añadida de *Lisis-Binding Buffer* y de Etanol absoluto.
- Se mezcló manualmente y la mezcla fue transferida a una columna del kit Invitrogen.
- Se centrifugó a 10 000 rpm durante un minuto.
- Se realizaron los lavados con los *Buffer* 1 y 2 del Kit.

→ Finalmente, el ADN fue eluido en 25 μ L de *Elution Buffer* en la columna para finalmente centrifugar y almacenar las muestras de ADN en tubos de 1,5mL a 4°C.

4. Extracción de ADN con CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y purificación con Fenol-cloroformo (Cerde-Granados & Díaz, 2013):

→ Las muestras fueron trituradas en *Buffer* a base de: Tris-HCl (10mM), EDTA (25mM) y NaCl (100mM).

→ Se añadió 40 μ L de SDS al 10% y se mezcló manualmente durante dos minutos.

→ Se añadió 20 μ L de Proteinasa K (20 mg/ml) y las muestras fueron incubadas durante veinte minutos a 55°C.

→ Se añadió 80 μ L de NaCl (5M), se añadió 60 μ L de CTAB, se mezcló y se incubó durante 10 minutos a 62°C.

→ Se añadió 600 μ L de Fenol y se centrifugó a 11 000 rpm durante tres minutos a 10°C.

→ Se extrajo el sobrenadante conociendo el volumen, se añadió dicha cantidad de Cloroformo y se centrifugó a 11 000 rpm durante tres minutos a 10°C.

→ Se extrajo el sobrenadante conociendo el volumen y se añadió la mitad de Agua Milli-Q y la otra mitad de Isopropanol; se mezcló manualmente y se dejó en refrigeración durante una hora.

→ Luego se centrifugó a 18 000 rpm durante quince minutos, se tiró el sobrenadante y se añadió 700 μ L de Etanol al 70%.

→ Se centrifugó a 18 000 rpm durante quince minutos, se tira el sobrenadante y se dejó secar los tubos invertidos.

→ Finalmente, el ADN fue resuspendido con 40 μ L de Agua Milli-Q; las muestras fueron almacenadas a 4°C.

Para seleccionar el método con mayor rendimiento se realizaron dos análisis al material genético (ADN) obtenidos en la extracción.

3.3.2. Análisis del ADN

3.3.2.1. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante el NanoDrop2000, donde el blanco será agua Milli-Q. La relación de absorbancia 260/280 debe estar en un valor de 1.8-2.0, para garantizar la pureza de las muestras extraídas (Asgar et al., 2015; Wang & Wang, 2012).

3.3.2.2. Visualización del ADN

Se realizó un gel de electroforesis al 0.8% durante 30 minutos para analizar la calidad del ADN obtenido en la extracción y confirmar los valores de la cuantificación.

3.3.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

3.3.3.1. Cebadores empleados en la PCR

Se evaluaron diferentes parejas de cebadores (Tabla 2 y Figura 26) para la amplificación de una región conservada del genoma, dicha zona conservada es la región 5' de la subunidad 1 de la Citocromo Oxidasa del genoma mitocondrial. Las diferentes parejas de cebadores se obtuvieron a través de datos bibliográficos (Folmer et al., 1994; Simon et al., 1994; Kjer et al., 2002) y de estudios realizados (Sanseverino et al., 1998; Prat et al., 2013)

Tabla 2.

Cebadores usados en PCR

Primer	Tipo	Secuencia (5'-3')	Referencia
MT6	Forward	GGAGGATTTGGAAATTG ATTAGTTCC	(Simon, et al., 1994)
NANCY	Reverse	CCCGGTAAAATTTAAAATA TAAACTTC	(Simon, et al., 1994)
LCO1490	Forward	GGTCAACAAATCATAAA GATATTGG	(Folmer et al., 1994)
HCO2198	Reverse	TAAACTTCAGGGTGACC AAAAAATCA	(Folmer et al., 1994)
1709Fg	Forward	TAATTGGAGGATTTGGW AAYTG	(Zhou, X., M. Kjer, 2007)
2191R	Reverse	CCYGGTAAAATTTAAAATA TAAACTTC	(Kjer et al., 2002)

A continuación, se muestra la posición de los cebadores en una secuencia de referencia de *Drosophila yakuba* (Figura 26), con el fin de analizar las posibles combinaciones que se podrían usar en la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y para conocer el tamaño de los fragmentos que se podrían obtener según la combinación que se plantee.

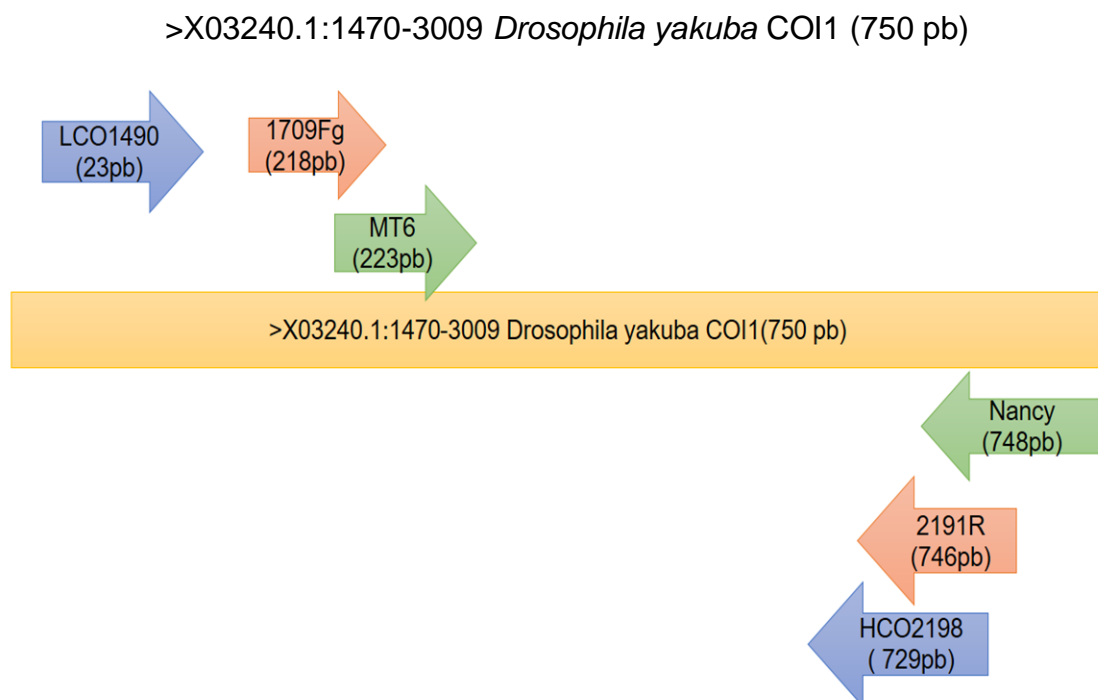


Figura 26. Muestra la posición de los cebadores en la secuencia de referencia; en el lado izquierdo se muestran los cebadores Forward y en el lado derecho se hallan los cebadores Reverse, cada color representa una pareja de cebadores.

3.3.3.2. Optimización de la Reacción en cadena de la Polimerasa

Para la PCR se probaron varias combinaciones de cebadores (Tabla 2), luego se realizó un gradiente de temperatura y variación de cantidad de ADN para la amplificación de la región 5' de la subunidad 1 de la Citocromo Oxidasa del

genoma mitocondrial. En algunos casos se realizaron diluciones 1/10 o 1/100 dependiendo de la concentración de ADN obtenido en la extracción y debido a los resultados se optó por realizar una PCR anidada probando diferentes combinaciones de cebadores; en dicha PCR el ADN añadido fue una dilución 1/100 del producto de PCR inicial.

En ambos casos el Master mix usado (Tabla 3) fue a partir del Kit GoTaq Green Master Mix y el programa usado se presenta en la Tabla 4:

Tabla 3.

Cantidades de los reactivos necesarias para preparar el Master Mix para la PCR

Master mix para la PCR	
Reactivo	Concentración Final
Agua Milli-Q (libre de nucleasas)	-
GoTaq Green Master Mix (2x)	1x
Forward Primer (10 μ M)	0.1 - 1.0 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.1 - 1.0 μ M
ADN	< 250 ng

Tabla 4.

Programa de PCR para amplificar la región 5' de la Citocromo oxidasa

	Denaturación Inicial	25 - 40 ciclos			Extensión Final
		Denaturación	Hibridación	Extensión	
Temperatura	95°C	95°C	45 – 50°C	72-74°C	72-74°C
Tiempo	2:00	0:45	0:30	0:45	5:00

En un inicio después de la extracción se usaron como control positivo cebadores universales que amplifican para el ARN ribosomal 18S, posteriormente en la experimentación se usaron las muestras con el método de extracción seleccionado y como control negativo se usó agua Milli-Q.

3.3.4. Visualización de los productos de amplificación

Se realizó una comprobación de la reacción en cadena de la Polimerasa mediante un gel de agarosa al 1.5% con *Syber Safe* durante 30 minutos y con 7 μ L de producto de PCR. Se usó *Ladder* de 100 pares de bases de ADN (Invitrogen, 2017).

3.3.5. Secuenciación

Las muestras amplificadas fueron secuenciadas en el servicio de secuenciación de la Universidad de las Américas (UDLA), dicho proceso se realiza según la metodología de Sanger. Se enviaron 10 μ L del producto de PCR para el proceso de secuenciación en la Universidad de las Américas y se enviaron alícuotas de los cebadores MT6 y Nancy con una concentración de 2 μ M para que se realice dicho proceso.

3.3.6. Análisis Bioinformático

En primer lugar, se construyó la secuencia consenso a partir de las dos lecturas obtenidas de la secuenciación mediante el programa MEGA 7; las lecturas con

ambos cebadores de cada muestra fueron alineadas con ClustalW y se corrigieron las incongruencias halladas, a través de los cromatogramas.

Luego, se comprobó que las secuencias obtenidas pertenecían a la familia Chironomidae y a la región 5' de la subunidad 1 de la Citocromo Oxidasa mediante una comparación con las secuencias de las bases de datos mediante el Programa Blast de la página web del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante el portal público del BoldSystems (www.boldsystems.org).

A continuación, debido a que la secuencia de interés es una región codificadora se comprobó que la secuencia de aminoácidos no tuviese codones de parada mediante el software *DNA Expaty* (<https://web.expasy.org/translate/>), para comprobar el marco de lectura.

3.3.6.1. Análisis de la Variabilidad Genética

La variabilidad genética fue analizada dentro de: toda la población, cada rango altitudinal y cada punto de muestreo. En este análisis se obtuvo la variabilidad genética a través de matrices de distancias generadas mediante un alineamiento de las secuencias con ClustalW, el modelo de Kimura de 2 parámetros y con un Bootstrap de 100 repeticiones; con ello se determinó la divergencia: máxima, media y mínima en el programa Mega 7 (Ninahuanca et al., 2013; Sari et al., 2015; Song et al., 2016).

3.3.6.2. Determinación de Unidades Taxonómicas Operativas (OTUS) para el análisis filogenético

- Determinación mediante un análisis de variabilidad genética

En este análisis se obtuvieron 14 secuencias de *Polypedilum nubifer* procedentes de: China, Australia y Corea; a través del portal público de datos de BoldSystems. Luego, fueron alineadas con una secuencia consenso mediante el método de ClustalW en el software MEGA7, para analizar el fragmento obtenido en la experimentación.

Después, se obtuvo una matriz de distancias genéticas en pares con el método de Máxima Verosimilitud (*Maximum Composite Likelihood*) y con un método de estimación de Varianza, Bootstrap de 100 repeticiones y se generó un árbol filogenético con el método de Máxima verosimilitud en el software MEGA 7.

Con esto, se analizó la variabilidad genética dentro de esta especie y se definió qué porcentaje de similitud entre dos secuencias, las agrupa dentro de la misma unidad taxonómica operativa (OTUs); en este análisis se evaluaron 5 secuencias de Corea, 4 de Australia y 5 de China.

- Determinación mediante el análisis de divergencia con el software *Automatic Barcode Gap Discovery* o ABGD

El software Descubrimiento automático de brechas de códigos de barras para la delimitación de especies primarias o ABGD por siglas en inglés (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>) (Puillandre, Lambert, Brouillet, & Achaz, 2011); es un programa que determina el número de OTUs dependiendo de la divergencia/distancias entre las secuencias.

Las distancias fueron calculadas a partir del alineamiento obtenido con las 69 secuencias consenso, mediante los parámetros usados en el estudio de *Tripodura*, donde se usó (Song et al., 2016):

- El modelo de Kimura de 2 parámetros

- Los límites de divergencia fueron de (P_{min}) 0,005 a (P_{max}) 0,1
- El ancho de brecha relativa (X) fue 1

3.3.6.3. Análisis filogenético

Una vez determinados los OTUs y los individuos que pertenecen a cada uno, se usó el software MEGA7 para agrupar a las secuencias según su respectivo OTU representado como sp#, después se realizó un árbol filogenético mediante el modelo estadístico *Neighbor-Joining*, un método de Kimura de 2 parámetros y con un Bootstrap de 100 repeticiones. Finalmente, se analizó como se agrupan las secuencias en el árbol.

4. Capítulo IV: Resultados y Discusión

4.1. Extracción de ADN

4.1.1. Lisis de las muestras

En primer lugar, según la cuantificación con el Nanodrop2000 y los datos obtenidos en la Concentración de la Tabla 5 se plantea que el método con mejor rendimiento fue usando el homogeneizador debido a las grandes cantidades de ADN obtenidas en las muestras P4 y P6. Sin embargo, al visualizar la calidad del ADN vs los productos de PCR en la Figura 26 se determinó que con la trituración con pistilo se obtiene un ADN de mejor calidad. Además, que con dicho método las muestras fueron fácilmente trituradas debido a que se trataba del cuerpo de las larvas del género *Polypedilum*.

Por otro lado, con los resultados obtenidos se planteó que el uso del homogeneizador y el nitrógeno líquido fragmentaron mucho más el ADN que el uso del pistilo (P6 de la Figura 26), lo que provocó una mayor degradación del material genético y por ende del ADN molde para el proceso de PCR.

La cuantificación de ADN de todas las muestras en el NanoDrop2000 reflejó valores aleatorios como se muestra en el ANEXO 1.

Tabla 5.

Cuantificación del ADN en el Nanodrop2000

Código	Método de lisis	Concentración (ng/ μL)	Calidad del ADN (+/-)
P1	Pistilo	10,3	+
P2	Pistilo	4,2	+
P3	Pistilo	15,3	+
P4	Homogeneizador	90,0	-
P5	Homogeneizador	14,8	-
P6	Homogeneizador	75,7	-

Nota: (+) Se evidenció bandas tenues de ADN y (-) El ADN estuvo muy degradado

Como se muestra a continuación, se analizó la calidad del ADN comparándolo con muestras procedentes de material vegetal fresco y se comprueba en la Figura 27 que las muestras del material vegetal tienen una banda de material genómico perfecta mientras que en las muestras de *Polypedilum* se ve el material genómico degradado y por ello la amplificación es menor; dicha amplificación fue realizada con cebadores universales para 18S.

No obstante, al realizar esta prueba con varias muestras y al analizar todos los datos de cuantificación y calidad en sus correspondientes geles, se concluyó que usar el pistilo para la trituración de las larvas, produce un mayor rendimiento en el proceso de PCR a pesar de que la banda de ADN genómico sea casi imperceptible en el gel como en la muestra P2 de la Figura 27.

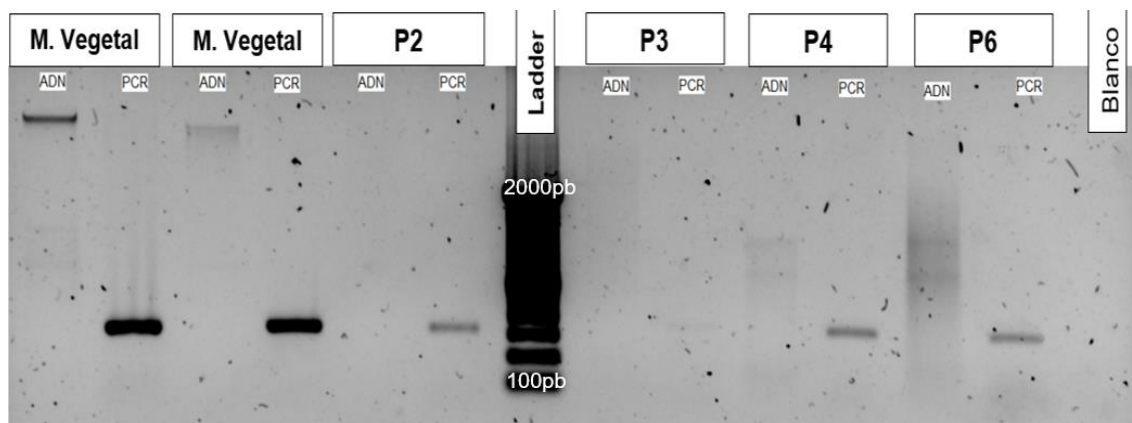


Figura 27. Muestra la comparación entre el ADN y el producto de PCR obtenidos a partir de los métodos de trituración, donde: M. Vegetal1, P2 y P3 corresponde al uso del Pistilo y M. Vegetal2, P4 y P6 corresponden al Homogeneizador.

4.1.2. Elección del método de extracción

En este tipo de investigaciones es necesario determinar el método de extracción óptimo según el tipo de muestra ya que aún no se ha definido un método 100% eficaz para las muestras de *Polypedilum* (Previšić et al., 2016; Kranzfelder et al.,

2017). En este caso, el mejor método fue la extracción con CTAB y la purificación con fenol-cloroformo, esto se concluyó gracias al análisis de la concentración de ADN (Tabla 6) donde, se puede observar (P49 y P50) que dicho método de extracción produce una cantidad considerable de ADN sin llegar a los valores obtenidos con el homogeneizador que con el análisis previo sabemos que cantidades tan altas como las de P4 y P6 reflejan un ADN muy degradado que dificulta el proceso de PCR.

Tabla 6.

Resultados obtenidos según el método de extracción usado

Código	Fecha	Método de extracción	Concentración (ng/μl)	Calidad del ADN (+/-)
P1	22/02/18	Pistilo + kit Qiagen	10,3	-
P2	1/3/2018	Pistilo + <i>Buffer</i>	4,2	+
P3	5/3/2018	Pistilo + kit Invitrogen	15,3	+
P4	22/02/18	Homogeneizador + kit Qiagen	90,0	-
P5	1/3/2018	Homogeneizador + <i>Buffer</i>	14,8	-
P6	5/3/2018	Homogeneizador + kit Invitrogen	75,7	-
P49	8/8/2018	Pistilo + CTAB	33,7	+
P50	8/8/2018	Pistilo + CTAB	26,0	+

Nota: (+) Se evidenció bandas tenues de ADN y **(-)** El ADN estuvo muy degradado

También, debido al análisis de la calidad ADN que se observa en la Figura 28 donde, el proceso de electroforesis permitió determinar que el ADN obtenido de la extracción con CTAB y Fenol-cloroformo está degradado, pero se obtuvieron mejores resultados en la amplificación en comparación a los otros métodos usados, al igual que en otros estudios (Wang & Wang, 2012).

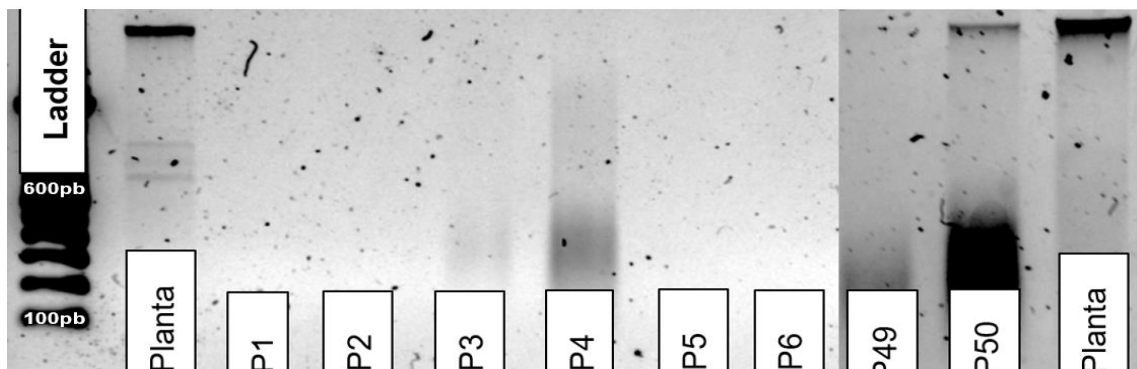


Figura 28. Análisis de la calidad del ADN obtenido de las diferentes metodologías presentadas en la Tabla 6; la P50 muestra una banda de ADN genómico muy notable en comparación a los otros métodos que muestran ADN muy degradado (P4).

4.2. Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En un inicio la PCR inicial fue posible solo en algunas muestras y su producto fue escaso, a pesar de las pruebas realizadas; por ello se optó por realizar una PCR anidada que permitió obtener una mayor cantidad del amplicón de interés.

Para la PCR inicial, se probaron diferentes combinaciones de cebadores en el Master mix (Tabla 3) con 2 μ L de ADN y el programa del termociclador (Tabla 4) con una temperatura de hibridación de 48°C y 40 ciclos. Sin embargo, debido a la irregularidad en los resultados previos se realizó una prueba donde se evalúa las mismas muestras a diferentes temperaturas de hibridación (Figura 29), en

este caso las muestras fueron sometidas a 45°C (a), 48°C (b) y 50°C (c); y también se realizó una variación en la cantidad de ADN con el fin de incrementar la intensidad de las bandas en la amplificación. Con esta prueba se logró determinar que la cantidad de ADN óptima es 2 µl de una elución de 40 µl obtenidos en la extracción de ADN, la cantidad en nanogramos es irregular debido a que el ADN extraído estuvo muy degradado. Además, se concluyó que la temperatura adecuada de hibridación para las muestras de *Polypedilum* es de 45°C (a) usando los cebadores LCO y HCO; a pesar de que en algunos casos las bandas del producto de PCR sean tenues (P10).

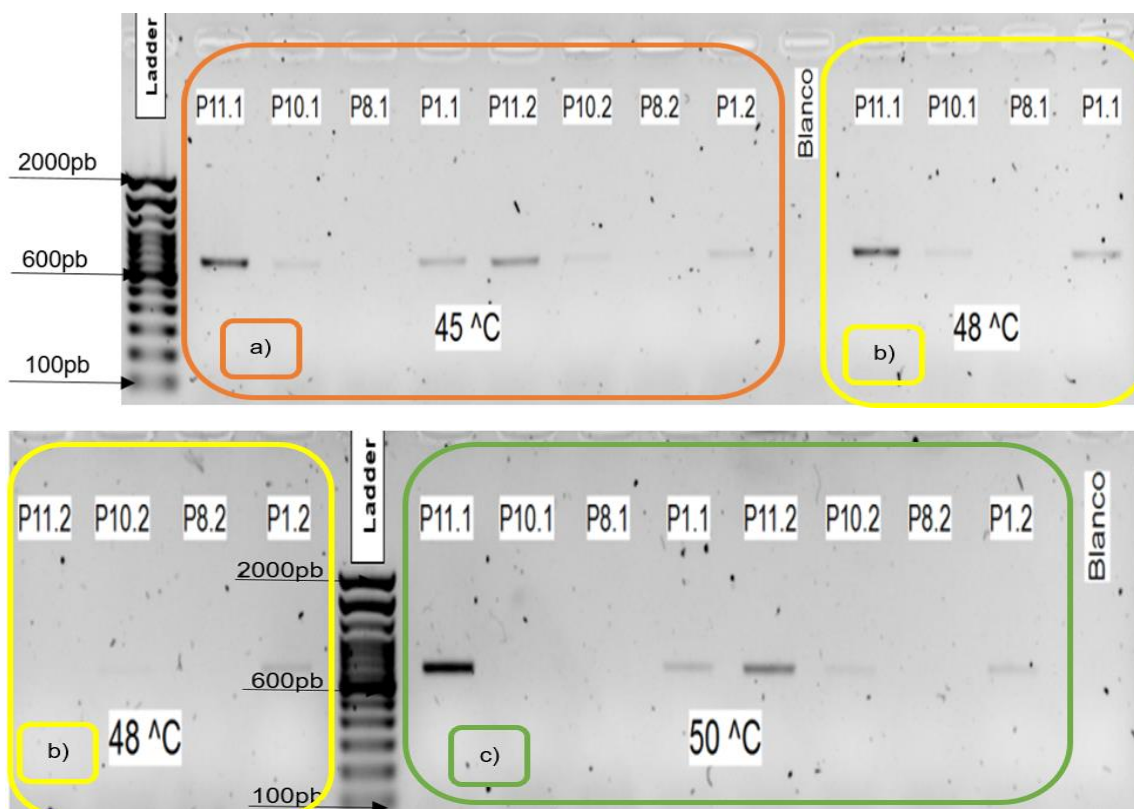


Figura 29. Resultados del gradiente de temperatura y la variación en la cantidad de ADN en la amplificación del ADN de muestras de *Polypedilum* con los cebadores LCO y HCO; donde:

- a) En color naranja corresponde a 45°C,
- b) En color amarillo corresponde a 48°C y
- c) En color verde corresponde a 50°C.

Por otro lado, a pesar de la variación de ADN y del gradiente de temperatura no se lograron obtener resultados positivos en todas las muestras evaluadas (P8 de la Figura 29), por ello se probaron diferentes combinaciones de cebadores que permitieron mejorar los resultados, como se ve en la Figura 30 con la combinación de cebadores LCO y Nancy se obtuvieron más resultados positivos que con la combinación de LCO y HCO.

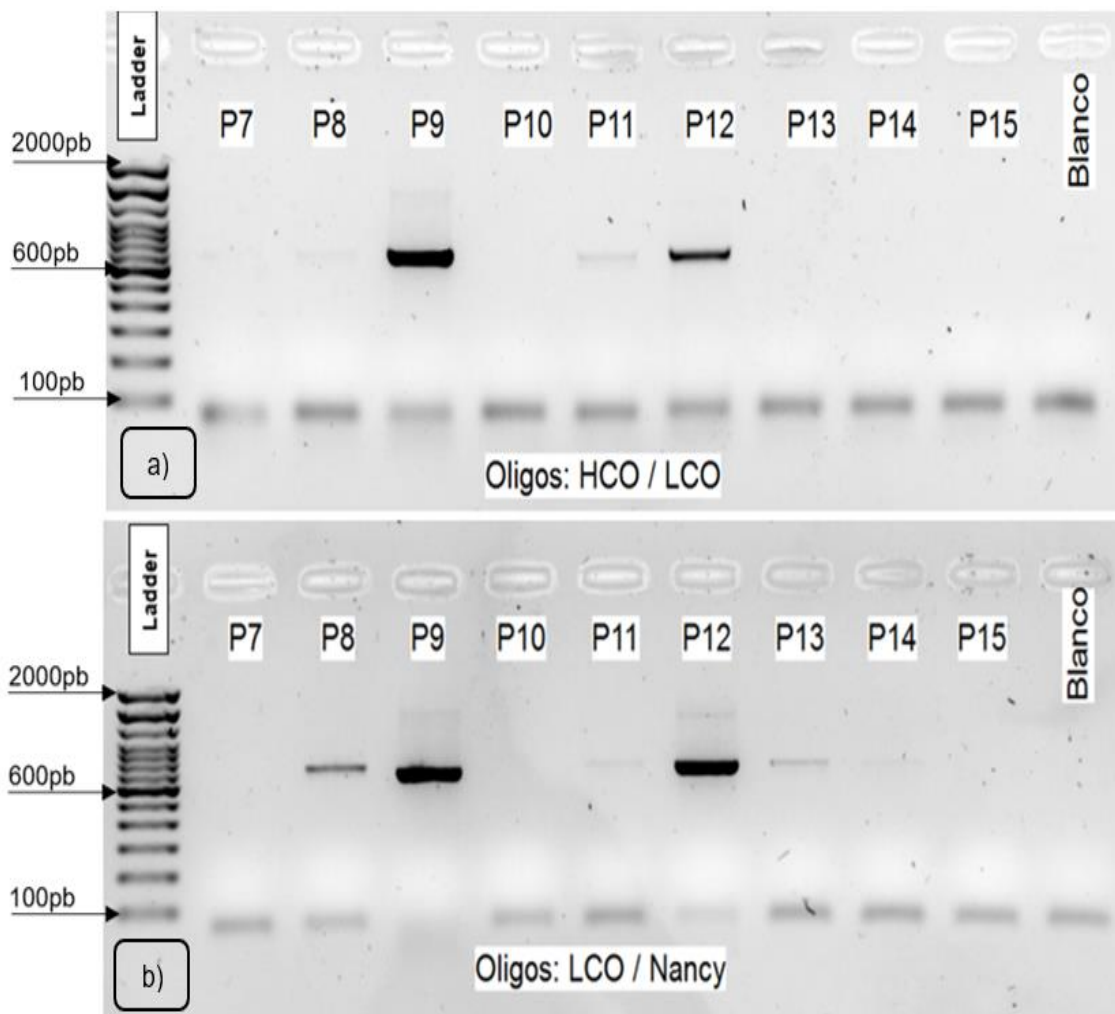


Figura 30. Resultados de las diferentes combinaciones de cebadores, la combinación LCO/Nancy muestra mejor rendimiento en la PCR; donde:

- a) PCR realizada con los cebadores HCO y LCO y
- b) PCR realizada con los cebadores LCO y Nancy.

Sin embargo, los resultados no fueron óptimos en la mayoría de las muestras y debido a la variabilidad y poco rendimiento en los resultados de la PCR inicial se realizó una reamplificación conocida como **PCR anidada**, donde se probaron diferentes combinaciones de cebadores (Tabla 2) según la Figura 26.

Tabla 7.

Posibles combinaciones para realizar una PCR anidada según la combinación usada en la PCR inicial

	PCR inicial	PCR anidada
Combinación 1	LCO y HCO	1709 y 2191
Combinación 2	LCO y Nancy	MT6 y Nancy

En la PCR anidada la muestra de ADN añadida al máster mix fue una dilución de 1/100 del producto de la PCR inicial de cada muestra con el fin de eliminar residuos de la PCR inicial y que así el fragmento de interés este más disponible para los elementos de la PCR anidada; la relación con el master mix fue de 5:15 y las condiciones usadas se muestran en las Tablas 3 y 4; donde la temperatura de hibridación fue de 45°C; durante 32 ciclos.

Gracias al gel de electroforesis se identificó que la combinación MT6/Nancy es la mejor para la amplificación del sitio de interés, obteniéndose una banda del tamaño esperado, como se puede ver en la Figura 31. Sin embargo, los resultados reflejan un poco de inespecificidad, dicho problema se solucionó incrementando la temperatura de hibridación.

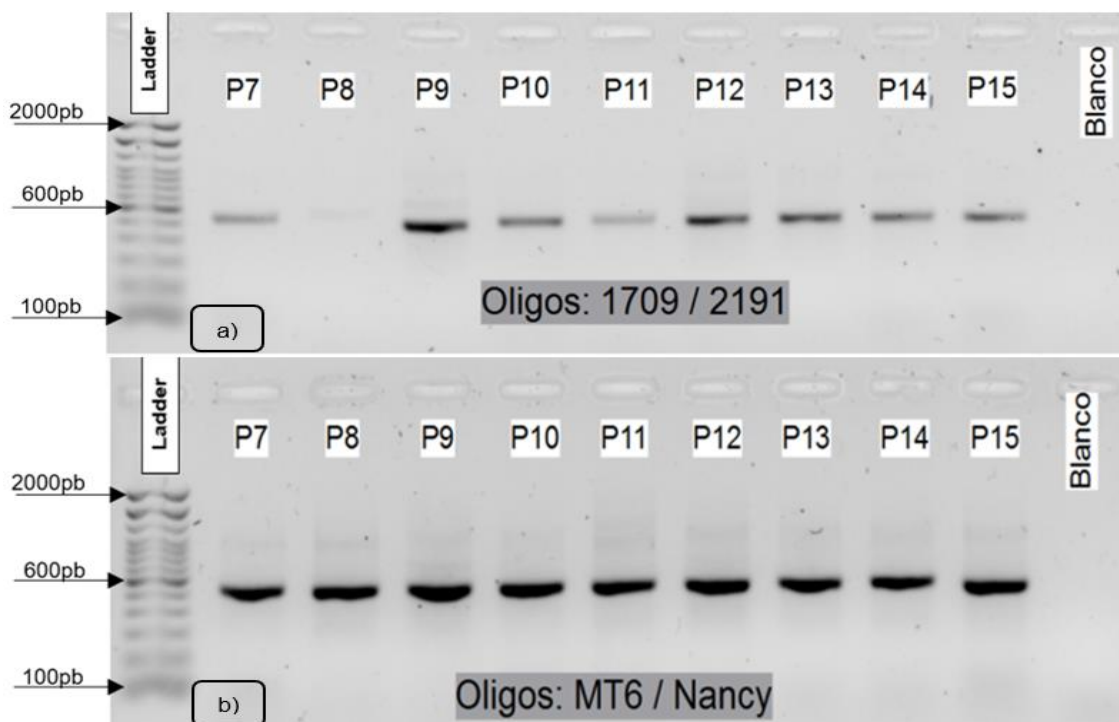


Figura 31. Resultados de las combinaciones de cebadores planteadas para la PCR anidada; donde:

- a) Combinación 1 de la Tabla 7 y
- b) Combinación 2 de la Tabla 7.

En este caso y en otros estudios se ha determinado que existen otros factores que pueden afectar el rendimiento de la PCR, por ejemplo: el tamaño de la larva, la especie, el lugar de muestreo, el método y tiempo de conservación de las muestras, la temperatura de hibridación, etc. Esto, debido a la cantidad de ADN molde que se puede obtener, la variabilidad genética del género, la degradación de la muestra e incluso se registraron algunos casos donde el aumento en la temperatura hibridación aumentaba el rendimiento de algunas muestras y disminuía el de otras (Wang and Wang, 2012; Sari et al., 2015; Hernández et al., 2016; Kranzfelder et al., 2017).

4.3. Análisis Genético

4.3.1. Secuenciación

De 131 individuos sometidos al proceso de extracción de ADN (Tabla 1), se obtuvieron las secuencias con un tamaño de 464 pares de bases de 69 (52,67%) muestras (Tabla 8). A pesar de la variación en los parámetros de la PCR no fue posible obtener los amplicones de todas las muestras al igual que en otras investigaciones donde incluso varían el método de extracción, el sitio de recolección y el tipo de muestra; por ejemplo, en Noruega de 190 muestras de pupas de quironómidos se obtuvieron 172 amplicones y de 190 muestras provenientes de Costa Rica solo se obtuvieron 148 amplicones (Kranzfelder et al., 2017).

Tabla 8.

Clasificación de los individuos para el análisis genético

Rango Altitudinal	Punto de muestreo	Individuos
1	EOP049	12
1	EOP050	9
2	EOP001	5
2	EOP020	17
3	EOP004	10
3	EOP017	16
Total de individuos		69

En otras experimentaciones los fragmentos de COI los fragmentos obtenidos de macroinvertebrados varían de 376 a 710 pares de bases dependiendo de los cebadores usados; sin embargo, en estudios de la Familia Chironomidae donde se usaron los mismos cebadores que en este estudio (MT6 y Nancy) obtuvieron un mayor rendimiento en el proceso de PCR pero tampoco lograron un rendimiento del 100% en el proceso de PCR; esto pudo deberse a otros factores que involucran a las muestras por ejemplo: el tipo de muestra, las condiciones y estado de conservación de estas antes del proceso de extracción del material genético (Folmer et al., 1994; Pons et al., 2004; Pauls et al., 2006; Prat et al., 2013; Sari et al., 2015).

4.3.2. Identificación con *DNA barcodes*

Al comparar las secuencias obtenidas con las bibliotecas informáticas no se logró identificar especies ya que el porcentaje de identidad fue máximo del 93% y el menor fue del 88% como se muestra en la Tabla 9 (Madrigal-Valverde, 2017), lo que no asegura que dicha muestra pertenezca a una especie específica.

También, las bases de datos poseen secuencias identificadas a nivel de familia o a nivel de género, pero en muy pocos casos a nivel de especie. Otras razones por las que la identificación no pudo ser posible podría ser que los amplicones obtenidos fueron de baja calidad o presentaban algún tipo de contaminación (Kranzfelder et al., 2017).

Además, la mayoría de las especies del género *Polypedilum* aún no han sido descritas a nivel genético, sobre todo en el Ecuador. Se debe considerar que el análisis con *DNA barcoding* sobreestima incorrectamente el número de especies con el 3% de divergencia de las secuencias (Hebert et al., 2004).

Tabla 9.

Muestras comparadas con bases de Datos

Muestra	GenBank	Base de datos	%Identidad
G1-EOP049-P67	KR460395.1	<i>Polypedilum sp.</i>	88%
G1-EOP050-P14	JF870580.1	<i>Polypedilum sp.</i>	89%
G1-EOP050-P18	KR460395.1	<i>Polypedilum sp.</i>	89%
G2-EOP001-P5	JF870580.1	<i>Polypedilum sp.</i>	89%
G2-EOP001-P59	KR460395.1	<i>Polypedilum sp.</i>	89%
G2-EOP020-P45	KU497053.1	<i>Polypedilum sp.</i>	89%
G2-EOP020-P86	LC329191.1	<i>Polypedilum japonicum</i>	88%
G3-EOP004-P66	HQ939285.1	<i>Polypedilum sp.</i>	93%
G3-EOP004-P127	KR085232.1	<i>Polypedilum halterale</i>	90%
G3-EOP017-P34	KR460395.1	<i>Polypedilum sp.</i>	89%
G3-EOP017-P40	JF870580.1	<i>Polypedilum sp.</i>	89%

Debido a la variabilidad genética y a la dificultad de identificación de las especies con los *DNA barcodes* se planteó determinar unidades operativas taxonómicas para analizar las poblaciones del género *Polypedilum*, para lo cual se determinó qué porcentaje de similitud o divergencia es el adecuado para considerar que muestras podrían ser de la misma unidad taxonómica operativa (N. Prat et al., 2013; Song et al., 2016).

De igual manera en otras investigaciones por la falta de información bioinformática o porque los individuos no han sido clasificados a nivel taxonómico, se plantea identificar unidades taxonómicas operativas para el análisis de las poblaciones del género *Polypedilum* (Thiru and Rundell, 2008; Saldamando and Marquez, 2012; Ninahuanca et al., 2013; Song et al., 2016).

4.3.3. Variabilidad genética del Género

Para analizar la variabilidad genética se realizó el alineamiento que se puede observar en la Figura 32, esto nos indica que existe una gran variabilidad genética dentro del género de *Polypedilum*; el alineamiento con MEGA 7 se puede observar en los Anexos 3 y 4.

Además, se identifican algunos casos como las muestras P34 o P29 con extremos muy distintos a la mayoría de las muestras y por ello se presume que existieron errores en la obtención de la secuencia consenso, es por esto que en otros estudios prueban a amplificar con varias combinaciones de cebadores y así obtener fragmentos más grandes de los cuales se pueda obtener una secuencia consenso donde los extremos no muestren tanta variabilidad o dicha variabilidad sea confirmada por la obtención de varias secuencias de la misma muestra (N. Prat et al., 2013). En este caso se podría amplificar con otra

combinación de cavadores para corroborar la divergencia genética hallada en los extremos de muestras como P34 o P29.

Species/Abbrv										*		*							*	*	*	*			*	*																									
24. G2-EOP001-P5	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
25. G2-EOP001-P59	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
26. G2-EOP001-P60	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
27. G2-EOP001-P62	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
28. G2-EOP001-P7	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
29. G2-EOP020-P23	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	A	G	C	T	C	C	T	G	A	T	A	T	A	G	C	T	T	T	C	C	C	T	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
30. G2-EOP020-P24	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	A	G	C	T	C	C	T	G	A	T	A	T	A	G	C	T	T	T	C	C	C	T	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
31. G2-EOP020-P25	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	A	G	C	T	C	C	T	G	A	T	A	T	A	G	C	T	T	T	C	C	C	T	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
32. G2-EOP020-P26	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	A	G	C	T	C	C	T	G	A	T	A	T	A	G	C	T	T	T	C	C	C	T	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
33. G2-EOP020-P30	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	A	G	C	T	C	C	T	G	A	T	A	T	A	G	C	T	T	T	C	C	C	T	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
34. G2-EOP020-P31	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	A	G	C	T	C	C	T	G	A	T	A	T	A	G	C	T	T	T	C	C	C	T	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
35. G2-EOP020-P83	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
36. G2-EOP020-P85	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	T	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
37. G2-EOP020-P29	C	T	T	A	T	A	A	T	G	A	G	A	G	C	T	C	C	T	G	A	T	A	T	A	G	C	T	T	T	C	C	C	T	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
38. G2-EOP020-P86	C	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A		
39. G2-EOP020-P27	T	C	G	A	C	A	A	A	A	G	G	G	A	A	C	T	C	T	G	A	T	A	T	G	G	C	T	T	C	C	T	C	G	A	T	A	A	T	A	A	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
40. G3-EOP017-P34	C	C	C	C	C	A	T	T	G	C	G	G	G	G	G	T	C	G	G	G	C	A	C	T	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	G	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
41. G2-EOP020-P87	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	T	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
42. G2-EOP020-P91	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	
43. G2-EOP020-P92	T	T	A	A	T	A	T	T	A	G	G	G	G	C	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	C	C	C	G	A	A	T	A	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	

Figura 32. Alineamiento parcial de las muestras en el programa MEGA 7, se puede evidenciar una gran variabilidad en el extremo 5' de las muestras P29, P86, P27 y P34.

Mediante el modelo de Kimura de 2 parámetros y con un Bootstrap de 100 repeticiones se obtuvo una matriz de distancias que permitió analizar la divergencia entre las muestras de la Tabla 8. Con esto, se determinó que las secuencias tienen una máxima similitud del 99,78%, exceptuando aquellas muestras que han sido totalmente idénticas, y una mínima similitud del 68,82%. Por otro lado, cuando la divergencia fue analizada entre la secuencia del género *Barbadocladus* (Outgroup) y las muestras, la máxima similitud fue del 81,4% y la mínima similitud fue del 68,44% (Kimura, 1980; Kumar, et al., 2016).

Además, se determinó que la similitud en promedio de toda la población es del 87%, lo que nos indica que en este caso existe un 13% de diversidad genética dentro del género de *Polypedilum*.

Tabla 10.

Divergencia de las 69 secuencias obtenidas

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	31,2%	31,6%
Mínima	0,2%	18,6%
Media	13,0%	21,6%

1.3.4.1. Variabilidad genética según el Rango Altitudinal y según el punto de muestreo

4.3.3.1.1. Rango Altitudinal 1

Las 21 muestras pertenecientes al rango altitudinal 1 con cuerpos de agua a 121 y 205 metros sobre el nivel del mar poseen una divergencia de 12,49%; con esto

se presume que en este rango altitudinal podrían vivir varias especies del género *Polypedilum*.

Dentro de esta población la similitud máxima fue de 99,8%, exceptuando a las exactamente iguales y la similitud mínima fue de 76,1%. Sin embargo, cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue de 80,2% y la menor fue de 75,4% como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11.

Divergencia de las muestras del Rango Altitudinal 1

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	23,92%	24,65%
Mínima	0,216%	19,85%
Media	12,49%	21,89%

4.3.3.1.1.1. Punto EOP049

En el punto de muestreo EOP049, las 12 muestras recolectadas en el Río Casacay a 121 metros sobre el nivel del mar poseen una divergencia media del 4,06%; por lo que se presume que en este río no se desarrollan muchas

especies; esto puede deberse a condiciones ambientales o fisicoquímicas de dicho punto de muestreo.

Este grupo reflejó una similitud máxima de 99,8%, exceptuando a las exactamente iguales y una similitud mínima de 88,9%. Sin embargo, cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue de 79,2% y la menor fue de 75,6% como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12.

Divergencia de las muestras del Punto EOP049

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	11,2%	24,4%
Mínima	0,2%	20,8%
Media	4,1%	21,9%

4.3.3.1.1.2. Punto EOP050

En el punto de muestreo EOP050, las 9 muestras provenientes del Río Colorado a 205 metros sobre el nivel del mar poseen una divergencia de 11,47%, lo que nos indica que, a pesar del pequeño tamaño de la población evaluada, la variabilidad genética es alta.

Este grupo posee una similitud máxima de 99,8% y no existieron secuencias exactamente iguales; esto puede ocurrir debido a la poca cantidad de muestras evaluadas. La mínima similitud fue de 77,6% y cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue de 80,2% y la menor fue de 75,4% como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13.

Divergencia de las muestras del Punto EOP050

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	22,4%	24,6%
Mínima	0,2%	19,8%
Media	11,5%	21,9%

En resumen, dentro del rango altitudinal 1, el punto de muestreo EOP050 es el que presenta la mayor diversidad genética a pesar de ser una población más pequeña que la del punto EOP049; es decir, en este caso se presume que en el Río Colorado existen más especies de *Polypedilum* que en el Río Casacay.

4.3.3.1.2. Rango Altitudinal 2

Las 22 muestras pertenecientes al gradiente altitudinal 2 con cuerpos de agua a 529 y 991 metros sobre el nivel del mar poseen una divergencia del 12, 62%; lo

que indica una gran variabilidad genética dentro de este gradiente altitudinal; esto puede deberse a la diferencia altitudinal entre los puntos de muestreo.

Este grupo reflejó una similitud máxima de 99,8%, exceptuando a las exactamente iguales y este grupo posee una similitud mínima de 69,1%. Sin embargo, cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue 79,5% y la menor fue 68,4% como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14.

Divergencia de las muestras del Rango Altitudinal 2

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	30,9%	31,6%
Mínima	0,2%	20,5%
Media	12,6%	22,1%

4.3.3.1.2.1. Punto EOP001

Las 5 muestras (larvas) recolectadas en un Riachuelo en el cantón Piñas a 529 metros sobre el nivel del mar correspondientes al punto de muestreo EOP001 poseen una divergencia de 10,55%; esto puede deberse al tamaño de la población evaluada. Sin embargo, podría indicar que en dicho Riachuelo viven varias especies del género *Polypedilum*.

Este grupo tuvo una similitud máxima de 99,8%, exceptuando a las exactamente iguales y este grupo posee una similitud mínima de 81,8%. A pesar de ser un grupo pequeño de muestras evaluadas hubo un caso donde dos muestras fueron 100% iguales.

Por otro lado, cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue de 79,4% y la menor fue de 78,3% como se muestra en la Tabla 15. En este caso a pesar de ser una población de solo 5 individuos, 2 de ellos fueron exactamente iguales.

Tabla 15.

Divergencia de las muestras del Punto EOP001

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	18,2%	21,7%
Mínima	0,2%	20,6%
Media	10,5%	21,2%

4.3.3.1.2.2. Punto EOP020

En el punto de muestreo EOP020 se analizaron 17 muestras recolectadas en el Río Ortega a 991 metros sobre el nivel del mar, poseen una divergencia del 13,22%; con lo que se presume que en dicho punto de muestreo coexisten varias especies del género *Polypedilum*.

Además, se halló una similitud máxima de 99,8%, exceptuando a las exactamente iguales y una similitud mínima de 69,1%. Sin embargo, cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue de 79,5% y la menor fue de 68,4% como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16.

Divergencia de las muestras del Punto EOP020

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	30,9%	31,6%
Mínima	0,2%	20,5%
Media	13,2%	22,3%

En resumen, dentro del rango altitudinal 2 el punto de muestreo EOP020 refleja más diversidad genética, aunque en ambos puntos la divergencia supera el 10%, con lo que se asume que este rango altitudinal existe una gran variedad de especies del género *Polypedilum*. En conclusión, en este caso el Río Ortega en el Cantón Zamora posee mayor diversidad que el Riachuelo en el Cantón Piñas.

4.3.3.1.3. Rango Altitudinal 3

Las 26 muestras pertenecientes al gradiente altitudinal 3 con cuerpos de agua a 1015 y 1923 metros sobre el nivel del mar poseen una divergencia del 12, 59%;

lo que indica una gran diversidad genética del género *Polypedilum* en ríos con mayor altitud.

Este grupo reflejó una similitud máxima de 99,8%, exceptuando a las exactamente iguales y este grupo posee una similitud mínima de 76,4%. Sin embargo, cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue 81,4% y la menor fue 75,4% como se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17.

Divergencia de las muestras del Rango Altitudinal 3

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	23,6%	24,0%
Mínima	0,2%	18,6%
Media	12,6%	20,8%

4.3.3.1.3.1. Punto EOP004

Las 10 muestras recolectadas en un Río Buenaventura a 1015 metros sobre el nivel del mar correspondientes al punto de muestreo EOP004 poseen una similitud divergencia del 6,08%; lo que no refleja gran diversidad genética en este punto de muestreo.

Además, este grupo reflejó una similitud máxima de 99,8%, exceptuando a las exactamente iguales y este grupo posee una similitud mínima de 83,1%. Sin embargo, cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue de 81,4% y la menor fue de 78,93% como se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18.

Divergencia de las muestras del Punto EOP004

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	16,8%	21,1%
Mínima	0,2%	18,6%
Media	6,08%	20,12%

4.3.3.1.3.2. Punto EOP017

Las 16 muestras del punto de muestreo EOP017, obtenidas de una quebrada en la vía San Luis a 1923 metros sobre el nivel del mar, reflejaron una divergencia de 10,88%, mostrando una gran diversidad genética del género *Polypedilum* en este punto.

Además, este grupo reflejó una máxima similitud de 99,8% exceptuando las secuencias que fueron exactamente iguales y la mínima similitud fue del 76,4%;

pero cuando se evaluó las muestras vs el outgroup la mayor similitud fue de 81,4% y la menor fue de 75,9% como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19.

Divergencia de las muestras del Punto EOP017

Divergencia	Entre las muestras	Muestras vs Outgroup
Máxima	23,6%	24,1%
Mínima	0,2%	18,6%
Media	10,8%	21,3%

En resumen, el punto de muestreo EOP017 es el que presenta mayor divergencia genética y se presume que en dicho hábitat se desarrollan más especies del género *Polypedilum* que en el punto EOP004; es decir en la quebrada sin nombre Vía San Luis hay mayor diversidad que en el Río Buenaventura.

- En conclusión, a nivel de rango altitudinal, es el rango 2 (G2) el grupo con mayor diversidad genética (12,62%), luego está el rango 3 (G3) y finalmente el rango 1 (G1); aunque cabe resaltar que la diferencia entre el G2 y el G1 es de apenas 0,13%; es decir, en los tres rangos altitudinales existe una gran diversidad genética del género *Polypedilum* en la Provincia de El Oro (Song et al., 2016; Kranzfelder et al., 2017). Por otro lado, a nivel de los puntos de muestreo, el punto EOP020 que corresponde al Río Ortega es la localidad

con mayor diversidad genética (13,22%), mientras que el punto EOP049 correspondiente al Río Casacay es la localidad con menor diversidad genética (4,06%).

- Además, existieron algunos (Tabla 19) casos en donde la divergencia máxima entre las muestras de *Polypedilum* se acercaba mucho a la divergencia de las muestras vs el Outgroup (*Barbadocladius*); con lo que se puede plantear que alguna de las larvas evaluadas haya sido mal clasificada y esta pertenece a otro género que no sea *Polypedilum*.

4.3.4. Análisis de divergencia y similitud con muestras del género *Polypedilum* de otros países

En primer lugar, se obtuvieron de las bases de datos 14 secuencias de *Polypedilum nubifer* provenientes de distintos países (China, Corea y Australia), se analizó la variabilidad en las secuencias (Tabla 20) de esta especie con el programa MEGA 7.

Con esto se comprobó que las secuencias depositadas en el *GenBank* para una misma especie tienen una divergencia media del 3,16% entre los tres países y un 99% de similitud en esta especie. Dichos resultados podrían variar según la especie que se analice, como se presenta en otros estudios donde se ha reportado una divergencia intraespecífica de 1,94% en especies de *Polypedilum*, es decir, si dos secuencias son 98% similares, pueden ser consideradas de la misma especie (N. Prat et al., 2013; Song et al., 2016).

Con los datos obtenidos en la Tabla 20 se determinó que la similitud de las secuencias de *Polypedilum nubifer* en un solo país es de 99,5%, mientras que la

similitud de las secuencias entre los 3 países es de 93,5%, esta variabilidad genética puede deberse a que los individuos fueron recolectados en diferentes posiciones geográficas donde las condiciones de su hábitat provoca diferencias a nivel genético (Kimura, 1980; Song et al., 2016; Kranzfelder et al., 2017).

Este análisis fue tomado como referencia de la divergencia de una especie del género *Polypedilum*, aunque se desconoce si dicha especie puede encontrarse en el Ecuador.

Tabla 20.

Divergencia en las secuencias de Polypedilum nubifer tomadas de las bases de datos

	Australia	China	Corea	3 países
Divergencia Máxima	0,434%	0,433%	0,433%	6,459%
Divergencia Mínima	0,433%	0,216%	0,433%	0,216%

Por otro lado, podemos observar claramente en el árbol generado con el modelo de Neighbor-Joining (Figura 33) como las secuencias se agrupan según su procedencia y similitud; dejando fuera a la secuencia de *Polypedilum* obtenida en Ecuador (Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987; Tamura et al., 2004; Prat et al., 2013; Sari et al., 2015).

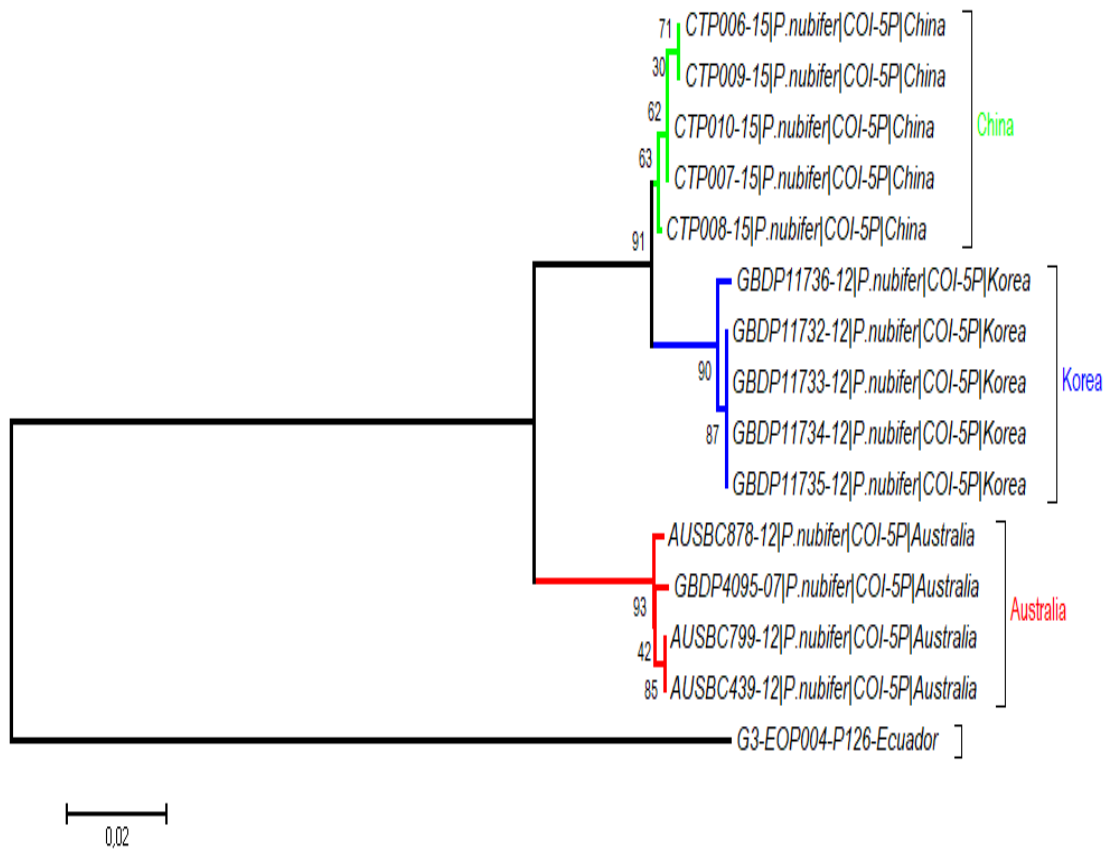


Figura 33. Árbol de máxima verosimilitud de *Polypedilum nubifer* agrupados por países: China (verde), Corea (azul) y Australia (rojo).

4.3.5. Análisis de divergencia con el software Automatic Barcode Gap Discovery o ABGD

Esta prueba dio como resultado agrupaciones de 10 a 25 OTUs dependiendo de la divergencia intraespecífica que se considere, como se muestra en la Figura 34. En el caso de las 25 OTUs, los individuos poseen un 99,5% de similitud al

igual que en el caso evaluado en el apartado anterior, por ello se definió que si dos secuencias poseen el 99,5 % de similitud son del mismo OTU.

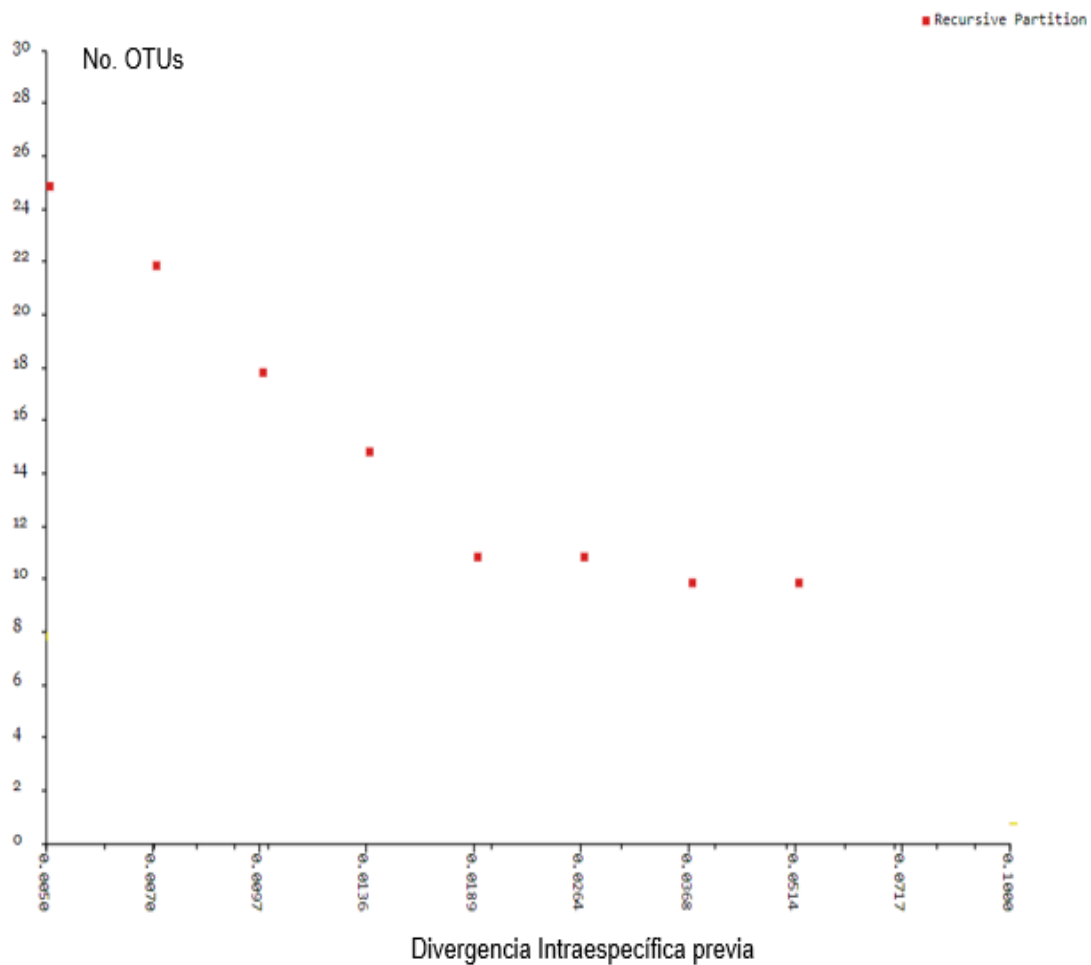


Figura 34. Número de OTUs según la divergencia intraespecífica calculado mediante ABGD usando el modelo de Kimura de 2 parámetros.

4.3.6. Análisis filogenético

En base a los análisis de las secuencias de los tres países (China, Corea y Australia) y a la prueba de ABGD se determinó que con un 0,0050 de divergencia intraespecífica, la población evaluada está conformada por 25 OTUs

representados como: sp1 hasta sp25, distribuidas en los tres rangos altitudinales como se muestra en la Tabla 21.

Sin embargo, existen algunos OTUs que solo aparecen en un rango altitudinal o incluso en un solo punto de muestreo, por ejemplo, el OTU sp3 solo aparece en el punto EOP050.

También, se presentaron casos donde ciertos OTUs aparecen en ambos puntos de muestreo de un solo rango altitudinal, como es el caso del OTU sp7 que está presente en ambos puntos de muestreo el rango altitudinal 3.

Finalmente, existen algunos OTUs que están presentes los tres gradientes altitudinales, como se puede observar en la Tabla 21 el OTU sp1, que fue el grupo más abundante (28 individuos), se halló en los puntos EOP0049 y EOP050 del rango altitudinal 1, en los puntos EOP001 y EOP020 del rango 2 y en el punto EOP017 del rango 3; cabe mencionar que sin importar el número de individuos por punto el OTU sp1 fue la especie más abundante excepción del punto EOP0500 donde solo hubo un individuo.

Con esto, si se plantease que cada OTU representa a una especie de *Polypedilum* podríamos asumir que el gradiente altitudinal no es una barrera para el flujo poblacional de dicha especie en la provincia de El Oro, aunque existen OTUS como el sp2 que solo se halla en el rango altitudinal 1 (G1) y el OTU sp7 que solo se halla en el rango altitudinal 3 (G3), lo que nos indica puede existir algún otro factor ambiental o ecológico que influye en la especiación del género *Polypedilum* en la provincia de El Oro.

Los OTUs más abundantes fueron:

- sp1 con 28 individuos distribuidos en los 3 gradientes altitudinales.
- sp5 con 8 individuos localizados solo en el punto EOP0004 del gradiente altitudinal 3.
- sp15 con 8 individuos distribuidos en los tres gradientes altitudinales.

Tabla 21.

Número de individuos según el OTU y en el punto de muestreo se recolectaron

OTU	Muestras de <i>Polypedilium</i> #individuos	Rango Altitudinal								
		G1			G2			G3		
		EOP049	EOP050	EOP001	EOP020	EOP004	EOP017			
sp1	28	+	+	+	+	-	+			
sp2	2	-	+	-	-	-	-			
sp3	1	-	+	-	-	-	-			
sp4	1	-	-	-	+	-	-			
sp5	8	-	-	-	-	+	-			
sp6	1	-	-	-	-	+	-			
sp7	2	-	-	-	-	+	+			
sp8	1	-	-	-	-	-	+			
sp9	1	+	-	-	-	-	-			
sp10	1	+	-	-	-	-	-			
sp11	1	+	-	-	-	-	-			
sp12	1	-	-	-	+	-	-			
sp13	1	-	-	-	-	-	+			
sp14	1	-	-	-	-	-	+			
sp15	8	-	+	-	+	-	+			
sp16	1	-	+	-	-	-	-			
sp17	1	-	+	-	-	-	-			
sp18	1	-	+	-	-	-	-			
sp19	2	-	-	+	-	-	+			
sp20	1	-	-	-	+	-	-			
sp21	1	-	-	-	+	-	-			
sp22	1	-	-	-	+	-	-			
sp23	1	-	-	-	+	-	-			
sp24	1	-	-	+	-	-	-			
sp25	1	-	-	-	-	-	+			

En la Figura 35 puede verse el árbol filogenético obtenido mediante el modelo de Kimura de 2 parámetros y con un Bootstrap de 100 repeticiones que es uno de los métodos más usados en los estudios filogenéticos de la familia de quironómidos; aunque también se usan otros modelos como el de máxima verosimilitud y con un mayor número de repeticiones lo que asegura la confiabilidad de los resultados obtenidos (Scheibler et al. , 2008; Saldamando and Marquez, 2012; Cornette et al., 2017).

Claramente, los 3 OTUs más abundantes están agrupados formando clados independientes: sp1 (verde), sp5 (azul) y sp15 (rosado); aunque el sp15 parece estar estrechamente relacionada con otros OTUs y en el caso del OTU sp1 los 26 individuos están agrupados en un clado independiente pero los 2 individuos faltantes están en otro clado El Outgroup está representado con el color amarillo.

Sin embargo, algunos autores plantean que en este tipo de investigaciones donde no se puede definir claramente las especies y donde se usan *DNA barcodes* los árboles filogenéticos no necesariamente muestran las relaciones filogenéticas reales entre los individuos evaluados (Hebert et al., 2004; Domínguez-Domínguez et al., 2009; Ninahuanca et al., 2013; Sari et al., 2015; Gill et al., 2016; Song et al., 2016).

Por otro lado, se puede observar clados bien definidos a pesar de que los OTUs poseen solo dos individuos, por ejemplo:

- sp2 (morado)
- sp7 (rojo)
- sp19 (celeste)

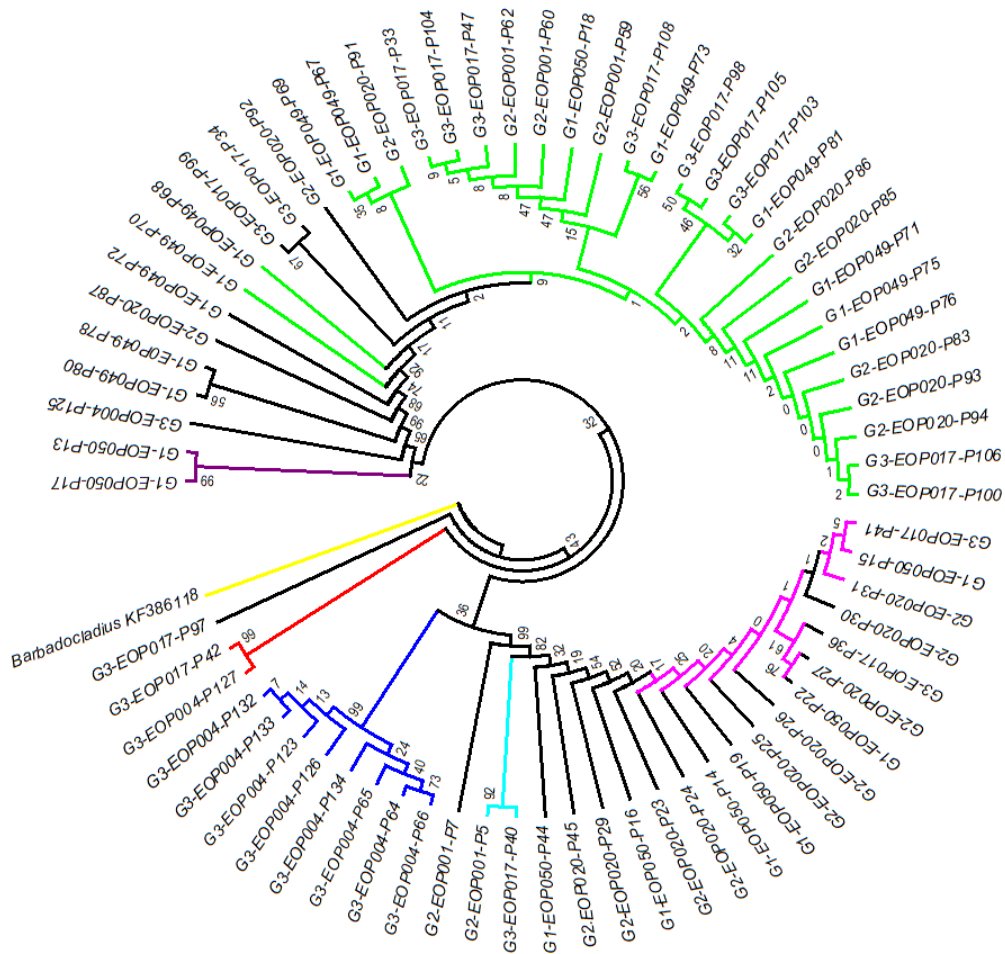


Figura 35. Árbol filogenético basado en secuencias COI parciales y el modelo de Kimura de 2 parámetros. Se muestra a los OTUs más abundantes de derecha a izquierda: sp1 (verde) sp15 (rosado), el sp5 (azul) y OTUs específicos de un rango: sp2 (morado), sp19 (celeste) y sp7 (rojo).

A continuación, en la Figura 36 se puede observar el árbol filogenético que representa la distancia genética y las relaciones evolutivas de los taxones previamente establecidos según la Tabla 21; las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Kimura de 2 parámetros. También, se puede observar que en los extremos del árbol se hallan OTUs específicos del rango altitudinal 1 (arriba) y el rango altitudinal 3 (abajo); mientras que en medio se ubican los OTUs que poseen individuos de los 3 rangos altitudinales.

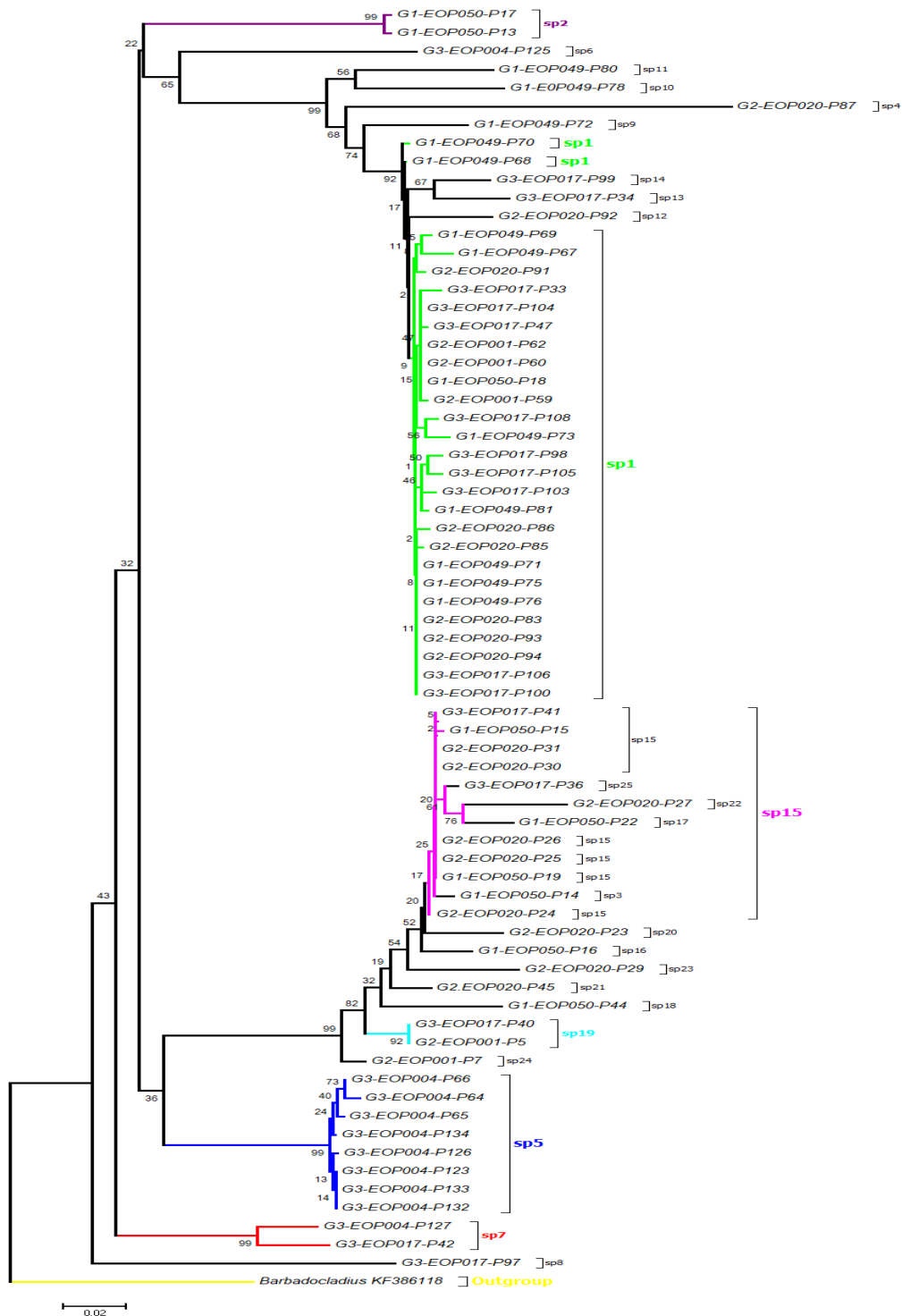


Figura 36. Árbol filogenético basado en secuencias COI parciales y el modelo de Kimura de 2 parámetros. Se puede observar los diferentes OTUs y como se agrupan en distintos clados dejando en otro clado la muestra del género *Barbadocladus* (amarillo).

En la Figura 37 se muestra a todos los individuos pertenecientes al OTU sp1 en color verde, donde en algunos en casos dentro de los clados internos se agrupan según el gradiente altitudinal y según el punto de muestreo. Sin embargo, a nivel general el OTU sp1 no forma clados internos según el gradiente altitudinal o el punto de muestreo. Además, este OTU parece estar relacionado con los OTUs sp12, sp13 y sp14.

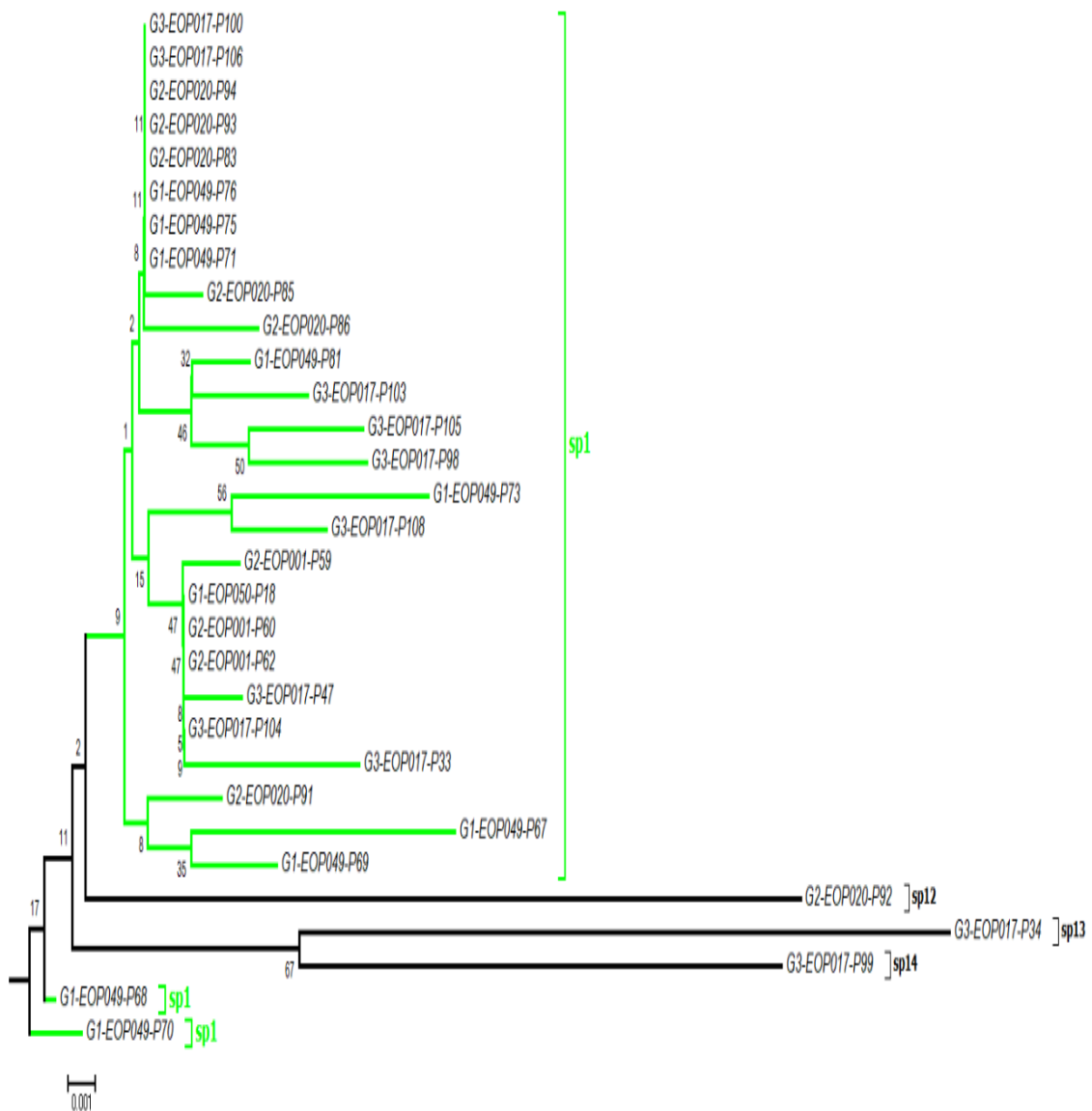


Figura 37. Subárbol filogenético del OTU sp1 modificado de la Figura 36 (Anexo6).

En la Figura 38 se muestra el subárbol del OTU sp5 en color azul, dicha población de ocho individuos forma claramente un clado y posee clados internos a pesar de pertenecer al mismo gradiente y al mismo punto de muestreo; con lo que se puede plantear que dicho OTU posee una gran variabilidad genética. Además, parece estar relacionado sobre todo con los OTUs: sp24 y sp19.

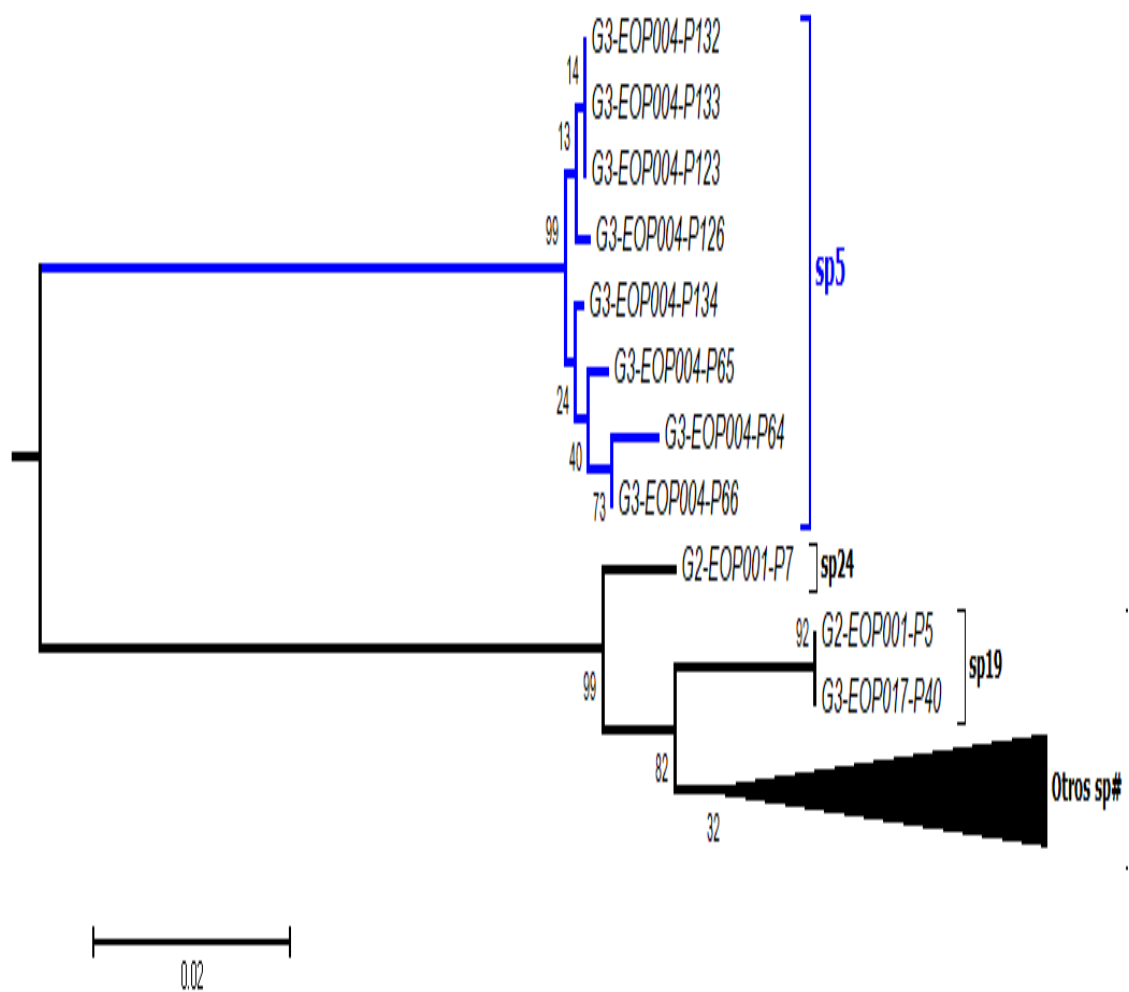


Figura 38. Subárbol filogenético del OTU sp5 modificado de la Figura 36.

En la Figura 39 se muestra el subárbol del OTU sp15 en color rosado, los individuos pertenecientes a este OTU se agrupan dentro de un solo clado; pero dentro de él se encuentran otros OTUs como: sp3, sp17, sp22 y sp25. Es por esto que en dicho caso podría plantear una repetición del análisis de dichos OTUs y sus respectivas secuencias aunque en muchos casos se plantea que en este tipo de experimentación los árboles filogenéticos no necesariamente muestran las relaciones evolutivas de las muestras (Domínguez-Domínguez et al., 2009; Gill et al., 2016; Hebert et al., 2014; Song et al., 2016).

Por otro lado, se puede observar que las muestras no se agrupan ni por el gradiente altitudinal, ni según el punto de muestreo al que pertenecen.

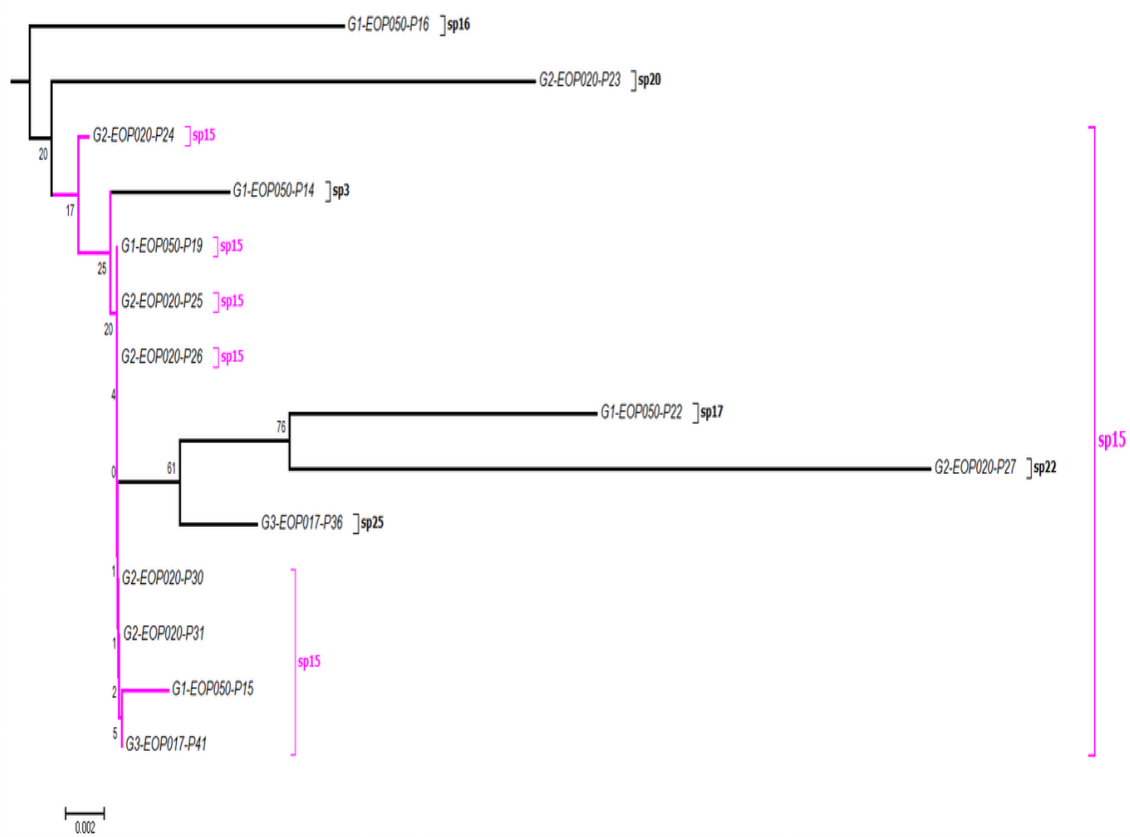


Figura 39. Subárbol filogenético del OTU sp15 modificado de la Figura 36 (Anexo6).

En la Figura 40 se muestra el subárbol del OTU sp2 en morado y otros clados cercanos en negro; en este caso sp2 solo posee dos individuos que claramente se han agrupado en un solo clado y pertenecen al mismo gradiente y punto de muestreo. Dichos individuos podrían estar relacionados genéticamente con los OTUs: sp6, sp11 y sp10.

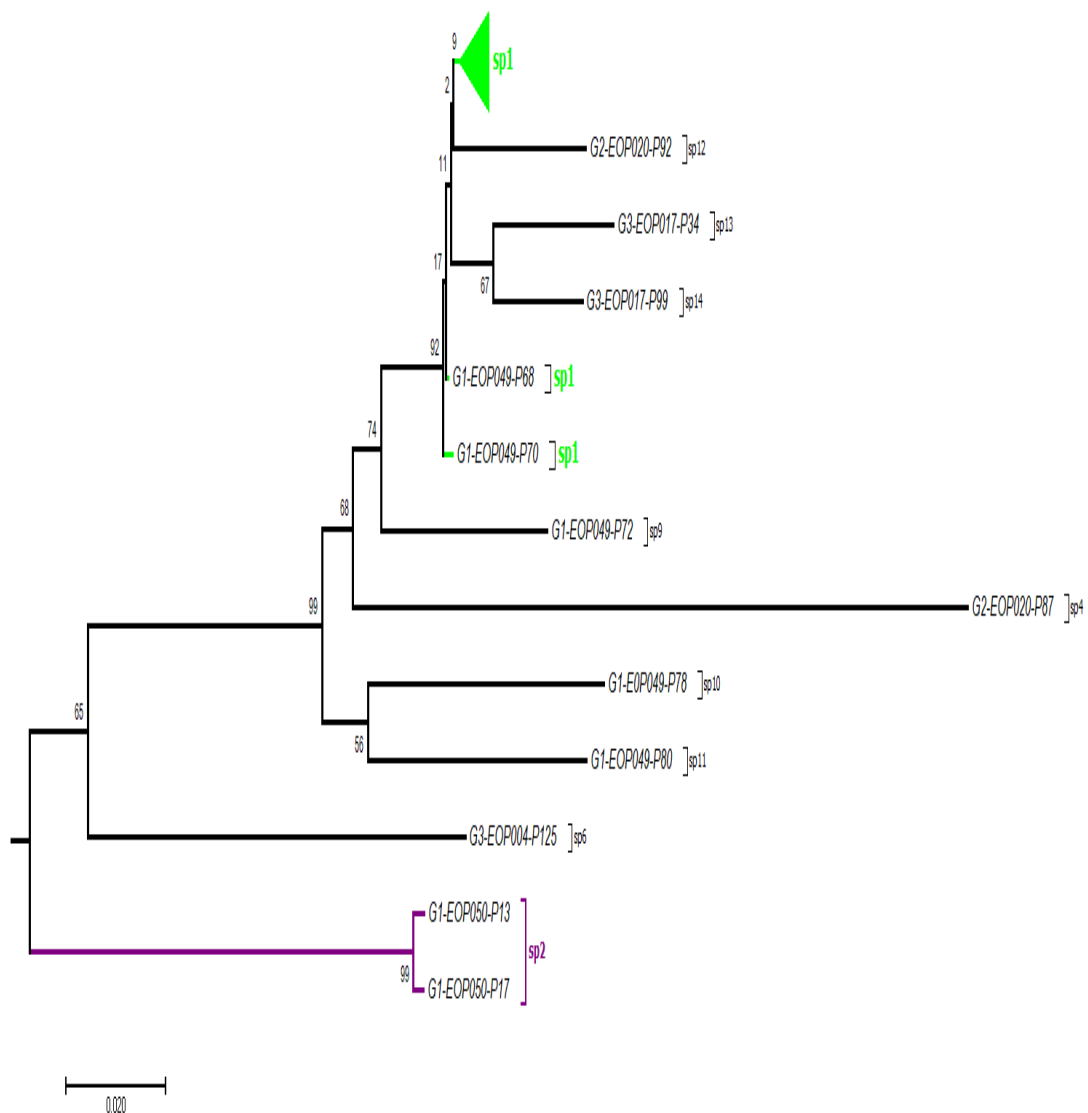


Figura 40. Subárbol filogenético del OTU sp2 modificado de la Figura 36.

En la Figura 41 se muestra a los individuos del OTU sp19 en color celeste, en este caso ambos individuos se hallan en un mismo clado, aunque pertenecen a gradientes y puntos de muestreo distintos; esto podría significar que se trata de una misma especie en dos hábitats de altitudes distintas, corroborando que el gradiente altitudinal no es una barrera para el flujo poblacional y/o genético del género *Polypedilum*.

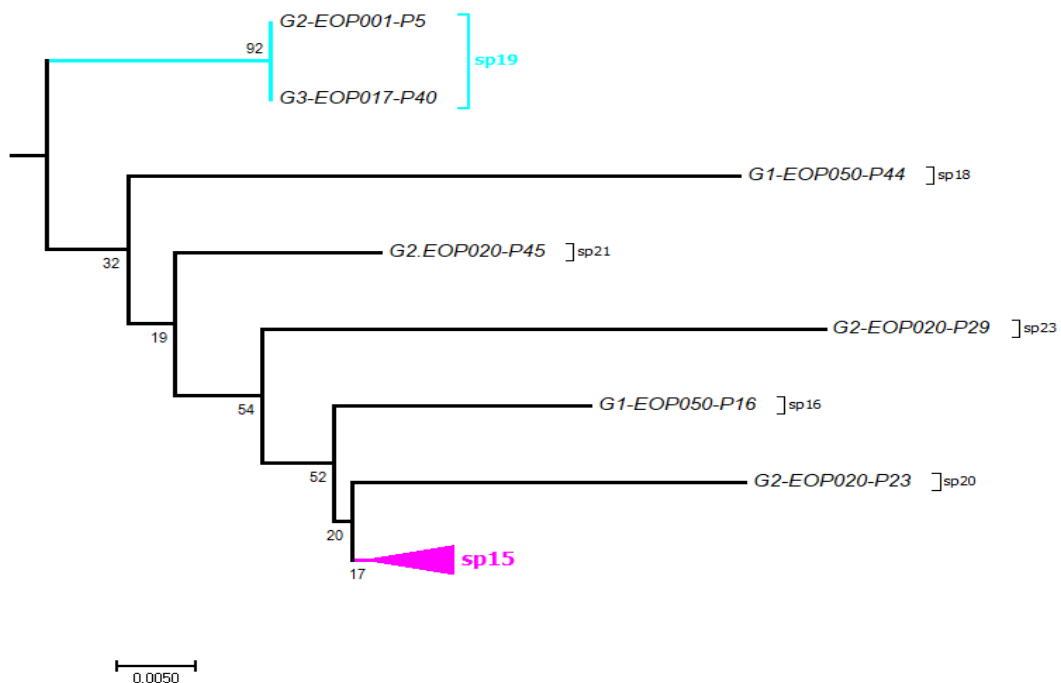


Figura 41. Subárbol filogenético del OTU sp19 modificado de la Figura 36.

En la Figura 42 se muestra el subárbol del OTU sp7 en color rojo y su relación con los anteriores subárboles mencionados. En este caso, el OTU sp7 está formado de dos individuos que pertenecen al mismo gradiente altitudinal, pero a distinto punto de muestreo.

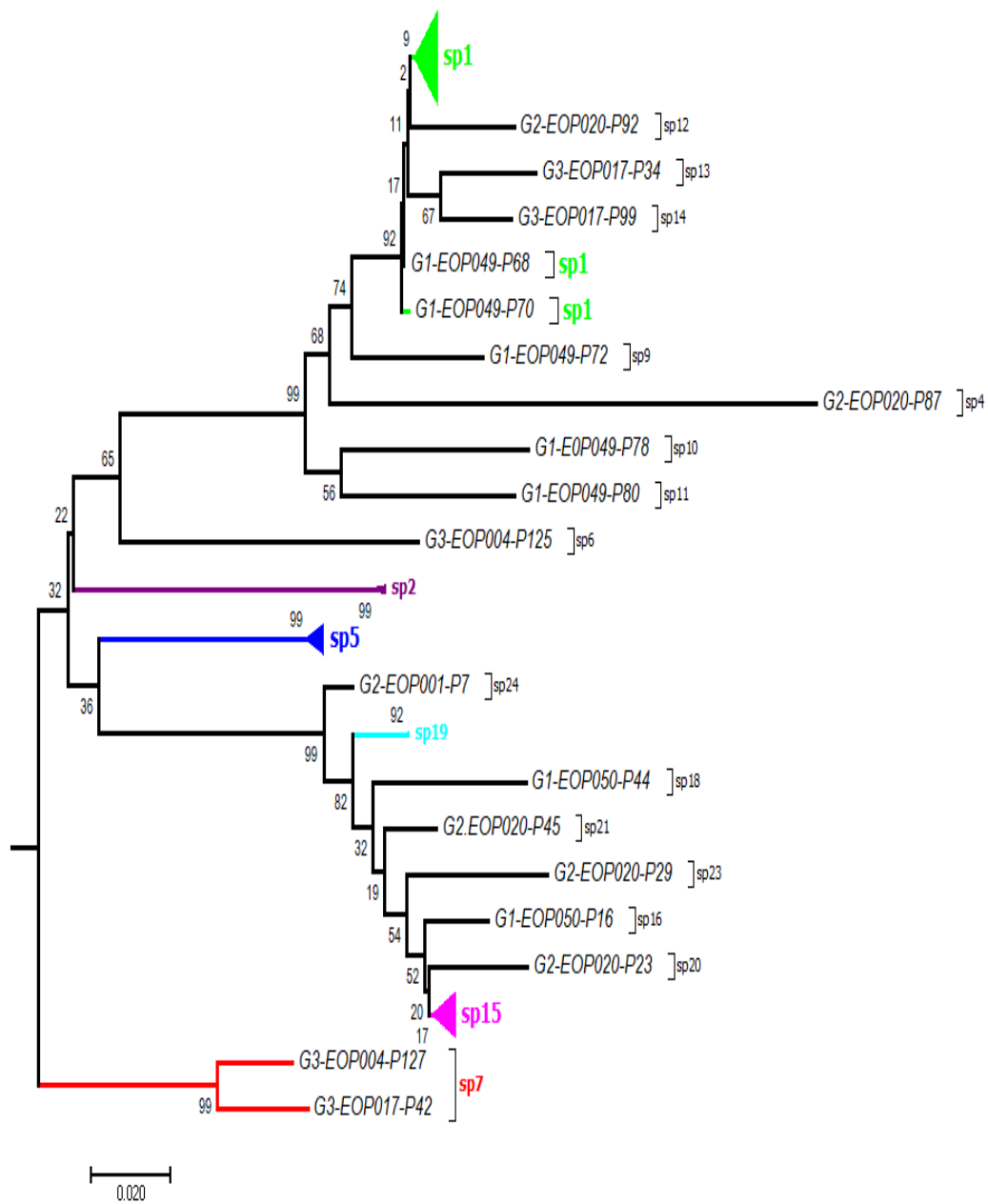


Figura 42. Subárbol filogenético del OTU sp7 modificado de la Figura 36.

En resumen, se podría plantear que cuando se trata de pocos individuos dentro de un OTU, estos sí se agrupan según el punto de muestreo o según el gradiente altitudinal mientras que aquellas poblaciones grandes como el OTU sp1 no se llegan a agrupar según los parámetros anteriormente mencionados.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

En conclusión, la obtención de las secuencias del gen citocromo oxidasa de las poblaciones del género *Polypedilum* de la provincia de El Oro, se obtienen a partir de una PCR inicial con los cebadores LCO y Nancy, seguida de una PCR anidada con los cebadores MT6 y Nancy, donde se debe variar la temperatura de hibridación (45-50°C) para la obtención de las secuencias de todas las muestras; cabe recalcar que en este estudio los fragmentos fueron de 464 pares de bases, pero en otros estudios se obtiene una secuencia más grande con los cebadores MT6 y Nancy.

El análisis de la diversidad genética se realizó en distintos niveles espaciales considerando: puntos de muestreo, rangos altitudinales y en todo el gradiente altitudinal (toda la población), donde: entre los rangos altitudinales no hubo diferencias significativas en la diversidad genética. No obstante, el rango altitudinal 2 fue el que mostró la mayor diversidad genética (12,62%).

Por otro lado, a nivel de los puntos de muestreo, el punto EOP020 que corresponde al río Ortega es el lugar con mayor diversidad genética (13,22%), mientras que el punto EOP049 correspondiente al río Casacay es el que tiene la menor diversidad genética (4,06%).

Además, la identificación de las especies del género *Polypedilum* en la provincia de El Oro no ha sido posible debido a la falta de una clasificación taxonómica e información bioinformática de los individuos de este género. Sin embargo, este

estudio podría ser la base para futuras investigaciones sobre la distribución del género en un gradiente altitudinal del Ecuador o de otros lugares.

El análisis genético nos señala que las muestras pueden agruparse según sus unidades taxonómicas (OTUs), usando el porcentaje de similitud entre sus secuencias genéticas. En esta investigación se determinaron 25 OTUs y gracias al análisis filogenético se concluyó que existen OTUs como sp1 y sp15 que se hallan distribuidos en todo el gradiente altitudinal y, por otro lado, existen OTUs que están restringidos al rango altitudinal 1 (sp2) o al rango altitudinal 3 (sp7). No obstante, en el árbol filogenético se observó que otros OTUs no se agrupan según su punto de muestreo o según el rango altitudinal al que pertenecen, exceptuando aquellas unidades taxonómicas que poseen pocos individuos.

Finalmente, debido a los resultados obtenidos se podría plantear que el gradiente altitudinal no es una barrera para el flujo genético del género *Polypedilum* en la Provincia de El Oro, pero según los OTUs identificados hay un recambio de especies a lo largo del gradiente altitudinal (Song et al., 2016; Kranzfelder et al., 2017).

5.2. Recomendaciones

En primer lugar, debido a la dificultad en la obtención de un ADN y producto de PCR de buena calidad se recomienda realizar estudios similares con muestras frescas. También, se recomienda verificar la variabilidad genética hallada en los extremos de las secuencias consenso mediante la obtención de fragmentos más grandes del gen de interés. En este caso se podría reamplificar las muestras mediante una PCR anidada usando los cebadores LCO y HCO que producirán un fragmento más grande con el fin de realizar un alineamiento y mediante los cromatogramas verificar la variabilidad o corregir las incongruencias.

En segundo lugar, en este caso al usar muestras identificadas solo a nivel de género (*Polypedilum*) y no de especie se recomienda analizar la variabilidad genética con una muestra de un género perteneciente a la misma familia (Chironomidae) y también, con una muestra de un género de otra familia de los macroinvertebrados acuáticos; con el fin de corroborar que la variabilidad hallada sea debido a la especiación de dicho género y no a los errores en la selección de las muestras, es decir si la diversidad genética es muy alta puede plantearse que dicha muestra no pertenece al género *Polypedilum*.

En tercer lugar, se recomienda la formación de especialistas en la identificación a nivel morfológico de este y otros géneros que son de interés ambiental para facilitar futuras investigaciones, ya que una identificación taxonómica rápida brinda información morfológica de los individuos hallados en un sitio específico y esto podría servir en el caso de los bioindicadores como una visión inicial para determinar si un ecosistema está contaminado o no.

En cuarto lugar, se recomienda clasificar a nivel de especie a los individuos de interés mediante su morfología en todas las etapas de desarrollo y luego realizar un análisis genético; ya que, en la mayoría de los estudios donde se usa la técnica del *DNA Barcoding*, los grupos estudiados ya han sido clasificados a nivel taxonómico y esta técnica generalmente es usada en dichos casos para identificar especies que a nivel morfológico son iguales, pero a nivel genético son distintas.

En quinto lugar, es importante realizar este tipo de estudios porque así se genera y acumula información genética del Ecuador y sus especies, dicha información puede servir como una base de comparación para futuras investigaciones ya que en este caso no se halló información genética de este género en el Ecuador. Por otro lado, esta información podría servir para identificar nuevas especies o para

diferenciar las características dentro de una misma especie precedentes de distintos países.

En sexto lugar, se recomienda el uso de varias herramientas bioinformáticas para el análisis de la variabilidad genética y la obtención de los árboles genéticos porque cada herramienta aporta distintos modelos y algoritmos matemáticos con los cuales podemos obtener un resultado específico en común, lo que da veracidad a los resultados obtenidos.

Finalmente, se recomienda un monitoreo del género *Polypedilum* en el Ecuador, debido a que son macroinvertebrados que viven en un sin número de hábitats del país y pueden ser usado como bioindicadores de contaminación de los hábitats donde se desenvuelven. Una vez que sean clasificados según su especie podría ser mucho más fácil determinar el contaminante que afecta a dicho ecosistema ya que con los estudios genéticos se puede corroborar que especies están adaptadas a un medio con un contaminante específico.

REFERENCIAS

- Al-Shami, S. A., Rawi, C. S. M., HassanAhmad, A., & Nor, S. A. M. (2010). Distribution of Chironomidae (Insecta: Diptera) in polluted rivers of the Juru River Basin, Penang, Malaysia. *Journal of Environmental Sciences*, 22(11), 1718–1727. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60311-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60311-9)
- Álvarez, R., De La Lanza, G., Contrera, A., & González, I. (2013). Insectos acuáticos indicadores de calidad del agua en México: Casos de estudio, ríos Copalita, Zimatán y Coyula, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1), 381–383. <https://doi.org/10.7550/rmb.31037>
- AnnaMapa. (2017). Mapa del Ecuador. Recuperado de <http://annamapa.com/ecuador/>
- Asghar, U., Malik, M. F., Anwar, F., Javed, A., & Raza, A. (2015). DNA extraction from insects by using different techniques: A review. *Advances in Entomology*, 3(October), 132–138. <https://doi.org/10.4236/ae.2015.34016>
- Baranov, V., Góral, T., & Ross, A. (2017). A new genus of Buchonomyiinae (Diptera, Chironomidae) from Upper Cretaceous Burmese amber, with the phylogeny of the subfamily revisited. *Cretaceous Research*, 79, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2017.07.007>
- Barriga, C., & Salazar, C. (2007). Aproximación a métodos de análisis filogenéticos. *Bioinformate*, 18(2), 1–29. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i2.243>
- BBC Mundo. (2013). El futuro incierto de los páramos andino. Recuperado de <https://acento.com.do/2013/bbcmundo/118351-el-futuro-incierto-de-los-paramos-andinos/>
- Beres, K., Wallace, R., & Segers, H. (2008). Rotifers and Hubbell'S Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography. *Natural Resource*

Modeling, 18(3), 363–376. <https://doi.org/10.1111/j.1939-7445.2005.tb00163.x>

Bervoets, L., Solis, D., Romero, A. M., Damme, P. V. A. N. Van, Ollevier, F., & Ollevier. (1998). Trace metal levels in chironomid larvae and sediments from a Bolivian river: Impact of mining activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(3), 275–283. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1707>

BOLDSYSTEM. (2017). Specimen Record. Recuperado de http://www.boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=AGAKG119-17

Boltovskoy, E. (1967). Indicadores biológicos en la oceanografía, 23 (2)(Ciencia e Investigación), 66–75.

Brown, J. (1984). Sobre la relación entre la abundancia y la distribución de especies. *The American Naturalist*, 124(2), 255–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/284267>

Cabrero, J., Pedro, J., & Camacho, M. (1998). Capítulo 6: FUNDAMENTOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES, 83–126. Recuperado de http://sesbe.org/sites/sesbe.org/files/recursos-sesbe/fundamentos_GdeP.pdf

Camacho, L., Amorocho, D. F., Mejía, L. M., & Palacio, J. D. (2008). Genetic characterization of the olive ridley sea turtle -*Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829)- in Gorgona National Natural Park (Colombian Pacific) from mitochondrial DNA sequences. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras Del Invemar*, 37(1007), 77–92.

Cerda-Granados, D., & Díaz, V. (2013). Protocolo de extracción ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. *Encuentro*, (94), 82–92.

Chatterjee, S. (2016). Código de barras del ADN: una técnica efectiva en taxonomía molecular. *Biotechnology and Bioengineering*, 3. Recuperado de <http://austinpublishinggroup.com/biotechnology->

bioengineering/fulltext/ajbtbe-v3-id1059.php

- Chaves, J. A., Pollinger, J. P., Smith, T. B., & LeBuhn, G. (2007). The role of geography and ecology in shaping the phylogeography of the speckled hummingbird (*Adelomyia melanogenys*) in Ecuador. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(3), 795–807. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.006>
- Cornette, R., Yamamoto, N., Yamamoto, M., Kobayashi, T., Petrova, N. A., Gusev, O., ... Okuda, T. (2017). A new anhydrobiotic midge from Malawi, *Polypedilum pembai* sp.n. (Diptera: Chironomidae), closely related to the desiccation tolerant midge, *Polypedilum vanderplanki* Hinton. *Systematic Entomology*, 42(4), 814–825. <https://doi.org/10.1111/syen.12248>
- De La Vega, G. J., & Schilman, P. E. (2015). La importancia de la fisiología en la distribución geográfica de los insectos. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 74(3–4), 101–108. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802015000200001&lang=pt%5Cnhttp://www.scielo.org.ar/pdf/rsea/v74n3-4/v74n3-4a01.pdf
- Di Barba, P. (2016). Optimización de viento múltiple y diseño de imán, 52(14), 1216–1218. <https://doi.org/10.1049/el.2016.1527>
- Domínguez-Domínguez, O., Vázquez-Domínguez, E., Domínguez, D., & Domínguez, V. (2009). Filogeografía : aplicaciones en taxonomía y conservación O . Domínguez – Domínguez & E . Vázquez – Domínguez. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 59–70.
- Duchet, C., Franquet, E., Lagadic, L., & Lagneau, C. (2015). Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and spinosad on adult emergence of the non-biting midges *Polypedilum nubifer* (Skuse) and *Tanytarsus curticornis* Kieffer (Diptera: Chironomidae) in coastal wetlands. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.029>

- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis., (Nucleic Acids Research).
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Liguori, J. A., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E., & Souza, V. (2013). Genómica de Poblaciones: Nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la Evolución. *Tip*, 16(1), 42–56. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72077-1](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72077-1)
- Encalada, A., Rieradevall, M., Ríos-Touma, B., García, N., & Prat, N. (2011). *Protocolo Simplificado y Guía de evaluación de la calidad Ecológica de Ríos Andinos*. Quito.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies.
- Fernández, M., & Novoa, B. (2002). Historia del agua como agente terapéutico. *Science Direct*, 24(2), 3–13. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0211-5638\(01\)73022-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0211-5638(01)73022-2)
- Fesl, C. (2002). Biodiversity and resource use of larval chironomids in relation to environmental factors in a large river. *Freshwater Biology*, 47- 1065-1087, 47(6), 1065–1087. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2002.00833.x>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>
- Franklin. (2013). Insects of Tasmania. Recuperado de <https://sites.google.com/site/insectsoftasmaniadiptera/suborder-nematocera/chironomidae-midges/genus-polypedilum>
- Freitas, A. (2012). ¿Agua, elemento importado en las cosmogonías griegas? In F. de H. y C. de la Educación (Ed.), *VI Coloquio Internacional del*

Centro de Estudios Helénicos. La Plata.

- Fuentes, C., & Donato, M. (2014). Review of taxonomic status of *Polypedilum quinquesetosum* (Diptera, Chironomidae). *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 73(3–4), 139–144.
- GADPEO - INABIO. (2018). *Ecosistemas Dulceacuícolas de la Provincia de El Oro: Peces y macroinvertebrados acuáticos como indicadores biológicos del Páramo al Manglar*. (Publicació). Quito-Ecuador.
- García-Rodríguez, J., Molina-Astudillo, I., Miranda-Espinoza, E., Soriano-Salazar, M. B., & Díaz-Vargas, M. (2015). Variación fitoplanctónica en un lago urbano del municipio de Cuernavaca, Morelos, México. *Acta Universitaria*, 25(2), 3–19. <https://doi.org/10.15174/au.2015>
- García, M., Vera, A., Joao, C., & Ligia, B. (2016). IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS MICROHÁBITATS DE AGUA DULCE, 1737(1).
- 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), 20160553. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0553>
- Giribet, G., Edgecombe, G., & Wheeler, W. (2001). Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature*, 413, 157–161.
- Gobeyn, S., Mouton, A. M., Cord, A. F., Kaim, A., Volk, M., & Goethals, P. L. M. (2019). Evolutionary algorithms for species distribution modelling: A review in the context of machine learning. *Ecological Modelling*, 392(November 2018), 179–195. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.11.013>
- Godoy Méndez, A. (2010). Los Invertebrados. Recuperado de <https://es.slideshare.net/agmgodoy/invertebrados-5658655>

- Groenendijk, D., Lücker, S. M. G., Plans, M., Kraak, M. H. S., & Admiraal, W. (2002). Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. *Environmental Pollution*, *117*(1), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00154-3)
- Guisan, A., & Thuiller, W. (2005). Predicting species distribution: Offering more than simple habitat models. *Ecology Letters*, *8*(9), 993–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00792.x>
- Guzman, D. Biogeografía (2016). Recuperado de https://2.bp.blogspot.com/-Dq2ecMe5OEs/WB-5MVGBOs/AAAAAAAAAB9M/-h9f_wX2Bz07voal5A23D8EEXBVmd_qAgCLcB/s1600/f.jpg
- Hanson, P., Springer, M., & Ramirez, A. (2010). Introducción a los grupos de macroinvertebrados acuáticos, *58*, 3–37.
- Hauer, R., & Lamberti, G. (1996). *Methods in stream Ecology* (Second Edi).
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one : DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Blanca, R., & Rieradevall, M. (2014). The Andean Biotic Index (ABI): revised tolerance to pollution values for macroinvertebrate families and index performance evaluation, *28*(15628019), 9–10.
- Hernández, L. M., Prosser, S. W., Rodríguez, M. A., Chaverri, L. G., Hebert, P. D. N., Ryan Gregory, T., ... Wissinger, S. A. (2016). Recovery of DNA barcodes from blackfly museum specimens (Diptera: Simuliidae) using primer sets that target a variety of sequence lengths. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *47*(1), 508–518. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12208>
- Holzenthal, R. W., & Calor, A. R. (2017). Catalog of the Neotropical Trichoptera (Caddisflies). *ZooKeys*, *2017*(654), 1–566. <https://doi.org/10.3897/zookeys.654.9516>

- Invitrogen. (2013). PureLink ® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. *PureLink Genomic DNA Kits For Purification of Genomic DNA*, (25), 1–48. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Invitrogen. (2017). 100bp DNA IADDER, (15628019), 1–2.
- Jacobsen, D., Cressa, C., Mathooko, J. M., & Dudgeon, D. (2008). Macroinvertebrates: Composition, Life Histories and Production. In D. B. T.-T. S. E. Dudgeon (Ed.), *Aquatic Ecology* (pp. 65–105). London: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50006-6>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Kjer, K. M., Blahnik, R. J., Hall, B., Brunswick, N., Holzenthal, R. W., & Avenue, F. (2002). Phylogeny of caddisflies (Insecta , Trichoptera), (July 2001), 83–91.
- Kranzfelder, P., Ekrem, T., & Stur, E. (2017). DNA Barcoding for Species Identification of Insect Skins: A Test on Chironomidae (Diptera) Pupal Exuviae. *Journal of Insect Science*, 17(6), 0–6. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex075>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*.
- Laurindo da Silva, F., Pinho, Luiz Carlos Wiedenbrug, S., Dantas, G., Andersen, T., & Trivinho, S. (2018). Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. In *Academic Press* (Fourth, pp. 661–700). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804223-6.00031-7>
- Liz, B., Sánchez, M., Enrique, A., Rivero, G., Geografía, F. De, Habana, U. De, ... Castillo, D. (2016). Calidad de las aguas del río Ariguanabo según índices físico-químicos y bioindicadores Water quality of Ariguanabo

river according to physico-chemical indices and bioindicators, *XXXVII*(2), 108–122.

- Loayza-Muro, R. A., Marticorena-Ruiz, J. K., Palomino, E. J., Merritt, C., De Baat, M. L., Gemert, M. Van, ... Admiraal, W. (2013). Persistence of chironomids in metal polluted andean high altitude streams: Does melanin play a role? *Environmental Science and Technology*, *47*(1), 601–607. <https://doi.org/10.1021/es302779b>
- Lozano, P. E. C. (2002). Los tipos de bosque en el sur del Ecuador. *Botánica Austroecuatorial: Estudios Sobre Los Recursos Vegetales En Las Provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipec*, (January 2002), 29–50. <https://doi.org/10.1378/chest.08-1829>
- Madrigal-Valverde, K. A. (2017). Uso de herramientas para alineación de secuencias y creación de árboles filogenéticos para la determinación de especies. *Revista Tecnología En Marcha*, *30*(5), 30. <https://doi.org/10.18845/tm.v30i5.3218>
- Manaaki Whenua. (2013). CHIRONOMID MIDGE (CHIRONOMIDAE: POLYPEDILUM). Recuperado de <https://www.landcareresearch.co.nz/resources/identification/animals/freshwater-invertebrates/guide/no-jointed-legs2/true-fly-larvae/midges/chironomid-midge10>
- Marchese, M., Paggi, A. C., Aceñolaza, F., & Mercedes, M. (2004). Diversidad de Oligochaeta (Annelida) y Chironomidae (Diptera) del Litoral Fluvial Argentino. *Temas de La Biodiversidad Del Litoral Fluvial Argentino INSUGEO*, *12*, 217–224. Recuperado de http://insugeo.org.ar/libros/misc_12/26.htm
- Martínez, M., Godínez, J., & Zuñiga-Ramos, C. (2012). *Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* (Vol. 0). <https://doi.org/10.7550/rmb.32706>
- Medina, A. I., & Paggi, A. C. (2004). Composición y abundancia de Chironomidae (Diptera) en un río serrano de zona semiárida (San Luis, Argentina).

Rev. Soc. Entomológica Argentina, 63(3–4), 107–118.

Ministerio del Ambiente. (1996). Parque Nacional Llanganates. Recuperado de <http://www.ambiente.gob.ec/16764/>

Mognaschi, M. (2017). Optimización multiobjetivo inspirada en microbiogeografía para diseño electromagnético industrial. *Electronics Letter*, 53(22), 1458–1460.

Monkhouse, F. (1978). *Diccionario de término geográficos*. (Tau Editions, Ed.) (Oikos). Barcelona.

Navarro, J.-C., Arregui, G., Enríquez, S., & Benítez-Oríz, W. (2015). *Molecular Taxonomy of Anopheles from Ecuador, using mitochondrial DNA (Cytochrome c Oxidase I) and Maximum Parsimony optimization*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* (Vol. 55).

Nieto, C., Malizia, A., Carilla, J., Izquierdo, A., Rodríguez, J., Cuello, S., ... Grau, H. (2016). Patrones espaciales en comunidades de macroinvertebrados acuáticos de la Puna Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 64(2), 747–762. <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i2.18801>

Nieto, C., Ovando, X. M. C. C., Loyola, R., Izquierdo, A., Romero, F., Molineri, C., ... Miranda, M. J. (2017). The role of macroinvertebrates for conservation of freshwater systems. *Ecology and Evolution*, 7(14), 5502–5513. <https://doi.org/10.1002/ece3.3101>

Ninahuanca, A., Arteaga, D., & Luna, R. (2013). Identificación de tricópteros de altura de Bolivia y Perú mediante el código de barras del ADN. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, 24(2), 76–82.

Palacios, A., Carrillo, D., Iruzubieta, J., Boutou, S., & Labadie, D. (2009). IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS ENOLÓGICAS, 1–11.

Palma, A. (2013). Clave para Macroinvertebrados de ríos de Chile. In *Guía para la identificación de invertebrados acuáticos*.

- Palomino, C., & González, Y. (2014). IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS : VENTAJAS Y LIMITACIONES, *31(3)*, 535–546.
- Panatta, Á., Stenert, C., Fagundes de Freitas, S. M., & Maltchik, L. (2006). Diversity of chironomid larvae in palustrine wetlands of the coastal plain in the south of Brazil. *Limnology*, *7(1)*, 23–30. <https://doi.org/10.1007/s10201-005-0160-y>
- Pauls, S., Lumbsch, T., & Haase, P. (2006). Phylogeography of the montane caddisfly *Drusus discolor*: Evidence for multiple refugia and periglacial survival. *Molecular Ecology*, *15(8)*, 2153–2169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02916.x>
- Peck, D. C. (2001). Diversidad y distribución geográfica del salivazo (Homoptera: Cercopidae) asociado con gramíneas en Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología*.
- PescataMinuta. (2007). Dípteros. Recuperado de <https://pescataminuta.es/entomologia/dipteros/>
- Podwojewski, P. (1999). Los Suelos de las Altas Tierras Andinas : Los Paramos del Ecuador. *Sociedad Ecuatoriana de La Ciencia Del Suelo*, *18*, 9–14.
- Pons, J., Bruvo, B., Petitpierre, E., Plohl, M., Ugarkovic, D., & Juan, C. (2004). Complex structural features of satellite DNA sequences in the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae): Random differential amplification from a common “satellite DNA library.” *Heredity*, *92(5)*, 418–427. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800436>
- Prat Fornells, N., Ríos-Touma, B., & Encalada, A. (2011). Ensamblajes de macroinvertebrados de un arroyo tropical andino de alta altitud: la importancia de la estación y el flujo. *Revista Internacional de Hidrobiología*, *96*, 667–685. <https://doi.org/10.1002 /iroh.201111342>
- Prat, N., Acosta, R., Villamarín, C., & Rieradevall, M. (2012). Guía para el reconocimiento de las larvas de Chironomidae (Diptera) de los ríos

Altoandinos de Ecuador y Perú. Clave para la determinación de los principales morfotipos larvarios, 41.

- Prat, N., Ribera, C., Rieradevall, M., Villamarín, C., & Acosta, R. (2013). Distribution, Abundance and Molecular Analysis of Genus *Barbadocladus* Cranston & Krosch (Diptera, Chironomidae) in Tropical, High Altitude Andean Streams and Rivers. *Neotropical Entomology*, 42(6), 607–617. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0161-1>
- Prat, N., Ríos, B., Acosta, R., & Rieradevall, M. (2006). LOS MACROINVERTEBRADOS COMO INDICADORES DE CALIDAD DE LAS AGUAS. In *Macroinvertebrados Bentónicos Sudamericanos*.
- Prefectura de El Oro. (2015). El Oro. Recuperado de <http://geovisor.eloro.gob.ec/>
- Previšić, A., Gelemanović, A., Urbanič, G., & Ternjej, I. (2016). Cryptic diversity in the Western Balkan endemic copepod: Four species in one? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3(1), 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.010>
- Previšić, A., Walton, C., Kučinić, M., Mitrikeski, P. T., & Kerovec, M. (2009). Pleistocene divergence of Dinaric *Drusus* endemics (Trichoptera, Limnephilidae) in multiple microrefugia within the Balkan Peninsula. *Molecular Ecology*, 18(4), 634–647. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04046.x>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2011). ABGD. Recuperado de <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>
- QIAGEN. (2006). DNeasy® Blood & Tissue Handbook, (July), 28–30.
- Ramírez García, Á. (2004). *Efectos Geográficos, Ambientales y Biológicos sobre la Distribución de las Aves Forestales Ibéricas*. Departamento de Zoología y Antropología Física.
- Regier, J. et al. (2010). Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature*.

- Rioja, L. (2012). Los macroinvertebrados acuáticos como indicadores del estado ecológico de los ríos, 24–29.
- Ríos-Touma, B., Holzenthal, R. W., Huisman, J., Thomson, R., & Rázuri-Gonzales, E. (2017). Diversity and distribution of the Caddisflies (Insecta: Trichoptera) of Ecuador. *PeerJ*, 5, e2851. <https://doi.org/10.7717/peerj.2851>
- Rodríguez-Correa, H., González-Rodríguez, A., Oyama, K., Rodríguez, H., González, A., & Oyama, K. (2017). Perspectivas de la Ecología Molecular en un país megadiverso. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.002>
- Rojas Valencia, L. (2010). Macroinvertebrados acuáticos como indicadores biológicos del estado de la cuenca del Rio Combeima Tolima, (Ecology).
- Rotvit, L., & Jacobsen, D. (2013). Aumento de la temperatura y rendimiento respiratorio de los macroinvertebrados con diferentes tolerancias a la contaminación orgánica. *ELSEVIER*, 43(6), 510–515. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.limno.2013.04.003>
- Rueda, J., & Molina, C. (2014). Los Macroinvertebrados acuáticos , excelentes indicadores biológicos en la EIA Los macroinvertebrados acuáticos , excelentes indicadores biológicos en las EIA : diferentes casos de estudio en el este de la Península Ibérica Introducción, (January 2012).
- Ruiz Caleño, Y., Rivera-Rondon, A., & Ovalle, H. (2018). Hábitos alimentarios de quironómidos (Diptera: Chironomidae) en lagos del páramo de Chingaza, Colombia. *Revista de Biología Tropical.*, 66(1), 136–148.
- Ruiz, J., Ospina, R., Gómez, H., & Riss, W. (2016). GUIA PARA LA IDENTIFICACION GENERICA DE LARVAS DE QUIRONÓMIDOS (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) DE LA SABANA DE BOGOTÁ . *Caldasia*, 22(1), 34–60. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/23641506>

- Saether, O. A. (2016a). Chironomid communities as water quality indicators. *Ecography*, 2(2), 65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1979.tb00683.x>
- Saether, O. A. (2016b). Chironomid Communities as Water Quality Indicators
Chironomid communities as water quality indicators, 2(2), 65–74.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.
- Saldamando, C. I., & Marquez, E. J. (2012). Approach to Spodoptera (Lepidoptera: Noctuidae) phylogeny based on the sequence of the cytochrome oxidase I (COI) mitochondrial gene | Aproximación a la filogenia de Spodoptera (Lepidoptera: Noctuidae) con el uso de un fragmento del gen de la citocromo ox. *Revista de Biología Tropical*, 60(3).
- Saldaña, T., & Villar, C. (2015). Distribucion de los organismos. *Saberes y Ciencias*, 45. Recuperado de <http://saberesyciencias.com.mx/2015/11/02/distribucion-de-los-organismos/>
- Sanchez, O., Kvist, L. P., Aguirre, Z., Aguirre M, Z., Kvist, L. P., & Sánchez T, O. (2006). Bosques secos en Ecuador y su diversidad. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, (8), 162–187. <https://doi.org/10.1017/S0009838800012258>
- Sanseverino, A., Nessimian, J., & Oliveira, A. (1998). A fauna de chironomidae em diferentes biótopos aquáticos da Serra do Subaio.
- Sari, A., Duran, M., Sen, A., & Bardakci, F. (2015). Investigation of Chironomidae (Diptera) relationships using mitochondrial COI gene. *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.01.005>
- Scheibler, E. E., Pozo, V., & Paggi, A. C. (2008). Distribución espacio-temporal de larvas de Chironomidae (Diptera) en un arroyo andino (Uspallata,

Mendoza, Argentina). *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 67(3–4), 45–58. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0373-56802008000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=en

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & 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. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Look, P. (1994). Evolution, Weighting and Phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. *Annals of the Entomological Society of America*.

Simon, D. (2008). Optimización Basada En Biogeografía. *Transactions on Evolutionary Computation (IEEE)*, 12(6), 702–713. Recuperado de <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/4475427>

Sogame, Y., & Kikawada, T. (2017). Current findings on the molecular mechanisms underlying anhydrobiosis in *Polypedilum vanderplanki*. *Current Opinion in Insect Science*, 19, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.10.008>

Song, C., Wang, Q., Zhang, R., Sun, B., & Wang, X. (2016). Exploring the utility of DNA barcoding in species delimitation of *Polypedilum* (Tripodura) non-biting midges (Diptera: Chironomidae). *Zootaxa*, 4079(5), 534–550. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4079.5.2>

Springer, Mónica; Ramírez, Alonso; Hanson, P. (2010, December). Macroinvertebrados de agua dulce de Costa Rica I. *Introducción a Los Grupos de Macroinvertebrados Acuáticos*, 41–50.

Su, L., & Aggí, A. (2003). Empleo Como Bioindicadores, 50–57.

Takahashi, M. a, Higuti, J., Bagatini, Y. M., Zviejkovski, I. P., Velho, L. F. M.,

- Zviejkovski, I. P., & Velho, L. F. M. (2008). Composition and biomass of larval chironomid (Insecta, Diptera) as potential indicator of trophic conditions in southern Brazil reservoirs. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 20(1), 5–13. Recuperado de http://www.ablimno.org.br/acta/pdf/acta20_vol1_02.pdf
- Talk about Insects. (2011). Tipos de insectos que existen y sus características. Recuperado de <http://hablemosdeinsectos.com/wp-content/uploads/2017/04/1-1.jpg>
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using neighbor-joining method.
- Tariq, S., Khan, M. A., & Alamgir, A. (2016). Physico-Chemical Profile of Malir River and Chinna Creek. *Procedia Environmental Sciences*, 34, 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.04.045>
- Tejerina, E., & Molineri, C. (2007). Comunidades de Chironomidae (Diptera) en arroyos de montaña del NOA: comparación entre Yungas y Monte. *Rev. Soc. Entomológica Argentina*, 66, 169–177. <https://doi.org/0373-5680>
- Thiru, P., & Rundell, R. J. (2008). Creating Phylogenetic Trees with MEGA. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1508), 3401–3412. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0110>
- Vannote, R., Minshall, W., Cummins, K., Sedell, J., & Cushing, C. (1980). The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(1), 130–137. <https://doi.org/10.1139/f80-017>
- Vera, S., Jiménez, P., & Franco, L. (2012). Uso de herramientas bioinformáticas en la evaluación de secuencias “ DNA barcode ” para la identificación a nivel de especie. *Facultad de Ciencias Básicas ISSN 1900-4699*, 8(2), 196–209.
- Villamarín, C. (2013). *Estructura y composición de las comunidades de*

macroinvertebrados acuáticos en ríos altoandinos del Ecuador y Perú. Diseño de un sistema de medida de la calidad del agua con índices multimétricos. Universidad de Barcelona.

- Walker. (2001). Chironomidae and related Diptera. *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*, 4, 43–66.
- Walker, I. R., Van Damme, P. A., Hamel, C., Ayala, A., Bervoets, L., Takahashi, M. a, ... Funk, W. C. (2008). Chironomid Communities as Water Quality Indicators Chironomid communities as water quality indicators. *Environmental Pollution*, 12(1), 190–195. [https://doi.org/10.1016/0277-3791\(87\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0277-3791(87)90014-X)
- Wang, Q., & Wang, X. (2012). Comparison of methods for DNA extraction from a single chironomid for PCR analysis. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(2), 421–426.
- Wharton, R., Parker, B., & Simmons, G. (1983). Distribución, composición de especies y morfología de matas de algas en lagos antárticos del valle seco. *Ficología*, 22(4), 355–365. <https://doi.org/https://doi.org/10.2216/i0031-8884-22-4-355.1>
- Yáñez-Muñoz, M. H. (2005). Diversidad y estructura de once comunidades de anfibios y reptiles de los Ecuador, (October 2005), 152. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2918.2483>
- Zhou, X., M. Kjer, J. M. (2007). Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae (Insecta: Hydropsychidae) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(4): 718-741.

ANEXOS

Anexo 1: Resultados de la cuantificación en el NanoDrop2000 de las muestras evaluadas.

Tabla 22.

Cuantificación en el Nanodrop2000

Muestra	Nucleic Acid Conc. (ng/μl)	Dilución (ng/μl)	260/280	260/230
Blanco	0	-	-0,55	0,89
P12	83.9	6.5	1,97	1,38
P13	35.9	3.8	1.62	0.58
P14	59.70	9.6	1,66	1,28
P15	462.30	24.1	1,6	1,78
P16	40.70	2.9	2,57	1,44
P17	146.3	4.2	1,6	1,74
P19	93.1	14.4	1,55	1,68
P20	29.7	6.5	1,87	0,79
P22	160.90	4.1	1,55	1,64
P25	40.6	8.6	1,81	1,31
P26	41.7	8.8	1,93	1,53
P27	64.7	11.4	2,01	1,9
P28	31.00	9.7	1,73	1,32
P29	120.7	40.8	1,55	1,67
P30	97.7	10	1,78	1,39
P32	23.6	4.4	1,61	1,56
P33	208.8	19.1	1,66	1,8
P34	243.8	15.1	1,7	1,77
P35	287.5	36.2	1,72	1,81
P36	376.3	16.3	1,86	1,94
P37	450.2	2.3	1,91	1,8
P38	387.7	9.8	1,85	1,86
P39	208.8	7.9	1,66	1,77

Anexo 2: Análisis de Cebadores

El análisis de cebadores mostró irregularidad en la concentración de los cebadores obtenidos como se muestra a continuación:

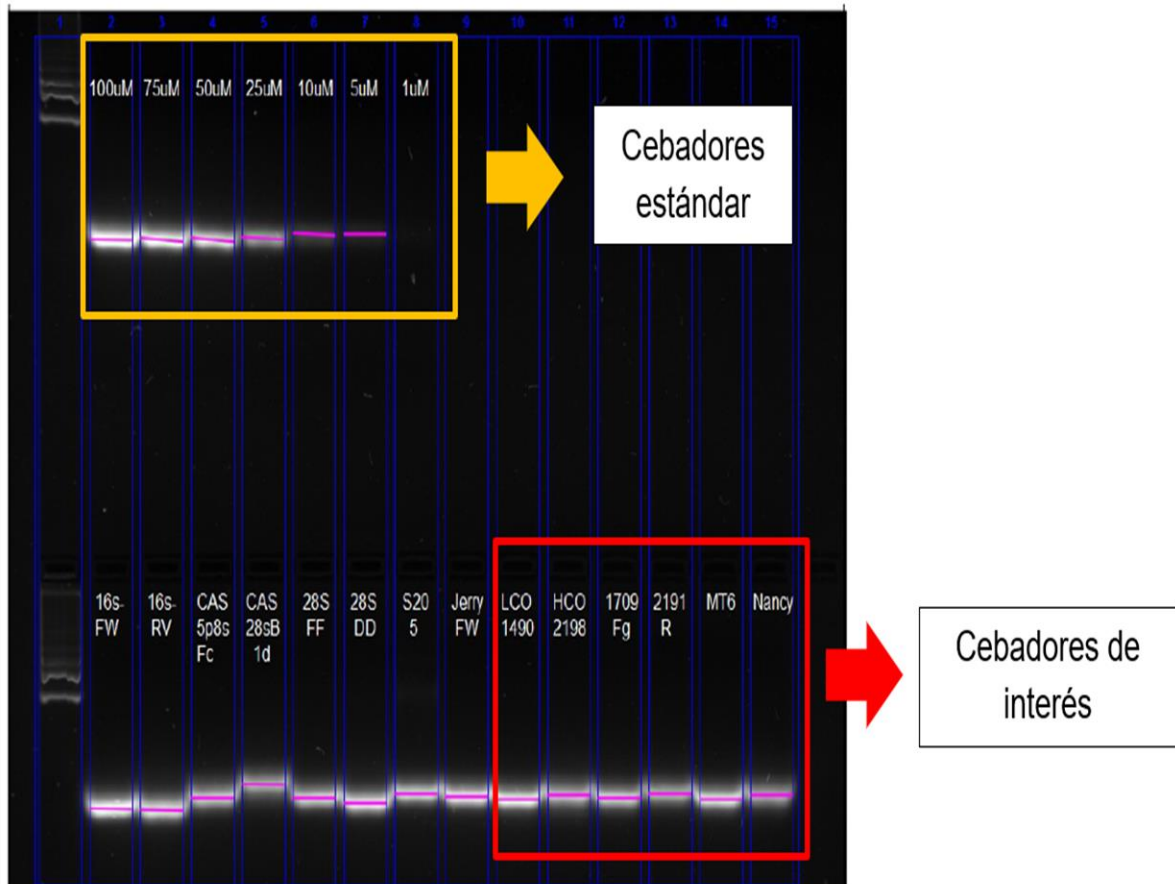


Figura 43. Gel de electroforesis del análisis de los cebadores.

Anexo 3: Alineamiento parcial de las Secuencias en MEGA7



Figura 44: Secuencias consenso en el software MEGA, corregidas y alienadas.

G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- TTTAGCTGGA GCTATTACTA TACTTTTAAAC GGATCGAAAT TTAAATACCT
G3-EOP017- TTTAGCTGGA GCTATTACTA TACTTTTAAAC GGATCGAAAT TTAAATACCT
G3-EOP017- TTTAGCTGGA GCTATTACTA TACTTTTAAAC GGATCGAAAT TTAAATACCT
G3-EOP017- TTTAGCCGGA GCCATTACTA TATTATTGAC TGATCGAAAT TTAAATACCT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- TCTTGCCGGA GCAATTACTA TATTATTAAC AGATCGAAAT TTAAATACTT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACAT
G3-EOP017- ATTAGCCGGA GCTATTACAA TACTATTAAC CGATCGAAAT TTAAATACCT

....|....||....||....||....||....|
 410 420 430 440 450

Barbadocladius- CCTTTTTTGA CCCTGCTGGA GGAGGGGACC CTATTCCTTA CCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA AGTAGAAAAC CCATTTTAAA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA AGTGGACATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGGGGAAAAC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA AGTGGAAAAC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA AGGGGAAAAC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA AGGAGAAAAC CCATTTTAAA TCAACCTTTA
G1-EOP049- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP050- CTTTCTTTGA TCCTGCTGGA GGAGGAGACC CTATTTTATA TCAACACTTA
G1-EOP050- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCCACATCTA
G1-EOP050- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATCTA
G1-EOP050- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATCTA
G1-EOP050- CTTTCTTTGA TCCTGCTGGA GGAGGAGACC CTATTTTATA TCAACACTTA
G1-EOP050- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G1-EOP050- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATCTA
G1-EOP050- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAAACC CAATTTTATA CCAACATCTA
G1-EOP050- CTTTTTTTGA TCCTGCCGGA GGAGAAAACC CTTTTTTATT CAAAAATCTA
G2-EOP020- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAAACC CTTTTTTATA CCAACTTCTA
G2-EOP001- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATCTA
G2-EOP001- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGG GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G2-EOP001- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G2-EOP001- CTTTTTTTGA TCCAGCAGGA GGTGGAGATC CTATTTTATA TCAACATTTA
G2-EOP001- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATTTA
G2-EOP020- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCACCATTTA
G2-EOP020- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATCTA
G2-EOP020- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATCTA
G2-EOP020- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATCTA
G2-EOP020- CTTTTTTTGA CCCTGCCGGA GGAGGAGACC CAATTTTATA CCAACATCTA

Anexo 5: Número de individuos según el OTU, punto de muestreo y rango altitudinal.

Tabla 21.

Número de individuos según el OTU, punto de muestreo y gradiente altitudinal.

Gradiente	Punto de Muestreo	OTUs	#individuos
G1	EOP049	sp1	9
		sp9	1
		sp10	1
		sp11	1
	EOP050	sp1	1
		sp2	2
		sp3	1
		sp15	2
		sp16	1
		sp17	1
G2	EOP0001	sp1	3
		sp19	1
		sp24	1
	EOP020	sp1	6
		sp4	1
		sp15	5
		sp20	1

		sp21	1
		sp22	1
		sp23	1
		sp12	1
G3	EOP004	sp5	8
		sp6	1
		sp7	1
	EOP017	sp1	9
		sp7	1
		sp8	1
		sp13	1
		sp14	1
		sp15	1
		sp19	1
		sp25	1

Anexo 6: Árbol filogenético modificado de la Figura 36

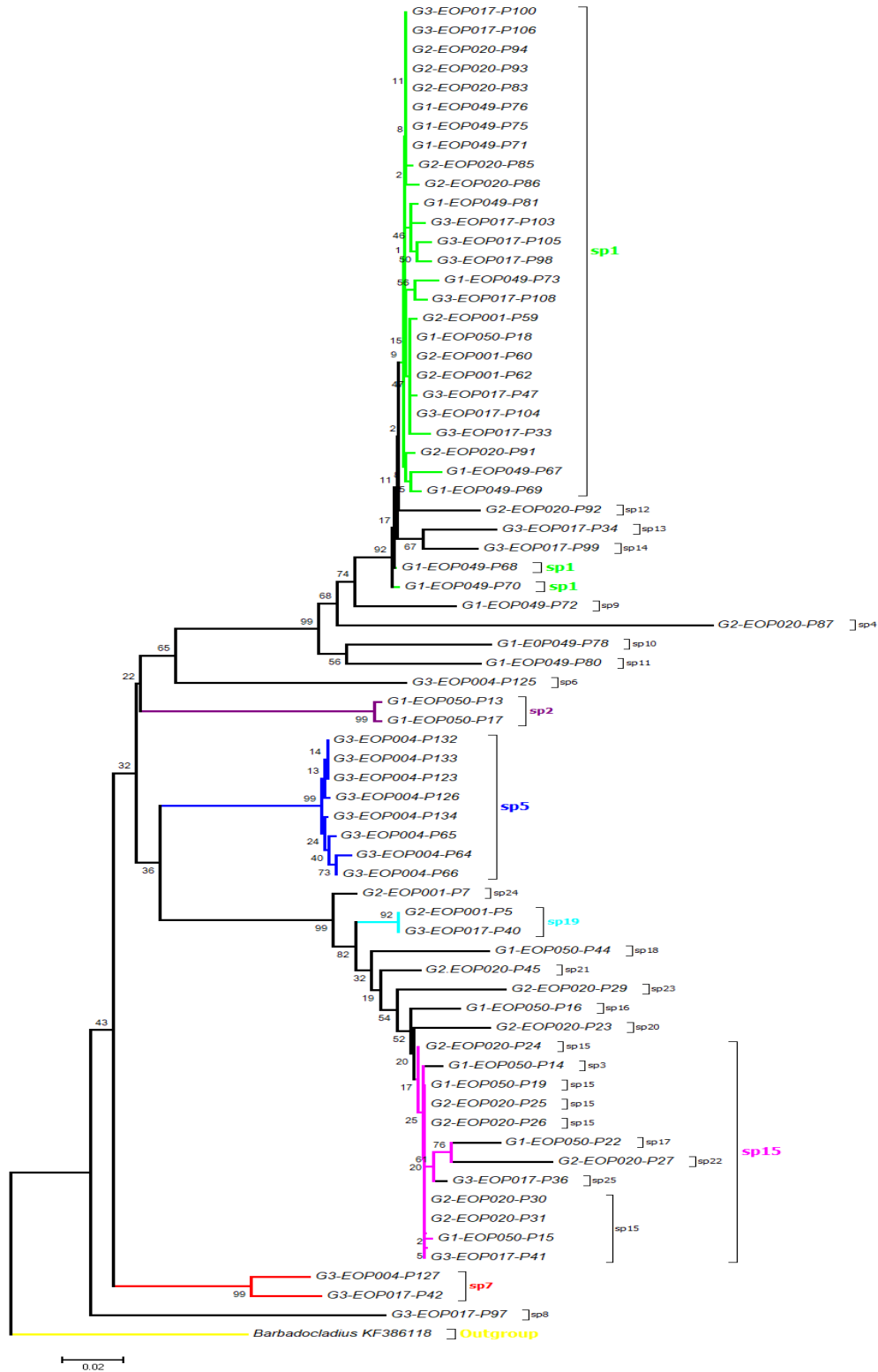


Figura 45. Árbol filogenético basado en secuencias COI parciales y el modelo de Kimura de 2 parámetros. Modificado de la Figura 35.

