



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES
DE *METRICHIA* DE LA CORDILLERA ANDINA ECUATORIANA.

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
Gisella Noemí Loachamín Punina

Año
2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, "Evaluación de la diversidad genética entre poblaciones de *Metrichia* de la Cordillera Andina ecuatoriana", a través de reuniones periódicas con el estudiante Gisella Noemí Loachamín Punina, en el semestre 201920, 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, "Evaluación de la diversidad genética entre poblaciones de *Metrichia* de la Cordillera Andina ecuatoriana", de Gisella Noemí Loachamín Punina, en el semestre 201920, 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”.

Gisella Noemí Loachamín Punina

CI: 1723535637

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Isabel Ballesteros por el constante apoyo y paciencia durante el desarrollo de la presente investigación, por compartir sus conocimientos y confiar en mis habilidades.

A la PhD Blanca Ríos, por darme la oportunidad de aprender y aportar en este proyecto. A los integrantes de la Dirección General de Investigación de la UDLA que me apoyaron y abrieron las puertas de sus instalaciones para la ejecución de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios que ha sido mi luz en los momentos más oscuros y es el pilar de mis padres Anibal y Narcisa. Ellos me levantaron en cada una de mis caídas y en compañía de mi hermano Joel me fortalecen día a día.

A mi hermana Joa, que ha sido una guía incondicional y junto a mis amigos Dani, Pame, Adrián, Pau, Ale, Nico y Zanco me impulsan a ser mejor en cada aspecto de mi vida.

Finalmente, a mis abuelos y padrinos que me han enseñado sobre la humildad y la constancia, valores que llevo en el corazón y espero sembrar en quienes me rodean.

RESUMEN

El funcionamiento ideal de los ecosistemas se encuentra directamente relacionado con la conservación de las especies, por lo tanto, el estudio de la diversidad de las mismas es una prioridad para los investigadores. En Ecuador estudios previos realizados sobre Trichoptera, específicamente en la especie *Anomalocosmoecus illiesi*, mostraron una variación interpoblacional relativamente alta entre los individuos, generando una pauta para el estudio de otras especies pertenecientes a este orden, los cuales son usados como bioindicadores para evaluar la calidad de los ecosistemas acuáticos. De esta manera, se propuso el género *Metrichia*, por su reducido tamaño es catalogado en la diversidad críptica, por consiguiente el estudio fenotípico debe ser complementado. Para este trabajo se propuso el uso de la filogeografía, que en base a secuencias de ADN y la distribución geográfica puede interpretar la relación entre poblaciones o especies estrechamente relacionadas. Para inferir la diversidad de genes entre las poblaciones, se empleó el ADN mitocondrial de la proteína citocromo c oxidasa subunidad I (COI) y el ADN ribosómico (ADNr) 16S, en muestras tomadas de las cuencas de los volcanes Illinizas, Chimborazo y del Parque Ecológico Cajas. Los análisis se realizaron en 36 fragmentos del gen de ADNmt COI de 477 pb y en 45 secuencias de 400 pb para el gen 16S. 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 21,7% de divergencia genética. Sin embargo, dado que en Ecuador no existen estudios sobre las especies del género *Metrichia*, para el análisis filogenético se utilizó el programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) que agrupa las muestras en unidades taxonómicas operativas basado en el porcentaje de divergencia, de este modo, se determinaron 5 unidades taxonómicas experimentales (MOTUs) con lo que se concluyó que existen poblaciones distribuidas a lo largo de la cordillera ecuatoriana, además de que se evidenció una facilidad de flujo de genes entre las mismas por medio del callejón interandino.

Palabras clave: *Metrichia*, diversidad genética, COI, 16S, filogeografía, cordillera ecuatoriana.

ABSTRACT

The ideal functioning of ecosystems is directly related to the conservation of species, therefore, the study of their diversity is a priority for researchers. In Ecuador, previous studies on Trichoptera, specifically in the species *Anomalocosmoecus illiesi*, showed a relatively high interpopulation variation among individuals, generating a guideline for the study of other species belonging to this order, which are used as bioindicators to evaluate the quality of aquatic ecosystems. In this way, the *Metrichia* genus was proposed, due to its small size it is cataloged in the cryptic diversity, therefore the phenotypic study must be complemented, for this work the use of phylogeography was proposed, which based on DNA sequences and the geographic distribution can interpret the relationship between populations or closely related species. To infer the diversity of genes among the populations, the mitochondrial DNA of the protein cytochrome c oxidase subunit I (COI) and the ribosomal DNA (rDNA) 16S was used in samples taken from the volcanoes Illinizas, Chimborazo and del Parque Ecological Boxes. The analyzes were performed on 36 fragments of the 477 bp mtDNA COI gene and 45 bp sequences for the 16S gene. 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 genetic divergence of 21.7%. However, given that in Ecuador there are no studies on the species of the genus *Metrichia*, for the phylogenetic analysis the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) program was used, which groups the samples into operating taxonomic units based on the percentage of divergence, thus, 5 experimental taxonomic units (MOTUs) were determined, which concluded that there are populations distributed along the Ecuadorian mountain range, in addition to the fact that there was an ease of gene flow between them through the inter-Andean alley

Keywords: *Metrichia*, genetic diversity, COI, 16S, phylogeography, Ecuadorian mountain range.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Problemática	3
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Justificación	4
2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Trichoptera	4
2.1.1 Generalidades.....	4
2.1.2 Morfología y desarrollo.....	5
2.1.3 Hábitat.....	5
2.1.4 Trichoptera en Ecuador.....	6
2.2 <i>Metrichia</i>	7
2.2.1 Variabilidad y estudios en el género	10
2.2.2 Análisis morfológico	11
2.2.3 Análisis molecular	12
2.2.3.1 Citocromo oxidasa subunidad 1 (COI)	13
2.2.3.2 16S mitocondrial	13
2.2.4 Filogeografía	14
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	15
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	16
4.1 Población analizada	16
4.2 Extracción de ADN.....	17
4.3 Amplificación y secuenciación.....	20
4.3.1 Visualización de los productos de amplificación.....	21

4.4	Análisis Bioinformático	21
4.5	Cálculo de variabilidad genética.....	22
4.6	Determinación de Unidades Taxonómicas Operativas (MOTUS).....	22
5.	Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1	Extracción de ADN y optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
5.2	Secuenciación	25
5.3	Identificación con DNA barcodes	26
5.4	Variabilidad genética.....	27
5.5	Divergencia entre los grupos	31
5.6	Divergencia dentro de los grupos	32
5.6.1	Parque Ecológico Cajas.....	32
5.6.2	Volcán Illiniza	33
5.6.3	Volcán Chimborazo.....	34
5.7	Análisis filogenético.....	35
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
6.1	Conclusiones	43
6.2	Recomendaciones.....	44
	REFERENCIAS	45
	ANEXOS	54

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Ecuador se encuentra atravesado por un sistema montañoso que da origen y divide a los sistemas hidrográficos, es decir, que los alimenta directamente generando condiciones idóneas para el desarrollo sustancial de la biodiversidad, incluida la diversidad genética intraespecífica entre los glaciares, así como entre los arroyos (Finn et al., 2016). Generalmente en áreas similares a esta zona como en la Península Balcánica, se han realizado estudios que confirman el desarrollo de endemismo principalmente en la fauna de agua dulce (Previšić et al., 2016). Sin embargo, estas zonas son poco estudiadas y, en consecuencia, pocas especies han sido descubiertas, como es el caso de los macroinvertebrados, que debido a su tamaño se encuentran en la diversidad críptica. En Ecuador se han realizado varias investigaciones para identificar a los macroinvertebrados con importancia ambiental, como es el caso de Trichoptera, que son insectos acuáticos con una alta diversidad de especies que habitan la mayoría de los ecosistemas acuáticos (Ríos-Touma et al., 2017).

En Ecuador la familia Trichoptera presenta una gran variedad de especies y probablemente es uno de los grupos de insectos acuáticos más conocido por su distribución en el país, además de ser reconocido porque presenta una alta tasa de endemidad en comparación con la fauna de vertebrados (Ríos-Touma et al., 2017.), por lo que se necesita con urgencia el conocimiento de su biología y taxonomía. Entre estas especies descritas en la diversidad críptica con posible endemismo dentro del orden Trichoptera se encuentra *Metrichia*, ya que se han evidenciado poblaciones con estas características a lo largo de la cadena montañosa en Argentina y Chile. Es así que, en Chile se ha determinado que la zona mediterránea consta de las condiciones adecuadas para el desarrollo de

especies endémicas, de igual forma los estudios morfológicos no contribuyen a la identificación de todas las variedades primitivas y al mismo tiempo numerosos ríos no han sido explorados (Figueroa et al., 2013).

Asimismo, la diversidad críptica hace referencia a especies que morfológicamente no evidencian cambio, pero su genética se ve afectada por variaciones en su medio. Las técnicas moleculares se han vuelto esenciales en el análisis genético, específicamente cuando la comparación de especies dependen únicamente del análisis de morfología, misma que resulta ineficaz en especies particularmente pequeñas, por ello el código del citocromo c oxidasa 1 mitocondrial de 650 pb es implementado en estos estudios, debido a que presenta características favorables, como la facilidad de secuenciar y el 97% de especificidad a nivel de especie (Meusnier et al., 2008). Además, es útil en el análisis molecular intraespecífico dado que muestra una elevada tasa de sustitución, lo que se refleja en una alta variación de este fragmento entre especies del mismo género (Blaxter, 2004).

Metrichia se encuentra distribuida desde el suroeste de los Estados Unidos, América Central, el Caribe y toda la zona montañosa de América del Sur (Angrisano & Sganga, 2005). Dada la amplia distribución de este género, se han realizado varios estudios y se han descrito alrededor de 107 especies, con mayor diversidad en América Central. Si bien es cierto, inicialmente *Metrichia* fue considerado como un subgénero de *Ochrotrichia* debido a las similitudes de la morfología adulta y las larvas casi indistinguibles (Santos et al., 2016), sin embargo, se proporcionó información suficiente sobre la morfología larvaria de *Ochrotrichia* y *Metrichia* y se constituyeron como géneros independientes (Wiggins, 1996). En resumen, *Metrichia* posee una amplia distribución geográfica, ha sido considerado como un grupo muy diverso y con una identificación morfológica deficiente, por lo que, el uso de herramientas como ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) podría indicar la existencia de diferentes especies crípticas (Santos et al., 2016), lo cual genera interés de estudio sobre este género.

1.2. Problemática

Este género se encuentra distribuido a lo largo de las cadenas montañosas en Ecuador, sin embargo, existen pocas variedades identificadas morfológicamente lo que representa un déficit de estudios en el país (Ríos-Touma et al., 2017) y resalta la ausencia de análisis moleculares en la identificación de especies. Además, *Metrichia* se encuentra entre los organismos descritos por la diversidad críptica, es decir, que su morfología primitiva se mantiene constante a pesar de los cambios en su genética (Beheregaray & Caccone, 2007). Estas modificaciones pueden originarse por las perturbaciones naturales o artificiales que se han realizado en su hábitat a lo largo de los años (Andrade et al., 2017), lo cual da lugar a la variabilidad de especies. Por otra parte, estudios sobre poblaciones de macroinvertebrados acuáticos han demostrado una amplia divergencia genética, a pesar de que las especies se localizan en el mismo hábitat; estos datos fueron analizados bajo el criterio de historia geológica y generaron resultados positivos para la resolución del enigma de la diversidad críptica presente en Europa (Previšić et al., 2016).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar la diversidad genética entre poblaciones de *Metrichia* provenientes de los sistemas acuáticos de los volcanes Illinizas, Chimborazo y del Parque Ecológico Cajas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar genéticamente las poblaciones de *Metrichia* provenientes de los sistemas acuáticos del Parque Nacional Cajas, Los Illinizas y Chimborazo.
- Determinar la variación genética ocasionada por las diferencias geográficas

entre las cadenas montañosas en las poblaciones de *Metrichia*.

1.4 Justificación

Varias especies de macroinvertebrados se han insertado en la biodiversidad críptica, debido a que conservan su morfología original independientemente del hábitat donde se desarrollan, a pesar de que los mismos en ocasiones presentan condiciones distintas (Gill et al., 2016). La identificación de estas especies es un desafío por la escasa información de caracteres morfológicos confiables, tanto en adultos como en estadios inmaduros acuáticos, es por ello que se recurren al uso de fragmentos de genes mitocondriales y nucleares (Vuataz et al., 2016).

El uso de técnicas moleculares facilita el proceso para dar una respuesta específica sobre la filogeografía, a través de macroinvertebrados como *Metrichia*. La obtención de fragmentos mitocondriales tales como COI y 16S, por medio de *primers* y tras la estandarización de los procesos de PCR favorecen a la identificación de divergencia genética entre poblaciones (Pons et al., 2004; Vuataz et al., 2016). Además, los cebadores conservados facilitan el aislamiento de secuencias diana durante la PCR (Dittrich et al., 2012). Estas herramientas permitirán afirmar que evidentemente el género *Metrichia* se encuentra en los nichos geográficos de Ecuador, favoreciendo al incremento de información molecular de este tipo de especies.

2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Trichoptera

2.1.1 Generalidades

Trichoptera o también conocido como *caddisflies*, representa a uno de los grupos más grandes y diversos de insectos acuáticos, debido a que se pueden encontrar en una gran variedad de hábitats (Schmidt et al., 2017). Se han descrito alrededor

de 14,500 especies y debido a su amplia distribución en agua corriente, pueden actuar como bioindicadores de perturbación ambiental (Graf et al., 2015). Estos animales de agua dulce carecen de esqueleto interno y pueden ser observados a simple vista, debido a que presentan un tamaño mayor a 2mm (Yetter, 2013).

2.1.2 Morfología y desarrollo

Los tricópteros son un grupo de insectos holometábolos con estadios inmaduros acuáticos (Ninahuanca et al., 2013). En su etapa adulta poseen una morfología similar al de las polillas, con un cuerpo de color marrón grisáceo y frágil, la diferencia radica en que sus alas presentan pelos lo que origina el nombre del orden Trichoptera (Tricho: pelo; ptera: ala) (Kriská, 2013). Las etapas larvales y pupales de casi todas las especies de tricópteros permanecen en el agua dulce, y solo se conocen unas pocas especies marinas o terrestres (Yukuhiro et al., 2016). Para la protección de las pupas pueden hilar capullos a base de proteínas fibrosas como seda y dado que las larvas de tricópteros viven principalmente bajo el agua, su seda parece tener propiedades mecánicas únicas que favorecen el desarrollo y protección de las mismas (Yukuhiro et al., 2016).

La determinación de la diversidad biológica de especies en base a distinciones morfológicas no puede ser aplicada en todos los organismos, ya que algunos no son distinguibles morfológicamente (especies crípticas); estudios han demostrado que los microtricópteros están dispersos en el neotrópico, manteniendo su morfología (Beheregaray & Caccone, 2007).

2.1.3 Hábitat

Generalmente, estas especies se encuentran ubicadas en los arroyos, donde su hábitat consiste en material orgánico de partículas gruesas como ramas y hojas incrustadas en arena (Westveer et al., 2018). Asimismo, varias especies de este

orden frecuentan pequeñas cascadas y se han hallado en áreas montañosas con bosques abundantes (Holzenthall y Flint 1995). Otras especies habitan las zonas de rociado, salpicaduras de cascadas y situaciones torrenciales similares (Holzenthall & Calor, 2017).

Por otra parte, el segundo lugar en términos de diversidad y endemismo de este orden se refleja en la región Neotropical (Holzenthall et al., 2015), es así que, cerca del 70% de las especies descritas en el Neotrópico son endémicas de dicha región. Las larvas se distribuyen desde lo alto del páramo andino, en los arroyos de montaña intermedia boscosa donde presentan mayor diversidad, hasta los ríos de flujo lento ubicados a menor altitud (Holzenthall y Calor, 2017).

Varias investigaciones aseguran que los glaciares que alimentan a los arroyos de gran altitud, pueden generar condiciones idóneas para el desarrollo de biodiversidad, incluyendo la diversidad intraespecífica entre glaciares y otros tipos de sistemas acuáticos (Finn et al., 2016), lugares donde se han evidenciado condiciones propicias para el desarrollo de especies pertenecientes al grupo Trichoptera. También se han descrito trichópteros que frecuentan aguas estancadas pero presentan poca diversidad genética en comparación con las especies que se encuentran en lagos y lagunas. Se pueden encontrar muy pocas especies en aguas de origen térmico o que se han visto afectadas por la actividad volcánica (Holzenthall y Calor, 2017).

2.1.4 Trichoptera en Ecuador

En Ecuador solo el 30% de las especies albergadas en los ecosistemas de agua dulce han sido estudiadas (Holzenthall & Ríos-Touma, 2012), lo que representa una desventaja sobretodo en especies de reducido tamaño donde el cambio de su morfología es imperceptible. Los estudios sobre diversidad y distribución de Trichoptera en el Ecuador, apenas describen 310 especies en el país, distribuidas

en 15 familias y 52 géneros (Ríos-Touma et al., 2017). Sin embargo, en un análisis descriptivo se estima que existen cerca de 578 especies de Trichoptera, lo que conlleva a la conclusión de que en Ecuador solo se conoce el 54% de este orden.

2.2 *Metrichia*

Metrichia es un insecto perteneciente al orden Trichoptera, de la familia Hydroptilidae, considerada un microtricoptero debido a su tamaño, el cual varía entre 2.2 - 2.6 mm. Las larvas de estos microtricopteros (Hydroptilidae) crean casas generalmente comprimidas lateralmente y son transportadas por el animal en el borde inferior de su cuerpo. Estos son estuches pequeños, típicamente comprimidos con aberturas estrechas, con forma de semilla u ovalados y hechos de material translúcido (Figura 1), similar a la quitina (Ríos-Touma et al., 2017). Es así que, las larvas de *Metrichia* construyen sus casas a manera de un estuche ovalado similar a un bolso, a base de seda, generalmente cubierto con filamentos de algas y algunas veces también tienen granos de arena (Pes et al., 2005).



Figura 1. Microcaddisfly perteneciente a la familia Hidroptilidae con estuche translúcido.

Tomado de (California Digital Reference Collection)

Originalmente, el género *Metrichia* era considerado un subgénero de *Ochrotrichia*, puesto que morfológicamente carecía de diagnóstico larval congruente, sin embargo, en 1996 tras estudios morfológicos específicos se propuso una diagnosis para este género (Wiggins, 1996). Morfológicamente se describe a *Metrichia* con una cabeza no alargada, la seta basal solo en la uña tarsal media y posterior, patas torácicas con una longitud similar, mientras que las patas anales son cortas y no se encuentran proyectadas por fuera del cuerpo. Además, presenta un estuche constituido de dos valvas de seda que por lo general tiene arena adherida (Figura 2), brácteas de musgos o en ocasiones algas filamentosas (Huamantínco & Ortiz, 2010).



Figura 2. Larva de *Metrichia bonita* sp. con su estuche fabricado a base de arena. Tomado de (Santos et al., 2016)

Existen varios estudios que reportan la distribución de los microtrícópteros en diferentes sistemas de agua dulce por todo el mundo, pero en el Neotrópico, es donde se evidencia una amplia variación (Ríos-Touma et al., 2017). Además, en el continente americano, *Metrichia* se encuentra distribuida desde el suroeste de los Estados Unidos, a lo largo de América Central y desde el norte y oeste de América del Sur a la Patagonia (Angrisano & Sganga, 2005).

En Ecuador se han registrado 7 géneros y 78 especies de la familia Hydroptilidae, de los cuales *Zumatrichia* y *Oxyethira* son los géneros más ricos en especies, pero ciertamente muchos más géneros y especies aún no han sido analizados. Además, *Betrichia*, *Costatrichia*, y *Mayatrichia* solo se conocen de una especie cada una en el país. (Ríos-Touma et al., 2017). Hasta la actualidad, se han descrito 107 especies de *Metrichia* desplazadas a lo largo del continente americano, pero con la mayor diversidad conocida en Centroamérica (Santos et al., 2016). Sin embargo, en nuestro país solo se han realizado hallazgos a nivel morfológico sin incursionar en el análisis molecular, como se detalla en la Tabla 1. Hasta el año 2017 se describieron cuatro especies, de las cuales una presenta endemismo y fue analizada morfológicamente en 1985, mientras que las otras fueron registradas por primera vez con su principal locación en la provincia de Pichincha (Ríos-Touma et al., 2017).

Tabla 1.

Especies de Metrichia descubiertas en Ecuador

Espece	Locación	Endemismo	Altitud	Fuente
<i>Metrichia argentinica</i> (Schmid, 1958)	Pichincha	-	2.807	Nuevo registro
<i>Metrichia cuenca</i> (Harper & Turcotte, 1985)	Azuay	Endémica	3.300	Harper & Turcotte (1985)
<i>Metrichia patagonica</i> (Flint, 1983)	Pichincha, Morona Santiago	-	3.848	Nuevo registro
<i>Metrichia spica</i> (Bueno-Soria & Holzenthal, 2003)	Pichincha	-		Nuevo registro

Adaptado de (Ríos-Touma et al., 2017)

2.2.1 Variabilidad y estudios en el género

Actualmente existen pocos estudios dirigidos a identificar la variabilidad del género *Metrichia* en Ecuador, en general las investigaciones que se han realizado se desarrollan alrededor del análisis fenotípico. Sin embargo, en países como Brasil se ha tratado de encontrar una respuesta a especies endémicas que se encuentran dentro de este género, a través de secuencias de códigos de barras y por medio de programas como ABGD que permiten una colaboración con el análisis morfológico para dar respuestas eficaces a esta problemática (Santos et al., 2016).

Estudios realizados en la zona mediterránea de Chile, demostraron que esta área presenta condiciones adecuadas para el desarrollo de especies endémicas dentro del género *Metrichia*. Así mismo, los análisis morfológicos no contribuyen a la identificación de todas las variedades primitivas y sobretodo numerosos ríos no han sido explorados, lo que representa una deficiencia de conocimientos sobre variabilidad genética de este género (Figueroa et al., 2013).

Por otra parte, varias especies de *Metrichia* han sido utilizadas para la evaluación de la tolerancia a la sedimentación, comparando los datos de pre y post-erupción del volcán Chaitén. Como consecuencia del evento, los sólidos totales en suspensión aumentaron y la riqueza y densidad de los microtricópteros disminuyó significativamente. De esta forma se pudo determinar que varias especies actúan como bioindicadores e incluso existen organismos que a pesar de pertenecer al mismo género presentan mayor sensibilidad a estas perturbaciones y por ende es difícil que vuelvan a evidenciarse en el mismo sitio (Brand & Miserendino, 2014).

2.2.2 Análisis morfológico

El fenotipo sigue siendo importante en la clasificación, las nuevas especies no pueden clasificarse y nombrarse sin al menos dos diferencias fenotípicas con las especies existentes. Las propiedades fenotípicas incluyen características tan diversas como la micromorfología, la fisiología, la bioquímica y la quimiotaxonomía (Christensen & Olsen, 2018).

La diversidad de los microtricópteros neotropicales es poco conocida y generalmente se encuentran varias especies no descritas en colecciones o entre material recolectado, sin embargo la falta de información para el análisis morfológico impide el avance en el estudio de dichos organismos. Esto ocurre probablemente debido a que los Hydroptilidae son muy pequeños y tienen genitales masculinos complejos, lo que los hace difíciles de observar con microscopios de menor aumento y para comprender las homologías entre algunas estructuras con un alto nivel de resolución taxonómica (Santos et al., 2016).

Este problema se debe a que la mayoría de la literatura taxonómica para Trichoptera está basada en adultos y al mismo tiempo existen desafíos técnicos involucrados en los enfoques de asociación de estadíos larvales-adultos debido al tamaño y complejidad estructural de las muestras (Figura 3) (Ruiter et al.,

2013).

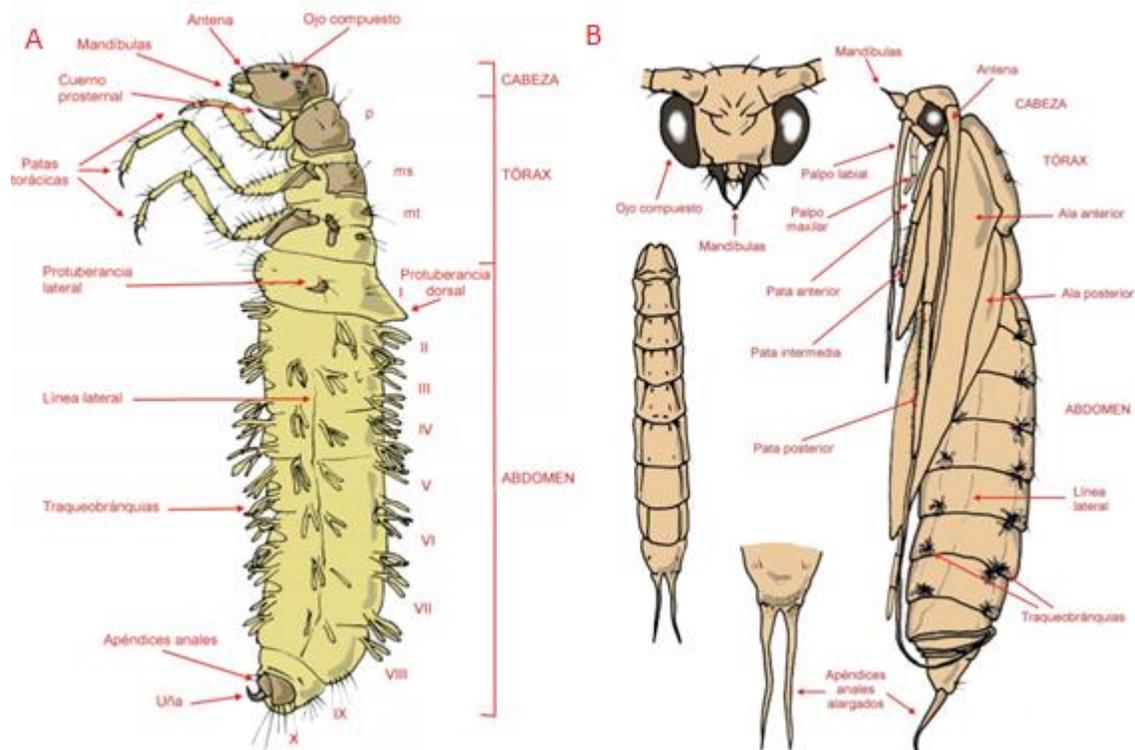


Figura 3. Análisis morfológico de un tricóptero.

Adaptado de (Zamora-Muñoz et al., 2015)

- a) Estadío larval
- b) Estadío adulto

2.2.3 Análisis molecular

Los códigos de barras de ADN son sistemas de bancos genéticos disponibles en bibliotecas digitales en línea para la caracterización rápida y precisa de especies en función de sus secuencias de ADN (Altamirano & Yanez, 2016). Esta herramienta usa la información de una o varias regiones génicas, cortas y estándar (400-800 pb), a modo de etiqueta para la identificación y reconocimiento rápido de todas las variedades biológicas, con el propósito de facilitar la preservación, comprensión y uso sustentable de la biodiversidad (Altamirano &

Yanez, 2016). Una región del genoma puede usarse como código de barras de ADN siempre y cuando permita reconocer entre variación intraespecífica (dentro de la misma especie) y variación interespecífica (entre especies estrechamente relacionadas), ofreciendo la posibilidad de identificar variedades incluso a partir de muestras biológicas incompletas, dañadas o en estado inmaduro (Gill et al., 2014).

2.2.3.1 Citocromo oxidasa subunidad 1 (COI)

En Trichoptera, un fragmento de la subunidad I (COI) del citocromo c oxidasa mitocondrial se emplea comúnmente para análisis molecular, ya que se ha encontrado que tiene una baja variación intraespecífica y una alta divergencia interespecífica, o una brecha de código de barras, en la mayoría de las especies de tricopteros, lo que permite una clara delimitación de las especies basada en el agrupamiento genético (Ruitter et al., 2013). Este marcador ha sido muy eficiente en la identificación de insectos, aves, mariposas, anfibios, peces, moscas y otros grupos de animales (Gill et al., 2014).

2.2.3.2 16S mitocondrial

El análisis del amplicón del gen del ARN ribosomal (ADNr) 16S sigue siendo el enfoque estándar para la investigación de la diversidad interespecífica (Klindworth et al., 2013), el motivo de la elección del gen 16S rRNA es que forma la columna vertebral de los ribosomas y los ribosomas son de un solo tipo en todos los organismos. Los ARN ribosómicos codificados por el genoma mitocondrial son necesarios para la traducción de ARN mensajeros en proteínas mitocondriales. El gen del ARNr 16S ocupa 1/10 de todo el genoma mitocondrial, además presenta numerosas sustituciones de nucleótidos (Yang et al., 2014). La comparación de la secuencia de 16S rRNA se puede utilizar para modelar las relaciones naturales y la evolución de dichos organismos (Christensen & Olsen, 2018).

Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR dependen del grado deseado de variabilidad y la longitud del producto. Por lo general, la mayor variabilidad del gen 16S rRNA está cerca del extremo 5', además su análisis metagenómico comenzó en 2007–2008 en busca de un mejor rendimiento de metodologías planteadas con antelación, pero que mantenían elevados costos de desarrollo (Christensen et al., 2018).

2.2.4 Filogeografía

La filogeografía es una nueva disciplina que resulta de la relación entre los análisis filogenéticos de datos moleculares con la información geográfica y ecológica (Shaw et al., 2009). El enfoque filogeográfico se centra en la descripción e interpretación de las relaciones entre la genealogía de poblaciones o especies estrechamente relacionadas, estimadas a partir de secuencias de ADN, y las correspondientes distribuciones geográficas (Mesa et al., 2005). Además, existen estudios sobre especies de Trichoptera donde se ha evidenciado que factores geológicos, climáticos y los procesos biogeográficos han influenciado en la generación de endemismo en un grupo de insectos de este orden (Szivák et al., 2017).

Las áreas montañosas son reconocidas como puntos de origen de biodiversidad y están fuertemente relacionadas con el desarrollo de especies de agua dulce (Diaz et al., 2003), ya que actúan como barreras frente a las fluctuaciones climáticas generando refugios para estas especies (Vuataz et al., 2016). Según Pauls (2006), estudios genéticos en *Drusus discolor* evidencian profundas divergencias entre linajes que se encontraban aislados geográficamente, también los datos mostraron poca variación molecular dentro de las poblaciones, pero entre las cadenas montañosas se determinó diferenciación genética.

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

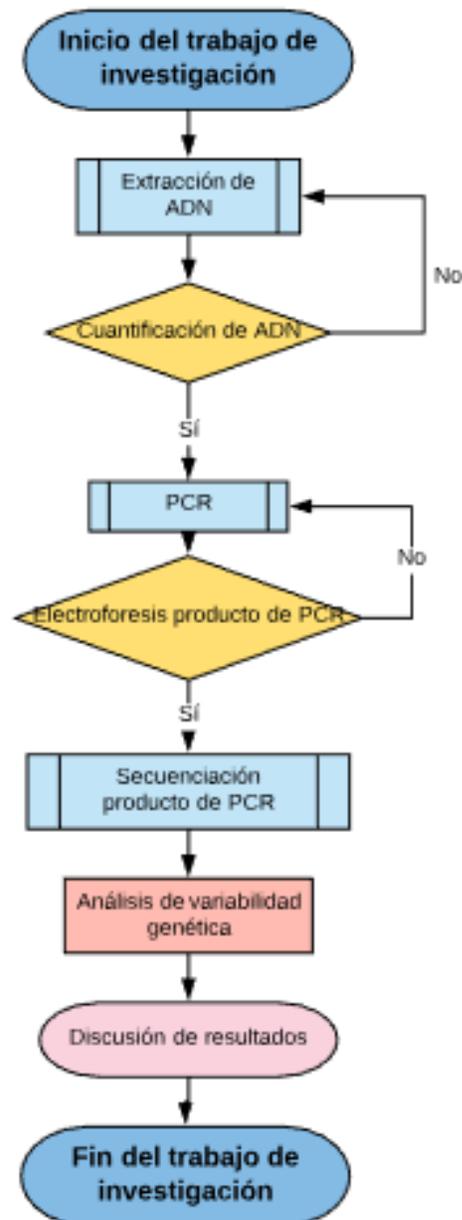


Figura 4. Diagrama de flujo del plan experimental para el estudio de la diversidad genética de las poblaciones de *Metrichia* provenientes de los sistemas acuáticos del Parque Nacional Cajas, Los Illinizas y Chimborazo.

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población analizada

El material se tomó de las larvas de *Metrichia*, muestras que fueron cedidas por el Proyecto AMB.BRT.17.005 “Diversidad y Distribución de Trichoptera de Ecuador”. Los puntos de muestreo se localizan en los sistemas acuáticos de los volcanes Illinizas, Cotopaxi, Cayambe, Chimborazo y del Parque Ecológico Cajas (Figura 5). Tras la recolección, las muestras fueron clasificadas y conservadas en etanol al 96%. Posteriormente, para el trabajo en el laboratorio se extrajeron las patas y la parte inferior del abdomen del insecto.



Figura 5. Puntos de muestreo de *Metrichia* en Ecuador.

Adaptado de (Google Earth, 2019)

Los individuos se tomaron de poblaciones ubicadas en: el volcán Cayambe (triángulo amarillo), en las cuencas del volcán Illinizas (triángulo rosado); en el río Pita, del volcán Cotopaxi (triángulo morado), en el arenal del Volcán Chimborazo (triángulo naranja) y en el Parque Ecológico Cajas (triángulo verde).

año en la que se realizó el muestreo. De los 170 individuos analizados, 34 pertenecen al Parque Ecológico Cajas con cuatro sitios de muestreo, asimismo 15 muestras provienen del arenal del volcán Chimborazo con tres puntos de muestreo, también se procesaron 55 muestras del volcán Illinizas, colectadas en el río San Pedro, en cinco puntos diferentes, 43 muestras del volcán Cotopaxi se recolectaron del río Pita en tres puntos de muestreo y por último, 28 muestras provenían del volcán Cayambe (Tabla 2).

Tabla 2.

Detalle del número de individuos por cada punto de muestreo

LUGAR DE MUESTREO	CÓDIGO	ALTITUD	Nº DE INDIVIDUOS
Cajas	EC20190226-1	3165	9
	EC20190226-2	3519	5
	EC20190227-1	3237	5
	EC20190227-3	3735	15
Total Cajas			34
Chimborazo	EC20190215-2	3246	5
	EC20190215-3	3463	5
	EC20190215-4	3450	5
Total Chimborazo			15
Volcán Illinizas / Río San Pedro	1.1SP	3586	10
	1.2SP	3601	28
	1.3SP	3596	5
	2.5SP	3331	4
	SP5	2617	8
Total Illinizas			55
Volcán Cotopaxi/ Río Pita	1.2PI	3888	35
	3.1PI	2844	4
	3.2PI	2845	4
Total Cotopaxi			43
Cayambe	CAYAMBE1		28
TOTAL			170

4.2 Extracción de ADN

La metodología de extracción de ADN se realizó por medio de la estandarización del protocolo con CTAB y purificación con fenol-cloroformo (Cerdeña-Granados & Díaz, 2013), como se detalla a continuación:

- Las muestras fueron colocadas en tubos de rosca con perlas en su interior, luego se sumergieron en nitrógeno líquido durante 2 minutos; posterior se trituraron en el homogeneizador a 6500rpm 2 veces /15 segundos.
- Después se añadió buffer de extracción compuesto de: Tris-HCl (10mM), EDTA (25mM) y NaCl (100mM) y se volvieron a colocar los tubos en el homogeneizador a 6500rpm 2 veces /15 segundos.
- Se añadieron 40 µL de SDS al 10% y se mezcló manualmente durante dos minutos.
- Se agregaron 20 µL de Proteinasa K (20 mg/ml) y las muestras fueron incubadas durante 2 horas a 55°C.
- Se añadieron 80 µL de NaCl (5M), se añadió 60 µL de CTAB, se mezcló y se incubó durante 30 minutos a 62°C.
- Se añadieron 600 µL de fenol saturado y se centrifugó a 11 000 rpm durante 10 minutos a 10°C.
- Se sacó el sobrenadante conociendo el volumen, se añadió la misma cantidad de Cloroformo y se centrifugó a 11 000 rpm durante 10 minutos a 10°C.
- Se extrajo el sobrenadante conociendo el volumen y se añadió la misma cantidad de Isopropanol; se mezcló manualmente y se dejó en refrigeración durante 2 horas.
- Luego se centrifugó a 18 000 rpm durante quince minutos, se tiró el sobrenadante y se añadió 700 µL de Etanol al 70%.
- Se centrifugó a 18 000 rpm durante quince minutos, se tira el sobrenadante y se dejó secar los tubos en el Speedvac durante 10

minutos a 37° C.

- Finalmente, el ADN se resuspendió con 40 µL de Agua Milli-Q y posteriormente se almacenaron a 4°C.

No obstante, se realizaron pruebas de extracción con Kit QIAGEN (QIAGEN, 2006), basada en las siguientes modificaciones:

- Una vez trituradas las muestras en el homogeneizador con nitrógeno líquido se añadieron 20 µL de Proteinasa K (20 mg/ml) y se realizó vórtex a los tubos.
- Después los tubos fueron incubados durante dos horas a 56°C en el termomixer y de vez en cuando se realizaba vórtex.
- Posteriormente, se añadieron 200 µL de *Buffer AL* y se realizó un vórtex durante 15 segundos.
- Luego se añadieron 200 µL de etanol al 96%, se hizo 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 con el fluido en su interior.
- Para los lavados se utilizaron 500 µL de los *Buffers AW1* y *AW2* respectivamente.
- Se añadieron 20 µL de *Buffer AL* para eluir el ADN de la columna pero en un nuevo tubo de 1,5mL; se repitió el mismo paso sin desechar el contenido del tubo.
- 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.

La integridad del ADN se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Además, para la cuantificación del ADN se empleó el equipo NanoDrop, la

relación de absorbancia 260/280 deberá tener un rango de 1.8 - 2.0 (ng/ μ L) para garantizar la pureza de las muestras (Asghar et al., 2015).

4.3 Amplificación y secuenciación

Para la amplificación de los fragmentos COI y 16S se realizó una PCR convencional y se usó una mix Platinum TM II Taq Hot-Start ADN Polymerase (Invitrogen), la cual estaba estandarizada y debía agregarse directamente. Dentro de este procedimiento, se usó como control positivo muestras de Trichoptera que han amplificado correctamente en otros experimentos y para el control negativo se usó agua milliQ. Además, en la amplificación se empleó el programa determinado por el distribuidor para la mix Platinum como se especifica en la Tabla 3.

Tabla 3.

Programa empleado en la amplificación de los fragmentos COI y 16S, usando la enzima Platinum II Taq Hot-Start (Invitrogen).

Paso		Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial		94°C	2 minutos
	Denaturación	94°C	15 segundos
45 ciclos	Hibridación	48°C	15 segundos
	Extensión	68°C	15 segundos
	Extensión final	68°C	30 segundos

En la Tabla 4, se detallan los cebadores utilizados para amplificar la región 5' de la subunidad 1 de la Citocromo Oxidasa del genoma mitocondrial, y la región 16s. Todas las reacciones de PCR se establecieron en 15 μ L usando: 5 μ L de ADN,

0.35 μ L de cada cebador a 5 uM, 1.75 μ L de agua PCR y 7.5 μ L del mix Platinum II Taq Hot-Start DNA Polymerase (Invitrogen).

Tabla 4.

Cebadores usados para la amplificación del ADN mitocondrial COI y 16S.

	Cebadores	Tipo	Secuencia 5-3	Referencia
COI	1709Fg	Forward	TAATTGGAGGATTTGGWA YTG	(Zhou, X., M. Kjer, 2007)
	2191R	Reverse	CCYGGTAAAATTAAAATA TAAACTTC	(Kjer et al., 2002)
16S	16sF	Forward	GTRCAAAGGTAGCATAAT	(Elbrecht et al., 2016)
	16sR	Reverse	TCCAACATCGAGGTCGCA	(Elbrecht et al., 2016)

4.3.1 Visualización de los productos de amplificación

Para comprobar que las muestras amplificaron correctamente se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. Además, para la verificación del peso molecular se usó *Ladder* de 100 pares de bases de ADN (Invitrogen). Por último, aquellas muestras con amplificación positiva fueron enviadas a secuenciar en ambas direcciones por el servicio de secuenciación de la UDLA.

4.4 Análisis Bioinformático

Las secuencias fueron editadas y ensambladas con el software MEGA7 (Kumar et al., 2016). Los fragmentos obtenidos fueron comparados en GeneBank de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), en el programa BLAST para la confirmación de su identidad. Luego, se realizó un alineamiento múltiple de

secuencia utilizando la herramienta Clustal W implementado en MEGA7, con los parámetros de alineamiento establecidos por el programa (Kumar et al., 2016), tanto para la COI como para la región 16S.

Posteriormente, se comprobó que las secuencias no tuviesen codones de parada, debido a que dicha secuencia es una región codificadora. Para ello, se utilizó el software *DNA Expasy* (<https://web.expasy.org/translate/>) y se comprobó el marco de lectura de cada una de las secuencias.

4.5 Cálculo de variabilidad genética

La variabilidad genética fue analizada por medio de matrices de distancias, con el modelo de Kimura 2 parámetros y con un *Bootstrap* de 100 repeticiones. Cada uno de los análisis fueron realizados dentro de:

- Toda la población
- Cada rango altitudinal
- Cada punto de muestreo

4.6 Determinación de Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares (MOTUS)

Para la determinación de los MOTUs se empleó el software ABGD (Descubrimiento automático de brechas de códigos de barras para la delimitación de especies primarias), su funcionalidad se basa en la determinación del número de MOTUs dependiendo de la divergencia-distancias entre las secuencias.

Las condiciones del programa se establecieron con relación a estudios similares realizados en el género *Metrichia*, donde se plateó el modelo de Kimura de 2 parámetros, con los límites de divergencia de (Pmin) 0,005 a (Pmax) 0,1 y el ancho de brecha relativa (X) de 1 (Santos et al., 2016).

Tras determinar los MOTUs y los individuos que pertenecen a cada uno, se usó el software MEGA7 para agrupar a las secuencias según su respectivo MOTU representado como título sp#. Para finalizar, se realizó un árbol filogenético con el modelo estadístico Neighbor-Joining, con los mismos parámetros un método de Kimura de 2 parámetros y con un *Bootstrap* de 100 repeticiones.

5. Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción de ADN y optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Dado el reducido tamaño de la muestra se utilizó el homogeneizador para asegurar la correcta lisis del tejido con la menor pérdida. Por otra parte, el mejor método de extracción fue con CTAB y la purificación con fenol-cloroformo, esto se concluyó tras la amplificación del ADN genómico extraído donde se evidenciaron mejores resultados en comparación con la extracción a partir de KIT.

Para la PCR inicial de los fragmentos COI y 16S, se probaron diferentes condiciones basados en el protocolo de la Master mix Platinum II Hot-Start PCR (2X), además se determinó que 4 μ L de ADN para una reacción de 10 μ L era la cantidad idónea para las reacciones. Por otra parte, el programa óptimo del termociclador se detalla en la Tabla 3, con una temperatura de hibridación de 45°C y 45 ciclos. No obstante, debido a la irregularidad en los resultados previos, se evaluaron las mismas muestras a diferentes temperaturas de hibridación. Para ello estas fueron sometidas a un gradiente de temperatura que iba desde los 43°C, 44°C hasta los 48°C. Los mejores resultados se obtuvieron a una temperatura de hibridación de 48°C usando los cebadores 1707Fg y 2191R (Figura 6), pero las bandas aun aparecían tenues, por lo cual, 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 determinó que la cantidad de ADN óptima es 5 μ l de una

elución de 40 μ l obtenidos en la extracción de ADN. El mismo procedimiento fue realizado con los *primers* para el fragmento 16S obteniendo una amplificación óptima (Figura 7).

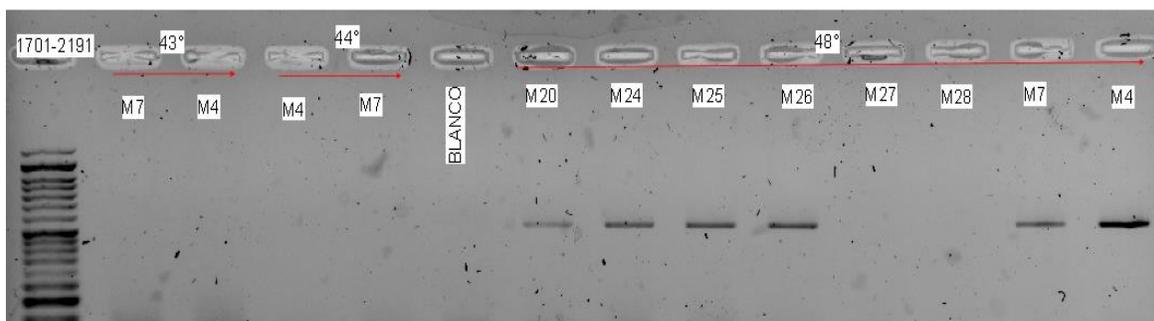


Figura 6. Gel de electroforesis con las amplificaciones del fragmento COI usando los cebadores 1707Fg y 2191R.

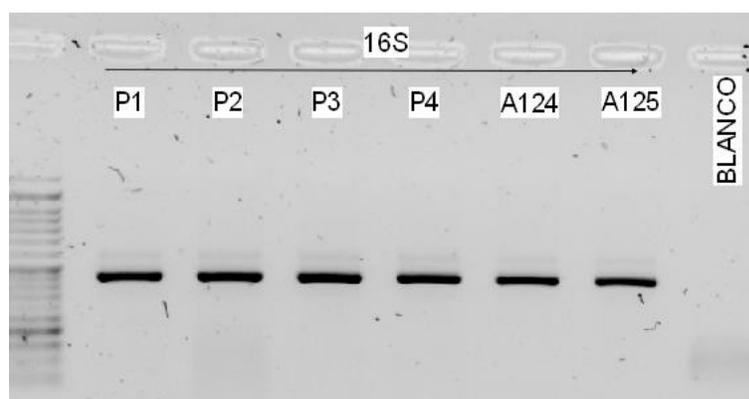


Figura 7. Amplificaciones del fragmento 16S en gel de electroforesis a 48°C.

A pesar de realizar varias modificaciones para la estandarización de los protocolos de amplificación, varias muestras no presentaron un buen rendimiento y no se evidenciaron amplificaciones positivas de varios individuos (Tabla 5), en otros estudios se ha determinado que existen varios factores que pueden interferir en el rendimiento de la PCR, por ejemplo: el tamaño de la larva, el método de muestreo, el tiempo de conservación de las muestras, la temperatura de hibridación, etc. (Hernández et al., 2014). 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).

Tabla 5.

Detalle del número de amplificaciones positivas (NA) para COI y 16S en contraste con el número de individuos obtenidos en el muestreo (NI).

LUGAR DE MUESTREO	CÓDIGO	NI	NA COI	NA 16S
Cajas	EC20190226-1	9	7	8
	EC20190226-2	5	5	5
	EC20190227-1	5	5	5
	EC20190227-3	15	-	-
Total Cajas		34	17	18
Chimborazo	EC20190215-2	5	4	5
	EC20190215-3	5	1	4
	EC20190215-4	5	4	5
Total Chimborazo		15	9	14
Volcán Illinizas / Río San Pedro	1.1SP	10	4	10
	1.2SP	28	7	9
	1.3SP	5	2	2
	2.5SP	4	-	-
	5SP	8	-	-
Total SP		55	13	21
Volcán Cotopaxi/ Río Pita	1.2PITA	35	-	-
	3.1PITA	4	-	-
	3.2PITA	4	-	-
Total PI		43	-	-
Cayambe	CAYAMBE1 (201218)	23	-	-
Total Cayambe		23	-	-
TOTAL		170	39	53

5.2 Secuenciación

Tras el análisis y edición de las secuencias para el fragmento COI se obtuvieron un total de 37 secuencias con un tamaño de 477 pb, mientras que para el fragmento 16S se obtuvieron 45 secuencias de 400 pb (Tabla 6).

Tabla 6.

Número de secuencias (NS) obtenidas tras los procesos de amplificación y secuenciación para COI y 16S.

LUGAR DE MUESTREO	CÓDIGO	NS COI	TOTAL NS COI	NS 16S	TOTAL NS 16S
CAJAS	EC20190226-1	6	16	8	18
	EC20190226-2	5		5	
	EC20190227-1	5		5	
SAN PEDRO	1.1SP	3	11	4	15
	1.2SP	6		9	
	1.3SP	2		2	
CHIMBORAZO	EC20190215-2	4	9	4	12
	EC20190215-3	1		6	
	EC20190215-4	4		2	
TOTAL SECUENCIAS			36		45

5.3 Identificación con *DNA barcodes*

Tras obtener las secuencias de los individuos pertenecientes al Cajas, Illinizas y Chimborazo se procedió a la comparación con las bases de datos genéticos, sin embargo, no se pudieron identificar especies. El porcentaje de identidad máximo fue del 95% con la familia Hydroptilidae y el menor fue del 79.37% con *Metrichia talhada*, lo que no nos permite relacionar las secuencias con una especie descrita anteriormente (Madrigal, 2017). Asimismo, las bases de datos poseen en su mayoría secuencias identificadas solo a nivel de familia o a nivel de género, pero en muy pocos casos a nivel de especie.

La información a nivel molecular de *Metrichia* es escasa, en Ecuador solo existe una secuencia perteneciente a *Metrichia* sp. colectada en la provincia del Napo y tras analizar la similitud con una de las secuencias de *Metrichia* de este estudio se obtuvo un 75,2% de similitud. 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). Además, al principio del

las secuencias de 16S, teniendo en consideración el porcentaje de divergencia obtenido en el cálculo de distancias se determinó que las secuencias con una similitud de 99,9% pertenecen al mismo MOTU, dando como resultado agrupaciones de 5 MOTUs, al igual que con el COI.

Los 5 MOTUs para COI fueron representados como: MOTU1 hasta MOTU5, distribuidas en los tres sitios de muestreo. Existen casos donde un MOTU solo aparece en un grupo de colecta, como es el caso del MOTU3 que se muestra en varios sitios del volcán Illiniza; o incluso en un solo punto de muestreo, como el MOTU5 que aparece en un sitio del grupo Cajas (Tabla 7), los resultados son similares para el análisis de 16S (Tabla 8), la diferencia radica en la agrupación de más secuencias que amplificaron para dicho fragmento.

Dentro de este análisis, se puede observar que el grupo Cajas comparte especies con los Illinizas y con el volcán Chimborazo, sin embargo entre Illinizas y Chimborazo no se evidencia una relación genética entre especies, pese a que estos sitios pertenecen a la Cordillera Occidental y la distancia geográfica entre los mismos es más corta en relación con el Parque Ecológico Cajas (Instituto Geofísico, 2019). Debido a que los individuos estrechamente relacionados de *Metrichia* están asociados con diferentes zonas fluviales, el género brinda la oportunidad de probar el efecto de diferentes tipos de hábitats en las especies a nivel de diversificación genética, en particular, ya que estos hábitats difieren en la estructura espacial y los niveles de conectividad entre las cuencas (Múrria et al., 2013). Es así que teniendo como guía la Figura 5, se puede deducir que los individuos pertenecientes al Cajas presentan un paso genético por el Callejón Interandino hacia los Illinizas, evidenciando un comportamiento de dispersión principalmente a lo largo de los corredores (Pauls et al., 2011). Por el contrario, la distribución del Cajas hacia el Chimborazo presenta una restricción de dispersión lateral (Pauls et al., 2011), disminuyendo la relación entre las especies de estos dos grupos, pese a que se puede dar una migración a través del corredor biológico

Llanganates-Sangay (Fierro, 2015). Asimismo, los ríos atraviesan paisajes que se caracterizan por un mayor relieve y mayores barreras potenciales de dispersión a grandes alturas (Múrria et al., 2013), características presentes en la zona montañosa entre los grupos Chimborazo e Illinizas, lo que ocasionaría poblaciones genéticamente diferenciadas indicando barreras geográficas y antrópicas al flujo de genes (Previšić et al., 2009).

Tabla 7.

Número de individuos para COI según el MOTU y punto de muestreo.

	Puntos de muestreo	MOTUs COI				
		MOTU1	MOTU2	MOTU3	MOTU4	MOTU5
CAJAS	EC20190226-1	-	-	-	5	1
	EC20190226-2	4	1	-	-	-
	EC20190227-1	1	4	-	-	-
ILLINIZAS	1.1SP	-	3	-	-	-
	1.2SP	-	1	5	-	-
	1.3SP	-	-	2	-	-
CHIMBORAZO	EC20190215-2	4	-	-	-	-
	EC20190215-3	-	-	-	1	-
	EC20190215-4	3	-	-	1	-

Tabla 8.

Número de individuos para 16S según el MOTU y punto de muestreo.

	Puntos de muestreo	MOTUs 16S				
		MOTU1	MOTU2	MOTU3	MOTU4	MOTU5
CAJAS	EC20190226-1	-	-	-	7	1
	EC20190226-2	4	1	-	-	-
	EC20190227-1	1	4	-	-	-
ILLINIZAS	1.1SP	-	4	-	-	-
	1.2SP	-	3	6	-	-
	1.3SP	-	-	2	-	-
CHIMBORAZO	EC20190215-2	4	-	-	-	-
	EC20190215-3	-	-	-	4	-
	EC20190215-4	3	-	-	1	-

5.5 Divergencia entre los grupos

Una vez obtenidos los grupos, 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, además se utilizó como muestra fuera de grupo a *Mesophylax aspersus*, que pertenece al orden Trichoptera y a la familia Limnephilidae..

Dentro del análisis de distancias entre grupos (Tabla 9), se determinó que la similitud en promedio de toda la población es del 78,3%, lo que nos indica que en este caso existe un 21,7% de diversidad genética dentro del género. Además, se corrobora la relación genética entre la población del Cajas y los Illinizas, debido a que existe menor divergencia entre ellos de un 19,6%, en comparación con los otros grupos. Por otra parte, la divergencia es mayor entre Illinizas y Chimborazo con un 24,8%.

Tabla 9.

*Porcentaje de divergencia entre los grupos de *Metrichia*.*

Grupos		Divergencia
Cajas	Illinizas	19,60%
Cajas	Chimborazo	20,70%
Illinizas	Chimborazo	24,80%
Cajas	Fuera de grupo	35,9%
Illinizas	Fuera de grupo	36,7%
Chimborazo	Fuera de grupo	36,5%

Acorde con el análisis de distancias, para el fragmento COI solo 8 secuencias tienen una similitud del 100%, lo que indica una elevada divergencia entre los grupos analizados. Asimismo, para el fragmento 16S se agruparon las secuencias similares donde se obtuvo que muestras pertenecientes al Cajas eran idénticas a individuos del Chimborazo. El género *Metrichia* no presenta una restricción altitudinal, lo que puede ser un antecedente para esta variabilidad. Existen datos donde se ha demostrado que especies pertenecientes a este género pueden encontrarse en altitudes que van desde los 300 a 900 m correspondientes a corrientes cálidas (Henriques & Nessimian, 2010), no obstante, también se han registrado hallazgos en zonas con una altitud que superan los 3800 m (Ríos-Touma et al., 2017).

5.6 Divergencia dentro de los grupos

5.6.1 Parque Ecológico Cajas

Dentro de la población del Parque Ecológico Cajas la similitud máxima fue de 99,8% para COI y 99,7% para 16S, considerando a las secuencias exactamente iguales, mientras que la similitud mínima fue de 69% para la COI y 87,4% para 16S. Es así que se pudo determinar una divergencia de 19.2% (Tabla 10) dentro

de este grupo, lo que representa una amplia variabilidad y sugiere que podrían existir varias especies dentro del género *Metrichia*.

Tabla 10.

Distancias entre las muestras del Parque Ecológico Cajas.

Divergencia	Entre las muestras (COI)	Entre las muestras (16S)
Mínima	0,2%	0,3%
Media	19,2%	9,2%
Máxima	31,0%	12,6%

5.6.2 Volcán Illiniza

Para esta población se determinó una divergencia de 7,3% para COI entre las 11 muestras y de 5,6% para 16S (Tabla 11), también se obtuvieron una similitud máxima de 99,8% y mínima del 84,4% para COI, mientras que para 16S la máxima similitud fue de 99,7% y mínima de 92,2%.

Tabla 11.

Distancias entre las muestras del Volcán Illiniza.

Divergencia	Entre las muestras (COI)	Entre las muestras (16S)
Mínima	0,2%	0,3%
Media	7,3%	5,6%
Máxima	15,6%	7,8%

5.6.3 Volcán Chimborazo

Se determinó una divergencia de 15,3% entre las 9 muestras (Tabla 12), también se obtuvieron una similitud máxima de 98% y mínima del 63,7% en el análisis del fragmento que codifica para COI. Sin embargo, tras el análisis de las secuencias de 16S, la divergencia entre estas fue de 10,7%, mientras la similitud máxima y mínima fue la misma con un 89,3%.

Tabla 12.

Divergencia entre las muestras del Volcán Chimborazo.

Divergencia	Entre las muestras (COI)	Entre las muestras (16S)
Mínima	2,0%	10,7%
Media	15,3%	10,7%
Máxima	36,3%	10,7%

Tras analizar los porcentajes de divergencia en cada uno de los grupos se evidenció que entre las muestras hay una divergencia mayor a 0,2%, lo que sugiere que podrían existir varias especies dentro un mismo grupo. Sin embargo, el Volcán Illinizas presenta la menor divergencia entre sus muestras con un 7,3% (Tabla 11), lo que puede ser atribuida a la poca distancia de muestreo entre los puntos de este grupo. A este grupo le sigue el volcán Chimborazo, con una divergencia de 15,3% (Tabla 12) y pese a que las distancias intraespecíficas poseen valores altos, en trabajos similares se encontraron divergencias intraespecíficas aún mayores del 5.9% (Craft et al., 2010) y valores de hasta el 14% en poblaciones de Trichoptera (Zhou et al., 2011). Por otra parte, la población del Parque Ecológico Cajas posee la mayor divergencia intraespecífica de 19,2% (Tabla 10) y en trabajos relacionados a especies de *Metrichia* las distancias intraespecíficas de COI fueron de hasta el 18,4% (Santos et al., 2016).

De igual modo, en cada uno de los cálculos de distancia también se realizó la comparación con 16S y aunque los valores confirman la divergencia presente en cada uno de los grupos, estos fueron menores a los de COI en cada uno de los análisis. Esto puede suceder debido a que los fragmentos que codifican para 16S presentan algunas regiones altamente conservadas (Yang et al., 2014) en comparación con los fragmentos que codifican para COI.

5.7 Análisis filogenético

En la Figura 11, se observa el árbol filogenético con el modelo de *Neighbor-Joining* obtenido mediante el modelo de Kimura de 2 parámetros y con un *Bootstrap* de 100 repeticiones para las secuencias del fragmento que codifican para COI. Además, bajo los mismos criterios se realizó el árbol filogenético para las secuencias del gen 16S (Figura 12). En ambas figuras cada MOTU ha formado un clado definido:

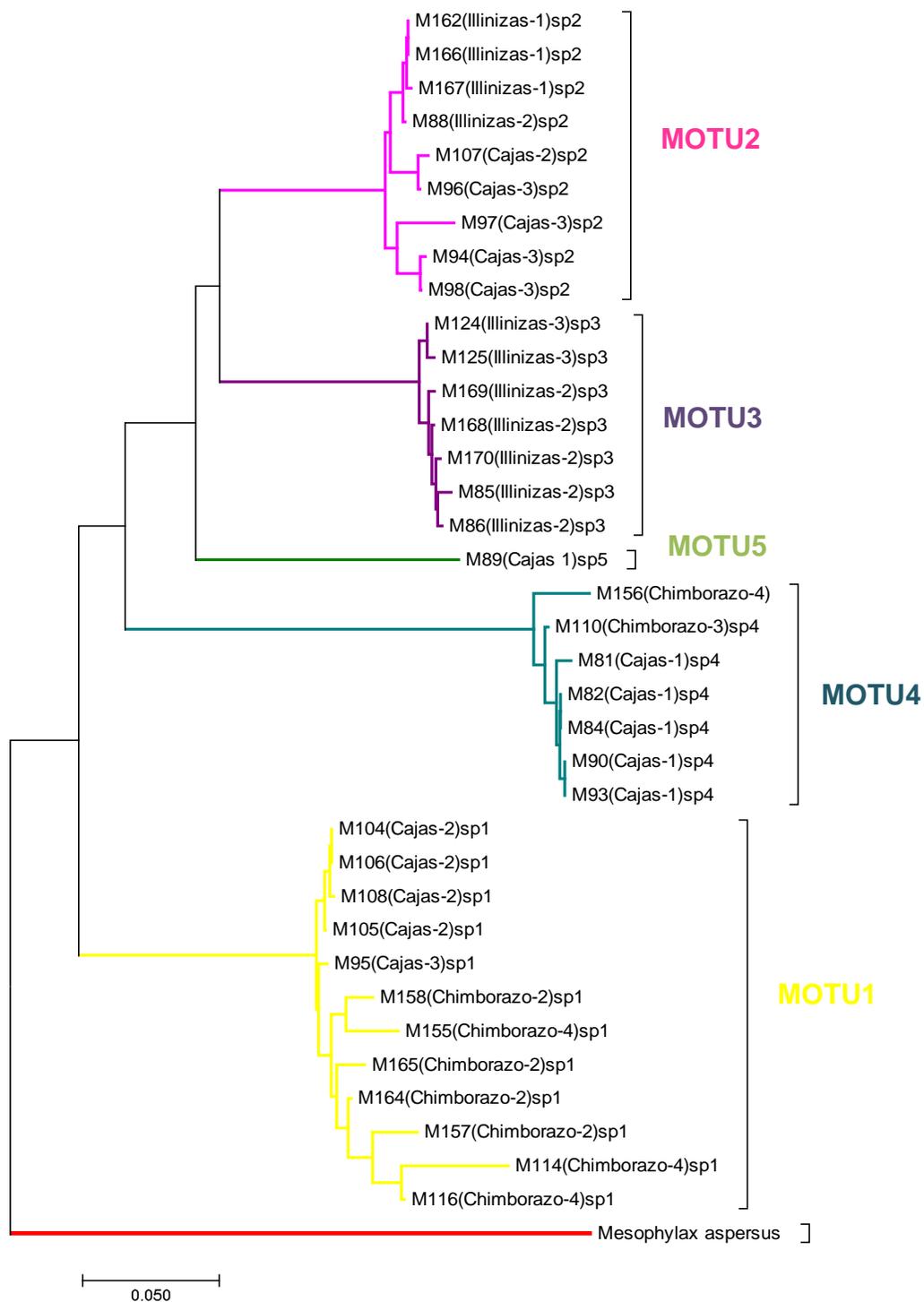


Figura 11. Árbol filogenético basado en secuencias COI donde se observan los diferentes MOTUs: MOTU1 (color verde), MOTU2 (color rosado), MOTU3 (color morado), MOTU4 (color turquesa) y MOTU5 (color verde).

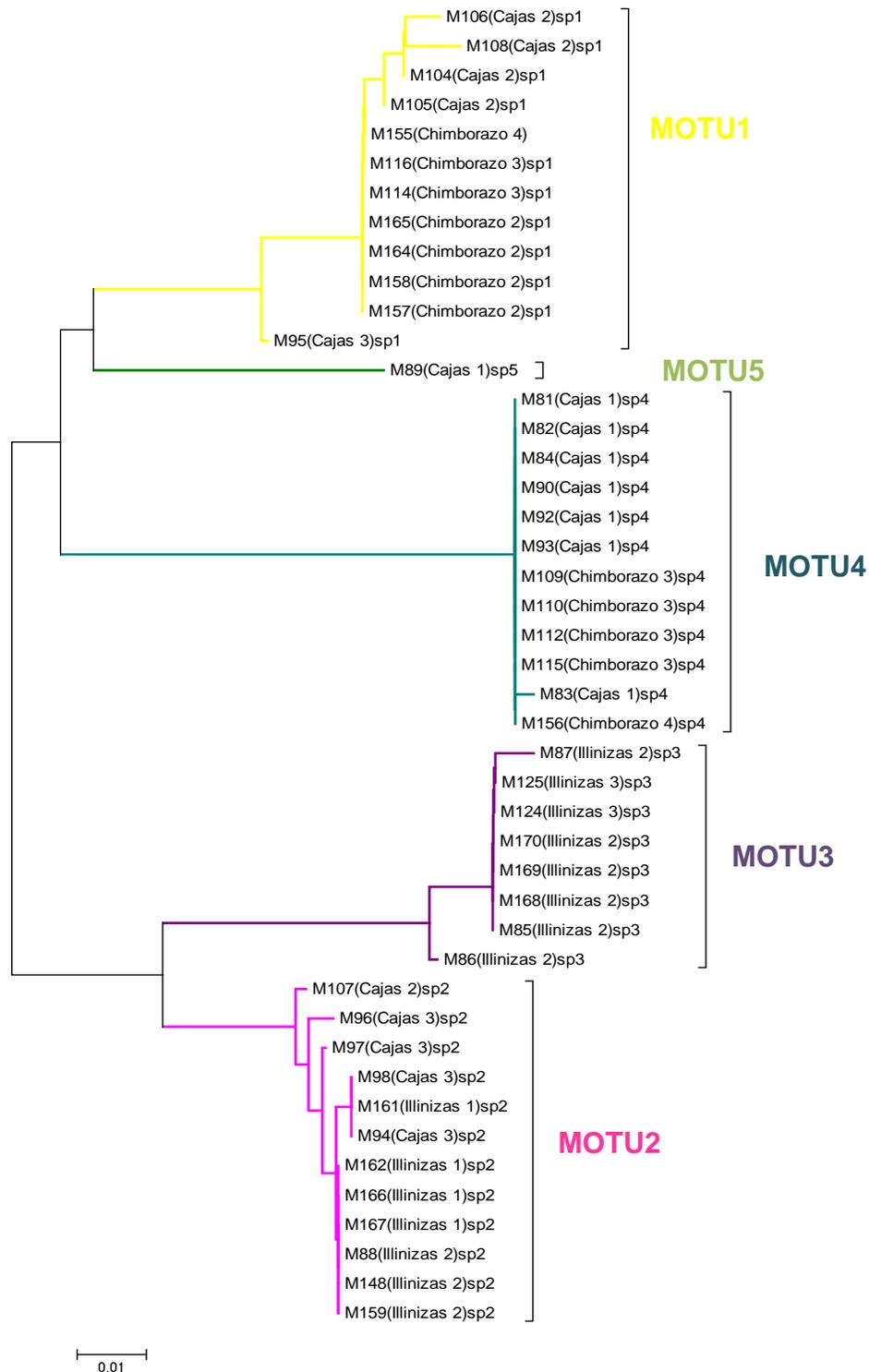


Figura 12. Árbol filogenético basado en secuencias 16S donde se observan los diferentes MOTUs: MOTU1 (color verde), MOTU2 (color rosado), MOTU3 (color morado), MOTU4 (color turquesa) y MOTU5 (color verde).

En las Figuras 13 y 14 se muestran a todos los individuos pertenecientes al MOTU1. Tanto en el subárbol para COI como para 16S, se observan clados internos específicos para cada sitio de muestreo a pesar de que estén agrupadas dentro de un mismo motu.

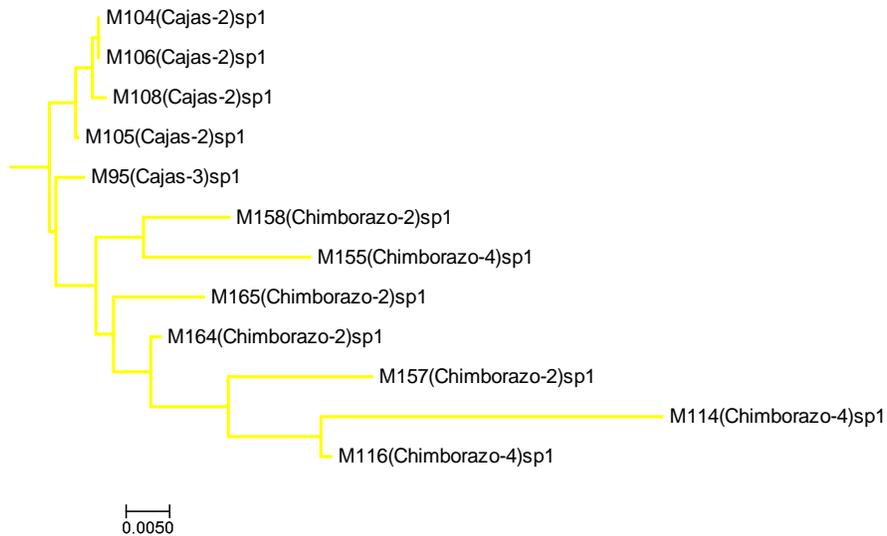


Figura 13. Subárbol filogenético del MOTU sp1 basado en secuencias COI.

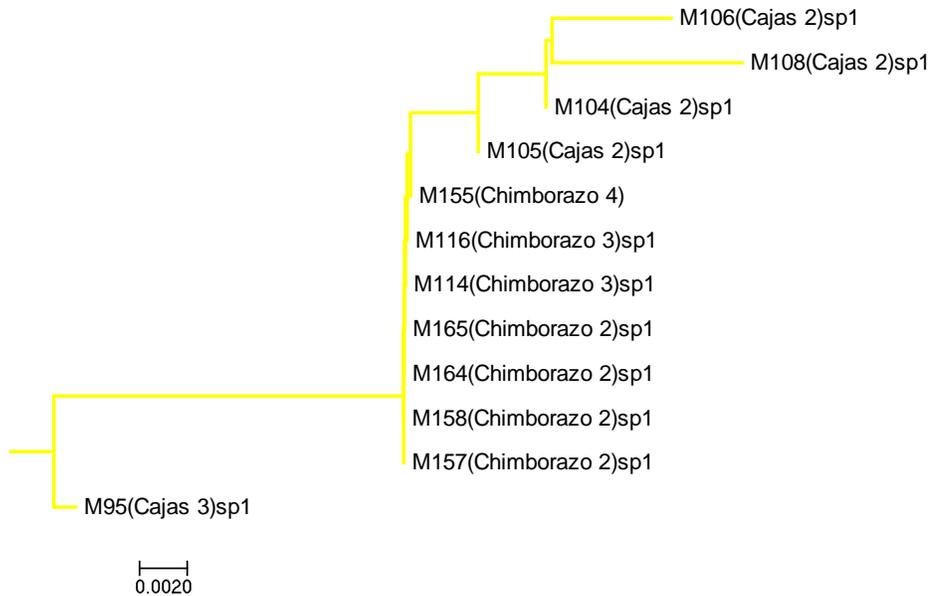


Figura 14. Subárbol filogenético del MOTU1 basado en secuencias 16S.

En las Figuras 15 y 16 se muestran los subárboles del MOTU2. En la agrupación para el subárbol de COI, se forman clados internos según el sitio de muestreo, sin embargo, en el subárbol de 16S los clados internos evidencian interacciones entre Cajas e Illinizas.

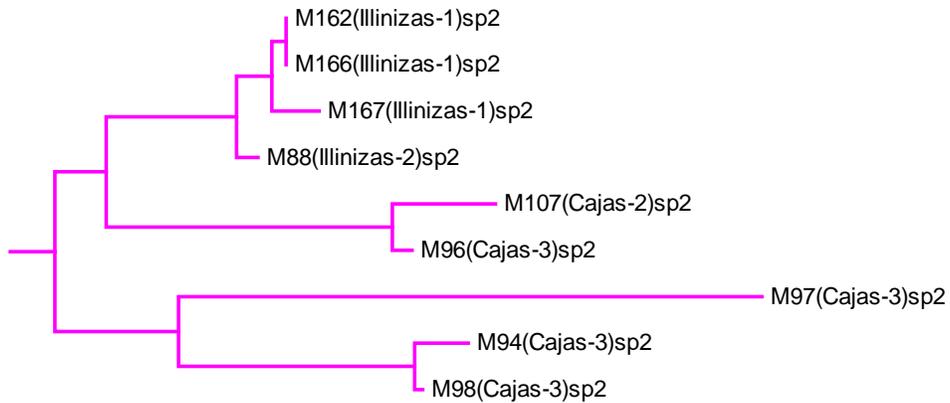


Figura 15. Subárbol filogenético del MOTU2 basado en secuencias de COI.

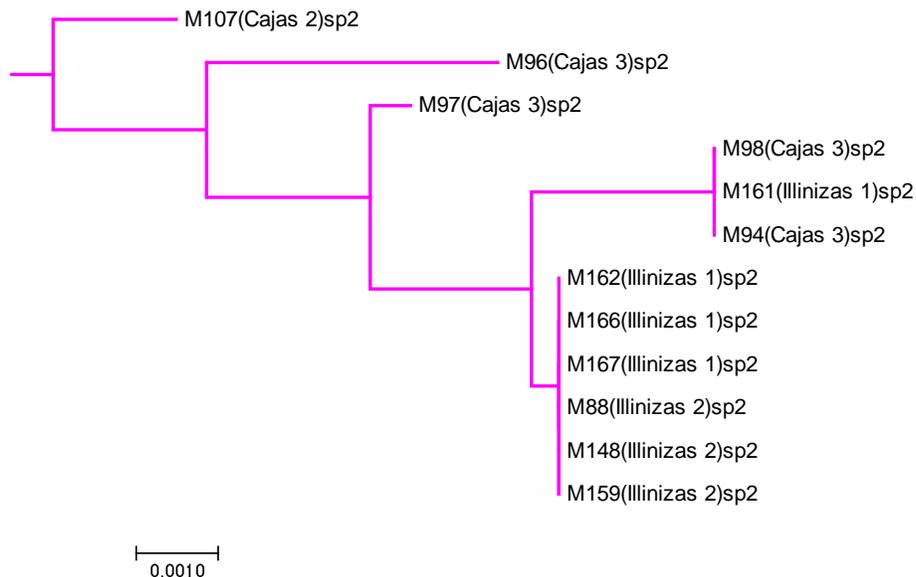


Figura 16. Subárbol filogenético del MOTU2 basado en secuencias de 16S.

Por otra parte, los subárboles del MOTU3 (Figuras 17 y 18), a pesar de estar constituidos únicamente por individuos pertenecientes al sitio Illinizas, presentan varios clados internos mostrando la variabilidad genética dentro de esta población.

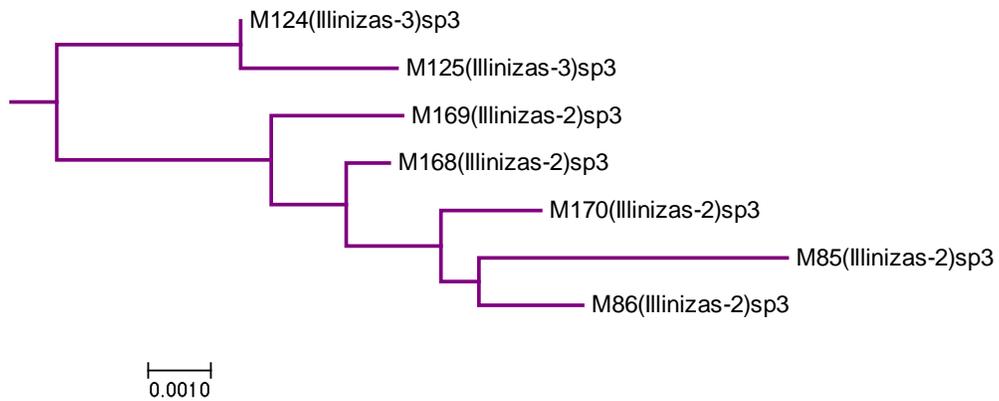


Figura 17. Subárbol filogenético del MOTU3 basado en secuencias de COI.

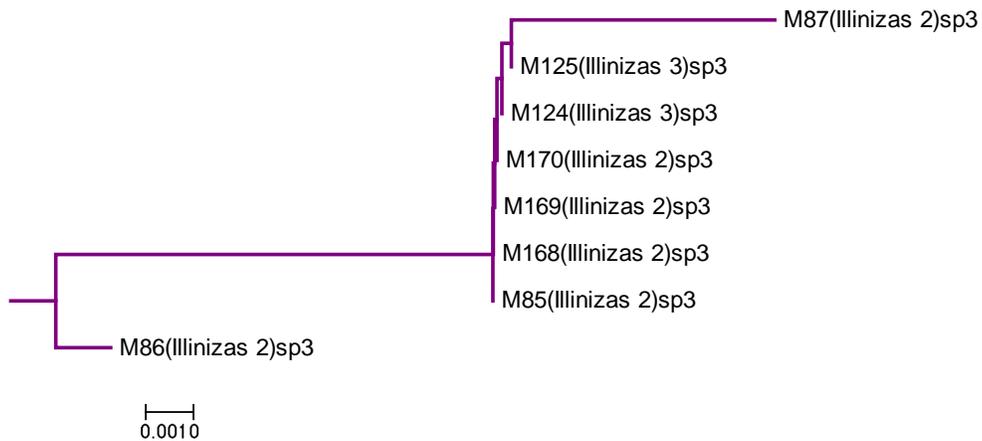


Figura 18. Subárbol filogenético del MOTU3 basado en secuencias de 16S.

En el MOTU4 se observan diferencias entre los subárboles. En el subárbol para COI se observa mayor variabilidad por el número de clados internos y agrupaciones por sitios (Figuras 19), mientras que para el subárbol para 16S, los clados internos muestran la interacción entre los puntos de los sitios de muestreo del Cajas y Chimborazo (Figura 20).

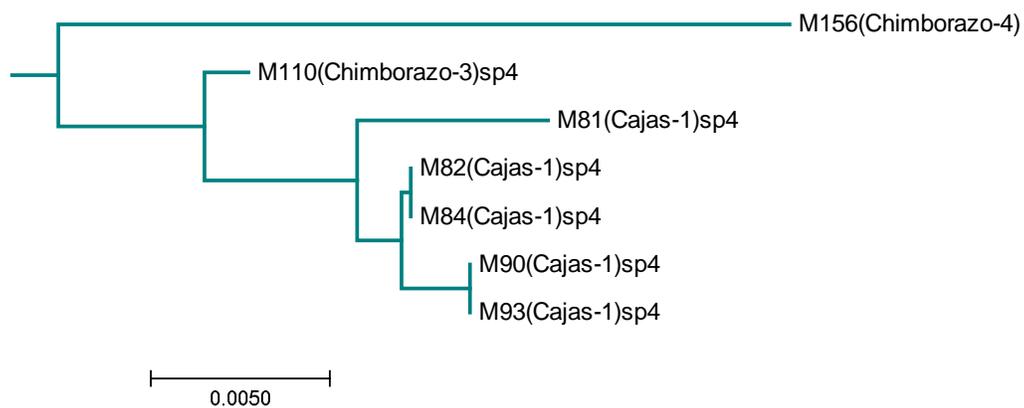


Figura 19. Subárbol filogenético del MOTU4 basado en secuencias de COI.

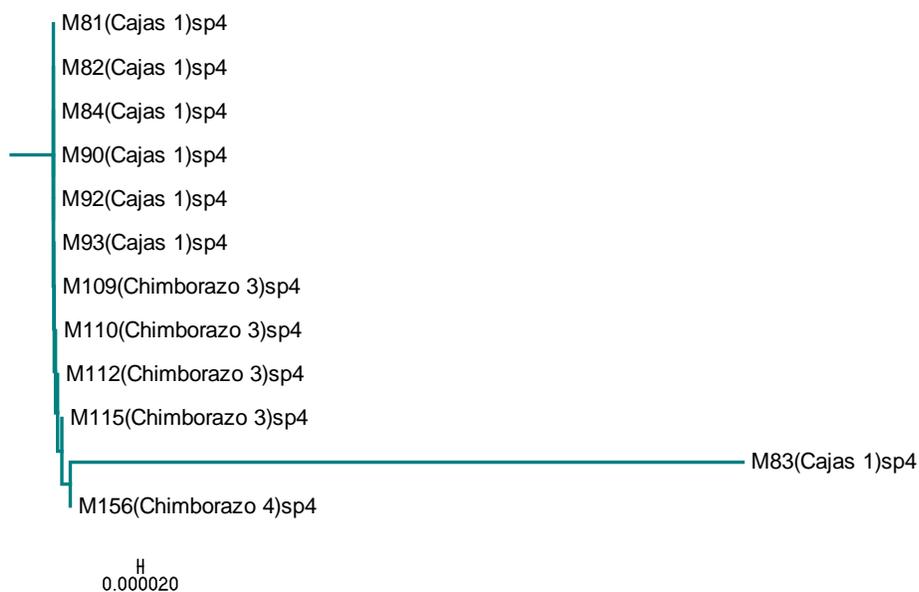


Figura 20. Subárbol filogenético del MOTU4 basado en secuencias de 16S.

Por último, el MOTU5 se encuentra constituido por un solo individuo y en ambos árboles filogenéticos se trata del organismo M89 perteneciente al punto EC20190226-1 del Parque Ecológico Cajas.

Pese a que en otras investigaciones se plantean que en este tipo de estudios donde se utilizan *DNA barcodes* para agrupar individuos por la dificultad de identificar especies, los árboles filogenéticos no necesariamente muestran las relaciones filogenéticas reales (Hebert et al., 2004), en esta ocasión ambos análisis se complementaron. De manera que, si se plantease que cada MOTU representa a una especie de *Metrichia* se puede asumir que existe una barrera para la distribución de los individuos, debido a que en ocasiones un MOTU se encontraba en un solo sitio de muestreo y ningún MOTU se observó en los 3 grupos al mismo tiempo.

En consecuencia, todos los datos sugieren que existe mayor variabilidad de especies en el sitio Cajas, seguido por Chimborazo y por último, se encuentra Illinizas. Ahora se puede afirmar que, los patrones de riqueza local (α -diversidad) presente en el grupo Cajas y su variación a través de rangos geográficos (β -diversidad) están determinados principalmente por una combinación de características locales de hábitat, barreras de paisaje y rasgos biológicos relacionados con la dispersión (Múrria et al., 2013), lo cual permite la relación con los Illinizas y Chimborazo, no obstante, entre estas dos últimas poblaciones la variabilidad es menor, dando lugar a la falta de agrupación de especies observada en los MOTUs (Tablas 7 y 8). Por consiguiente, se puede deducir una dispersión lineal de sur a norte por la Cordillera Occidental de los Andes, lo cual, se ha observado en estudios relacionados con la filogeografía en Trichoptera, en los Alpes Occidentales en Europa Central, donde se obtuvieron altos niveles de diversidad genética al sur de los Alpes y empobrecimiento genético al norte de los mismos (Pauls et al., 2011), sugiriendo una migración de hábitat por el cambio de condiciones en el nicho ecológico.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

En conclusión, las secuencias del gen citocromo oxidasa de las poblaciones del género *Metrichia*, se obtienen a partir de una PCR convencional con los cebadores 1709Fg y 2191F, mientras que los correspondientes a la región 16S con los cebadores 16S F y 16S R, donde la temperatura de hibridación adecuada es de 48°C para los dos casos, además en este estudio el tamaño de los fragmentos fueron de 477 y 400 pares de bases para el gen citocromo oxidasa y la región 16S, respectivamente, mismos que no corresponden a los tamaños esperados.

El análisis genético mostró una agrupación de las muestras según sus unidades taxonómicas moleculares (MOTUs), a través del porcentaje de similitud entre las secuencias genéticas. En este estudio se determinaron 5 MOTUs y con el análisis filogenético se concluyó que pueden existir MOTUs para un solo punto de muestreo, sin embargo, ningún MOTU se observó al mismo tiempo en todas las poblaciones analizadas. Además, en los árboles filogenéticos se observó cómo los MOTUs se agrupan por poblaciones, mientras que en los clados internos se agrupaban por sitio de muestreo. Tras estos resultados se podría aseverar que existe una barrera para el flujo genético del género *Metrichia* en los Andes ecuatorianos.

Finalmente, se puede afirmar que existe facilidad de flujo genético en forma longitudinal a través del Callejón Interandino y una restricción en la distribución lateral debido a barreras del paisaje o incluso por la presión antrópica, lo que provoca bajos niveles de diversidad genética, específicamente en las poblaciones que presentan una distancia geográfica razonablemente estrecha entre ellas.

6.2 Recomendaciones

En estudios posteriores, se recomienda utilizar muestras frescas para facilitar la extracción de ADN y mejorar la calidad del mismo, de esta manera se utilizaran menos recursos en los procedimientos posteriores del trabajo en el laboratorio. Asimismo, es necesario que el análisis morfológico sea en conjunto con el análisis molecular para aseverar que la muestra pertenece a determinada especie o género y de esta forma tener resultados confiables para futuras investigaciones

Para tener resultados más específicos dentro del análisis bioinformático se recomienda el uso de programas con mayor sensibilidad como GMYC que evalúa la delimitación de “especies potenciales”, sobre todo en este tipo de organismos donde la identificación morfológica resulta complicada.

Por último, se recomienda agregar más individuos dentro de cada sitio de muestreo especialmente en el sitio correspondiente a Chimborazo, además es necesario incluir individuos localizados en la Cordillera Oriental para un mejor análisis de la distribución geográfica de este género, con la finalidad de mejorar la precisión filogenética. De este modo, la diversidad genética entre las poblaciones tendrá un mayor soporte para inferir la historia evolutiva.

REFERENCIAS

- Altamirano, M., & Yanez, P. (2016). El código de barras de ADN (barcoding): una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en Ecuador. *La Granja*, 23(1). Recuperado el 23 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.17163/lgr.n23.2016.01>
- Angrisano, E., & Sganga, J. (2005). Contribution to the knowledge of the genus *Metrichia* Ross from Argentina (Trichoptera: Hydroptilidae: Ochrotrichiini). *Aquatic Insects*, 27(2), (pp. 113–123). Recuperado el 12 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1080/01650420500062782>
- 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*, 03(04), (pp. 132–138). Recuperado el 15 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.4236/ae.2015.34016>
- Beheregaray, L. B., & Caccone, A. (2007). Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology*, 6(4), Article 9. Recuperado el 8 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1186/jbiol60>
- Blaxter, M. L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1444), (pp. 669–679). Recuperado el 15 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1447>
- Brand, C., & Miserendino, M. L. (2014). Biological traits and community patterns of Trichoptera at two Patagonian headwater streams affected by volcanic ash deposition. *Zoological Studies*, 53(1), (pg. 72). Recuperado el 16 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s40555-014-0072-9>
- Christensen, H., Andersson, A. J., Jørgensen, S. L., & Vogt, J. K. (2018). 16S *rRNA Amplicon Sequencing for Metagenomics*. Recuperado el 20 de

junio de 2019 de https://doi.org/10.1007/978-3-319-99280-8_8

- Christensen, H., & Olsen, J. E. (2018). Sequence-Based Classification and Identification of Prokaryotes. In *Introduction to Bioinformatics in Microbiology. Volumen I* (pp. 121–134). Recuperado el 20 de junio de 2019 de https://doi.org/10.1007/978-3-319-99280-8_7
- Craft, K., Pauls, S., Darrow, K., Miller, S., Hebert, P., Helgen, L., Novotny, V. & Weiblen, G. (2010). Population genetics of ecological communities with DNA barcodes: an example from New Guinea Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), (pp. 5041–5046). Recuperado el 11 de octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1073/pnas.0913084107>
- Cuasapas, S. (2019). *Estudio de la diversidad genética entre dos poblaciones de Anomalocosmoecus illiesi provenientes de los volcanes Cotopaxi e Illinizas*. Recuperado el 21 de julio de 2019 de dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10653/4/UDLA-EC-TIB-2019-05.pdf
- Diaz, H. F., Grosjean, M., & Graumlich, L. (2003). Climate Variability and Change in High Elevation Regions: Past, Present and Future. *Climatic Change*, 59(1/2), (pp. 1–4). Recuperado el 16 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1023/A:1024416227887>
- Dittrich-Schröder, G., Wingfield, M. J., Klein, H., & Slippers, B. (2012). DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), (pp. 109–115). Recuperado el 28 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03074.x>
- Elbrecht, V., Taberlet, P., Dejean, T., Valentini, A., Usseglio, P., Beisel, J., Coissac, E., Boyer, F., Leese, F. (2016). Testing the potential of a

ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ*, 4, 1966. Recuperado el 21 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.7717/peerj.1966>

Fierro Alabarda, C. A. (2015). Corredores biológicos como una estrategia de conservación: el caso del Corredor de Conservación Llanganates – Sangay, Ecuador. *Pontificia Universidad Católica Del Ecuador*. Recuperado el 23 de junio de 2019 de repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/8656

Figueroa, R., Bonada, N., Guevara, M., Pedreros, P., Correa-Araneda, F., Díaz, M. E., & Ruiz, V. H. (2013). Freshwater biodiversity and conservation in mediterranean climate streams of Chile. *Hydrobiologia*, 719(1), (pp. 269–289). Recuperado el 18 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1685-4>

Finn, D. S., Encalada, A. C., & Hampel, H. (2016). Genetic isolation among mountains but not between stream types in a tropical high-altitude mayfly. *Freshwater Biology*, 61(5), (pp. 702–714). Recuperado el 10 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1111/fwb.12740>

Gill, B. A., Kondratieff, B. C., Casner, K. L., Encalada, A. C., Flecker, A. S., Gannon, D. G., Ghalambor, C., Guayasamin, J. M., Poff, N. L., Simmons, M. P., Thomas, S. A., Zamudio, K. R. & 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). Recuperado el 20 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0553>

Gill, Brian A., Harrington, R. A., Kondratieff, B. C., Zamudio, K. R., LeRoy Poff, N., & Chris Funk, W. (2014). Morphological taxonomy, DNA barcoding, and

species diversity in southern Rocky Mountain headwater streams. *Freshwater Science*, 33(1), (pp. 288–301). Recuperado el 6 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1086/674526>

Graf, W., Vitecek, S., Previšić, A., & Malicky, H. (2015). New species of Limnephilidae (Insecta: Trichoptera) from Europe: Alps and Pyrenees as harbours of unknown biodiversity. *Zootaxa*, 3911(3), (pp. 381–395). Recuperado el 23 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3911.3.5>

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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), (pp. 14812–14817). Recuperado el 19 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>

Henriques-Oliveira, A. L., & Nessimian, J. L. (2010). Aquatic macroinvertebrate diversity and composition in streams along an altitudinal gradient in Southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 10(3), (pp. 115–128). Recuperado el 5 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000300012>

Hernández-Triana, L. M., Prosser, S. W., Rodríguez-Perez, M. A., Chaverri, L. G., Hebert, P. D. N., & Ryan Gregory, T. (2014). Recovery of DNA barcodes from blackfly museum specimens (Diptera: Simuliidae) using primer sets that target a variety of sequence lengths. *Molecular Ecology Resources*, 14(3), (pp. 508–518). Recuperado el 3 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12208>

Holzenthal, R. W., & Calor, A. R. (2017). Catalog of the Neotropical Trichoptera (Caddisflies). *ZooKeys*, 654, (pp. 1–7). Recuperado el 11 de noviembre

de 2018 de <https://doi.org/10.3897/zookeys.654.9516>

Holzenthal, R. W., & Ríos-Touma, B. (2012). *Contulma paluguillensis* (Trichoptera:Anomalopsychidae), a new caddisfly from the high Andes of Ecuador, and its natural history. *Freshwater Science*, 31(2), (pp. 442–450). Recuperado el 12 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1899/11-067.1>

Huamantínco, A., & Ortiz, W. (2010). Genera key to Trichoptera (Insecta) larvae from Western slope of the Andes, Lima, Peru. In *Revista Peruana de Biología* (Vol. 17). Recuperado el 23 de marzo de 2019 de www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332010000100009

Instituto Geofísico. (2019). Red de Observatorios Vulcanológicos (ROVIG) - Instituto Geofísico - EPN. Recuperado el 15 de julio de 2019 de <https://www.igepn.edu.ec/red-de-observatorios-vulcanologicos-rovig>

Klindworth, A., Priesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR *primers* for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1). Recuperado el 20 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kriská, G. (2013). *Caddisflies – Trichoptera*. In *Freshwater Invertebrates in Central Europe* (pp. 300–329). Recuperado el 25 de mayo de 2019 de https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1547-3_20

Luiza-Andrade, A., Montag, L. F. de A., & Juen, L. (2017). Functional diversity in studies of aquatic macroinvertebrates community. *Scientometrics*, 111(3), (pp. 1643–1656). Recuperado el 20 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s11192-017-2315-0>

- Madrigal-Valverde, K. A. (2017). Using tools for sequence alignment and outline of phylogenetic trees to determine species. *Revista Tecnología En Marcha*, 30, 30–34. Recuperado el 15 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.18845/tm.v30i5.3218>
- Mesa, O., Díaz, H., Masoliver, P., & Clar, C. (2005). Bioinformatics in phylogeography: analytical methods and applications. *BMC Bioinformatics*, 6(Suppl 3), (pg. 22). Recuperado el 17 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-S3-P22>
- Meusnier, I., Singer, G. A., Landry, J.-F., Hickey, D. A., Hebert, P. D., & Hajibabaei, M. (2008). A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9(1), (pg. 214). Recuperado el 12 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-214>
- Múrria, C., Bonada, N., Arnedo, M. A., Prat, N. & Vogler, A. P. (2013). Higher β - and γ -diversity at species and genetic levels in headwaters than in mid-order streams in *Hydropsyche* (Trichoptera). *Freshwater Biology*, 58(11), (pp. 2226–2236). Recuperado el 15 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1111/fwb.12204>
- Ninahuanca, A., Arteaga, D., & Luna, R. (2013). Identificación de Trichopteros de altura de Bolivia y Perú mediante código de barras de ADN. *BAG. Journal of Basic and Applied Genetics*, (pp. 76–82). Recuperado el 8 de abril de 2019 de www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-62332013000300008
- Pauls, S. U., Engelhardt, C. H., & Haase, P. (2011). From the Western Alps across Central Europe: Postglacial recolonisation of the tufa stream specialist *Rhyacophila pubescens* (Insecta, Trichoptera). *Frontiers in Zoology*, 8(1), (pg. 10). Recuperado el 16 de abril de 2019 de

<https://doi.org/10.1186/1742-9994-8-10>

- Pes, A. M. O., Hamada, N., & Nessimian, J. L. (2005). Chaves de identificação de larvas para famílias e gêneros de Trichoptera (Insecta) da Amazônia Central, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 49(2), (pp. 181–204). Recuperado el 12 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1590/S0085-56262005000200002>
- 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), (pp. 418–427). Recuperado el 18 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800436>
- 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*, 100, (pp. 124–134). Recuperado el 26 de mayo de 2019 de <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. Recuperado el 18 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04046.x>
- 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. Recuperado el 2 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.7717/peerj.2851>
- Ruiter, D. E., Boyle, E. E., & Zhou, X. (2013). DNA barcoding facilitates associations and diagnoses for Trichoptera larvae of the Churchill

(Manitoba, Canada) area. *BMC Ecology*, 13(1), (pg. 5). Recuperado el 26 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-5>

Santos, A. P. M., Takiya, D. M., & Nessimian, J. L. (2016). Integrative taxonomy of *Metrichia* Ross (Trichoptera: Hydroptilidae: Ochrotrichiinae) microcaddisflies from Brazil: descriptions of twenty new species. *PeerJ*, 4, e2009. Recuperado el 25 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.7717/peerj.2009>

Schmidt-Kloiber, A., Neu, P. J., Malicky, M., Pletterbauer, F., Malicky, H., & Graf, W. (2017). Aquatic biodiversity in Europe: a unique dataset on the distribution of Trichoptera species with important implications for conservation. *Hydrobiologia*, 797(1), (pp. 11–27). Recuperado el 10 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3116-4>

Szivák, I., Mikes, T., Szalontai, B., Kučinić, M., Vučković, I., Vadkerti, E., Kisfali, P., Pauls, S. & Bálint, M. (2017). Ecological divergence of *Chaetopteryx rugulosa* species complex (Insecta, Trichoptera) linked to climatic niche diversification. *Hydrobiologia*, 794(1), (pp. 31–47). Recuperado el 28 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s10750-016-3068-0>

Vuataz, L., Rutschmann, S., Monaghan, M. T. & Sartori, M. (2016). Molecular phylogeny and timing of diversification in Alpine Rhithrogena (Ephemeroptera: Heptageniidae). *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), (pg. 194). Recuperado el 3 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0758-1>

Westveer, J. J., Verdonschot, P. F. M., & Verdonschot, R. C. M. (2018). Biotic interactions enhance survival and fitness in the caddisfly *Micropterna sequax* (Trichoptera: Limnephilidae). *Hydrobiologia*, 818(1), (pp. 31–41). Recuperado el 29 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3493-8>

- Wiggins, G. (1996). Larvae of the North American Caddisfly Genera (Trichoptera) . G. B. Wiggins. *Journal of the North American Benthological Society*, 15(3), (pp. 403–405). Recuperado el 5 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.2307/1467289>
- Yang, L., Tan, Z., Wang, D., Xue, L., Guan, M.-X., Huang, T. & Li, R. (2014). Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific Reports*, 4, 4089. Recuperado el 22 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1038/srep04089>
- Yetter, S. E. (2013). Freshwater Macroinvertebrates of the Mid-Atlantic Region. In *Mid-Atlantic Freshwater Wetlands: Advances in Wetlands Science, Management, Policy, and Practice* (pp. 339–379). Recuperado el 27 de marzo de 2019 de https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5596-7_10
- Yukuhiro, K., Sezutsu, H., Tsubota, T., Takasu, Y., Kameda, T., & Yonemura, N. (2016). Insect Silks and Cocoons: Structural and Molecular Aspects. In *Extracellular Composite Matrices in Arthropods* (pp. 515–555). Recuperado el 8 de abril de 2019 de https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1_14
- Zamora-Muñoz, C., Sáinz-Bariáin, M., & Bonada, N. (2015). CLASE INSECTA Orden Trichoptera. *Revista IDE@-SEA*, N^o, 64, (pp. 1–21). Recuperado el 14 de junio de 2019 de www.sea-entomologia.org/IDE@
- Zhou, X., Robinson, J. L., Geraci, C. J., Parker, C. R., Flint, O. S., Etnier, D. A., Ruitter, D., DeWalt, E., Jacobus, L. & Hebert, P. D. N. (2011). Accelerated construction of a regional DNA-barcode reference library: caddisflies (Trichoptera) in the Great Smoky Mountains National Park. *Journal of the North American Benthological Society*, 30(1), (pp. 131–162). Recuperado el 6 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1899/10-010.1>

ANEXOS

