

**UTILIDAD DEL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO C OXIDASA I (COI)  
COMO CÓDIGO DE BARRAS PARA LA DELIMITACIÓN DE ESPECIES DE  
LAGARTIJAS *Anolis* Daudin 1802 EN LOS ANDES COLOMBIANOS**



**SANTIAGO OROZCO CHAMORRO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2018**

**UTILIDAD DEL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO C OXIDASA I (COI)  
COMO CÓDIGO DE BARRAS PARA LA DELIMITACIÓN DE ESPECIES DE  
LAGARTIJAS *Anolis* Daudin 1802 EN LOS ANDES COLOMBIANOS**

SANTIAGO OROZCO CHAMORRO

Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de Biólogo

DIRECTORA

MARÍA DEL ROSARIO CASTAÑEDA, PhD.

CODIRECTOR

JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS, PhD

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2018

Nota de aceptación

---

---

---

Directora: \_\_\_\_\_

María del Rosario Castañeda, Ph.D

Codirector: \_\_\_\_\_

Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Ph.D

Jurado: \_\_\_\_\_

Carlos Enrique Guarnizo Caro, Ph.D

Jurado: \_\_\_\_\_

Charles Sidney Muñoz Nates, M. Sc

Fecha de sustentación: Popayán, 13 de abril de 2018

*A mi padre Alberto Orozco Orozco*

*A mi madre Claudia Chamorro Méndez*

*A mi bella hermana Claudia Milena Orozco Chamorro  
por su educación y apoyo incondicional durante toda mi vida...*

## AGRADECIMIENTOS

A la Doctora María del Rosario Castañeda por compartir sus conocimientos y amplia experiencia con las espectaculares lagartijas *Anolis*. Desde los inicios del trabajo sus comentarios, correcciones y sugerencias fueron claves para contribuir en mi formación como Biólogo.

Al profesor Nelson Toro Perea por brindar el espacio y los equipos del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle, por sus comentarios constructivos, aportes científicos y permitirme aprender de la experiencia del Grupo de Estudios Ecogenéticos y de Biología Molecular, especialmente al Profesor Heiber Cárdenas, Sandra M. Velasco, Laura M. Martínez, Jenny J. Gallo, Diana N. Duque, José Lopez, Mauricio Peñuela y Ronald A. Viafara, por estar dispuestos a resolver dudas, expresar sugerencias y compartir conocimientos adquiridos en su trayectoria investigativa. Agradezco al laboratorista de la sección de Genética Alexander Ramírez por ayudar en todos los procedimientos de laboratorio.

A la Universidad del Cauca y los docentes del Departamento de Biología que aportaron y aportan lo mejor de cada uno para formar Biólogos comprometidos con la profesión.

A los Biólogos: Cristian R. Palacios por sus asesorías para análisis de datos, Andrés F. Liévano y Miyer I. Cerón por compartir sus conocimientos y herramientas para el diseño de mapas, al Profesor Gustavo A. Londoño, Jhan C. Salazar y al estudiante Jhon S. Ovalle por su vital apoyo en trabajo de campo.

A la Bióloga María A. Lazo, por tu apoyo constante a lo largo de toda la carrera y especialmente en esta etapa final de formación. Gracias por tu paciencia, por poner a disposición tu tiempo y conocimientos en aspectos académicos y por mostrarme tu excepcional humanidad en aspecto personales.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Saurios en Colombia .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. El género <i>Anolis</i> Daudin 1802 .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Las especies de interés .....</b>	<b>24</b>
3.3.1. <i>Anolis antonii</i> Boulenger 1908 .....	24
3.3.2. <i>Anolis tolimensis</i> Werner 1916 .....	25
3.3.3. <i>Anolis mariarum</i> Barbour 1932 .....	26
<b>3.4. El Código de Barras de ADN .....</b>	<b>28</b>
<b>3.5. El método Automatic Barcode Gap Discovery - ABGD .....</b>	<b>29</b>
3.5.1. Parámetros y resultados del algoritmo ABGD .....	30
<b>3.6. Inferencia filogenética a partir de secuencias de ADN .....</b>	<b>31</b>
3.6.1. Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood – ML).....	33
3.6.2. Inferencia Bayesiana .....	35
<b>3.7. Redes de haplotipos.....</b>	<b>36</b>
<b>4. ANTECEDENTES.....</b>	<b>37</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Colección de muestras .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2. Extracción de ADN, amplificación de secuencias y secuenciación</b> <b>.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3. Análisis de datos .....</b>	<b>42</b>
5.3.1. Alineación de secuencias .....	42

5.3.2.	Estimación de divergencias intra- e interespecíficas .....	44
5.3.3.	Algoritmo Automatic Bacoder Gap Discovery (ABGD) .....	45
5.3.4.	Relaciones filogenéticas y red de haplotipos.....	46
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
6.1.	Divergencia intra- e interespecífica .....	48
6.2.	Aplicación del algoritmo ABGD.....	49
6.3.	Análisis filogenéticos .....	52
6.4.	Red de haplotipos.....	56
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>58</b>
7.1.	Divergencia intra- e interespecífica en el género <i>Anolis</i> .....	58
7.2.	Aplicación del algoritmo ABGD.....	61
7.3.	Análisis filogenéticos y red de haplotipos .....	63
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

## TABLA DE FIGURAS

- Figura 1.** Coloración gular en machos de *Anolis antonii* Boulenger 1908. A, Patrón de coloración descrito en Ayala y Castro (no publ.), MRC287, Laguna de Sonso, Valle del Cauca; B, MRC221, Jericó, Antioquia; C, MRC176, El Cairo, Valle del Cauca. fotos en A, B y C por M. del R. Castañeda.....25
- Figura 2.** Coloración gular en machos de *Anolis tolimensis* Werner 1916. A, Patrón de coloración descrito en Ayala y Castro (no publ.), MRC236, Laguna de Pedro Palo, Cundinamarca; B, TOL019, Falán, Tolima; C, MRC235, Laguna de Pedro Palo, Cundinamarca. fotos en A, B y C por M. del R. Castañeda. ....26
- Figura 3.** Coloración gular en machos de *Anolis mariarum* Barbour 1932. A, Patrón de coloración descrito en Ayala y Castro (no publ.), MAR012, Belmira, Antioquia; B, MRC185, Carolina del Príncipe, Antioquia; C, MAR024, Alto de San Miguel, Antioquia. fotos en A, B y C por M. del R. Castañeda. ....27
- Figura 4.** Distribución teórica de *Anolis antonii*, *Anolis mariarum* y *Anolis tolimensis*. El mapa muestra los registros georeferenciados disponibles para las tres especie en los portales de datos SIB Colombia (SIB Colombia, 2016) y VertNet (Constable *et al.*, 2010). Se observa la discrepancia entre la identificación de especímenes en colecciones biológicas (puntos en el mapa) y la distribución teórica de las tres especies (regiones sombreadas en color rojo para *A. antonii*, azul para *A. mariarum* y verde para *A. tolimensis*). ....27
- Figura 5.** Distribución geográfica de las localidades muestreadas para *Anolis antonii* (letras rojas), *A. mariarum* (letras azules) y *A. tolimensis* (letras verdes). A - Anorí; B - Carolina del príncipe; C - Belmira; D - Alto de San



Miguel; E - Jericó; F - PNN Tatamá; G - El Dorado; H - Laguna de Sonso, I – La Minga, J – El Pato; K – Cajibío; I – Falán; M – Yacopí; N – Caparrapí; O – Sasaima; P – Laguna de Pedro Palo..... 41

**Figura 6.** A, Histograma de distribución frecuencias de distancias genéticas pareadas (kimura 2 parámetros) entre las secuencias en la matriz b (nueve especies de Genbank/BOLD, *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*). La flecha indica el valor umbral encontrado por el algoritmo ABGD que separa la variación genética intra- e interespecífica. B, Diagrama mostrando cómo el número de grupos encontrados por el algoritmo varía respecto a diferentes valores de distancia máxima previa intraespecífica o umbrales. 51

**Figura 7.** Árbol bayesiano reconstruido a partir de secuencias del gen COI de *A. antonii* (rojo), *A. tolimensis* (verde), *A. mariarum* (azul) y de especies con secuencias de Genbank/BOLD (negro). Para cada secuencia se indica la localidad en letras: A - Anorí; B - Carolina del Príncipe; C - Belmira; D - Alto de San Miguel; E - Jericó; F - PNN Tatamá; G - El Dorado; H - Laguna de Sonso; I – La Minga; J – El Pato; K – Cajibío; I – Falán; M – Yacopí; N – Caparrapí; O – Sasaima; P – Laguna de Pedro Palo. Se indican los soportes de nodo para aquellos con valores de Probabilidad Posterior igual o mayor a 0.75.....54

**Figura 8.** Arbol de Máxima Verosimilitud reconstruido a partir de secuencias del gen COI de *A. antonii* (rojo), *A. tolimensis* (verde), *A. mariarum* (azul) y de especies con secuencias de Genbank/BOLD (negro). Para cada secuencia se indica la localidad en letras: A – Anorí; B – Carolina del Príncipe; C – Belmira; D – Alto de San Miguel; E – Jericó; F – PNN Tatamá; G – El Dorado; H – Laguna de Sonso; I – La Minga; J – El Pato; K – Cajibío; I – Falán; M – Yacopí; N – Caparrapí; O – Sasaima; P – Laguna de Pedro Palo. Se indican los soportes de nodo para aquellos con Bootstrap mayor o igual a 70%.....55

**Figura 9.** Red de haplotipos para *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*. Cada haplotipo está representado por un círculo en la red. el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Círculos en la red compuestos de dos colores corresponden a un haplotipo compartido entre dos especies. El color de los círculos (haplotipos) y las letras (localidades) indican cada especie, *A. antonii* (rojo), *A. mariarum* (azul) y *A. tolimensis* (verde). Círculos blancos representan secuencias inferidas. Letras en la red corresponden a localidades de origen de las muestras indicadas también en el mapa. Líneas segmentadas en la red agrupan haplotipos de una misma localidad. La longitud de las ramas es proporcional al número pasos mutacionales (líneas transversas sobre ramas) entre haplotipos. ....57

**Figura 10.** Coloración gular en machos de *Anolis tolimensis*. A, MHUA-R 12770 foto por F. A. Grisales-Martínez; B, MRC235 Laguna de Pedro Palo Cundinamarca; C, TOL019 Falán Tolima; TOL010 Laguna de Pedro. Fotos en B, C y D por M. del R. Castañeda.....68

## TABLA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción de localidades e individuos usados para el análisis de Códigos de Barras. ....	43
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de divergencia intra- e interespecífica (bajo la diagonal) y de desviación estándar (sobre la diagonal) calculados a partir de las secuencias de individuos identificados como <i>Anolis antonii</i> , <i>A. mariarum</i> y <i>A. tolimensis</i> . ....	49
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de divergencia intra- e interespecífica y de desviación estándar calculados a partir de las secuencias (sec.) de especies de <i>Anolis</i> encontradas en las bases de datos Genbank y BOLD. ....	50
<b>Tabla 4.</b> Número de grupos (especies potenciales) encontrados por el algoritmo ABGD en las particiones inicial ( $P_0$ ) y recursiva ( $P_r$ ) a partir de diferentes valores de divergencia intraespecífica mínima ( $p_{min}$ ), máxima ( $p_{max}$ ) y número de iteraciones (steps). ....	52
<b>Tabla 5.</b> Comparación de valores promedio y desviación estándar de la longitud rostro-cloacal (LRC) de individuos <i>A. antonii</i> , <i>A. mariarum</i> y <i>A. tolimensis</i> reportados por grisales <i>et al.</i> , 2017 y los obtenidos en este estudio. ....	70

## TABLA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Resolución 1070 del 28 de agosto de 2015, expedida por la Autoridad Nacional De Licencias Ambientales, por la cual se otorga un Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial a la Universidad del Valle..... 84

**Anexo 2.** Resolución 1234 del 02 de octubre de 2015, expedida por la Autoridad Nacional De Licencias Ambientales, por la cual se otorga un Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial a la investigadora María del Rosario Castañeda Prada..... 85

**Anexo 3.** Listado de especies y secuencias del gen COI utilizadas en los cálculos de divergencia intra- e interespecífica y/o los análisis filogenéticos. Se muestra el número de accesoión en Genbank, números de registro en BOLD y localidad (País y/o provincia/departamento) de cada secuencia. Las secuencias indicadas con un asterisco (\*) fueron usadas en los análisis filogenéticos.....86

**Anexo 4.** Listado de secuencias del gen COI de individuos colectados en campo y utilizadas en los cálculos de divergencia intra- e interespecífica y/o los análisis filogenéticos. Se muestra el código de campo y la localidad (municipio y departamento) de cada secuencias (\*). Todas las secuencias están por someter en Genbank.....94

**Anexo 5.** Código de campo y localidad de las secuencias de *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* en la matriz B utilizada para ejecutar el algoritmo ABGD y para la reconstrucción de árboles filogenéticos. Se indica en un mismo color las secuencias que pertenecen a un mismo grupo cuando el algoritmo ABGD

encontró 10, 14 y 17 grupos. Todas las secuencias están por someter en Genbank.....95

## RESUMEN

La identificación y descripción de nuevas especies de reptiles se ha basado principalmente en caracteres morfológicos, sin embargo, ésta estrategia tiene limitaciones que pueden llevar a diagnósticos errados. Particularmente, el género de lagartijas *Anolis* Daudin 1802 posee una alta variación morfológica intraespecífica, dificultando la selección de caracteres taxonómicos informativos. Frente a este problema se propone la utilización de Códigos de Barras de ADN, en donde secuencias genéticas actúan como etiquetas únicas para identificar cada especie. No obstante solo ciertos genes funcionan exitosamente como etiquetas únicas y la efectividad de ésta aplicación no ha sido evaluada en todos los grupos. *Anolis antonii* Boulenger 1908, *A. tolimensis* Werner 1916 y *A. mariarum* Barbour 1932 son tres especies poco conocidas endémicas de Colombia, distribuidas a lo largo de la cordillera de los Andes y valles interandinos, que presentan alta similaridad morfológica, variación intraespecífica y solapamiento parcial en sus rangos de distribución, haciéndolas excelentes candidatas para evaluar la efectividad de técnicas moleculares en la identificación de especies. Este estudio evaluó la información de un fragmento del gen mitocondrial Citocromo C oxidasa I (COI) como Código de Barras para delimitar estas tres especies de *Anolis*. Se obtuvieron 68 secuencias de ADN de un fragmento de ~605 pares de bases a partir de individuos de las tres especies provenientes de 16 poblaciones. Para evaluar la utilidad del fragmento se estimó la divergencia genética intra- e interespecífica del gen COI de diferentes especies de *Anolis* y se aplicó un algoritmo (Automatic Barcode Gap Discovery) para estimar el número de grupos o “especies potenciales”, encontrando que las especies de interés forman un solo grupo. Así mismo, se estimaron las relaciones filogenéticas entre las especies usando métodos Bayesiano y Máxima Verosimilitud. Los árboles reconstruidos mostraron que las tres especies de interés no son monofiléticas. A través de una red de haplotipos se encontró que no hay estructura genética que corresponda

con la geografía de los Andes y que hay haplotipos compartidos entre dos de las especies. Las líneas de evidencia presentadas en este estudio, aplicación del algoritmo, inferencia filogenética y red de haplotipos, demuestran que el fragmento del gen COI no es informativo para identificar especies de *Anolis* estrechamente relacionadas.

**Palabras clave:** *Anolis*, Código de Barras de ADN, COI, Especies crípticas

## INTRODUCCIÓN

La cordillera de los Andes constituye uno de los más importantes hotspots de biodiversidad a nivel global por su riqueza en especies y endemismos de plantas y vertebrados (Hutter *et al.*, 2013). Sin embargo, para la zona Norte de la cordillera (*i.e.* Colombia) el número de especies descritas para estos grupos parece estar subestimado (Guarnizo *et al.*, 2015). Colombia posee uno de los patrimonios naturales más diversos del planeta al albergar cerca del 15% de las especies descritas de flora y fauna (Páez *et al.*, 2006) y es el cuarto país en cuanto a riqueza de reptiles a nivel mundial (Morales-Betancourt *et al.*, 2017). A pesar de ésta alta diversidad, aún se desconocen varios aspectos biológicos, taxonómicos y genéticos de los reptiles colombianos, particularmente a nivel genético, lo cual los hace candidatos ideales para investigaciones que generen este tipo de datos (Andrade, 2011; Gómez *et al.*, 2016).

Identificar y describir nuevas especies de reptiles a través de la diagnosis morfológica (taxonomía clásica) tiene limitaciones importantes (Hebert *et al.*, 2003a; Smith *et al.*, 2008; Köhler, 2014). Por ejemplo, la variabilidad de caracteres morfológicos dentro de una especie (variabilidad intraespecífica) puede hacerlos menos informativos para identificar especies (Goldstein y DeSalle, 2011). A su vez, es frecuente encontrar un mismo carácter cuya definición difiere entre investigadores. Esto dificulta la comparación entre estudios dado que los métodos utilizados para la obtención de datos también difieren entre los mismos (Köhler, 2014). Además, la existencia de claves morfológicas restringidas a un género en particular, a ciertos estadios de vida o a regiones que no cubren el rango completo de distribución de las especies dificulta aún más la identificación, generando diagnósticos errados (Savolainen *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2008; Laopichienpong *et al.*, 2016) e impidiendo la identificación de especies crípticas (Hebert *et al.*, 2003a; Bergsten *et al.*, 2012; Köhler *et al.*, 2016).



La dificultad de usar caracteres morfológicos para identificar especies ha motivado la búsqueda de nuevos sistemas de diagnóstico. Así, se ha optado por usar datos moleculares (*i.e.* segmentos del genoma) que faciliten la identificación (Hebert *et al.*, 2003a, 2004; Paz y Crawford, 2012; Guarnizo *et al.*, 2015). Éstos han permitido revelar especies que son muy parecidas en su morfología, fisiología y comportamiento, pero que a nivel genético pueden ser consideradas entidades distintas (*i.e.* especies crípticas; (Köhler *et al.*, 2016). Así, los análisis moleculares han ayudado a fortalecer los estudios de biodiversidad y a resolver en parte las dificultades en la identificación de especies dado que la especiación no siempre manifiesta cambios morfológicos evidentes (Glor *et al.*, 2003; Bickford *et al.*, 2007; Guarnizo *et al.*, 2015). Uno de estos sistemas de diagnóstico es el Código de Barras de ADN, que pretende identificar especies a través del uso de secuencias cortas de una región particular del genoma (Hebert *et al.*, 2003a). De esta manera se pueden identificar individuos más rápidamente en comparación a la forma tradicional, sin requerir experticia en el grupo estudiado (Savolainen *et al.*, 2005).

Inicialmente se propuso un fragmento corto de cientos de pares de bases del gen Citocromo C Oxidasa I (COI) como etiqueta para identificar especies (Hebert *et al.*, 2003a, 2003b). Esta herramienta molecular ha sido utilizada para identificar y delimitar especies en varios grupos animales como invertebrados (Hebert *et al.*, 2010), anfibios (*e.g.* Guarnizo *et al.*, 2015), aves (*e.g.* Hebert *et al.*, 2004) y algunos reptiles (*e.g.* Nagy *et al.*, 2012; Hawlitschek *et al.*, 2016). En múltiples grupos se ha demostrado la utilidad del gen COI (Vences *et al.*, 2005; Yassin *et al.*, 2010; Crawford *et al.*, 2013), en otros se ha encontrado que no es efectivo (Hebert *et al.*, 2003a; Bucklin *et al.*, 2011; Hawlitschek *et al.*, 2016) y en otros más no se ha aplicado la técnica.

Uno de los grupos donde se desconoce aún la utilidad del gen COI como código de barras son las lagartijas del género *Anolis* Daudin 1802 (Köhler *et al.*, 2014b). Éstas lagartijas se caracterizan principalmente por la presencia de un abanico gular en los machos (excepto en dos especies) y en hembras de algunas

especies (Fitch y Hillis, 1984), y de almohadillas plantares ensanchadas cubiertas con lamelas subdigitales (Peterson, 1983). Particularmente los *Anolis* presentan una alta variabilidad intraespecífica en varios caracteres morfológicos utilizados tradicionalmente en la delimitación de especies, lo cual ha dificultado su identificación (Nicholson *et al.*, 2007; Köhler, 2014). Esto los hace un excelente grupo candidato para evaluar técnicas moleculares que resulten en una diagnosis específica más objetiva y precisa (Chambers y Hebert, 2016; Köhler *et al.*, 2016).

En Colombia, uno de los países con mayor riqueza de especies de lagartijas *Anolis* con 76 especies reportadas (Páez *et al.*, 2006; Uetz *et al.*, 2018), existen tres especies endémicas y poco conocidas del grupo de especies de especies *fuscoauratus* (Dactyloidae): *Anolis antonii* Boulenger 1908, *A. tolimensis* Werner 1926 y *A. mariarum* Barbour 1932, cuyas características las hacen excelentes candidatas para la aplicación del código de barras de ADN. Estas especies son altamente similares en su lepidosis y coloración corporal, y su coloración gular, uno de los caracteres principales para diferenciarlas, es altamente variable entre poblaciones de la misma especie lo cual dificulta su identificación. Bajo estas condiciones resulta conveniente evaluar la independencia de cada linaje utilizando información genética que corrobore el estatus o la posibilidad de estar ante grupos de individuos de una misma especie con variaciones interpoblacionales (Losos, 2009; Köhler *et al.*, 2014b, 2016).

En este trabajo se utilizará una parte del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa I (COI) como Código de Barras de ADN para determinar si este fragmento es informativo para reconocer las especies *Anolis antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum* como clados independientes, lo cual validaría su estatus categórico de especies.

## 1. JUSTIFICACIÓN

Además de identificar individuos rápidamente sin requerir experticia en el grupo estudiado, la aplicación del Código de Barras de ADN tiene ventajas económicas. A pesar de que la obtención de datos moleculares puede ser costosa, los cebadores (primers) universales y el bajo costo de secuenciar solo una corta región del genoma permiten hacer esta metodología cada vez más asequible y útil. En este sentido, el Código de Barras de ADN es una alternativa altamente factible ya que propone el uso de una corta secuencia de ADN de un solo gen capaz de actuar como etiqueta única para cada especie por separado (Puillandre *et al.*, 2011). Además, el fragmento genético se puede amplificar a partir de un par de cebadores universales sin la necesidad de conocimiento previo de las secuencias (Folmer *et al.*, 1994).

Por otra parte, para Colombia existe poca información sobre la diversidad, ecología, sistemática, distribución y estado poblacional de la mayoría de especies de pequeños lagartos (*e.g.* lagartijas *Anolis*; (Castaño-Mora, 2002; Páez *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2015). Parte de esta falta de información se debe, entre otras cosas, a la falta de estudios taxonómicos detallados que permitan identificar las especies; los estudios a nivel molecular constituyen una línea de evidencia clave para la diagnosis específica en grupos difíciles de identificar. Así, el problema de subestimar especies debido a identificaciones erradas dificulta los esfuerzos por conocer, utilizar y conservar las especies presentes en el país (MADS, 2012). La apropiada identificación de especies es crucial en aspectos como la implementación de controles biológicos, identificación de especies invasoras e inventarios de fauna (Bickford *et al.*, 2007).

En Colombia el conocimiento de la Biodiversidad Nacional a nivel genético es limitado y no se cuenta con cifras representativas de su estado actual (Mejía y Hodson, 2006; Gómez *et al.*, 2016). Sin embargo, la Política Nacional para la

Gestión Integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos reconoce el carácter estratégico del conocimiento de la biodiversidad en todos sus niveles (diversidad genética, de especies y de ecosistemas) como fuente principal, base y garantía del suministro de servicios ambientales, indispensables para el desarrollo del país, como base de competitividad y como parte fundamental del bienestar de la sociedad colombiana (MADS, 2012; Andrade, 2011). En este sentido, existe un requerimiento urgente de conocer y comprender mejor la biodiversidad en términos de sus componentes fundamentales (genes y taxa), sus interrelaciones y los factores que la amenazan (Mejía y Hodson, 2006). Así, ante la presión actual de extinción de especies, el análisis del ADN para la identificación es una herramienta muy útil en el campo de la conservación (Savolainen *et al.*, 2005). Por tanto, los estudios a nivel genético de la Diversidad Biológica Nacional permiten fortalecer la comprensión de los procesos evolutivos responsables de la misma, proporcionando un importante recurso para lograr los tres pilares de la Política Nacional de Biodiversidad: Conocer, utilizar y conservar (Mejía y Hodson, 2006).

Conociendo la falta de información sobre la diversidad biológica y la urgente necesidad de desarrollar capacidades científicas, técnicas e institucionales (Ley 165 de 1994), en este proyecto se plantea valorar la efectividad de la técnica molecular Código de Barras de ADN utilizando el gen COI, como herramienta de apoyo en la diagnosis específica de un grupo de reptiles poco estudiado en Colombia (Castillo-Mora, 2002). El gen COI ha sido usado en estudios de Código de Barras de DNA en varios grupos animales, siendo efectivo en invertebrados (*e.g.* Hebert *et al.*, 2010), anfibios (*e.g.* Guarnizo *et al.*, 2015), aves (*e.g.* Hebert *et al.*, 2004) y algunos reptiles (Jeong *et al.*, 2013; Köhler *et al.*, 2014a; Hawlitschek *et al.*, 2016). Para este último grupo se ha encontrado que no resulta útil para ciertas especies (Hawlitschek *et al.*, 2016).

Con este trabajo también se contribuirá a incrementar las bases de datos de información genética de las especies de reptiles presentes en el país y se

aumentará la información biológica de *Anolis antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum*, que no están catalogadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2018). Esta información es útil para inferir procesos naturales importantes en la historia de vida de las especies y para lograr un entendimiento básico que permita planificar y aplicar las medidas adecuadas para la conservación de las mismas (Morales *et al.*, 2015).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la información obtenida a través del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa I (COI) como Código de Barras para la delimitación de tres especies de *Anolis* Daudin 1802 de los Andes Colombianos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar la divergencia a nivel intra- e interespecífico entre secuencias del gen COI de *Anolis antonii* Boulenger 1908, *A. tolimensis* Werner 1916 y *A. mariarum* Barbour 1932.

Describir si las secuencias de individuos identificados como *Anolis antonii* Boulenger 1908, *A. tolimensis* Werner 1916 y *A. mariarum* Barbour 1932 forman grupos independientes (especies potenciales) al aplicar el algoritmo Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD).

Establecer si las tres especies de *Anolis* Daudin 1802 representan linajes independientes a través de la reconstrucción de árboles filogenéticos utilizando métodos de Máxima Verosimilitud y Bayesiano.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Saurios en Colombia

Los Andes colombianos cuentan con una alta diversidad de ecosistemas y especies. Esto resulta de la variedad geográfica (amplio rango altitudinal y variabilidad climática en los valles interandinos) originada por procesos geológicos que determinan una heterogeneidad en cuanto a tipos de suelo, clima, vegetación, entre otros (Etter y van Wyngaarden, 2000). Colombia es el cuarto país más rico en diversidad de reptiles a nivel mundial (Morales-Betancourt *et al.*, 2017) con 537 especies reportadas (Morales *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2016). La mayoría de las especies se concentran en la región andina y en el Chocó biogeográfico. Sin embargo, el estado de riesgo y amenaza del 20% de los reptiles colombianos es desconocido (Morales *et al.*, 2015). Dado que en Colombia se distribuye aproximadamente el 5.2% de la riqueza mundial de reptiles, es preciso fortalecer las estrategias de investigación y conservación dirigidas a este grupo de vertebrados (Morales *et al.*, 2015; Morales-Betancourt *et al.*, 2017).

Del total de especies de reptiles reportadas para Colombia, 233 especies son lagartijas, distribuidas en 48 géneros y 11 familias, siendo los Andes nuevamente la zona más diversa con 87 especies, seguida por la región Pacífica con 78 (Castaño-Mora, 2002). El género *Anolis* Daudin 1802 presenta la mayor diversidad con 76 especies reportadas (Uetz *et al.*, 2018). Recientemente, Morales *et al.*, (2015) han documentado dos especies en peligro crítico, ocho especies en peligro y seis especies vulnerables, incluyendo en las dos primeras categorías a tres especies de *Anolis*. En parte, el desconocimiento sobre las especies se debe a que los saurios colombianos no han sido suficientemente estudiados como para conocer el estado de sus poblaciones y las amenazas a las que se ven enfrentados, por lo que hay especies clasificadas en la categoría de Datos insuficiente (DD), sin descartar la posibilidad de estar bajo una categoría de amenaza (Páez *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2015).

### **3.2. El género *Anolis* Daudin 1802**

*Anolis* es el único género de la familia Dactyloidae Fitzinger 1843 (Uetz *et al.*, 2018). Actualmente, se reconocen 424 especies de *Anolis*, distribuidas en las islas del Caribe y desde la mitad norte de Sur América hasta México tropical, a través de América Central (Poe *et al.*, 2017; Uetz *et al.*, 2018). Estas lagartijas oscilan en Longitud Rostro-Cloacal (LRC) de 33–191 mm, tienen una cola que puede alcanzar entre una y cuatro veces la longitud del cuerpo y tiene la capacidad de realizar autotomía en la mayoría de especies. Muy pocas especies tienen dieta especializada, la mayoría se alimenta de una amplia variedad de insectos, aunque hay especies carnívoras y frugívoras (Marín *et al.*, 2007; Losos, 2009). Múltiples especies de *Anolis* pueden coexistir en un mismo lugar (simpátricas) o ser solitarias, siendo la hibridación una característica rara en este grupo (Losos, 2004). Producen un huevo a la vez, lo cual es un aspecto inusual entre lagartijas (Andrews y Rand, 1974; Andrews, 1985). Dentro del papel que juega este grupo de reptiles en la funcionalidad de los ecosistemas se destaca ser presa de aves, mamíferos, serpientes, otras lagartijas (*e.g.* otros *Anolis*), ranas e incluso arañas y otros invertebrados. Son también depredadores de invertebrados, convirtiéndose en importantes reguladores de sus poblaciones.

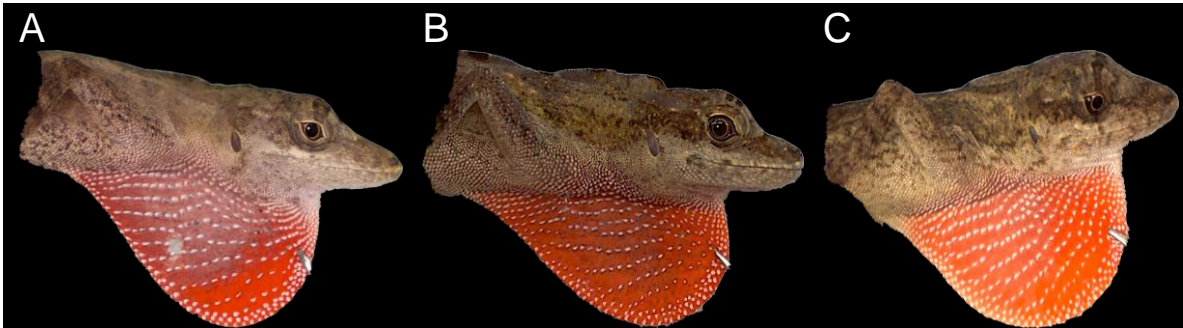
### **3.3. Las especies de interés**

#### **3.3.1. *Anolis antonii* Boulenger 1908**

Es una especie de lagarto pequeño, con una LRC reportada de 53-55 mm, de color canela-marrón claro o amarronado parduzco, con manchas dispersas oscuras en la espalda. Las hembras pueden presentar una línea vertebral clara de color crema ausente en los machos (Losos, 2009) y un gular reducido incoloro o anaranjado (Obs. pers.). Vientre color crema; abanico gular en los machos adultos principalmente de dos colores: naranja encendido al frente y rosado opaco en los últimos dos tercios (Fig. 1A), con variaciones a lo largo de su rango de distribución (Fig. 1B y 1C), con 8-10 líneas longitudinales de



escamas blancas. Cuerpo cilíndrico con escamas pequeñas y levemente quilladas en el dorso y escamas aplanadas, redondeadas y lisas en el vientre, patas alargadas, hembra ligeramente más grande que el macho. Los juveniles no presentan características externas fácilmente visibles que indiquen dimorfismo sexual. Hemipenes con pronunciada bifurcación distal. Hocico corto pero con prominente canto rostral. Se distribuye en las Cordilleras Central y Occidental (Fig. 4), entre los 800 - 2000 m s.n.m., en zonas templadas a ambos lados del valle del Río Cauca (Boulenger, 1908; Ayala y Castro, datos no publicados).



**Figura 1. Coloración gular en machos de *Anolis antonii* Boulenger 1908.** **A**, Patrón de coloración descrito en Ayala y Castro (no publ.), MRC287, Laguna de Sonso, Valle del Cauca; **B**, MRC221, Jericó, Antioquia; **C**, MRC176, El Cairo, Valle del Cauca. Fotos en A, B y C por M. del R. Castañeda.

### **3.3.2. *Anolis tolimensis* Werner 1916**

Es una especie de lagarto pequeño con LRC reportado de 56-58 mm, de color café-rojizo amarronado. Las hembras pueden presentar una línea vertebral clara de color crema, ausente en los machos. Vientre color crema. Abanico gular ausente en las hembras; en los machos es dos colores: naranja oxidado en la parte anterior y rosado grisáceo opaco en los últimos dos tercios (Fig. 2A), con variaciones a lo largo de su rango de distribución (Fig. 2B y 2C), presenta ocho a diez líneas longitudinales blancas. El cuerpo es cilíndrico, con escamas pequeñas, miembros relativamente largos y hocico corto. Hemipenes cilíndricos sin bifurcación distal. A pesar de encontrarse ampliamente distribuida, siendo

relativamente común en las Cordilleras Central y Oriental de Colombia (Fig. 4) entre los 100 y 2300 m s.n.m.. Poco se conoce sobre la historia natural de esta especie (Werner, 1916; Marín *et al.*, 2007); Ayala y Castro, datos no publicados).

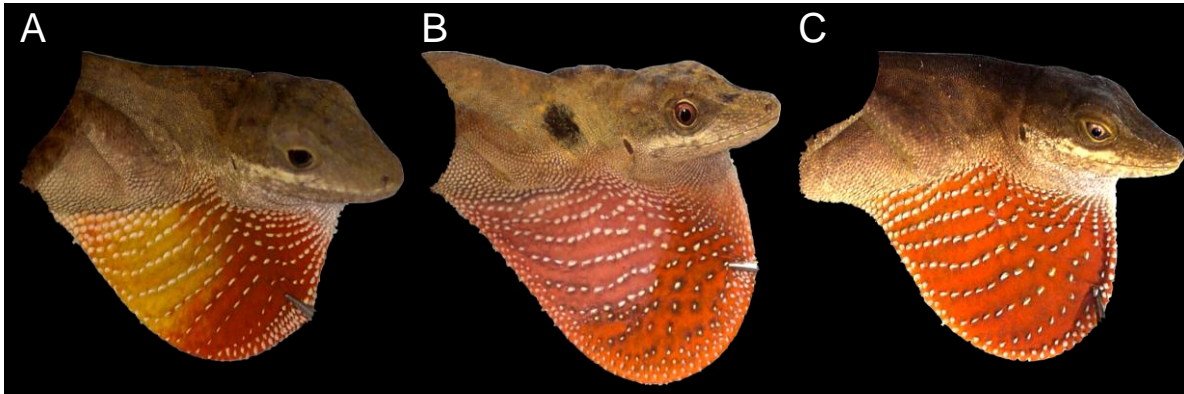


**Figura 2. Coloración gular en machos de *Anolis tolimensis* Werner 1916. A,** Patrón de coloración descrito en Ayala y Castro (no publ.), MRC236, Laguna de Pedro Palo, Cundinamarca; **B,** TOL019, Falán, Tolima; **C,** MRC235, Laguna de Pedro Palo, Cundinamarca. Fotos en A, B y C por M. del R. Castañeda.

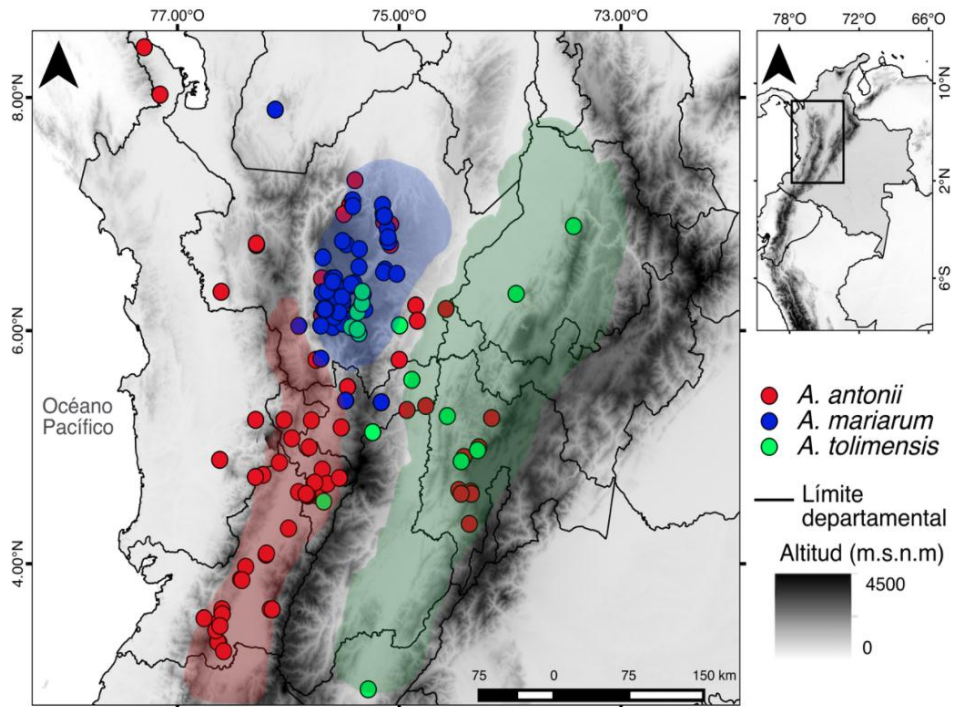
### 3.3.3. *Anolis mariarum* Barbour 1932

Es una especie de lagarto pequeño (LRC 56-58 mm) de color marrón, a veces marrón-verdosa. Vientre color crema con manchas marrón-gris a los costados. Las hembras pueden presentar una línea vertebral clara de color crema, ausente en los machos (Losos, 2009). El abanico gular en machos, descrito como grande y grueso, se extiende hacia atrás en el primer tercio del abdomen. De acuerdo a Barbour (1932) la coloración gular es rosado pálido en el borde anterior, un punto oscuro en el borde anterior del pliegue y el resto es blanco rosáceo. También, el gular es de color amarillo únicamente en la base posterior y naranja oxidado hacia la parte anterior y a lo largo del borde (Fig. 3A) de acuerdo a Ayala y Castro (sin publ.), con variaciones a lo largo de su rango de distribución (Fig. 3B y 3C). Gular ausente en las hembras. Gran cabeza y cuerpo robusto, referido con una apariencia relativamente más áspera que otras especies del grupo. Escamas pequeñas y quilladas en el dorso, y más grandes, redondeadas y lisas en el vientre. Hemipenes largos con bifurcación terminal distintiva. Se

encuentra en zonas templadas y frías de la Cordillera Central (Fig. 4), entre los 1300 y 2800 m s.n.m. (Barbour, 1932; Ayala y Castro, datos no publicados).



**Figura 3. Coloración gular en machos de *Anolis mariarum* Barbour 1932.** A, Patrón de coloración descrito en Ayala y Castro (no publ.), MAR012, Belmira, Antioquia; B, MRC185, Carolina del Príncipe, Antioquia; C, MAR024, Alto de San Miguel, Antioquia. Fotos en A, B y C por M. del R. Castañeda.



**Figura 4. Distribución teórica de *Anolis antonii*, *Anolis mariarum* y *Anolis tolimensis*.** El mapa muestra los registros georeferenciados disponibles para las

tres especies en los portales de datos SIB Colombia (SIB Colombia, 2016) y VertNet (Constable *et al.*, 2010). Se observa la discrepancia entre la identificación de especímenes en colecciones biológicas (puntos en el mapa) y la distribución teórica de las tres especies (regiones sombreadas en color rojo para *A. antonii*, azul para *A. mariarum* y verde para *A. tolimensis*).

### **3.4. El Código de Barras de ADN**

El código de barras de ADN es una metodología que utiliza una corta secuencia de ADN para la identificación, reconocimiento y descubrimiento de especies. El propósito inicial es reconocer especímenes desconocidos en términos de una clasificación conocida, complementando las prácticas taxonómicas existentes. Fue propuesta por (Hebert *et al.*, 2003a) quienes hacen mención a un Sistema de Código de Barras para la vida animal basado en la diversidad de secuencias del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI).

El ADN mitocondrial se ha propuesto como Código de Barras para la vida animal. Este ha sido ampliamente empleado en estudios filogenéticos de animales, porque evoluciona más rápido que el genoma nuclear, resultando en la acumulación de diferencias entre especies estrechamente relacionadas (Hebert *et al.*, 2004). Los análisis filogenéticos se centraban con frecuencia en genes mitocondriales de ADN ribosomal (12S, 16S), pero su uso en análisis taxonómicos está limitado por la prevalencia de inserciones y deleciones (*indels* en inglés) que complican enormemente el alineamiento de las secuencias. Los 13 genes que codifican proteínas en el genoma mitocondrial animal resultaron más efectivos por la rareza de *indels* puesto que la ocurrencia de éstas en la mayoría de los casos conducen a un cambio en el marco de lectura (Hebert *et al.*, 2003a).

Particularmente el gen Citocromo C Oxidasa I (COI) tiene dos importantes ventajas: Primero, cebadores universales han sido descritos para esta región, los

cuales permiten amplificar un fragmento de 710 pares de bases (pb; (Folmer *et al.*, 1994). Segundo, COI parece tener mayor rango de señales filogenéticas que cualquier otro gen mitocondrial, la tercera posición nucleotídica en los codones para aminoácidos muestra una alta incidencia de sustitución de bases, resultando en una tasa de evolución molecular casi tres veces mayor que la de los genes de ADN ribosomal 12S o 16S (Hebert *et al.*, 2003a). Así, es más probable que este gen permita evidenciar señales filogenéticas más profundas que otros genes mitocondriales alternativos. De hecho, la evolución de este gen es lo suficientemente rápida para permitir la discriminación de especies estrechamente relacionadas y de grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Cox y Hebert, 2001).

### **3.5. El método Automatic Barcode Gap Discovery - ABGD**

El Código de Barras de ADN puede usarse como una herramienta exploratoria en grupos no estudiados previamente. En estos casos, los resultados obtenidos con las etiquetas de ADN no pueden compararse directamente con otros datos independientes (como especies descritas en la literatura existente). Así, los grupos propuestos a partir de las secuencias podrían usarse como especies potenciales (Puillandre *et al.*, 2011).

El Código de Barras de ADN es eficiente cuando la divergencia genética intraespecífica para el gen utilizado es menor que la divergencia genética interespecífica, es decir cuando las secuencias de una misma especie son más similares entre ellas en comparación con las secuencias de especies diferentes (Hebert *et al.*, 2004; Puillandre *et al.*, 2011). En este caso se puede observar un espacio (gap) entre la diversidad intra- e interespecífica que se ha denominado "Barcode gap" (Bucklin *et al.*, 2011; Puillandre *et al.*, 2011). Aunque se ha intentado estandarizar un límite (umbral) entre la divergencia intra- e interespecífica (*e.g.* Hebert *et al.*, 2004), ese valor no se puede generalizar para todos los grupos (Will y Rubinoff, 2004). Además, se ha encontrado

sobrelapamiento entre estas distancias, por lo que no es fácil definir este valor umbral (Meyer y Paulay, 2005; Guarnizo *et al.*, 2015).

El ABGD es un procedimiento que estima la distribución de distancias genéticas pareadas entre las secuencias de un alineamiento e infiere estadísticamente múltiples barcodes gaps para agrupar las secuencias de tal manera que la distancia entre dos secuencias tomadas de distintos grupos será siempre mayor que el barcode gap. Este procedimiento se aplica repetidamente para cada uno de los grupos formados inicialmente hasta que no se formen más grupos (Puillandre *et al.*, 2011). El procedimiento que sigue el algoritmo ABGD es el siguiente:

Primero, se encuentra el primer barcode gap que ocurre en un valor  $dist_{limit}$  calculado en función de la tasa de mutación poblacional estimada a partir del conjunto de datos con un valor umbral  $P$  dado por el usuario ( $P$  es la máxima divergencia intraespecífica). Segundo, se toma un valor igual al barcode gap calculado en el paso uno y se calcula la “partición inicial” en la que los grupos encontrados son los primeros candidatos a especies. Tercero, para considerar la variabilidad de la tasa mutacional a través de los taxa y el sobrelapamiento de divergencias intra- e interespecíficas, el algoritmo aplica repetidamente los dos primeros pasos a cada agrupación de la partición inicial. Estas repeticiones dividen las particiones primarias en particiones secundarias o “particiones recursivas” hasta que los grupos no puedan ser divididos (Puillandre *et al.*, 2011).

### 3.5.1. Parámetros y resultados del algoritmo ABGD

El método analiza un rango previo de divergencia intraespecífica desde **Pmin** (valor mínimo de divergencia intraespecífica) hasta **Pmax** (valor máximo de divergencia intraespecífica) con **Steps** (número de agrupamientos recursivos o iteraciones). El valor **X** es un aproximado de la amplitud relativa mínima del gap (Puillandre *et al.*, 2011). El resultado del algoritmo incluye una lista con las

particiones y, para cada una, el número de grupos encontrado, la composición de cada grupo y el valor previo P de distancia máxima intraespecífica (o valor umbral) encontrado para hacer las particiones. Esta información puede resumirse en dos figuras: un histograma de distribución de frecuencias de distancias genéticas pareadas con el que es posible determinar visualmente la existencia un espacio (barcode gap) entre las distancias genéticas intra- e interespecíficas; y un diagrama que muestra cómo el número de grupos encontrados por el algoritmo (eje x) varía con respecto a diferentes valores de P (eje y). La interfaz web del algoritmo se encuentra disponible en <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>

### **3.6. Inferencia filogenética a partir de secuencias de ADN**

Los análisis filogenéticos se utilizan para determinar las relaciones evolutivas entre especies a partir de caracteres que son compartidos entre ellas, por ejemplo usando secuencias de ADN (Ridley, 2004; Futuyma, 2013; Holder, 2014). Otras posibilidades incluyen la utilización de datos morfológicos, diferencias en comportamiento, estructura celular, estructura cromosómica y marcadores moleculares diferentes de las secuencias de ADN (aminoácidos, microsatélites, aloenzimas, etc) (Carranza, 2002; Futuyma, 2013). En general el proceso de análisis filogenético a partir de secuencias de ADN comprende cuatro pasos básicos que se ejecutan en orden: 1) alineación de secuencias, de tal manera que los nucleótidos en una columna de la matriz estén relacionados por descendencia de un residuo ancestral común (*i.e.* caracteres homólogos); 2) determinación del modelo evolutivo que mejor describe la matriz, 3) inferencia del árbol filogenético, el cual es considerado como la mejor de muchas hipótesis (*i.e.* muchos árboles) posibles, y 4) evaluación de la robustez de los diferentes clados encontrados (Wheeler, 1996; Carranza, 2002; Futuyma, 2013).

Dentro de los métodos que se pueden usar para inferir filogenias a partir de evidencia molecular están las que se basan en 1) distancias moleculares, 2) principio de parsimonia y 3) métodos probabilísticos como Máxima Verosimilitud

y aproximación Bayesiana. Los métodos de distancia usan una matriz de distancias entre secuencias (ADN o aminoácidos) para representar la distancia evolutiva (número de cambios ocurridos entre dos secuencias). Sin embargo las diferencias observadas entre secuencias no son un reflejo exacto de la distancia evolutiva entre ellas (Holder y Lewis, 2003). En el ADN por ejemplo, a través de un largo período de tiempo evolutivo, pueden ocurrir múltiples sustituciones nucleotídicas (*i.e.* “multiple hits”) en la misma posición y esconder la verdadera distancia entre secuencias, haciéndolas parecer erróneamente cercanas entre sí. Este problema puede ser corregido con un modelo de evolución de secuencias. Se han propuesto modelos generales de evolución cuyos parámetros describen aspectos del proceso evolutivo, como la probabilidad relativa de transiciones versus transversiones o el grado en el que difiere la tasa de evolución entre sitios. Además, la tasa de evolución de secuencias no es constante a través del tiempo, por lo que una simple medida de la diferencia genética entre secuencias no es un indicador confiable de qué tan divergentes son (Holder y Lewis, 2003; Ridley, 2004; Futuyma, 2013).

Si una rama en una filogenia inferida a partir de secuencias de ADN muestra pocos cambios se asume que “multiple hits” son improbables en cualquier sitio. Pero si una rama muestra muchos cambios en la secuencia entonces “multiple hits” son más probables por sitio y el número de cambios detectados puede ser menor al número de cambios que en realidad ocurrieron. Ramas largas pueden ser causadas por largos periodos de tiempo entre eventos de especiación, por una alta tasa de cambios nucleotídicos o por una combinación de ambos factores (Futuyma, 2013; Holder, 2014).

Parsimonia es uno de los métodos más simples de análisis filogenético. La idea general al usar parsimonia fue mencionada desde la primera vez que se mencionó en la literatura científica por Edwards y Cavalli-Sforza’s en 1963 (Felsenstein, 2004a). El principio de parsimonia plantea que la verdadera filogenia estimada es la que requiere el menor número de cambios evolutivos. Al



aplicar este principio a secuencias de ADN, el árbol con el menor número de pasos es el preferido y no se tienen en cuenta las longitudes de las ramas, pues la longitud solo reflejará el número de cambios que han ocurrido (muchos cambios = ramas largas, pocos cambios = ramas cortas). Además, en parsimonia no se puede incorporar un modelo evolutivo. Esto último, en trabajos con datos moleculares es una desventaja, pues no estaría incorporando información que es importante a partir de parámetros que intentan describir el proceso evolutivo verdadero (Futuyma, 2013; Holder, 2014).

Sí en dos ramas de un árbol han ocurrido muchos cambios no detectados entonces la mayoría de caracteres (nucleótidos) que fueron compartidos con otras ramas habrán de perderse y nucleótidos que una vez fueron compartidos habrán sido reemplazados por nucleótidos que no dan información sobre las relaciones o que pueden incluso ser mal interpretadas dado que hay una alta probabilidad de que los cambios converjan hacia un mismo carácter independientemente. Este problema es conocido como atracción de ramas largas y hace que se produzca un árbol filogenético errado. Joseph Felsenstein fue el primero en describir este problema, por lo que adoptó el conocido método estadístico Máxima Verosimilitud para estimar filogenias con alto soporte estadístico. La inferencia filogenética a partir de Máxima Verosimilitud e inferencia Bayesiana son los métodos estadísticos más ampliamente usados para estimar filogenias a partir de datos de secuencias moleculares (Futuyma, 2013; Holder, 2014).

### **3.6.1. Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood – ML)**

El método de máxima verosimilitud fue introducido por R. A. Fisher en publicaciones sucesivas en los años 1912, 1921 y 1922. El uso del método aplicado a filogenias fue introducido por Edwards y Cavalli-Sforza en 1964 en análisis de datos de frecuencia de genes y su aplicación a secuencias moleculares fue introducida por el estadístico Jerzy Neyman en 1971 (Felsenstein, 2004b). El objetivo en la máxima verosimilitud es calcular para

todas las filogenias posibles la probabilidad de los datos observados de un conjunto de especies usando un modelo de evolución de secuencias. La filogenia (árbol) más probable es la que tiene la probabilidad más alta de haber producido las secuencias observadas (esta probabilidad es la *verosimilitud* del árbol) (Holder y Lewis, 2003; Ridley, 2004; Holder, 2014). La idea principal al inferir filogenias con máxima verosimilitud es determinar la topología de árbol, longitudes de ramas y parámetros del modelo evolutivo (e.g. tasa de transiciones/trasversiones, frecuencia de bases, tasa de variación entre sitios) que maximicen la probabilidad de observar las secuencias en el alineamiento (Schmidt y Haeseler, 2009; Holder, 2014;). Un modelo completamente especificado es un conjunto específico de parámetros. El valor de un parámetro del modelo que maximice la verosimilitud del árbol se considera como apropiado para usarse. Para ello, los algoritmos que encuentran el valor de verosimilitud deben explorar a través de un conjunto de parámetros, lo que involucra considerar las probabilidades asociadas con un gran número posible de escenarios evolutivos que pudieron haber llevado a los datos observados. Al final se obtiene una hipótesis filogenética. Existen dos principales formas de juzgar la confiabilidad de una hipótesis filogenética inferida por cualquier método. La primera es ver si la filogenia inferida concuerda con fuentes de datos independientes como características morfológicas y secuencias de ADN que evolucionan independientemente. La segunda hace uso de principios estadísticos para evaluar si una hipótesis (árbol) se ajusta mejor a los datos en lugar de otra (Futuyma, 2013). Una de las pruebas estadísticas que tradicionalmente se usa para evaluar el efecto del error de muestreo (errores en la estimación causados por una pequeña muestra de datos) es el *bootstrap*, que indica que tan soportadas están cada una de las relaciones representadas en el árbol (Holder y Lewis, 2003; Holder, 2014).

En el procedimiento, cada carácter de la matriz de datos originales es aleatoriamente muestreado (con repetición) haciendo modificaciones en la columna *i* a partir de la columna *i*-original del alineamiento para producir pseudo-

réplicas del conjunto de datos. De cada matriz pseudo-réplica, de igual tamaño a la original, se reconstruirá un árbol. Al final se construirá un árbol consenso incorporando aquellas ramas que ocurren en la mayoría de los árboles construidos (Holder y Lewis, 2003; Schmidt y Haeseler, 2009). El bootstrap ofrece una medida de cuales partes del árbol están fuertemente soportadas. Un agrupamiento que está presente en un porcentaje bajo (<70%) de las réplicas no está estadísticamente soportado (Holder y Lewis, 2003). Se debe tener en cuenta que el bootstrap ayuda a predecir si el mismo resultado puede ser obtenido cuando se tienen en cuenta más datos, no si el resultado obtenido es correcto (Holder y Lewis, 2003).

### **3.6.2. Inferencia Bayesiana**

Los métodos bayesianos datan desde 1790, época en la que se enuncia el teorema en probabilidad planteado por Thomas Bayes denominado Teorema de Bayes (Felsenstein, 2004b). Mientras que la verosimilitud mide la probabilidad de los datos dado un árbol, el enfoque Bayesiano dice que la hipótesis óptima es la que maximiza la probabilidad posterior del árbol (Holder y Lewis, 2003). En la inferencia Bayesiana primero se empieza por considerar todos los valores parámetro, asignando a cada valor una probabilidad previa que representa el grado de confianza del parámetro sin examinar los datos. El siguiente paso es restablecer las probabilidades previas en probabilidades posteriores aplicando reglas de probabilidad. Así, el teorema de Bayes manifiesta que la probabilidad asociada con un valor parámetro es proporcional a los valores parámetros previos multiplicados por la verosimilitud de esos valores parámetro, por lo que la Inferencia Bayesiana está muy relacionada con la inferencia por Máxima Verosimilitud (Holder, 2014).

Las ventajas de la inferencia Bayesiana incluyen su habilidad para producir un solo mejor estimado de un parámetro (por ejemplo, la filogenia con la probabilidad posterior más alta), permite implementar modelos complejos de evolución de secuencias y una fácil interpretación del soporte. Si la probabilidad

posterior para un clado es cercana a uno entonces las relaciones en ese árbol o clado están fuertemente soportadas. Si el clado con la probabilidad posterior más alta es 0.4 entonces se sabe que esa inferencia es dudosa. Como el objetivo es describir la probabilidad de todos los posibles valores parámetro, la Inferencia Bayesiana se lleva a cabo en corridas computacionales simuladas a través del espacio de todos los valores parámetro (espacio paramétrico). Las simulaciones se pueden ajustar para que las corridas tiendan a evitar valores parámetro con baja verosimilitud, facilitando la búsqueda de los valores óptimos del modelo evolutivo dentro del espacio paramétrico (proceso denominado Cadena de Markov Monte Carlo). Correr esas simulaciones con un gran número de repeticiones provee un conjunto de parámetros que son muestreados en proporción a su probabilidad posterior hasta obtener el valor de todos los parámetros con la probabilidad posterior más alta (Holder, 2014).

### **3.7. Redes de haplotipos**

Un haplotipo es una secuencia de bases única en una región del genoma. Individuos que comparten un haplotipo (*i.e.* un mismo alelo) tienen exactamente la misma secuencia en esta región y por tanto son inferidos como estrechamente relacionados. Las redes de haplotipos son representaciones gráficas usadas en el análisis de datos genéticos poblacionales para visualizar relaciones generalmente a nivel intraespecífico, además de hacer una inferencia sobre la biogeografía de las poblaciones (Leigh y Bryant, 2015). Así, se pueden comparar individuos entre poblaciones (*e.g.* individuos de una misma localidad) para saber cuáles poblaciones están más estrechamente relacionadas entre sí (Dool *et al.*, 2013). Las redes de haplotipos se componen de nodos que representan a los haplotipos y éstos se encuentran unidos por ramas con longitud definida en función del número de nucleótidos (pasos mutacionales) que difieren entre haplotipos (Mardulyn, 2012; Leigh y Bryant, 2015). Así, las redes de haplotipos proveen una representación concisa de los datos, un aspecto que con frecuencia se pierde en los métodos de inferencia que dependen de modelos.

#### 4. ANTECEDENTES

Hebert *et al.*, (2003a, 2003b) proponen el uso del gen mitocondrial Citocromo C oxidasa subunidad I (COI) como candidato a etiqueta o Código de Barras para asignar individuos a una determinada unidad taxonómica. El método se propone como una posibilidad de crear un sistema de identificación de especies basado en el análisis de la divergencia entre secuencias del gen COI. Esta técnica ha permitido solucionar en muchos casos las dificultades de la identificación basada en caracteres morfológicos en diversos grupos de animales, aunque su efectividad no es igual en todos ellos.

Hebert *et al.*, (2004) probaron la efectividad del Código de Barras de ADN utilizando el gen COI para distinguir entre especies de aves de Norte América. Cada especie tuvo un Código de Barras distintivo, incluso se identificaron por separado especies estrechamente relacionadas y cuatro grupos que posiblemente corresponden a especies aún no descritas, confirmando la efectividad del código de barras en la identificación de especies de aves. En base a que los patrones de variación intra- e interespecífica en COI parecen similares en varios grupos animales, los autores proponen un umbral estándar: 10X, donde X es el promedio de variación intraespecífica en el grupo de estudio. Este trabajo fue uno de los primeros con los que se iniciaron las librerías de secuencias COI correspondientes a especies ya descritas.

Köhler *et al.*, (2014a) hacen la descripción de una nueva especie de *Anolis*: *A. peucephilus* usando como línea de evidencia un criterio fenotípico (morfología externa: coloración, morfometría y lepidosis) y un criterio de aislamiento reproductivo a partir de diferenciación genética del código de barras del gen mitocondrial COI. El análisis del fragmento del gen COI reveló una distancia entre *Anolis peucephilus* Köhler *et al.*, 2014a y *Anolis omiltemanus* Davis 1954 de 11.5%, siendo éste el único valor de divergencia en el gen COI reportado en la literatura entre especies de *Anolis*.

Guarnizo *et al.*, (2015) evidencian la efectividad de la metodología del Código de Barras de ADN en la identificación de especímenes de Anuros en un corto período de tiempo y en el descubrimiento de posibles nuevas especies en una región tropical altamente diversa en anfibios como lo es la Cordillera Oriental de Colombia. Esto se logró al poner a prueba dos métodos estadísticos para estimar el número de grupos o especies candidatas sin confirmar, siendo el algoritmo ABGD (Puillandre *et al.*, 2011) el más apropiado para este objetivo (al igual que en Paz y Crawford 2012). También encontraron aislamiento geográfico usando Código de Barras de ADN.

Poe *et al.*, (2015) describen la especie *Anolis elcopensis* (Poe *et al.*, 2015) del grupo *fuscoauratus*, mostrando una filogenia a partir de un Análisis Bayesiano particionado de datos morfológicos y moleculares incluyendo a las especies *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*. Se presenta un politomia para 12 de las especies incluidas. En esta politomia *A. antonii* y *A. mariarum* forman un clado altamente soportado (Probabilidad Posterior = 1). *Anolis tolimensis* se encuentra en otro clado débilmente soportado (Probabilidad posterior = 0.5) junto con *A. fuscoauratus* D'Orbigny, 1837, *A. elcopensis* y *A. bocourti* Cope 1876. Por distribución geográfica (Panamá) y coloración gular del macho (naranja sólido), *A. elcopensis* se diferencia de las especies suramericanas *A. antonii* (parte noroccidental de los Andes, gular del macho rosado y naranja-rojizo), *A. mariarum* (extremo noroccidental de los Andes, gular del macho naranja-rojo y amarillo) y *A. tolimensis* (parte nororiental de los Andes, gular del macho rosado y anaranjado-rojo).

Hawlitsek *et al.*, (2016) realizaron el primer estudio de Código de Barras de ADN para la herpetofauna de Bavaria (Alemania). El objetivo fue crear una librería de secuencias del gen COI que hiciera más rápida y eficiente la identificación de las especies de reptiles y anfibios del centro de Europa. Sin embargo, este trabajo muestra el problema del Código de Barras en especies

híbridas. También muestran la posible aplicabilidad del método en cuanto a la detección de linajes introducidos y monitoreo de flujo genético.

Köhler *et al.* (2016) usó el gen mitocondrial 16s como Código de Barra de ADN para describir dos nuevas especies de *Anolis* de Honduras referidas como *Norops tropidonotus* por diferentes autores. Se presenta la evidencia de cuatro especies que constituyen un complejo de especies, siendo similares morfológicamente pero difieren en distancias moleculares y relaciones ancestrales de acuerdo con los linajes formados en los árboles filogenéticos reconstruidos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

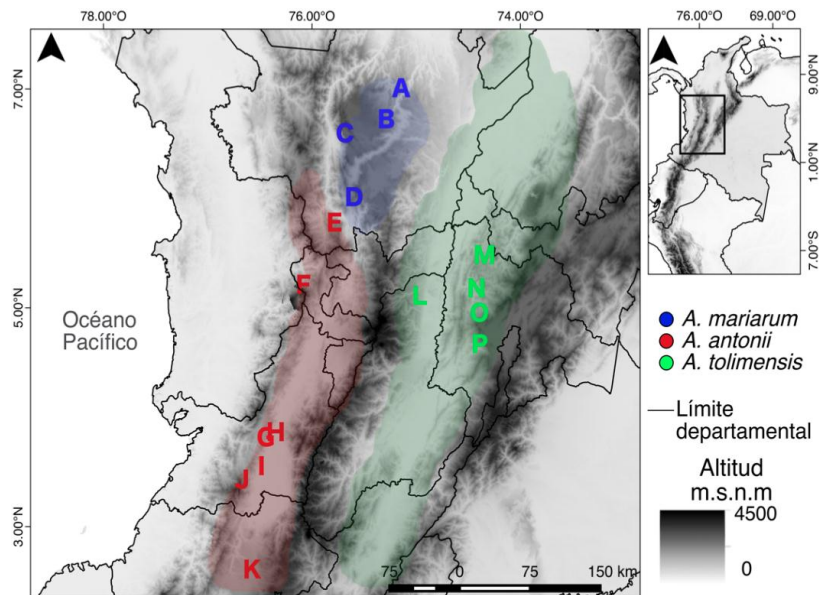
### 5.1. Colección de muestras

Muestras de las especies *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* fueron colectadas en 16 localidades a lo largo de la Cordillera de los Andes de Colombia, entre los 900–2350 m s.n.m. (Fig. 5, Tabla 1). Las localidades de muestreo fueron seleccionadas en base a registros nacionales de museos disponibles en los portales de datos biológicos SIB Colombia (SIB Colombia, 2016) y VerNet (Constable *et al.*, 2010) (Fig. 4). Los muestreos se realizaron diurnos y nocturnos, aplicando la técnica de búsqueda libre y sin restricciones (Angulo *et al.*, 2006) usando lazadas y captura manual. Se capturaron entre seis a ocho individuos adultos (LRC >45 mm) de la misma especie en cada localidad. Se tomaron coordenadas geográficas en todos los lugares de colecta (GPS GARMIN GPSMAP 60CSx) y se marcaron con cinta flagging. Los individuos fueron transportados en bolsas plásticas con material vegetal y aire hasta la estación de campo donde se realizó la identificación y asignación preliminar a especie usando distribución geográfica, coloración gular, morfología hemipeneal y medida de la longitud rostro-cloacal (LRC).

Los individuos seleccionados para muestra de tejido de hígado fueron sacrificados inyectando 0.1–0.35 ml de solución 1:10 de Penthal-agua directamente al corazón y preservando el tejido en tubos eppendorf con etanol al 96%. Los especímenes testigos (vouchers) fueron fijados con etanol al 96%, almacenados en etanol al 70% y luego depositados en colección de referencia (por definir). Los individuos seleccionados para muestra de sangre fueron liberados en su lugar de captura identificado con la cinta flaggin. Las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de punción de la vena caudal y colectadas en tarjetas FTA (QIAGEN Inc.) Los permisos para colecta de individuos para este estudio están enmarcados en la Resolución 1070 del 28 de agosto de 2015, expedida por la Autoridad Nacional De Licencias Ambientales, por la cual se otorga un Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies



Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial a la Universidad del Valle (Anexo 1), a través del proyecto “Efecto de la fragmentación sobre la estructura genética de lagartijas *Anolis* de los Andes con diferentes preferencias de hábitats”, a cargo de la investigadora postdoctoral María del Rosario Castañeda de la Universidad del Valle. Muestras adicionales de tejido de *A. antonii* (La Minga y El Dorado – Valle del Cauca) y *A. mariarum* (Anorí – Antioquia) fueron aportadas por la directora del proyecto, colectados bajo el permiso establecido en la Resolución 1234 del 02 de octubre de 2015, expedida por la Autoridad Nacional De Licencias Ambientales, por la cual se otorga un Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial a la investigadora María del Rosario Castañeda Prada (Anexo 2). La procedencia de las muestras y la cantidad de individuos secuenciados por localidad se muestran en la Tabla 1.



**Figura 5. Distribución geográfica de las localidades muestreadas para *Anolis antonii* (letras rojas), *A. mariarum* (letras azules) y *A. tolimensis* (letras verdes). A - Anorí; B - Carolina del Príncipe; C - Belmira; D - Alto de San Miguel; E - Jericó; F - PNN Tatamá; G - El Dorado; H - Laguna de Sonso, I – La Minga, J – El Pato; K – Cajibío; L – Falán; M – Yacopí; N – Caparrapí; O – Sasaima; P – Laguna de Pedro Palo.**

## 5.2. Extracción de ADN, amplificación de secuencias y secuenciación

La extracción de ADN genómico de las muestras de tejido (hígado) y tarjetas FTA (sangre) se realizó usando el DNeasy Tissue Extraction Kits (QIAGEN Inc.), siguiendo el protocolo del kit. Se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ~605 pares de bases del gen Citocromo C Oxidasa I (COI), usando cinco cebadores a partir de diferentes combinaciones: LCO1490 – HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994), REPTBCf – REPTBCr (Castañeda y de Queiroz, 2013) y TRPF.12 (Schulte *et al.*, 2003). Las amplificaciones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de Castañeda y de Queiroz (2013), en un T100™ THERMAL CYCLER (BIO-RAD), con un volumen final de 27µL por tubo de reacción. Los amplificados se verificaron en electroforesis de gel de agarosa al 1%. Estos procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle. La purificación y secuenciación de los amplificados (Sanger, bidireccional) se realizó a través de MACROGEN USA. Las secuencias obtenidas fueron editadas, ensambladas y traducidas a aminoácidos en Sequencher v.4.1.4 (Genecode).

## 5.3. Análisis de datos

### 5.3.1. Alineación de secuencias

Secuencias del fragmento del gen COI de *A. antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum* (Tabla 1) fueron alineadas en CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) junto con secuencias de otras especies de *Anolis* disponibles en las bases de datos GenBank y Barcode of Life Data System –BOLD (Ratnasingham y Hebert, 2007) (Mayo de 2017; Anexo 3). No se encontraron secuencias del gen COI de las especies de interés en ninguna de las bases de datos examinadas. Los siguientes parámetros fueron ajustados para el alineamiento pareado y múltiple: Gap Opening = 30, Gap Extended = 6, DNA Weight Matrix = CLUSTALW(1.6) y Protein Weight Matrix = Gonnet 250. El alineamiento resultante fue revisado

**Tabla 1.** Descripción de localidades e individuos usados para el análisis de Códigos de Barras.

<b>Localidad</b>	<b>Latitud N,</b>	<b>Longitud W.</b>	<b>Elevación (msnm)</b>	<b>Vertiente, Cordillera</b>	<b>Nº ind. secuenciados</b>
Anorí <sup>A</sup>	7.02320	-75.14412	1661	Oriental, Central	2
Carolina del Príncipe <sup>A</sup>	6.73977	-75.28746	1878	Oriental, Central	5
Belmira <sup>A</sup>	6.61052	-75.68214	2670	Occidental, Central	6
Alto de San Miguel <sup>A</sup>	6.02747	-75.59592	2046	Occidental, Central	6
Jericó <sup>A</sup>	5.79470	-75.78446	2045	Oriental, Occidental	5
PNN Tatamá <sup>R</sup>	5.22677	-76.08282	1370	Occidental, Occidental	4
El Dorado <sup>VC</sup>	3.83310	-76.44288	1588	Oriental, Occidental	4
Laguna de Sonso <sup>VC</sup>	3.87943	-76.34689	969	Occidental, Central	7
La Minga <sup>VC</sup>	3.56916	-76.58861		Oriental, Occidental	1
El Pato <sup>VC</sup>	3.44747	-76.67033	2145	Oriental, Occidental	6
Cajibío <sup>C</sup>	2.63040	-76.57607	1801	Occidental, Central	4
Laguna de Pedro Palo <sup>Cu</sup>	4.68450	-74.38997	2000	Occidental, Oriental	5
Falán <sup>T</sup>	5.12583	-74.97147	1141	Oriental, Central	5
Yacopí <sup>Cu</sup>	5.50492	-74.34257	1228	Occidental, Oriental	1
Caparrapí <sup>Cu</sup>	5.38224	-74.42207	1501	Occidental, Oriental	1
Sasaima <sup>Cu</sup>	4.96995	-74.39371	1246	Occidental, Oriental	6

<sup>A</sup> Antioquia; <sup>R</sup> Risaralda; <sup>VC</sup> Valle del Cauca; <sup>C</sup> Cauca; <sup>Cu</sup> Cundinamarca, <sup>T</sup> Tolima.

manualmente para verificar la correspondencia de bases por posición (verificación de homología) y ubicar posibles inserciones de gaps que alteraran el marco de lectura. La matriz resultante (-605 pb) fue dividida en tres. Cada una fue utilizada para realizar diferentes análisis:

- Matriz A: Secuencias de Genbank/BOLD. Contiene secuencias de *Anolis* descargadas desde GenBank/BOLD (*i.e.* diferentes a *A. antonii*, *A. mariarum*, *A. tolimensis*) (Anexo 3) y secuencias de *A. tropidogaster* Hallowell 1856 y *A. heterodermus* Duméril 1851 de individuos colectados en campo (Anexo 4). Esta matriz fue utilizada para calcular la divergencia intra- e interespecífica para el gen COI del género *Anolis*.
- Matriz B: Secuencias de las especies de interés y de otras 8 especies de *Anolis* disponibles en GenBank/BOLD. Contiene secuencias de *Anolis antonii*, *A. mariarum*, y *A. tolimensis*, junto con tres secuencias de *Polychrus marmoratus* (grupo externo para análisis filogenéticos) y múltiples secuencias de ocho especies de *Anolis* (tres a cuatro por especie) obtenidas de GenBank/BOLD. Estas especies de *Anolis* fueron seleccionadas intentando cubrir los principales clados reconocidos en *Anolis* a partir de la hipótesis filogenética de Poe *et al* (2017). Esta matriz fue utilizada para 1) calcular la divergencia intra- e interespecífica para el gen COI de *Anolis antonii*, *A. mariarum*, y *A. tolimensis* 2) ejecutar el algoritmo ABGD y 3) la reconstrucción de árboles filogenéticos.
- Matriz C: Secuencias de *Anolis antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum*. Contiene las 68 secuencias de *Anolis antonii*, *A. mariarum*, y *A. tolimensis*. Esta matriz fue utilizada para reconstruir la red de haplotipos.

### 5.3.2. Estimación de divergencias intra- e interespecíficas

Los cálculos se realizaron asumiendo el modelo Kimura dos parámetros (K2P) en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) y ajustando un bootstrap de 10000 para obtener valores de desviación estándar. Los valores de divergencia y desviación

estándar serán reportados en porcentajes al multiplicar el valor obtenido en MEGA X 100.

La ejecución del algoritmo ABGD requiere valores de divergencia intraespecífica máxima (Pmax) y mínima (Pmin). Para estimarlos, se utilizó la matriz A. En este cálculo no fueron incluidas las secuencias de los individuos *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* dado que la delimitación de especies por distribución geográfica puede llevar a una incorrecta asignación de individuos a especie y por tanto, a sesgar los valores calculados de divergencia. El cálculo de divergencias intra- e interespecíficas de las especies de interés (*A. antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum*) fue realizado a partir de la matriz B.

Dada la variación observada entre el número de secuencias disponibles por especie en GenBank y BOLD (245 secuencias pertenecientes a 78 especies, ver resultados) y para evaluar el efecto de los valores de divergencia, calculados a partir de un número variable de especies (y de individuos/secuencias por especie), sobre el número de grupos formados por el algoritmo ABGD, se calculó la divergencia intra- e interespecífica para el gen COI del género *Anolis* a partir de:

**Caso 1:** Todas las especies (253 secuencias, 78 especies).

**Caso 2:** Especies con dos o más secuencias disponibles (220 secuencias, 45 especies).

**Caso 3:** Especies con tres o más secuencias disponibles (188 secuencias, 29 especies).

### 5.3.3. Algoritmo Automatic Bacoder Gap Discovery (ABGD)

Se analizó si los grupos encontrados por el algoritmo (especies tentativas) en la matriz B eran congruentes con las especies de Genbank y BOLD (nueve especies, nueve grupos) y si *A. antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum* forman grupos independientes. También se evaluó el efecto que tienen los parámetros Pmax, Pmin y Steps sobre el número de grupos (especies tentativas) formados.

Los parámetros Pmin (divergencia intraespecífica mínima) y Pmax (divergencia intraespecífica máxima) fueron inicialmente dejados en los valores por defecto (Pmax=0.1 y Pmin=0.001) de acuerdo a Puillandre *et al.*, (2011) y Guarnizo *et al.*, (2015). Luego fueron modificados de acuerdo a los valores de divergencia intraespecífica máxima y mínima sin transformar (*i.e.* sin multiplicar los valores de MEGA X100) calculados previamente en cada uno de los tres casos mencionados en la sección anterior. El parámetro Steps fue ajustado en dos valores diferentes (10 y 5000) para cada par de valores Pmin y Pmax. En total se ejecutaron ocho análisis diferentes manteniendo los siguientes parámetros por defecto: X (relative gap width) = 1.5 y No. bins = 20. Entre las tres opciones que tiene el algoritmo para calcular distancias pareadas entre las secuencias del alineamiento se eligió Kimura (K80) TS/TV por ser el modelo más ampliamente utilizado al comparar divergencias genéticas entre taxa y en Códigos de Barras de ADN.

#### **5.3.4. Relaciones filogenéticas y red de haplotipos**

Para contrastar los resultados obtenidos por el método ABGD se estimaron las relaciones filogenéticas entre las especies de *Anolis* de la matriz B. Primero se calculó el modelo de sustitución y número de particiones óptimas que mejor se ajusta a los datos usando Partitionfinder v.1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012). Las relaciones filogenéticas se estimaron a partir de inferencia Bayesiana usando MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012) y Máxima Verosimilitud usando RAxML (Stamatakis, 2014) con las herramientas MrBayes on XSEDE y RAxML-HPC Blacbox respectivamente, a través de la plataforma CIPRES (Miller *et al.*, 2010). El análisis Bayesiano se ejecutó con los siguientes parámetros: cuatro corridas independientes de 20 millones de generaciones con un árbol inicial aleatorio, cada corrida con cuatro cadenas de Markov Monte Calor (MCMC), temperatura de 0.15, árboles muestreados con una frecuencia de un árbol cada 1000 generaciones. El primer 25% de los árboles muestreados fueron descartados como “burn-in”. Nodos soportados con una probabilidad posterior mayor a 0.90

se consideraron como altamente soportados. RAxML-HPC Blacbox se ejecutó sin modificar ningún parámetro.

Para evidenciar si hay haplotipos compartidos entre las localidades de muestreo y observar patrones geográficos de estructura genética entre las poblaciones de *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* se construyó una red de haplotipos *Neighbour-joining* en PopArt (Leigh y Bryant, 2015). PopArt toma datos de secuencias como input para inferir las relaciones entre haplotipos.

## 6. RESULTADOS

En total se obtuvieron 88 muestras (27 de sangre y 61 de tejido), 45 de *Anolis antonii*, 23 de *A. mariarum* y 20 de *A. tolimensis*. Se visitaron 16 localidades a lo largo de la cordillera de los Andes (Tabla 1) capturando de seis a ocho individuos por localidad, excepto para *A. tolimensis* en las localidades de Cundinamarca, Yacopí (un individuo) y Caparrapí (un individuo) y para *A. antonii* en las localidades de Valle del Cauca, El Dorado (dos individuos). Adicionalmente se obtuvieron muestras de tejido (hígado) para *A. mariarum* (cuatro muestras de Anorí, Antioquia), y para *A. antonii* (tres muestras de La Minga, Valle del Cauca y cinco muestras de El Dorado, Valle del Cauca).

En total se obtuvieron 68 secuencias del fragmento del gen COI distribuidas así: 31 secuencias para *A. antonii* (a partir de 7 muestras de sangre y 24 de hígado), 19 secuencias para *A. mariarum* (a partir de 5 muestras de sangre y 14 de hígado) y 18 secuencias para *A. tolimensis* (a partir de 8 muestras de sangre y 10 de hígado), lo cual corresponde al 72.27% de éxito. No fue posible obtener la secuencia deseada del gen COI en 20 (27.73%) de las 88 muestras disponibles.

### 6.1. Divergencia intra- e interespecífica

Se encontró que *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* presentan sobrelapamiento de divergencias intra- e interespecíficas dado que el mayor valor de divergencia intraespecífica es 8.76% para *A. antonii* y el mínimo valor de divergencia interespecífica es 7.7% entre *A. tolimensis* y *A. mariarum* (Tabla 2).

En las especies de *Anolis* con secuencias del gen COI encontradas en las bases de datos GenBank/Bold de la matriz A (*i.e.* diferentes a *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*; Anexo 3), 33 especies (42.31%) contaban con una secuencia, 16 especies (20.51%) contaban con dos secuencias, y 29 especies (37.18%)



contaban con tres o más secuencias. El número promedio de secuencias del gen COI por especie de *Anolis* fue 3.24 (DS  $\pm$  4.8). En todos los casos evaluados se encontró solapamiento de las distancias intra- e interespecíficas.

**Tabla 2.** Porcentaje de divergencia intra- e interespecífica (bajo la diagonal) y de desviación estándar (sobre la diagonal) calculados a partir de las secuencias de individuos identificados como *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*.

Divergencia intraespecífica		Divergencia interespecífica		
		<i>A. antonii</i>	<i>A. mariarum</i>	<i>A. tolimensis</i>
8.76 $\pm$ 0.97	<i>A. antonii</i>		$\pm$ 0.93	$\pm$ 1,01
2.86 $\pm$ 0.41	<i>A. mariarum</i>	8.31		$\pm$ 1.01
4.98 $\pm$ 0.68	<i>A. tolimensis</i>	9.30	7.7	

En los casos uno (todas las especies) y dos (especies con dos o más secuencias) la máxima divergencia intraespecífica es 18.29% y 18.24%, y la mínima divergencia interespecífica es 5.48% y 5.53%, respectivamente. Lo mismo sucede en el caso tres (especies con tres o más secuencias), la máxima divergencia intraespecífica es 9,80% y la mínima divergencia interespecífica es 5.57% (Tabla 3). Por tanto no es posible definir un barcode gap que separe la divergencia intra- e interespecífica del gen COI para las especies del género *Anolis* con secuencias en las bases de datos GenBank/BOLD.

## 6.2. Aplicación del algoritmo ABGD

No se observó un espacio (barcode gap) entre la distancia genética intra- e interespecífica en el histograma de distribución de frecuencias de distancias genéticas pareadas entre las secuencias de la matriz B (Fig. 6A). Se encontró un número variable de grupos (o especies tentativas) al utilizar diferentes valores de distancia intraespecífica mínima (Pmin), máxima (Pmax) y número de iteraciones (Steps) (Tabla 4). El número de grupos encontrados en la partición inicial fue

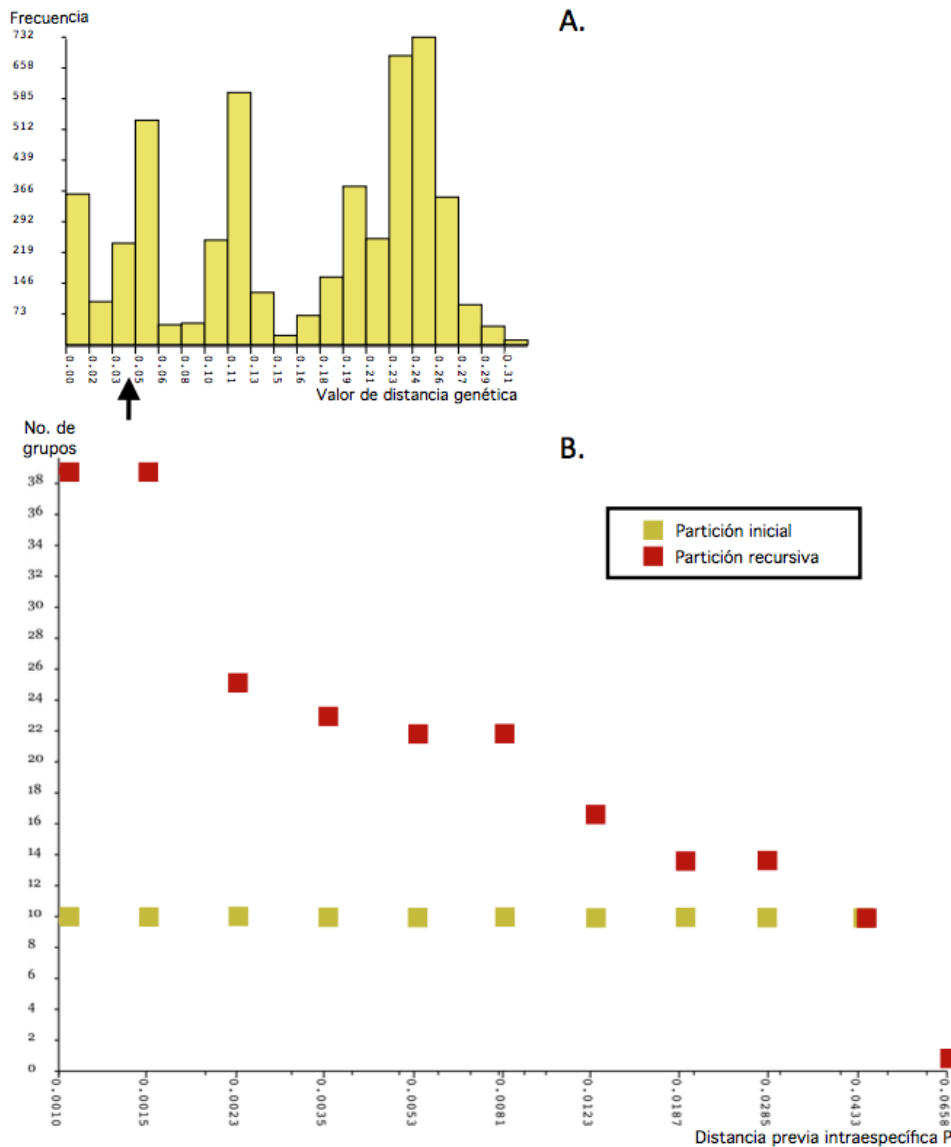
constante (10 grupos, Tabla 4 y Fig. 6B) en los ocho análisis ejecutados por el algoritmo y fue similar al número de especies incluidas en la matriz B (12 especies).

**Tabla 3.** Porcentaje de divergencia intra- e interespecífica y de desviación estándar calculados a partir de las secuencias (sec.) de especies de *Anolis* encontradas en las bases de datos GenBank y BOLD.

	<b>Todas las spp (78 spp, caso 1)</b>	<b>spp con dos o más sec. (45 spp, caso 2)</b>	<b>spp con tres o más sec. (29 spp, caso 3)</b>
<b>Divergencia intraespecífica</b>			
Máxima	18.29 ±2.09	18.24 ±2.17	9.80 ±1.07
Mínima	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.08 ±0.08
Promedio	3.08 ±0.52	3.08 ±0.53	3.03 ±0.50
<b>Divergencia interespecífica</b>			
Máxima	32.91 ±3.18	31.76 ±2.96	31.97 ±2.92
Mínima	5.48 ±0.92	5.53 ±0.90	5.57 ±0.90
Promedio	23.69 ±2.43	23.33 ±2.34	23.32 ±2.33

Las nueve especies de GenBank/Bold fueron reconocidas como grupos independientes en todos los análisis realizados. Estos grupos se mantuvieron constantes tanto en las particiones iniciales como en las particiones recursivas, independientemente del valor ajustado en los parámetros Pmin, Pmax y Steps. Las diferencias encontradas al variar estos parámetros se concentraron exclusivamente en las especies *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* (Anexo 5). Las secuencias de estas especies formaron uno, cinco y ocho grupos (especies potenciales) cuando el algoritmo encontró 10, 14 y 17 grupos respectivamente (Anexo 5). *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* no formaron tres grupos, por lo tanto no son reconocidas como especies independientes por el algoritmo ABGD. En la máxima partición que registró el algoritmo (*i.e.* 10 grupos, ver discusión) las secuencias de las tres especies

formaron un solo grupo, indicando que corresponden a una misma especie potencial.



**Figura 6.** A, Histograma de distribución de frecuencias de distancias genéticas pareadas (Kimura 2 parámetros) entre las secuencias en la matriz B (nueve especies de GenBank/BOLD, *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*). La flecha indica el valor umbral encontrado por el algoritmo ABGD que separa la variación genética intra- e interespecífica. B, Diagrama mostrando cómo el número de grupos encontrados por el algoritmo varía respecto a diferentes valores de distancia máxima previa intraespecífica o umbrales.

**Tabla 4.** Número de grupos (especies potenciales) encontrados por el algoritmo ABGD en las particiones inicial ( $P_0$ ) y recursiva ( $P_R$ ) a partir de diferentes valores de divergencia intraespecífica mínima ( $P_{min}$ ), máxima ( $P_{max}$ ) y número de iteraciones (steps).

Parámetros			No. grupos $P_0$	No. grupos $P_R$
$P_{min}$	$P_{max}$	steps		
<b>Valores por defecto</b>				
0,001	0,1	10	10	14
0,001	0,1	5000	10	<b><u>10</u></b>
<b>Caso 1: Todas las especies (78 spp)</b>				
0,000001*	0,1829	10	10	17
0,000001*	0,1829	5000	10	<b><u>10</u></b>
<b>Caso 2: Especies con dos o más secuencias (45 spp)</b>				
0,000001*	0,1824	10	10	17
0,000001*	0,1824	5000	10	<b><u>10</u></b>
<b>Caso 3: Especies con tres o más secuencias (29 spp)</b>				
0,0008	0,0979	10	17	14
0,0008	0,0979	5000	17	<b><u>10</u></b>

\*La divergencia intraespecífica en los casos uno y dos fue 0 (Tabla 3). Para calcular el número de grupos por el algoritmo ABGD en estos dos casos se ajustó un valor de  $P_{min} = 0.000001$ , pues la ejecución del algoritmo no acepta un valor de  $P_{min} = 0.0$ .

### 6.3. Análisis filogenéticos

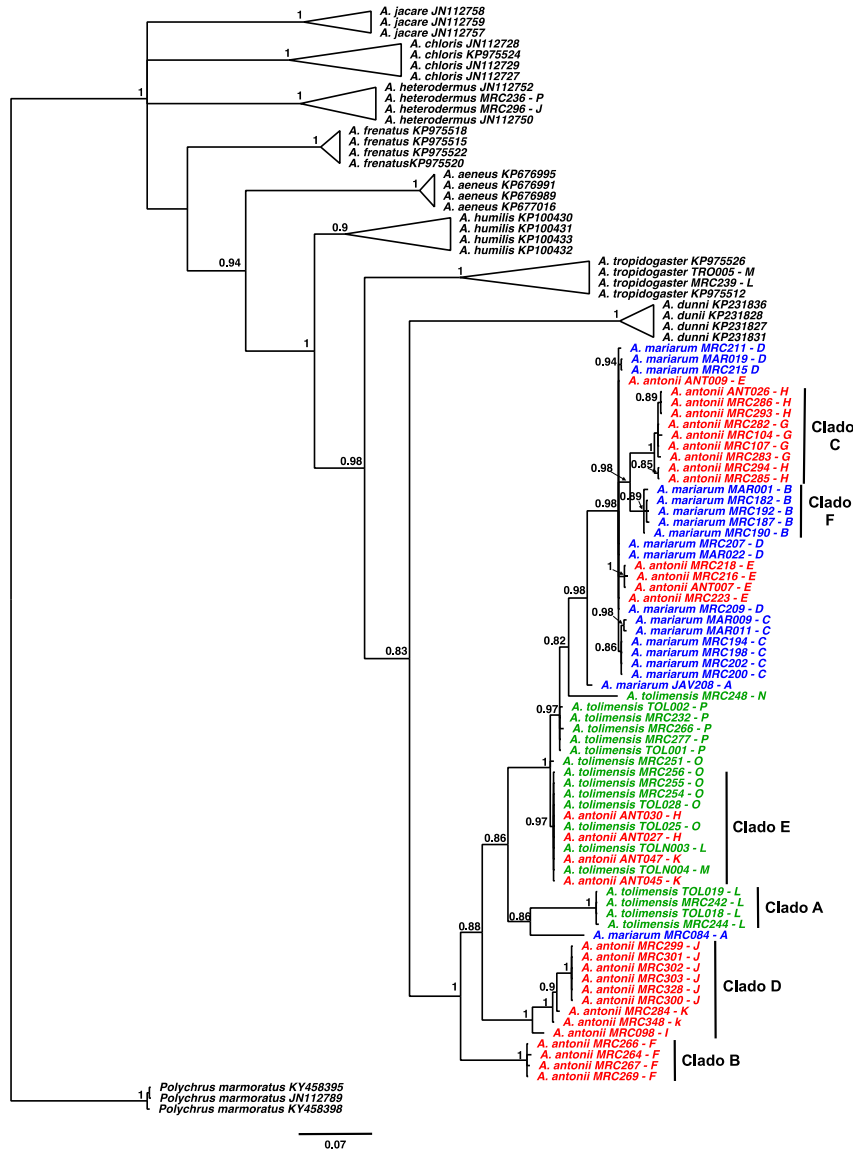
Los árboles filogenéticos resultantes (Figs. 7 y 8) fueron parecidos en cuanto a su topología y difieren solo en nodos que están débilmente soportados, por lo que solo se tendrán en cuenta nodos que están soportados en ambos árboles. En los análisis filogenéticos las ocho especies de *Anolis* con secuencias de Genbank/BOLD son inferidas como monofiléticas con alto soporte de nodos

(Probabilidad posterior,  $PP \geq 0.90$  y Bootstrap,  $B > 90\%$ , excepto *A. humilis*  $B = 78\%$ ; Figs. 7 y 8, respectivamente). Las especies *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* no son inferidas monofiléticas, sin embargo las tres especies forman un clado bien soportado ( $PP = 1$ , Fig. 7;  $B = 94\%$ , Fig. 8). En este clado se obtuvieron seis grandes clados (A – F) con alto soporte en ambos árboles ( $PP > 0.89$  y  $B > 93\%$ ) conformados por cuatro o más individuos de una misma localidad en todos los casos, incluyendo a veces individuos de localidades o especies diferentes. Cinco clados estuvieron conformados por individuos de la misma especie y un clado estuvo conformado por individuos de dos especies.

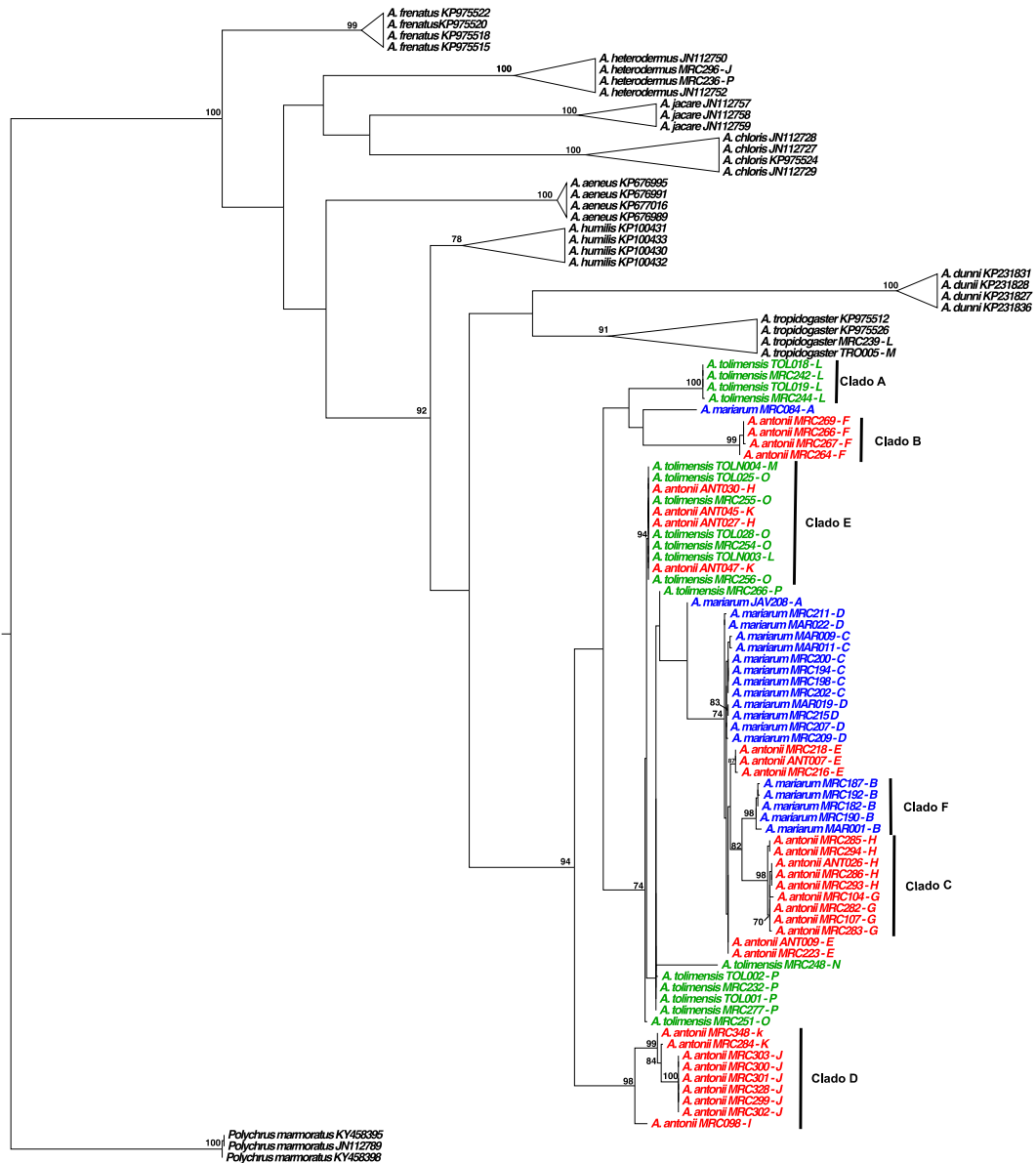
- El clado A conformado por cuatro de los cinco individuos *A. tolimensis* de Falán en Tolima ( $PP = 1$ ;  $B = 100\%$ ).
- El clado B conformado por todos los individuos (cuatro) *A. antonii* de Tatamá en Risaralda ( $PP = 1$ ;  $B = 99\%$ ).
- El clado C conformado por cinco de los siete individuos *A. antonii* de la Laguna de Sonso y todos los individuos (cuatro) de El Dorado en el Valle del Cauca ( $PP = 1$ ;  $B = 98\%$ ).
- El clado D conformado por dos de los cuatro individuos *A. antonii* de Cajibío en Cauca y todos (seis) los individuos *A. antonii* de El Pato y La Minga (uno) en el Valle del Cauca ( $PP = 1$ ;  $B = 98\%$ ).
- El clado E conformado por individuos de dos especies: dos de los siete individuos *A. antonii* de la Laguna de Sonso en el Valle del Cauca, dos de los cuatro individuos *A. antonii* de Cajibío en el Cauca, cuatro de los cinco individuos *A. tolimensis* de Sasaima, el único individuo *A. tolimensis* de Yacopí en Cundinamarca y uno de los cinco individuos *A. tolimensis* de Falán en Tolima ( $PP = 0.97$ ;  $B = 94\%$ ).
- El clado F conformado por individuos *A. mariarum* de Carolina del Príncipe en Antioquia ( $PP = 0.89$ ;  $B = 98\%$ ).

Los árboles filogenéticos sugieren una cercana relación entre localidades geográficamente separadas (*e.i.* Antioquia y Valle del Cauca) que corresponden

a rangos de distribución de especies diferentes (e.i. *Anolis mariarum* y *A. antonii*, respectivamente).



**Figura 7. Árbol Bayesiano reconstruido a partir de secuencias del gen COI de *A. antonii* (rojo), *A. tolimensis* (verde), *A. mariarum* (azul) y de especies con secuencias de GenBank/BOLD (negro). Para cada secuencia se indica la localidad en letras: A - Anorí; B - Carolina del Príncipe; C - Belmira; D - Alto de San Miguel; E - Jericó; F - PNN Tatamá; G - El Dorado; H - Laguna de Sonso; I - La Minga; J - El Pato; K - Cajibío; L - Falán; M - Yacopí; N - Caparrapí; O - Sasaima; P - Laguna de Pedro Palo. Se indican los soportes de nodo para aquellos con valores de Probabilidad Posterior igual o mayor a 0.75.**



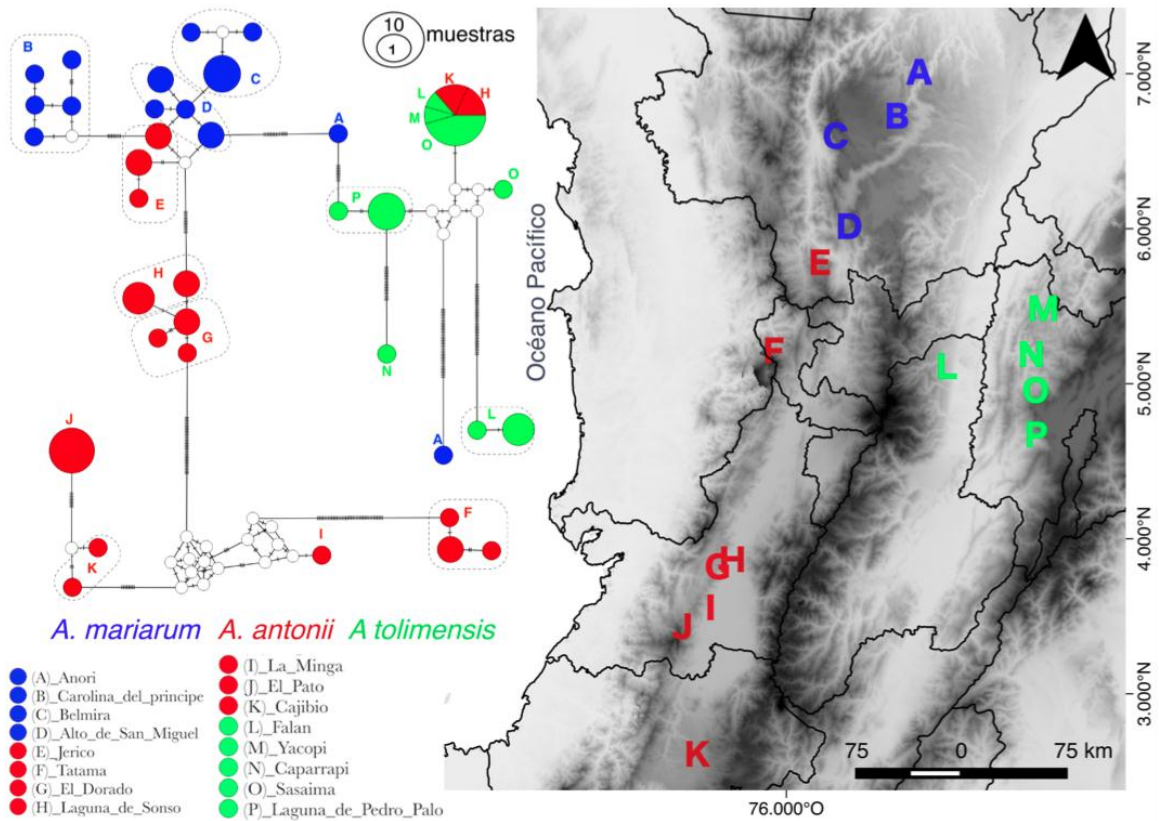
**Figura 8. Árbol de Máxima Verosimilitud reconstruido a partir de secuencias del gen COI de *A. antonii* (rojo), *A. tolimensis* (verde), *A. mariarum* (azul) y de especies con secuencias de GenBank/BOLD (negro).** Para cada secuencia se indica la localidad en letras: A – Anorí; B – Carolina del Príncipe; C – Belmira; D – Alto de San Miguel; E – Jericó; F – PNN Tatamá; G – El Dorado; H – Laguna de Sonso; I – La Minga; J – El Pato; K – Cajibío; L – Falán; M – Yacopí; N – Caparrapí; O – Sasaima; P – Laguna de Pedro Palo. Se indican los soportes de nodo para aquellos con Bootstrap mayor o igual a 70%.

Las secuencias de individuos *A. mariarum* pertenecientes a tres localidades en Antioquia (e.i. Anorí, Belmira y Alto de San Miguel) y los individuos *A. antonii* de Jericó, también en Antioquia, no forman clados soportados por localidad. Sin embargo todos los individuos colectados en las localidades de Antioquia (excepto Anorí) forman un clado soportado (PP = 0.98, Bootstrap = 74%) que incluye también individuos de localidades en el Valle del Cauca (Laguna de Sonso y El Dorado).

#### **6.4. Red de haplotipos**

Se encontraron 36 haplotipos entre las secuencias de las especies de interés: 16 para *A. antonii*, 14 para *A. mariarum* y 7 para *A. tolimensis*. Los haplotipos pertenecientes a las localidades Alto de San Miguel para *A. mariarum* y Jericó para *A. antonii* en Antioquia se encuentran separados por solo un paso mutacional, indicando una relación estrecha entre los individuos de estas dos especies en Antioquia. La red de haplotipos muestra congruencia geográfica entre 4 de las cinco localidades muestreadas en Antioquia (B, C, D y E, Fig. 9) dado que los haplotipos encontrados para estas cuatro localidades se encuentran separados por un paso mutacional (excepto haplotipos de Carolina del Príncipe, ocho pasos). Para *A. antonii* no hay congruencia entre la relación de los haplotipos mostrados en la red y la ubicación geográfica de las localidades de muestreo. El mismo caso se presenta para *A. tolimensis* ya que haplotipos de una misma localidad (Falán) se encuentran separados hasta por 41 pasos (Fig. 9). Individuos *A. antonii* del Cauca (Cajibío) y Valle del Cauca (Laguna de Sonso) comparten un haplotipo con individuos *A. tolimensis* de Tolima (Falán) y Cundinamarca (Yacopí y Sasaima; Fig. 6).





**Figura 9. Red de haplotipos para *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*. Cada haplotipo está representado por un círculo en la red. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Círculos en la red compuestos de dos colores corresponden a un haplotipo compartido entre dos especies. El color de los círculos (haplotipos) y las letras (localidades) indican cada especie, *A. antonii* (rojo), *A. mariarum* (azul) y *A. tolimensis* (verde). Círculos blancos representan secuencias inferidas. Letras en la red corresponden a localidades de origen de las muestras indicadas también en el mapa. Líneas segmentadas en la red agrupan haplotipos de una misma localidad. La longitud de las ramas es proporcional al número pasos mutacionales (líneas transversas sobre ramas) entre haplotipos.**

## 7. DISCUSIÓN

El éxito en la amplificación del fragmento del gen COI fue 72.27% dado que no fue posible obtener la secuencia deseada en 20 de las 88 muestras disponibles. La discrepancia entre el número de muestras disponibles y el número de secuencias obtenidas se debió a problemas en la amplificación por PCR del fragmento de COI, a pesar de haber usado diferentes combinaciones de cebadores, y a la baja calidad de las secuencias obtenidas en algunas muestras. Este porcentaje de éxito es menor al obtenido por (Jeong *et al.*, 2013) con un éxito en la amplificación del gen COI de reptiles de Korea de 78%, y por Guarnizo *et al.*, (2015) con un éxito en la amplificación del mismo gen en Anuros de Colombia de 88.6%. A pesar de haber usado cebadores universales (*i.e.* LCO1490 – HCO2198, Folmer *et al.*, 1994), como en Jeong *et al.*, (2013) y Guarnizo *et al.*, (2015), estos no amplificaron el fragmento deseado en ninguna reacción de PCR a partir del ADN genómico de *A. antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum*. Los cebadores universales amplificaron la región deseada usando como ADN molde (templete) fragmentos amplificados con la combinación de cebadores TRPF.12 - REPTBCr o TRPF.12 - HCO2198, teniendo en cuenta que bandas claras en los geles al revelar los amplificados no siempre son indicadores de una posterior secuenciación de buena calidad.

### 7.1. Divergencia intra- e interespecífica en el género *Anolis*

Para las especies *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* se encontraron valores de divergencia intraespecífica (dintra) = 8.76%, 2.86% y 4.98% respectivamente (Tabla 2). *Anolis antonii* y *A. tolimensis* presentan una divergencia intraespecífica mayor al promedio de divergencia intraespecífica calculado a partir de las especies de *Anolis* en GenBank/BOLD en los casos uno (Todas las especies, dintra = 3.08%), caso dos (especies con dos o más secuencias, dintra = 3.08%) y caso tres (especies con tres o más secuencias, dintra = 3.03%; Tabla 3). *Anolis mariarum* es la única de las especies de interés

que presenta una divergencia intraespecífica similar al promedio de divergencia intraespecífica para el género *Anolis* en los casos uno, dos y tres (Tabla 3). Comparados con otros grupos de reptiles, los valores de divergencia intraespecífica encontrados para *A. mariarum* y *A. tolimensis* están dentro de los valores mínimos y máximos reportados en lagartos de la familia Lacertidae en Alemania (Hawlitschek *et al.*, 2016). Estos valores oscilan entre 0.09% (para la especie *Zootoca vivípara* Lichtenstein 1823) y 8.07% (para la especie *Podarcis muralis* Laurenti 1768) con un promedio de 1.60%. La familia Lacertidae fue la única referencia dentro de los lagartos con valores reportados de divergencia intraespecífica del gen COI. Laopichienpong *et al.*, (2016) reportan valores de divergencia intraespecífica del gen COI para 35 especies de serpientes de Tailandia que oscilan entre 0-6.81%, con un promedio de 1.4%. Jeong *et al.*, (2013) reportan valores de divergencia intraespecífica del gen COI para reptiles de Korea que oscilan entre 0-1.7%, con un promedio de 0.2%. Chambers y Hebert (2016) reportan valores de divergencia intraespecífica del gen COI que oscilan entre 0-21.22%, con un promedio de divergencia intraespecífica de 2.96% para 172 especies de reptiles de Norte América de diferentes géneros y de diferentes familias, siendo el valor más cercano al promedio de divergencia intraespecífica encontrado en los casos uno, dos y tres (Tabla 3) pero teniendo en cuenta especies de un mismo género (*e.i.* *Anolis*).

*Anolis antonii* y *A. tolimensis* tuvieron la divergencia interespecífica más alta entre las especies de interés (9.30%), seguida de la divergencia entre *A. antonii* y *A. mariarum* (8.31%) y por último entre *A. mariarum* y *A. tolimensis* (7.7%) (Tabla 2). Estos valores de divergencia interespecífica son más bajos respecto al promedio de divergencia intraespecífica ( $p_{d\text{intra}}$ ) calculado a partir de las especies de GenBank/BOLD en los casos uno (todas las especies,  $p_{d\text{intra}} = 23.69\%$ ), caso dos (especies con dos o más secuencias,  $p_{d\text{intra}} = 23.33\%$ ) y caso tres (especies con tres o más secuencias,  $p_{d\text{intra}} = 23.32\%$ ; Tabla 3). Köhler *et al.*, (2014a) reportan un valor de divergencia interespecífica para el gen COI entre *Anolis peucephilus* X *Anolis omiltemanus* de 11.5%, siendo hasta

ahora el único valor de divergencia en el gen COI reportado entre especies de *Anolis*. Sin embargo, para este valor no se menciona el procedimiento para realizar el cálculo, por lo que no es un valor comparable con los valores en la Tabla 3. Las secuencias de *A. peucephilus* y *A. omilatemanus* no estaban disponibles al momento de hacer la búsqueda de secuencias del gen COI en GenBank y en BOLD y no fueron incluidas en los cálculos relacionados en la Tabla 3. Además, parece haber discrepancia en el reconocimiento de *A. peucephilus* como especie válida dado que no hay certeza de que *A. peucephilus* y *A. omiltemanus* sean especies diferentes, pues no ha habido un muestreo exhaustivo que cubra las localidades en las que se distribuyen estas taxa (Steve Poe, comentario personal). Hawlitschek *et al.*, (2016) reportan valores de divergencia interespecífica de 6.01% (*Lacerta bilineata* Daudin 1802 X *Lacerta viridis* Laurenti 1768) y 13.66% (*Lacerta agilis* Linnaeus 1758 X *Lacerta viridis* Laurenti 1768) para especies congénicas de lagartos Lacertidae, con un promedio de 8.56%. Laopichienpong *et al.*, (2016) reportan valores de divergencia interespecífica del gen COI para 35 especies de serpientes (teniendo en cuenta diferentes géneros de diferentes familias) de Tailandia que oscilan entre 4.02 – 27.71%. Jeong *et al.*, (2013) reportan valores de divergencia interespecífica del gen COI para reptiles de Korea (teniendo en cuenta diferentes géneros de diferentes familias) que oscilan entre 1.9 – 9.3%, con un promedio de 6.0%. Las divergencias interespecíficas encontradas en los estudios mencionados sugieren que no hay un valor promedio de divergencia interespecífica similar entre diferentes taxa de reptiles para el gen COI, siendo las serpientes de Tailandia y las especies de *Anolis* los taxa con valores de divergencia interespecífica mayores a 20%.

Los valores promedio de divergencia intraespecífica reportados en estudios de código de barras de ADN en reptiles están por debajo de 3,0% (e.g. Jeong *et al.*, 2013; Chambers y Hebert, 2016; Hawlitschek *et al.*, 2016; Laopichienpong *et al.*, 2016), similar al valor encontrado en este estudio para *A. mariarum* (2,86%). Por el contrario, los valores de divergencia intraespecífica encontrados para *A.*

*antonii* y *A. tolimensis* (8.76% y 4.98%, respectivamente; Tabla 2), y aquellos encontrados para las otras especies de *Anolis* evaluadas (casos uno = 3.08%, dos = 3.08%, y tres = 3.03%; Tabla 3) estuvieron por encima de 3.0%, el umbral sugerido por Hebert *et al.*, (2003) como barcode gap general. Los resultados indican que este valor no puede ser usado como valor umbral para separar especies en *Anolis*.

## 7.2. Aplicación del algoritmo ABGD

El algoritmo ABGD encuentra un valor de distancia intraespecífica máxima previa P o valor umbral que es usado para separar las secuencias de un alineamiento en grupos potenciales candidatos a especie Puillandre *et al.*, (2011). Teóricamente, el valor umbral (o barcode gap) se define en base al supuesto de que las diferencias entre las especies son significativamente más altas en comparación a las diferencias dentro de las especies (Hebert *et al.*, 2003b, 2004; Bucklin *et al.*, 2011), por tanto hay un espacio en la distribución de diferencias pareadas entre secuencias de un alineamiento que separa las diferencias intraespecíficas de las interespecíficas. Este barcode gap no existe para las especies del género *Anolis* (Fig. 6A), debido a que se observa solapamiento entre las divergencias intra- e interespecíficas para este grupo. Chambers y Hebert (2016) reportan la misma situación para 172 especies de reptiles en Norteamérica.

El número de grupos encontrados en la partición inicial del ABGC fue constante: 10 grupos en los ocho análisis ejecutados. Éste valor fue similar al número de especies en el conjunto de datos (12 especies). Esto coincide con lo sugerido por Puillandre *et al.*, (2011) al encontrar que las particiones iniciales son típicamente estables en un amplio rango de valores P (previa distancia máxima intraespecífica o valor umbral) encontrados para hacer las particiones, siendo similar el número de grupos encontrados y el número de especies delimitadas por taxonomía clásica. El número de grupos encontrados en la partición recursiva en los casos con Steps = 10 fue variable (Tabla 4). El parámetro Steps es dejado por defecto en 10 por el algoritmo y por lo general no es modificado en

los estudios donde se ha reportado la utilización del mismo (e.g. Puillandre *et al.*, 2011; Guarnizo *et al.*, 2015; Boissin *et al.*, 2017; excepto Laopichienpong *et al.*, 2016 con Steps = 50). Sin embargo, en este estudio se encontró que el número de grupos encontrados en las particiones recursivas varió al modificar el parámetro Steps sin modificar los valores de Pmax y Pmin (Tabla 4). Por ejemplo, cuando los parámetros Pmin y Pmax fueron ajustados a los valores por defecto el algoritmo recuperó 14 grupos con Steps = 10. Luego, el algoritmo recuperó 10 grupos con Steps = 11; 10 grupos con Steps = 12, 14 grupos con Steps = 20, 10 grupos con Steps = 50 y mantuvo constante el número de 10 grupos hasta un Steps = 5000 (máximo valor de Steps ajustado para ejecutar el algoritmo). El valor de Steps fue aumentado gradualmente de 500 en 500 a partir de Steps = 50 (resultados no mostrados).

En todos los análisis ejecutados el número de grupos converge a 10 cuando el valor de Steps = 5000 independientemente del valor de Pmin y Pmax utilizado (Tabla 4). Las secuencias incluidas en cada uno de los 10 grupos también fueron constantes (Anexo 5). El número de grupos encontrados por el algoritmo con Steps = 5000, independientemente del valor que se ajuste en Pmax y Pmin, indica que el parámetro Steps es muy importante para llegar a un número constante de grupos y que por tanto el valor por defecto del parámetro (10) no asegura un estimado confiable del verdadero número de grupos (especies tentativas) que puede inferir el algoritmo. Por tanto se considera que la partición óptima encontrada es de 10 grupos en el conjunto de datos: nueve grupos corresponden a las nueve especies con secuencias de Genbank/BOLD por lo que éstas especies fueron delimitadas apropiadamente por el algoritmo, y un grupo que incluye las 68 secuencias de *A. antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum* (Anexo 5), indicando que corresponden a una sola especie potencial. Al aplicar el algoritmo ABGD se considera que una especie es delimitada apropiadamente cuando todas las secuencias de dicha especie pertenecen a un mismo grupo sin incluir secuencias de otras especies (Puillandre *et al.*, 2011).

Para que el algoritmo ABGD funcione correctamente, la tasa de especiación y el

número de especies evaluado son factores importantes. Cuando el evento de especiación entre las especies en estudio ha sido suficientemente antiguo el algoritmo puede encontrar todas las especies, pero cuando el evento de especiación es muy reciente no hay posibilidad de que los datos moleculares permitan diferenciar las especies, pues es probable que no se puedan ver diferencias entre la divergencia intra- e interespecífica (Puillandre *et al.*, 2011). Este hecho podría explicar por qué las especies de interés conforman un solo grupo (*e.i.* una sola especie potencial).

### **7.3. Análisis filogenéticos y red de haplotipos**

Las nueve especies con secuencias de Genbank y BOLD son inferidas como monofiléticas, sin embargo las relaciones entre estas están débilmente soportadas (politomía Fig. 7; B < 70% Fig. 8). Esto posiblemente se debe a la elevada tasa de evolución molecular en el gen mitocondrial COI, por lo que es útil para informar sobre relaciones históricas recientes a través de cortos periodos de tiempo (*e.g.* linajes con breves historias de aislamiento reproductivo) pero haciéndolo un marcador deficiente para calcular relaciones profundas entre especies (Hebert *et al.*, 2004; Galtier *et al.*, 2009). Por el contrario, *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* no son inferidas monofiléticas, aunque las tres especies forman un clado fuertemente soportado (PP = 1, Fig. 7; B = 94%, Fig. 8). Este resultado concuerda con el algoritmo ABGD en la máxima partición que registró (10 grupos – Tabla 3), donde las 68 secuencias de *Anolis antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum* conformaron un grupo independiente (Anexo 5).

Los árboles filogenéticos reconstruidos muestran un clado altamente soportado que contiene todas las secuencias de *A. antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum*, concordando con la filogenia calculada a partir del gen mitocondrial ND2 en Grisales-Martínez *et al.*, (2017). Sin embargo Poe *et al.*, (2015, 2017) muestran una filogenia en la que *A. antonii* y *A. mariarum* forman un clado bien soportado (PP = 1) que excluye a *A. tolimensis*, contrario a lo observado en este estudio donde en los árboles reconstruidos hay clados fuertemente soportados con

secuencias de *A. antonii* y *A. tolimensis* (PP = 0.97, Fig. 7; B = 94%, Fig. 8) y de *A. mariarum* con *A. tolimensis* (PP = 0.86, Fig. 7).

Dentro del clado que contiene todas las secuencias de *A. antonii*, *A. tolimensis* y *A. mariarum* se destacan seis clados (A – F) con alto soporte en los análisis Bayesianos y de Máxima Verosimilitud conformados por cuatro o más individuos de una misma localidad pero no necesariamente incluyendo todos los individuos de una misma localidad o de localidades cercanas geográficamente (clados A, C, D y E), situación que solo presentan los clados B y F. Los clados A y B están conformados por individuos de la misma especie, *A. tolimensis* y *A. antonii* respectivamente, pertenecientes a la misma localidad (aunque no todos los individuos de esas localidades están incluidos en el clado; clado A; Fig. 7 y 8). De hecho, las secuencias que forman cada uno de estos dos clados son reconocidas como dos grupos independientes por el algoritmo ABGD cuando el número de grupos encontrado es 14 y 17 grupos (Tabla 4, Anexo 5). Resulta interesante el hecho de que el clado A (con individuos *A. tolimensis*) tenga una relación débilmente soportada con la secuencia de un individuo de *A. mariarum* de Anorí (Antioquia), posiblemente teniendo implicaciones geográficas no descritas (ver más adelante). La secuencia de ese individuo *A. mariarum* fue reconocida como un “grupo” independiente por el algoritmo ABGD cuando el número de grupos fue 17.

A pesar de la continuidad geográfica entre todas las localidades de muestreo para *A. antonii* desde el sur (Cauca) hasta el norte (Antioquia) de la cordillera de los Andes en Colombia, no es posible observar ese continuo geográfico en los árboles filogenéticos reconstruidos, salvo el clado C que está conformado por individuos *A. antonii* que pertenecen a localidades geográficamente cercanas en el Valle del Cauca (El Dorado y Laguna de Sonso, Fig. 5 y 9). Estas últimas (clado C) aparecen más relacionadas con localidades de Antioquia que pertenecen al rango de distribución de *A. mariarum*, principalmente con la localidad Carolina del Príncipe (clado F) y además no todos los individuos de las



localidades del clado C están incluidas (*e.i.* incluye solo dos de los cuatro individuos de Cajibío Cauca). Esta relación entre los clados C y F está bien soportada en el árbol Bayesiano y de Máxima Verosimilitud ( $P = 0.98$  y  $B = 82\%$ ). Esta situación es similar en las localidades muestreadas para *A. mariarum*. A pesar de la continuidad geográfica de las localidades en Antioquia no es posible ver un patrón geográfico en los árboles filogenéticos dado que solamente secuencias de individuos *A. mariarum* de Carolina del Príncipe formaron un clado con alto soporte en ambos árboles ( $PP = 0.89$  y  $B = 98\%$ ), siendo éste el único clado (F) con secuencias de *A. mariarum* que pertenecen a una misma localidad. El resto de individuos *A. mariarum* pertenecientes a localidades en Antioquia se encuentran en clados con bajo soporte (Fig. 7 y 8). El clado D está conformado por individuos *A. antonii* en localidades a lo largo de un continuo geográfico que va desde el Cauca (Cajibío) hasta el Valle del Cauca (El Pato y La Minga; Fig. 5, 7 y 8), pero no incluye localidades que también pertenecen a este último departamento (Laguna de Sonso y El Dorado) y no todos los individuos del Cauca (2 individuos de Cajibío) pertenecen al clado D.

El clado E estuvo conformado por individuos *A. antonii* del Valle del Cauca (Laguna de Sonso) y Cauca (Cajibío) junto con individuos *A. tolimensis* de Tolima (Falán) y Cundinamarca (Yacopí, Sasaima). Este clado resulta ser muy interesante debido a la morfología hemipeneal de las dos especies que agrupa. Este carácter es importante para discriminar entre especies estrechamente relacionadas (Köhler *et al.*, 2012; Klaczko *et al.*, 2015). En este caso la diferencia en morfología hemipeneal entre *A. antonii* (hemipene bilobado) y *A. tolimensis* (hemipene unilobado) permite delimitar las especies, pero la información molecular del gen COI no está soportando esta delimitación. Además, las localidades a las que pertenecen los individuos de *A. antonii* se encuentran separadas de las localidades a las que pertenecen los individuos de *A. tolimensis* por la Cordillera Central (Fig. 2). El clado E puede ser evidencia de flujo genético reciente entre *A. antonii* y *A. tolimensis* y la diferencia en morfología hemipeneal entre estas dos especies puede ser explicada por la alta

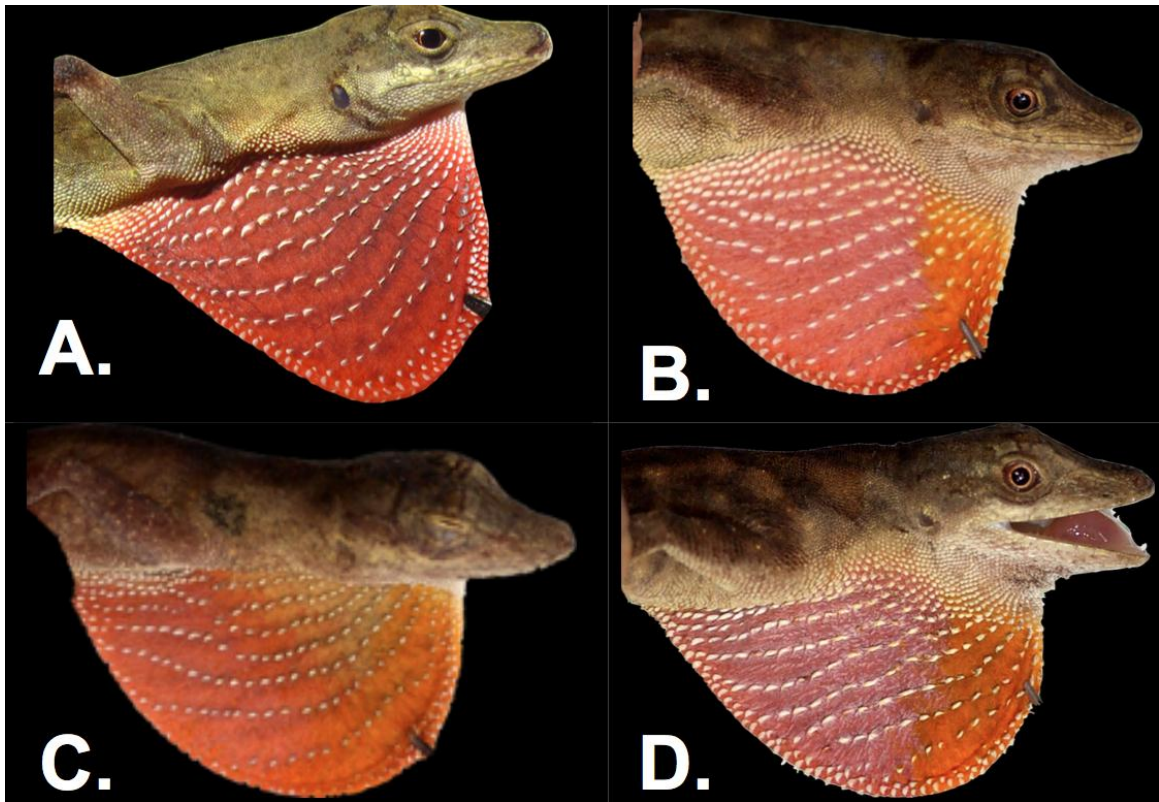
tasa de evolución de caracteres genitales de machos sobre otros caracteres morfológicos no genitales, característico en *Anolis* (Köhler *et al.*, 2012; Klaczko *et al.*, 2015). Por ejemplo, en *Anolis* del Caribe caracteres hemipeneales evolucionan aproximadamente seis veces más rápido que caracteres no genitales (*e.g.* gular y longitud de extremidades traseras; Klaczko *et al.*, 2015). Si esto es así, vale la pena determinar qué factores influyen en la forma que adoptan los hemipenes en especies que han divergido recientemente, y para las especie de interés determinar qué factores han promovido que *A. antonii* y *A. mariarum* compartan igual morfología hemipeneal (hemipene bilobado) y que las hace diferentes de la forma presente en *A. tolimensis* (hemipene unilobado).

Las localidades de muestreo más cercanas geográficamente para especies diferentes se hallan en Antioquia: Alto de San Miguel para *A. mariarum* y Jericó para *A. antonii*, separadas por aproximadamente 35 Km lineales atravesando el valle geográfico del Río Cauca. Los haplotipos pertenecientes a estas dos localidades se encuentra separados por solo un paso mutacional (Fig. 9), indicando una relación muy estrecha entre los individuos de las dos especies en Antioquia y que puede ser explicada por flujo genético reciente entre individuos de estas dos localidades. Además, la red de haplotipos muestra congruencia geográfica entre 4 de las cinco localidades muestreadas para *A. mariarum* en Antioquia (B, C, D y E; Fig. 9) dado que los haplotipos encontrados para estas cuatro localidades se encuentran separados hasta por un paso mutacional (excepto haplotipos de Carolina del Príncipe). Para *A. antonii* no es evidente la congruencia entre la relación de los haplotipos mostrados en la red y la ubicación geográfica de las localidades de muestreo (Fig. 9). Haplotipos encontrados en Jericó Antioquia son más similares a los haplotipos del Valle del Cauca en El Dorado y Laguna de Sonso en comparación a los haplotipos de Risaralda en Tatamá, localidad geográficamente más cercana a Jericó (Fig. 9). La red de haplotipos muestra la misma relación soportada en los árboles filogenéticos.

Un haplotipo presente en individuos *A. antonii* del Cauca en Cajibío y del Valle del Cauca en Laguna de Sonso es compartido con individuos *A. tolimensis* de Tolima en Falán y de Cundinamarca en Yacopí y Sasaima, lo que resulta interesante dado que estas dos especies presentaron la divergencia interespecífica más alta entre las especies de interés (9.30%; Tabla 2) y formaron un clado (clado E) altamente soportado en los árboles filogenéticos. Este haplotipo compartido entre *A. antonii* y *A. tolimensis* (Fig. 9) no permite delimitar las especies usando el fragmento del gen COI propuesto como código de barras universal.

Existe una similitud de los haplotipos de Antioquia para *Anolis mariarum* que corresponde con la geografía de la cordillera Central. Haplotipos de localidades sobre la ladera occidental de la Cordillera Central (*e.i.* Belmira y Alto de San Miguel) son más similares entre sí que con los haplotipos de localidades sobre la ladera oriental de la Cordillera Central (*e.i.* Anorí y Carolina del Príncipe). Los árboles filogenéticos y la red de haplotipos también muestran una relación entre individuos *A. mariarum* de Anorí con haplotipos de la especie *A. tolimensis*. El clado A (con individuos *A. tolimensis* de Falán) aparece débilmente relacionado con la secuencia de un individuo de *A. mariarum* de Anorí y la Figura 6 muestra que los haplotipos de Anorí son más similares a todos los haplotipos de *A. tolimensis* (10 pasos mutacionales) en lugar de ser más similares al resto de haplotipos presentes en Antioquia (14 pasos mutacionales). La presencia de un haplotipo compartido entre individuos *A. antonii* del Cauca y Valle del Cauca con individuos *A. tolimensis* de Tolima y Cundinamarca (clado E) y la similitud entre los haplotipos de *A. mariarum* en Anorí (Antioquia) con haplotipos de *A. tolimensis* (Cundinamarca, Tolima) podría sugerir que los tres taxa son en realidad una sola especie con poblaciones geográficamente divergentes, explicando también porqué el algoritmo ABGD reconoce todas las secuencias de las tres especies como un solo grupo (una sola especie potencial). De hecho *A. mariarum* y *A. tolimensis* podrían representar un caso similar documentado en especies de *Anolis* de Centroamérica. *Anolis polylepis* Peters 1874 y *Anolis osa*

Köhler *et al* 2010 son especies de Panamá con caracteres morfológicos muy similares pero con morfología hemipeneal claramente distinguible (hemipene unilobado para *A. ossa* y hemipene bilobado para *A. polylepis*), excepto para individuos de una zona de contacto entre las dos especies en donde los machos presentan un morfología hemipeneal intermedia y hay entrecruzamiento entre individuos de las dos especies (Köhler *et al.*, 2012). Dada la similitud entre haplotipos de *A. mariarum* en Anorí (Antioquia) con haplotipos de *A. tolimensis* (Cundinamarca, Tolima), es posible que haya existido (o que exista) una zona de contacto entre individuos *A. mariarum* y *A. tolimensis* en algún punto de la ladera oriental de la Cordillera Central en Antioquia, sin descartar la posibilidad haber existido poblaciones en donde los machos tuvieran una morfología hemipeneal intermedia entre hemipene bilobado (*A. mariarum*) y unilobado (*A. tolimensis*).



**Figura 10. Coloración gular en machos de *Anolis tolimensis*.** A, MHUA-R 12770 foto por F. A. Grisales-Martínez; B, MRC235 Laguna de Pedro Palo Cundinamarca; C, TOL019 Falán Tolima; TOL010 Laguna de Pedro. Fotos en B, C y D por M. del R. Castañeda.

Tanto el algoritmo ABGD como los árboles filogenéticos muestran que *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* no se pueden reconocer como especies independientes. Esto puede deberse a la presencia de haplotipos compartidos (Fig. 6), por lo que para las especies de interés el fragmento usado como marcador no es suficientemente informativo para separar las especies. Los resultados obtenidos con el fragmento del COI en este estudio son contrarios a los obtenidos por Grisales-Martínez *et al.*, (2017), quienes usando el gen mitocondrial ND2 junto con información de morfología, coloración gular y distribución geográfica, reconocen a *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* como especies independientes, además de proponer la existencia de una nueva especie dentro del grupo *fuscoauratus*, *Anolis urraoi*, distribuida en la ladera occidental de la cordillera Occidental, en el municipio de Urao Antioquia.

A pesar de tener diferentes líneas de evidencia para soportar sus resultados e incluir las localidades tipo de las tres especies, Grisales-Martínez *et al* (2017) no consideraron el amplio rango de distribución de *A. antonii* y *A. tolimensis*. Los resultados obtenidos a partir del gen ND2 pueden no reflejar la variación genética real para los dos taxa (Bergsten *et al.*, 2012; Laopichienpong *et al.*, 2016) y los resultados a partir de coloración gular y morfometría podrían estar sesgados por efecto de sub-muestreo, ignorando posibles variaciones fenotípicas interpoblacionales. A partir de los individuos de *A. antonii* y *A. tolimensis* de las localidades relacionadas en la Tabla 1 se puede demostrar el efecto de submuestreo en Grisales-Martínez *et al* (2017).

Primero, Grisales-Martínez *et al* (2017) describen para *A. tolimensis* un gular completamente rojizo-anaranjado en base a tres especímenes frescos de la localidad tipo (Tolima: Ibagué, Cañón del Combeima), sin considerar variaciones interpoblacionales en coloración gular a lo largo del rango de distribución de la especie. En las localidades muestreadas para *A. tolimensis* (Fig. 5) se capturaron machos con variación de coloración gular entre amarillo, rosado y

anaranjado-rojizo (Fig. 10), concordando con la descripción mencionada por Poe *et al*, (2015) sobre el color del gular rosado y anaranjado-rojizo en machos de *A. tolimensis*. Segundo, se encontraron diferencias con los valores de Longitud Rostro-Cloacal (LRC) promedio reportados por Grisales-Martínez *et al* (2017). Estos autores reportan datos a partir de 38 individuos de *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*; en este estudio se estimaron valores a partir de 210 individuos de las tres especies provenientes de las localidades indicadas en la Figura 2 (Tabla 5). Grisales-Martínez *et al* (2017) encontraron que el carácter LRC permite separar las tres especies pero los valores encontrados a partir de los 210 individuos medidos indican que los promedios de LRC son similares entre las tres especies, por lo que no es imposible diferenciarlas al usar esta medida (Tabla 5). Teniendo en cuenta los dos aspectos mencionados anteriormente se puede decir que los resultados obtenidos en Grisales-Martínez *et al* (2017) están sesgados por efecto de submuestreo y que por tanto la consideración de las localidades tipo para las especies de interés no es suficiente para cubrir variaciones intraespecíficas genéticas y morfológicas.

**Tabla 5.** Comparación de valores promedio y desviación estándar de la Longitud Rostro-Cloacal (LRC) de individuos *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* reportados por Grisales *et al.*, 2017 y los obtenidos en este estudio.

Especie	Sexo	Este estudio		Grisales <i>et al.</i> , 2017	
		No. ind medidos	promedio $\pm$ ds	No. ind medidos	promedio $\pm$ ds
<i>A. antonii</i>	♂	48	44.98 $\pm$ 3.20	7	41.93 $\pm$ 3.36
	♀	55	47.38 $\pm$ 3.85	6	45.63 $\pm$ 4.79
<i>A. mariarum</i>	♂	31	47.74 $\pm$ 3.61	9	48.40 $\pm$ 5.23
	♀	27	49.30 $\pm$ 2.64	10	47.54 $\pm$ 3.57
<i>A. tolimensis</i>	♂	18	46.33 $\pm$ 2.81	5	47.97 $\pm$ 3.39
	♀	31	47.68 $\pm$ 2.80	1	45.71

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el fragmento del gen COI usado como código de barras no reconoce a cada una de las especies de interés

como especies independientes. Los análisis realizados (aplicación del algoritmo ABGD, reconstrucción de árboles filogenéticos y red de haplotipos) sugieren que estas especies son en realidad una sola especie con poblaciones divergentes genéticamente a lo largo de la cordillera de los Andes. Sin embargo hay que resaltar que datos de secuencias de un único gen (COI en este estudio) pueden no proveer suficiente información para delimitar especies (DeSalle, 2006; Roe y Sperling, 2007; Galtier *et al.*, 2009). Una razón que puede explicar por qué COI no permite reconocer las tres especies de manera independiente es que se trate de especies que tengan un tiempo de divergencia muy corto y que por tanto no han acumulado suficiente variación en el gen mitocondrial COI y posiblemente en todo su genoma (Puillandre *et al.*, 2011). También se debe tener en cuenta que varios procesos evolutivos, aparte de tiempos de divergencia recientes entre especies, pueden homogenizar el genoma mitocondrial de distintas especies a través de introgresión genética (haciendo que la diversidad mitocondrial interespecífica sea muy baja) o por selección balanceadora (aquella que mantiene la diversidad intraespecífica alta; Galtier *et al.*, 2009). Tales procesos pueden afectar seriamente la distinción entre divergencias intra- e interespecíficas, provocando errores al usar secuencias como etiquetas (*i.e.* barcodes) para la identificación de especímenes y la delimitación de especies (Galtier *et al.*, 2009).

En conclusión, para identificar *Anolis*, el gen COI no debería ser utilizado como código de barras exclusivo y debería ser combinado con el análisis de otros genes, junto con datos morfológicos, geográficos, y/o ecológicos para tener una confiable delimitación de especies, respondiendo a lo que se ha denominado una taxonomía integrativa (*e.g.* (Puillandre *et al.*, 2011; Damm *et al.*, 2010; Cacciali y Köhler, 2018).

## 8. CONCLUSIONES

- Existe sobrelapamiento en la divergencia intra- e interespecífica del gen COI de las especies *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* dado que el mayor valor de divergencia intraespecífica es 8.76% (*A. antonii*) y el mínimo valor de divergencia interespecífica es 7.7% (*A. tolimensis* X *A. mariarum*).
- Las secuencias de las especies *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* forman un grupo en la máxima partición que registró el algoritmo ABGD (10 grupos), por tanto son reconocidas por el algoritmo como una sola especie potencial.
- Las especies *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* no son inferidas monofiléticas en los árboles filogenéticos reconstruidos. Los clados formados con secuencias de estas especies están soportados en los árboles filogenéticos Bayesiano y de Máxima Verosimilitud, estando conformados por secuencias de individuos de dos especies diferentes (e.i. clado E -*A. antonii* y *A. tolimensis*, Probabilidad Posterior = 0.97 y Bootstrap = 94%) o indicar una relación cercana entre localidades geográficamente separadas y de dos especies diferentes (e.i. Clado C para *A. antonii* del Valle del Cauca con individuos *A. antonii* y *A. mariarum* de todas las localidades en Antioquia, excepto Anorí; Probabilidad Posterior = 0.98 y Bootstrap = 74%).
- El fragmento del gen COI propuesto como códigos de barras universal para la identificación de especímenes no debería ser utilizado como etiqueta única para identificar especies de lagartijas del género *Anolis*. El algoritmo ABGD agrupa las secuencias de *A. antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* en un solo grupo (una sola especie potencial), la inferencia filogenética soporta clados con secuencias de hasta dos especies y la red de haplotipos evidencia la presencia de haplotipos compartidos y falta de estructuración genética poblacional entre las localidades muestreadas para las especies de interés.



- Existe sobrelapamiento en la divergencia intra- e interespecífica del gen COI para el género de lagartijas *Anolis* dado que los valores máximos de divergencia intraespecífica (e.g. 9.80%, caso 3) son más altos que los valores mínimos de divergencia interespecífica (e.g. 5.57%, caso 3).

## 9. RECOMENDACIONES

Realizar análisis a partir de diferentes líneas de evidencia (e.g. caracteres morfológicos, escamación, coloración gular) para soportar el estatus taxonómico de *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis*. En este estudio la información molecular del gen mitocondrial COI sugiere que los tres taxa nombrados corresponden a la misma especie. Sin embargo la información molecular de otro gen mitocondrial (ND2) sugiere que se trata de tres especies diferentes. Por tanto el problema de identificación de las tres especies aún debe ser tratado con cuidado dado que genes mitocondriales están mostrando resultados contrarios.

Hacer morfometría clásica, conteo de escamas, fotografías de especímenes vivos y obtener muestras de ADN (o de tejido) de individuos *Anolis urraoi*, nueva especie propuesta por Grisales-Martínez *et al* (2017), del municipio de Urao en Antioquia para determinar si en realidad existen suficientes diferencias morfométricas, de coloración gular y moleculares para ser considerada como una especie diferente a *A. mariarum*.

Dada la restringida distribución geográfica considerada por Grisales-Martínez *et al* (2017) es pertinente cubrir la totalidad del rango de distribución de las especies en los Andes y utilizar otros marcadores moleculares mitocondriales como ND2, 16s y/o Cyt b, además de marcadores nucleares (PRLR, BDNF, PTPN12; Hofmann y Townsend, 2017), para corroborar el estatus categórico de estos tres taxa y reconstruir la historia filogeográfica de las especies (Dool *et al.*, 2013).

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, M.G., 2011. Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas Físicas Nat.* 35, 491–507.
- Andrews, R., Rand, A.S., 1974. Reproductive Effort in Anoline Lizards. *Ecology* 55, 1317–1327.
- Andrews, R.M., 1985. Oviposition Frequency of *Anolis carolinensis*. *Copeia* 1985, 259–262.
- Angulo, A., Almonacid, J.V.R., Mahecha, J.V.R., Marca, E.L., 2006. Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la region tropical andina. Conservacion Internacional Colombia.
- Barbour, T., 1932. New anoles. *Proc. N. Engl. Zool. Club* 12, 97–102.
- Bergsten, J., Bilton, D.T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M.T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, G.N., Ribera, I., Nilsson, A.N., Barraclough, T.G., Vogler, A.P., 2012. The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. *Syst. Biol.* 851–869.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22, 148–155.
- Boissin, E., Hoareau, T.B., Paulay, G., Bruggemann, J.H., 2017. DNA barcoding of reef brittle stars (Ophiuroidea, Echinodermata) from the southwestern Indian Ocean evolutionary hot spot of biodiversity. *Ecol. Evol.* 7, 11197–11203.
- Boulenger, G.A., 1908. LXX.—Descriptions of new batrachians and reptiles discovered by Mr. MG Palmer in South-western Colombia. *J. Nat. Hist.* 2, 515–522.
- Bucklin, A., Steinke, D., Blanco-Bercial, L., 2011. DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3, 471–508.

- Cacciali, P., Köhler, G., 2018. Diversity of *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) in Paraguay—an integrative taxonomic approach based on morphological and molecular genetic evidence. *Zootaxa* 4375, 511–536.
- Carranza, S., 2002. Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los Anfibios y Reptiles ibéricos, in: Pleguezuelos, J.M., Márquez, R., Lizana, M. (Eds.), *Atlas y Libro Rojo de Los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española (2a impresión), Madrid, España, 550–579.
- Castañeda, M. del R., de Queiroz, K., 2013. Phylogenetic relationships of the Dactyloa clade of *Anolis* lizards based on nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 61, 784–800.
- Castaño-Mora, O.V., 2002. *Libro Rojo de los Reptiles de Colombia*. Bogota, Colombia, Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia. ed. Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia.
- Chambers, E.A., Hebert, P.D.N., 2016. Assessing DNA Barcodes for Species Identification in North American Reptiles and Amphibians in Natural History Collections. *PLOS ONE* 11, 1–15.
- Constable, H., Guralnick, R., Wieczorek, J., Spencer, C., Peterson, T., 2010. VertNet: A New Model for Biodiversity Data Sharing. *PLoS BIOL* 8, 1–4.
- Cox, A.J., Hebert, P.D., 2001. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.* 10, 371–386.
- Crawford, A.J., Cruz, C., Griffith, E., Ross, H., Ibáñez, R., Lips, K.R., Driskell, A.C., Bermingham, E., Crump, P., 2013. DNA barcoding applied to ex situ tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 1005–1018.

- Damm, S., Schierwater, B., Hadrys, H., 2010. An integrative approach to species discovery in odonates: from character-based DNA barcoding to ecology. *Mol. Ecol.* 19, 3881–3893.
- DeSalle, R., 2006. Species Discovery versus Species Identification in DNA Barcoding Efforts: Response to Rubinoff. *Conserv. Biol.* 20, 1545–1547.
- Dool, S.E., Puechmaille, S.J., Dietz, C., Juste, J., Ibáñez, C., Hulva, P., Roué, S.G., Petit, E.J., Jones, G., Russo, D., Toffoli, R., Viglino, A., Martinoli, A., Rossiter, S.J., Teeling, E.C., 2013. Phylogeography and postglacial recolonization of Europe by *Rhinolophus hipposideros*: evidence from multiple genetic markers. *Mol. Ecol.* 22, 4055–4070.
- Etter, A., van Wyngaarden, W., 2000. Patterns of Landscape Transformation in Colombia, with emphasis in the Andean Region. *AMBIO J. Hum. Environ.* 29, 432–439.
- Felsenstein, J., 2004a. Parsimony methods, in: *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., U.S.A.
- Felsenstein, J., 2004b. Bayesian inference of phylogenies, in: *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Inc.
- Fitch, H.S., Hillis, D.M., 1984. The *Anolis* Dewlap: Interspecific Variability and Morphological Associations with Habitat. *Copeia* 1984, 315–323.
- 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. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Futuyma, D., 2013. *The Tree of life: Classification and Phylogeny*, in: *Evolution*. Sinauer Associates, Massachusetts U.S.A.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G.D.D., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 18, 4541–4550.
- Glor, R., Kolbe, J., Powell, R., Larson, A., Losos, J., 2003. Phylogenetic analysis of ecological and morphological diversification in Hispaniolan trunk-ground anoles (*Anolis cybotes* group). *Evol. Int. J. Org. Evol.* 57, 2383–2397.

- Goldstein, P.Z., DeSalle, R., 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 33, 135–147.
- Gómez, M., Moreno, L., Andrade, G., Rueda, C. (Eds.), 2016. Biodiversidad 2015. Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C., Colombia.
- Grisales-Martínez, F.A., Velasco, J.A., Bolívar, W., Williams, E.E., Daza, J.M., 2017. The taxonomic and phylogenetic status of some poorly known *Anolis* species from the Andes of Colombia with the description of a nomen nudum taxon. *Zootaxa* 4303, 213–230.
- Guarnizo, C., Paz, A., Muñoz, A., Flechas, S., Méndez-Narváez, J., Crawford, A., 2015. DNA Barcoding Survey of Anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the Impact of the Andes on Cryptic Diversity. *PLoS ONE* 10, 1–20.
- Hawlitschek, O., Morinière, J., Dunz, A., Franzen, M., Rödder, D., Glaw, F., Haszprunar, G., 2016. Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 242–253.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 313–321.
- Hebert, P., Dewaard, J.R., Landry, J.-F., 2010. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol. Lett.* 6, 359–362.
- Hebert, P., Ratnasingham, S., deWaard, J., 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, S96–S99.
- Hebert, P., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S., Francis, C.M., 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLOS Biol.* 2, 1657–1663.
- Hofmann, E.P., Townsend, J.H., 2017. Origins and biogeography of the *Anolis crassulus* subgroup (Squamata: Dactyloidae) in the highlands of Nuclear Central America. *BMC Evol. Biol.* 17, 267.
- Holder, M., 2014. Phylogenetic Inference, in: Losos, J.B., Baum, D.A., Futuyma, D.J., Hoekstra, H.E., Lenski, R.E., Moore, A.J., Peichel, C.L., Schluter, D.,

- Whitlock, M.J., Whitlock, M.J., Whitlock, M.J. (Eds.), The Princeton Guide to Evolution. Princeton University Press.
- Holder, M., Lewis, P.O., 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat. Rev. Genet.* 4, 275.
- Hutter, C.R., Guayasamin, J.M., Wiens, J.J., 2013. Explaining Andean megadiversity: the evolutionary and ecological causes of glassfrog elevational richness patterns. *Ecol. Lett.* 16, 1135–1144.
- IUCN 2018, n.d. IUCN 2018, The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3, <http://www.iucnredlist.org>. Consultado Feb 11, 2018.
- Jeong, T.J., Jun, J., Han, S., Kim, H.T., Oh, K., Kwak, M., 2013. DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 1019–1032.
- Klaczko, J., Ingram, T., Losos, J., 2015. Genitals evolve faster than other traits in *Anolis* lizards. *J. Zool.* 295, 44–48.
- Köhler, G., 2014. Characters of external morphology used in *Anolis* taxonomy - Definition of terms, advice on usage, and illustrated examples. *Zootaxa* 3774, 201–257.
- Köhler, G., Dehling, M., Köhler, J., 2010. Cryptic species and hybridization in the *Anolis polylepis* complex, with the description of a new species from the Osa Peninsula, Costa Rica (Squamata: Polychrotidae). *Zootaxa* 2718, 23–38.
- Köhler, G., Pérez, R., Petersen, C., Cruz, F., 2014a. A new species of pine anole from the Sierra Madre del Sur in Oaxaca, Mexico (Reptilia, Squamata, Dactyloidae: *Anolis* ). *Zootaxa* 3753, 453–468.
- Köhler, G., Townsend, J., Petersen, C., 2016. A taxonomic revision of the *Norops tropidonotus* complex (Squamata, Dactyloidae), with the resurrection of *N. spilorhipis* (Álvarez del Toro and Smith, 1956) and the description of two new species. *Mesoamerican Herpetol.* 3, 8–41.
- Köhler, G., Vargas, J., Lotzkat, S., 2014b. Two new species of the *Norops pachypus* complex (Squamata, Dactyloidae) from Costa Rica. *Mesoamerican Herpetol.* 1, 254–280.

- Köhler, J., Hahn, M., Köhler, G., 2012. Divergent evolution of hemipenial morphology in two cryptic species of mainland anoles related to *Anolis polylepsis*. *Salamandra* 48, 1–11.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701.
- Laopichienpong, N., Muangmai, N., Supikamolseini, A., Twilprawat, P., Chanhome, L., Suntrarachun, S., Peyachoknagul, S., Srikulnath, K., 2016. Assessment of snake DNA barcodes based on mitochondrial COI and Cytb genes revealed multiple putative cryptic species in Thailand. *Gene* 594, 238–247.
- Leigh, J.W., Bryant, D., 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* 6, 1110–1116.
- Losos, J., 2009. *Lizards in an Evolutionary Tree: Ecology and Adaptive Radiation of Anoles*. University of California Press.
- Losos, J., 2004. Adaptation and Speciation in Greater Antillean Anoles, in: Dieckmann, U., Doebeli, M., Metz, J.A.J., Tautz, D. (Eds.), *Adaptive Speciation*. Cambridge, UK.
- MADS, 2012. *Política Nacional para la Gestión Integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos*.
- Mardulyn, P., 2012. Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation? *Mol. Ecol.* 21, 3385–3390.
- Marín, D.A.A., Ruiz, E.J.H., Reyes, D.G.G., 2007. Ecología de *Anolis tolimensis* (Sauria, Iguanidae) en la Cordillera Oriental de Colombia. *Herpetotropicos* 4, 71–78.
- Mejía, P., Hodson, E., 2006. Aspectos genéticos y moleculares en el estudio de la biodiversidad colombiana, en: *Informe Nacional Sobre El Avance En El Conocimiento y La Información de La Biodiversidad 1998 - 2004 Tomo II*.



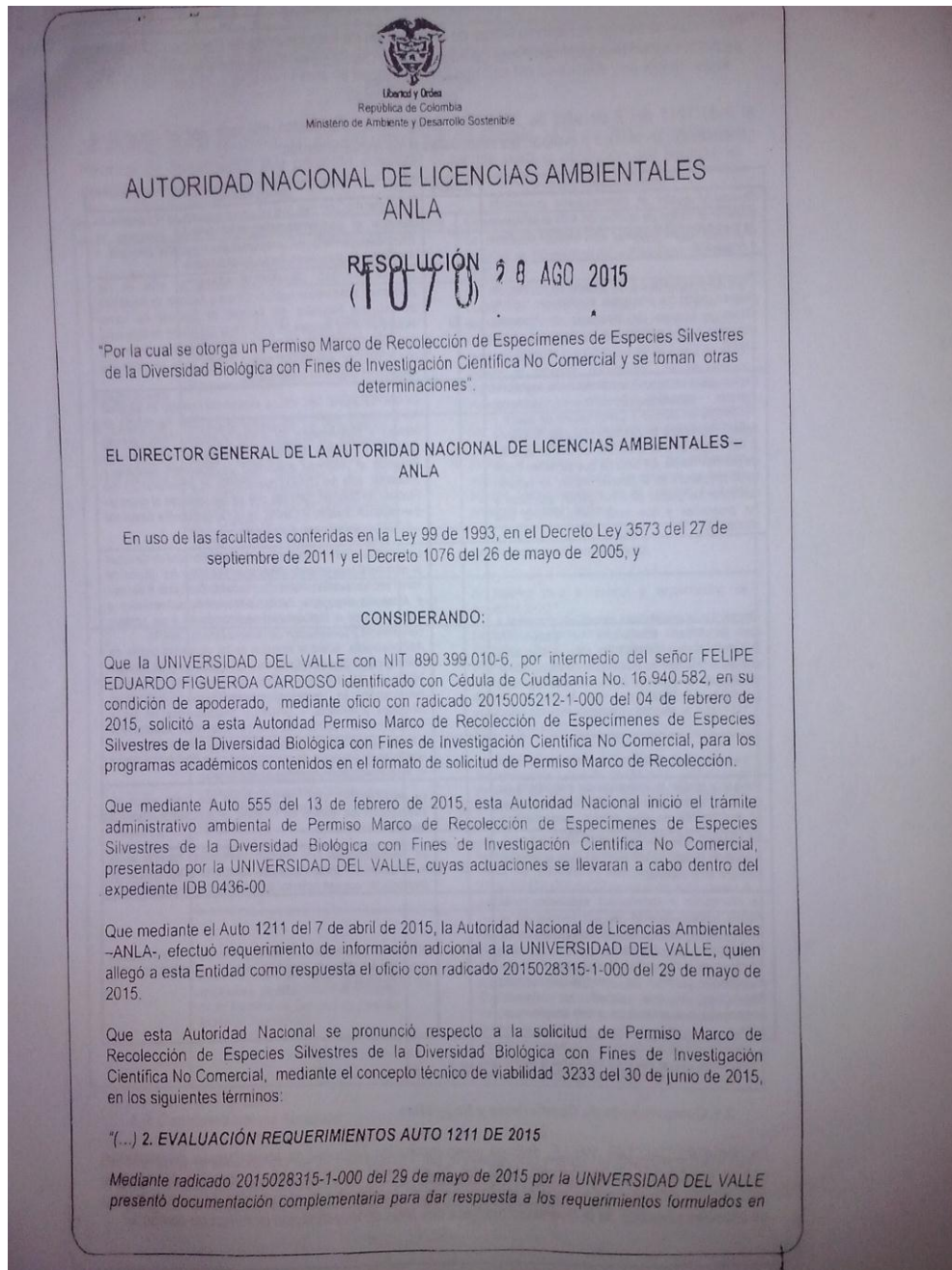
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt., Colombia.
- Meyer, C.P., Paulay, G., 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLOS Biol.* 3, e422.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 2010 Gatew. Comput. Environ. Workshop GCE 1–8.
- Morales, M., Lasso, C., Páez, V., Bock (Eds.), 2015. Libro rojo de los reptiles de Colombia. Bogotá, D.C., Colombia.
- Morales-Betancourt, M.A., Lasso, C.A., Páez, V.P., Bock, B.C., 2017. Reptiles amenazados de Colombia, en: Moreno, L.A., Andrade, G.I., Ruíz-Contreras, L.F. (Eds.), *Biodiversidad 2016. Estado y Tendencias de La Biodiversidad Continental de Colombia*. Bogotá, D. C., Colombia.
- Nagy, Z.T., Sonet, G., Glaw, F., Vences, M., 2012. First Large-Scale DNA Barcoding Assessment of Reptiles in the Biodiversity Hotspot of Madagascar, Based on Newly Designed COI Primers. *PLoS ONE* 7, 1–11.
- Nicholson, K.E., Harmon, L.J., Losos, J.B., 2007. Evolution of *Anolis* Lizard Dewlap Diversity. *PLOS ONE* 2, e274.
- Páez, V.P., Arredondo, J.C., López, C., Martínez, L.M., Molina, C., Restrepo, A., 2006. Reptiles de Colombia, diversidad y estado del conocimiento, en: Chaves, M.D., Santamaria, M. (Eds.), *Informe Nacional Sobre El Avance En El Conocimiento y La Información de La Biodiversidad 1998 - 2004 Tomo II*. Bogotá D.C. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt., Colombia.
- Paz, A., Crawford, A.J., 2012. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: A comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. *J. Biosci.* 37, 887–896.
- Peterson, J.A., 1983. The Evolution of the Subdigital Pad of *Anolis* 2. Comparisons among the Iguanid Genera Related to the Anolines and a View from outside the Radiation. *J. Herpetol.* 17, 371–397.

- Poe, S., Nieto-Montes de Oca, A., Torres-Carvajal, O., de Queiroz, K., Velasco, J.A., Truett, B., Gray, L.N., Ryan, M.J., Köhler, G., Ayala-Varela, F., Latella, I., 2017. A Phylogenetic, Biogeographic, and Taxonomic study of all Extant Species of *Anolis* (Squamata; Iguanidae). *Syst. Biol.* 66, 663–697.
- Poe, S., Scarpetta, S., Schaad, E.W., 2015. A new species of *Anolis* (Squamata: Iguanidae) from Panama. *Amphib. Reptile Conserv.* 9, 1–13.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G., 2011. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21, 1864–1877.
- Ratnasingham, S., Hebert, P., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol. Ecol. Notes* 7, 355–364.
- Ridley, M., 2004. The Reconstruction of Phylogeny, en: *Evolution*. Blackwell Science Ltd, Italy, pp. 423–470.
- Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 325–345.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Savolainen, V., Cowan, R., Vogler, A., Roderick, G., Lane, R., 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 1805–1811.
- Schmidt, H., Haeseler, A., 2009. Phylogenetic inference using Maximum Likelihood methods, en: Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A. (Eds.), *The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press, United States, 181–199.


- Schulte, J.A., Valladares, J.P., Larson, A., 2003. Phylogenetic relationships within iguanidae inferred using molecular and morphological data and a phylogenetic taxonomy of iguanian lizards. *Herpetologica* 59, 399–419.
- Smith, M.A., Poyarkov, N.A., Hebert, P.D.N., 2008. DNA BARCODING: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 235–246.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Uetz, P., Freed, P., Hošek, J. (Eds.), 2018. The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, consultado Feb 2, 2018.
- Vences, M., Thomas, M., van der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D.R., 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front. Zool.* 2, 1–12.
- Werner, F., 1916. Bemerkungen über einige niedere Wirbeltiere der Anden von Kolumbien mit Beschreibungen neuer Arten. *Zool Anz* 47, 301–311.
- Wheeler, W., 1996. Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics* 12, 1–9.
- Yassin, A., Markow, T.A., Narechania, A., O’Grady, P.M., DeSalle, R., 2010. The genus *Drosophila* as a model for testing tree- and character-based methods of species identification using DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 509–517.

## 11. ANEXOS

**Anexo 1.** Resolución 1070 del 28 de agosto de 2015, expedida por la Autoridad Nacional De Licencias Ambientales, por la cual se otorga un Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial a la Universidad del Valle.



**Anexo 2.** Resolución 1234 del 02 de octubre de 2015, expedida por la Autoridad Nacional De Licencias Ambientales, por la cual se otorga un Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial a la investigadora María del Rosario Castañeda Prada.

  
Libertad y Orden  
República de Colombia  
Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible

**AUTORIDAD NACIONAL DE LICENCIAS AMBIENTALES  
ANLA**

**RESOLUCIÓN**  
**(1234)**, 02 OCT 2015

\*Por la cual se otorga un Permiso Individual de Recolección de especímenes de especies silvestres de la Diversidad Biológica con fines de investigación científica no comercial y se toman otras determinaciones\*

**EL DIRECTOR DE LA AUTORIDAD NACIONAL DE LICENCIAS AMBIENTALES – ANLA**

En uso de las facultades legales, en especial, de las conferidas en el Decreto Ley 2811 de 1974, la Ley 99 de 1993, el Decreto Ley 3573 de 2011, el Decreto 1076 del 26 de mayo de 2015, y

**CONSIDERANDO**

Que mediante radicado 2015020938-1-000 del 21 de abril de 2015, la investigadora MARÍA DEL ROSARIO CASTAÑEDA PRADA, identificada con cédula de ciudadanía No. 52.385.042, presentó ante esta Autoridad Nacional de Licencias Ambientales – ANLA, solicitud de Permiso Individual de Recolección de especímenes de especies silvestres de la Diversidad Biológica con fines de investigación científica no comercial, para el proyecto "Estudio sobre las relaciones filogenéticas de las lagartijas *Anolis* (*Sauria*: *Dactyloidae*)".

Que mediante Auto 2069 del 27 de mayo de 2015 se dio inicio al trámite de Permiso Individual de Recolección de especímenes de especies silvestres de la Diversidad Biológica con fines de investigación científica no comercial para el proyecto "Estudio sobre las relaciones filogenéticas de las lagartijas *Anolis* (*Sauria*: *Dactyloidae*)", y se le asignó el expediente IDB 0456-00, bajo el cual se realizan todas las actuaciones administrativas correspondientes.

Que con radicado 2015033130-2-000 del 24 de junio de 2015, la ANLA solicitó a Parques Nacionales Naturales de Colombia, emitir concepto técnico sobre el proyecto presentado por la investigadora MARÍA DEL ROSARIO CASTAÑEDA PRADA.

Que a través de escrito con radicado 2015033130-1-001 del 17 de julio de 2015, Parques Nacionales Naturales de Colombia remitió a esta Entidad el concepto solicitado, en el cual consideró viable otorgar el permiso en comento en las localidades ubicadas en el Parque Nacional Natural Gorgona y el Santuario de Fauna y Flora Malpelo.

Que evaluada la documentación obrante en el expediente por el área técnica de la Subdirección de Instrumentos, Permisos, y Trámites Ambientales de la ANLA, se emitió el concepto técnico 3867 del 30 de julio de 2015 en los siguientes términos:

{...}

**2 INFORMACIÓN PARA EL TRÁMITE DEL PERMISO**

La información que se presenta a continuación corresponde a una copia textual de la solicitud presentada por la investigadora María del Rosario Castañeda, mediante radicado 2015020723-1-000 del 20 abril de 2015:

**Anexo 3.** Listado de especies y secuencias del gen COI utilizadas en los cálculos de divergencia intra- e interespecífica y/o los análisis filogenéticos. Se muestra el número de accesión en Genbank, números de registro en BOLD y localidad (País y/o provincia/departamento) de cada secuencia. Las secuencias indicadas con un asterisco (\*) fueron usadas en los análisis filogenéticos.

<b>ESPECIE</b>	<b>ACCESION GENBANK</b>	<b>REGISTRO EN BOLD</b>	<b>LOCALIDAD</b>
<i>A. aeneus</i> *	KP676991	GBGCR846-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677004	GBGCR859-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677006	GBGCR861-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677015	GBGCR870-15	Granada
<i>A. aeneus</i> *	KP677016	GBGCR871-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677017	GBGCR872-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	JN112719	GBGC12163-13	Granada
<i>A. aeneus</i> *	KP676989	GBGCR844-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676990	GBGCR845-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676992	GBGCR847-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676994	GBGCR849-15	Granada
<i>A. aeneus</i> *	KP676995	GBGCR850-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676999	GBGCR854-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677001	GBGCR856-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677002	GBGCR857-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677003	GBGCR858-15	Granada Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677005	GBGCR860-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677009	GBGCR864-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677011	GBGCR866-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677013	GBGCR868-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677021	GBGCR876-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677023	GBGCR878-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676988	GBGCR843-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676993	GBGCR848-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676997	GBGCR852-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676998	GBGCR853-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677008	GBGCR863-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677014	GBGCR869-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677018	GBGCR873-15	Granada

<i>A. aeneus</i>	KP677020	GBGCR875-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677022	GBGCR877-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677024	GBGCR879-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676987	GBGCR842-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP676996	GBGCR851-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677000	GBGCR855-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677007	GBGCR862-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677012	GBGCR867-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677019	GBGCR874-15	Granada
<i>A. aeneus</i>	KP677010	GBGCR865-15	Granada
<i>A. aequatorialis</i>	JN112720	GBGC12162-13	Pichincha – Ecuador
<i>A. aequatorialis</i>	JN112721	GBGC12161-13	Pichincha – Ecuador
<i>A. agassizi</i>	JN112722	GBGC12160-13	Isla Gorgona – Colombia
<i>A. anatoloros</i>	JN112723	GBGC12159-13	Barinas – Venezuela
<i>A. anoriensis</i>	JN112736	GBGC12147-13	Antioquia – Colombia
<i>A. anoriensis</i>	JN112735	GBGC12148-13	Antioquia – Colombia
<i>A. anoriensis</i>	JN112734	GBGC12149-13	Antioquia – Colombia
<i>A. aquaticus</i>	KP100439	GBGCR880-15	No reportada
<i>A. bimaculatus</i>	JN112781	GBGC12102-13	San Cristobal y Nieves
<i>A. biporcatus</i>	KP100438	GBGCR881-15	No reportada
<i>A. boulengerianus</i>	KP231856	GBGCR886-15	México
<i>A. boulengerianus</i>	KP231855	GBGCR885-15	México
<i>A. boulengerianus</i>	KP231853	GBGCR884-15	México
<i>A. boulengerianus</i>	KP231800	GBGCR883-15	México
<i>A. boulengerianus</i>	KP231799	GBGCR882-15	México
<i>A. calimae</i>	JN112725	-	Valle del Cauca – Colombia
<i>A. calimae</i>	JN112724	GBGC12158-13	Valle del Cauca – Colombia
<i>A. capito</i>	KP975519	-	Darién – Panamá
<i>A. carlliebi</i>	KP231860	GBGCR888-15	México
<i>A. carlliebi</i>	KP231859	GBGCR887-15	México
<i>A. casildae</i>	JN112726	GBGC12157-13	Chiriquí – Panamá

<i>A. chloris</i> *	JN112727	GBGC12156-13	Pichinchá – Ecuador
<i>A. chloris</i> *	KP975524	-	Darién – Panamá
<i>A. chloris</i> *	JN112729	GBGC12154-13	Chocó – Colombia
<i>A. chloris</i> *	JN112728	GBGC12155-13	Esmeraldas – Ecuador
<i>A. cupreus</i>	JN112782	GBGC12101-13	Guanacaste – Costa Rica
<i>A. cupreus</i>	KP100437	GBGCR889-15	No reportada
<i>A. cuvieri</i>	JN112783	GBGC12100-13	Arecibo – Puerto Rico
<i>A. danieli</i>	JN112732	GBGC12151-13	Antioquia – Colombia
<i>A. danieli</i>	JN112733	GBGC12150-13	Antioquia – Colombia
<i>A. dunni</i>	KP231837	GBGCR903-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231841	GBGCR904-15	México
<i>A. dunni</i> *	KP231836	GBGCR902-15	México
<i>A. dunni</i> *	KP231831	GBGCR901-15	México
<i>A. dunni</i> *	KP231828	GBGCR899-15	México
<i>A. dunni</i> *	KP231827	GBGCR898-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231798	GBGCR894-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231797	GBGCR893-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231796	GBGCR892-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231781	GBGCR890-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231795	GBGCR891-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231824	GBGCR897-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231822	GBGCR895-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231830	GBGCR900-15	México
<i>A. dunni</i>	KP231823	GBGCR896-15	México
<i>A. equestris</i>	JN112784	GBGC12099-13	La Habana – Cuba
<i>A. euskalerruari</i>	JN112737	GBGC12146-13	Zulia – Venezuela
<i>A. euskalerruari</i>	JN112738	GBGC12145-13	Zulia – Venezuela
<i>A. extremus</i>	KU986314	EANAH782-12	No reportada
<i>A. extremus</i>	JN112739	GBGC12144-13	Castries – Santa Lucia
<i>A. festae</i>	JN112740	GBGC12143-13	Esmeraldas – Ecuador



<i>A. fitchi</i>	JN112742	GBGC12141-13	Tungurahua – Ecuador
<i>A. fitchi</i>	JN112741	GBGC12142-13	Napo – Ecuador
<i>A. fraseri</i>	JN112744	GBGC12139-13	Esmeraldas – Ecuador
<i>A. fraseri</i>	JN112743	GBGC12140-13	Pichinchá – Ecuador
<i>A. frenatus</i>	JN112745	GBGC12138-13	Chiriquí – Panamá
<i>A. frenatus</i>	JN112746	GBGC12137-13	Antioquia – Colombia
<i>A. frenatus</i>	KP975521	-	Darién – Panamá
<i>A. frenatus</i>	KP975527	-	Colón – Panamá
<i>A. frenatus</i> *	KP975522	-	Guna Yala – Panamá
<i>A. frenatus</i> *	KP975520	-	Panamá – Panamá
<i>A. frenatus</i> *	KP975518	-	Darién – Panamá
<i>A. frenatus</i> *	KP975515	-	Darién – Panamá
<i>A. gadovii</i>	KP231793	GBGCR908-15	México
<i>A. gadovii</i>	KP231784	GBGCR906-15	México
<i>A. gadovii</i>	KP231783	GBGCR905-15	México
<i>A. gadovii</i>	KP231792	GBGCR907-15	México
<i>A. gemmosus</i>	KJ854220	GBGCR311-15	Carchi – Ecuador
<i>A. gemmosus</i>	KJ854219	GBGCR310-15	Carchi – Ecuador
<i>A. gemmosus</i>	JN112748	GBGC12135-13	Pichinchá – Ecuador
<i>A. gemmosus</i>	JN112747	GBGC12136-13	Pichinchá – Ecuador
<i>A. griseus</i>	JN112749	GBGC12134-13	San Jorge – San Vicente y las Granadinas
<i>A. heterodermus</i>	JN112751	GBGC12132-13	Antioquia – Colombia
<i>A. heterodermus</i> *	JN112750	GBGC12133-13	Caldas – Colombia
<i>A. heterodermus</i> *	JN112752	GBGC12131-13	Huila – Colombia
<i>A. huilae</i>	JN112754	GBGC12129-13	Huila – Colombia
<i>A. huilae</i>	JN112753	GBGC12130-13	Huila – Colombia
<i>A. humilis</i> *	KP100433	GBGCR912-15	No reportada
<i>A. humilis</i> *	KP100432	GBGCR911-15	No reportada
<i>A. humilis</i> *	KP100431	GBGCR910-15	No reportada

<i>A. humilis</i> *	KP100430	GBGCR909-15	No reportada
<i>A. ibanezi</i>	JN112730	GBGC12153-13	Chocó – Colombia
<i>A. ibanezi</i>	JN112731	GBGC12152-13	Chocó – Colombia
<i>A. ibanezi</i>	KP975525	-	Darién – Panamá
<i>A. ibanezi</i>	KP975528	-	Darién – Panamá
<i>A. ibanezi</i>	KP975517	-	Darién – Panamá
<i>A. ibanezi</i>	KP975511	-	Panamá – Panamá
<i>A. immaculogularis</i>	KP231802	GBGCR914-15	México
<i>A. immaculogularis</i>	KP231801	GBGCR913-15	México
<i>A. immaculogularis</i>	KP231805	GBGCR916-15	México
<i>A. immaculogularis</i>	KP231804	GBGCR915-15	México
<i>A. inderenae</i>	JN112755	GBGC12128-13	Colombia
<i>A. insignis</i>	JN112756	GBGC12127-13	Chiriquí – Panamá
<i>A. jacare</i> *	JN112759	GBGC12124-13	Tachira – Venezuela
<i>A. jacare</i> *	JN112758	GBGC12125-13	Zulia – Venezuela
<i>A. jacare</i> *	JN112757	GBGC12126-13	Merida – Venezuela
<i>A. laeviventris</i>	KP100442	GBGCR917-15	No reportada
<i>A. latifrons</i>	KP975514	-	Darién – Panamá
<i>A. latifrons</i>	KP975513	-	Darién – Panamá
<i>A. lemuringus</i>	KP100434	GBGCR918-15	No reportada
<i>A. limifrons</i>	KP975523	-	Bocas del Toro – Panamá
<i>A. liogaster</i>	KP231790	GBGCR923-15	México
<i>A. liogaster</i>	KP231789	GBGCR922-15	México
<i>A. liogaster</i>	KP231788	GBGCR921-15	México
<i>A. liogaster</i>	KP231787	GBGCR920-15	México
<i>A. liogaster</i>	KP231786	GBGCR919-15	México
<i>A. luciae</i>	JN112760	GBGC12123-13	Castries – Santa Lucia
<i>A. lucius</i>	JN112785	GBGC12098-13	Cienfuegos – Cuba
<i>A. macrinii</i>	KP231858	GBGCR928-15	México
<i>A. macrinii</i>	KP231857	GBGCR927-15	México
<i>A. macrinii</i>	KP231807	GBGCR926-15	México
<i>A. macrinii</i>	KP231806	GBGCR925-15	México

<i>A. macrinii</i>	KP231803	GBGCR924-15	México
<i>A. maculigula</i>	JN112762	GBGC12121-13	Antioquia – Colombia
<i>A. maculigula</i>	JN112761	GBGC12122-13	Antioquia – Colombia
<i>A. marcanoii</i>	JN112786	GBGC12097-13	Peravia – República Dominicana
<i>A. marsupialis</i>	KP100429	GBGCR931-15	No reportada
<i>A. marsupialis</i>	KP100427	GBGCR929-15	No reportada
<i>A. marsupialis</i>	KP100428	GBGCR930-15	No reportada
<i>A. megapholidotus</i>	KP231829	GBGCR935-15	México
<i>A. megapholidotus</i>	KP231791	GBGCR934-15	México
<i>A. megapholidotus</i>	KP231785	GBGCR933-15	México
<i>A. megapholidotus</i>	KP231780	GBGCR932-15	México
<i>A. microlepidotus</i>	KP231847	GBGCR940-15	México
<i>A. microlepidotus</i>	KP231846	GBGCR939-15	México
<i>A. microlepidotus</i>	KP231826	GBGCR938-15	México
<i>A. microlepidotus</i>	KP231825	GBGCR937-15	México
<i>A. microlepidotus</i>	KP231821	GBGCR936-15	México
<i>A. microlepidotus</i>	KP231863	GBGCR941-15	México
<i>A. neblininus</i>	JN112763	GBGC12120-13	Amazonas – Venezuela
<i>A. nebuloides</i>	KP231843	GBGCR949-15	México
<i>A. nebuloides</i>	KP231842	GBGCR948-15	México
<i>A. nebuloides</i>	KP231818	GBGCR947-15	México
<i>A. nebuloides</i>	KP231817	GBGCR946-15	México
<i>A. nebuloides</i>	KP231816	GBGCR945-15	México
<i>A. nebuloides</i>	KP231815	GBGCR944-15	México
<i>A. nebuloides</i>	KP231814	GBGCR943-15	México
<i>A. nebuloides</i>	KP231813	GBGCR942-15	México
<i>A. nebuloides</i>	KP231844	GBGCR950-15	México
<i>A. nietoi</i>	KP231840	GBGCR957-15	México
<i>A. nietoi</i>	KP231839	GBGCR956-15	México
<i>A. nietoi</i>	KP231838	GBGCR955-15	México
<i>A. nietoi</i>	KP231835	GBGCR954-15	México
<i>A. nietoi</i>	KP231834	GBGCR953-15	México
<i>A. nietoi</i>	KP231833	GBGCR952-15	México
<i>A. nietoi</i>	KP231832	GBGCR951-15	México
<i>A. occultus</i>	JN112787	GBGC12096-	Humacao –

		13	Puerto Rico
<i>A. orcesi</i>	KU316041	-	No reportada
<i>A. otongae</i>	KJ854222	GBGCR263-15	Pinchicha – Ecuador
<i>A. otongae</i>	KJ854221	GBGCR262-15	Pinchicha – Ecuador
<i>A. peraccae</i>	JN112765	GBGC12118-13	Pinchicha – Ecuador
<i>A. peraccae</i>	JN112764	GBGC12119-13	Esmeraldas – Ecuador
<i>A. podocarpus</i>	JN112780	GBGC12103-13	Loja – Ecuador
<i>A. poei</i>	KJ854225	GBGCR327-15	Bolivar – Ecuador
<i>A. poei</i>	KJ854224	GBGCR326-15	Bolivar – Ecuador
<i>A. poei</i>	KJ854223	GBGCR325-15	Bolivar – Ecuador
<i>A. princeps</i>	JN112768	GBGC12115-13	Choco – Colombia
<i>A. princeps</i>	JN112767	GBGC12116-13	Los Ríos – Ecuador
<i>A. princeps</i>	JN112766	GBGC12117-13	Esmeraldas – Ecuador
<i>A. punctatus</i>	JN112769	GBGC12114-13	Amazonas – Venezuela
<i>A. quercorum</i>	KP231850	GBGCR961-15	México
<i>A. quercorum</i>	KP231849	GBGCR960-15	México
<i>A. quercorum</i>	KP231848	GBGCR959-15	México
<i>A. quercorum</i>	KP231845	GBGCR958-15	México
<i>A. quercorum</i>	KP231862	GBGCR966-15	México
<i>A. quercorum</i>	KP231861	GBGCR965-15	México
<i>A. quercorum</i>	KP231852	GBGCR963-15	México
<i>A. quercorum</i>	KP231854	GBGCR964-15	México
<i>A. quercorum</i>	KP231851	GBGCR962-15	México
<i>A. richardii</i>	JN112770	GBGC12113-13	San Jorge – Granada
<i>A. roquet</i>	JN112771	GBGC12112-13	Le Marin – Martinica
<i>A. sacamecatensis</i>	KP231869	GBGCR972-15	México
<i>A. sacamecatensis</i>	KP231868	GBGCR971-15	México
<i>A. sacamecatensis</i>	KP231867	GBGCR970-15	México
<i>A. sacamecatensis</i>	KP231866	GBGCR969-15	México
<i>A. sacamecatensis</i>	KP231865	GBGCR968-15	México

<i>A. sacamecatensis</i>	KP231864	GBGCR967-15	México
<i>A. sagrei</i>	KP100441	GBGCR973-15	No reportada
<i>A. smaragdinus</i>	JN112788	GBGC12095-13	Isla Bimini Sur – Bahamas
<i>A. stevepoei</i>	KP231810	GBGCR976-15	México
<i>A. stevepoei</i>	KP231809	GBGCR975-15	México
<i>A. stevepoei</i>	KP231808	GBGCR974-15	México
<i>A. subocularis</i>	KP231794	GBGCR980-15	México
<i>A. subocularis</i>	KP231782	GBGCR979-15	México
<i>A. subocularis</i>	KP231778	GBGCR977-15	México
<i>A. subocularis</i>	KP231779	GBGCR978-15	México
<i>A. taylori</i>	KP231777	GBGCR985-15	México
<i>A. taylori</i>	KP231776	GBGCR984-15	México
<i>A. taylori</i>	KP231775	GBGCR983-15	México
<i>A. taylori</i>	KP231774	GBGCR982-15	México
<i>A. taylori</i>	KP231773	GBGCR981-15	México
<i>A. tigrinus</i>	JN112772	GBGC12111-13	Vargas – Venezuela
<i>A. transversalis</i>	JN112773	GBGC12110-13	Orellana – Ecuador
<i>A. trinitatis</i>	JN112774	GBGC12109-13	San Jorge – San Vicente y las Granadinas
<i>A. tropidogaster*</i>	KP975526	-	Darién – Panamá
<i>A. tropidogaster*</i>	KP975512	-	Darién – Panamá
<i>A. vanzolinii</i>	JN112775	GBGC12108-13	Sucumbios – Ecuador
<i>A. ventrimaculatus</i>	JN112776	GBGC12107-13	Valle del Cauca – Colombia
<i>A. ventrimaculatus</i>	JN112777	GBGC12106-13	Valle del Cauca – Colombia
<i>A. woodi</i>	KP100440	GBGCR986-15	No repostada
<i>A. zapotecorum</i>	KP231820	GBGCR990-15	México
<i>A. zapotecorum</i>	KP231819	GBGCR989-15	México
<i>A. zapotecorum</i>	KP231812	GBGCR988-15	México
<i>A. zapotecorum</i>	KP231811	GBGCR987-15	México
<i>A. zeus</i>	KP100435	GBGCR991-15	No reportada
<i>A. zeus</i>	KP100436	GBGCR992-15	No reportada
<i>P. marmoratus*</i>	JN112789	GBGC12094-13	Pará – Brasil
<i>P. marmoratus*</i>	KY458395	-	Pará – Brasil
<i>P. marmoratus*</i>	KY458398	-	Pará – Brasil

**Anexo 4.** Listado de secuencias del gen COI de individuos colectados en campo y utilizadas en los cálculos de divergencia intra- e interespecifica y/o los análisis filogenéticos. Se muestra el código de campo y la localidad (municipio y departamento) de cada secuencias (\*). Todas las secuencias están por someter en Genbank.

<b>ESPECIE</b>	<b>CÓDIGO DE CAMPO</b>	<b>LOCALIDAD</b>
<i>A. heterodermus</i> *	MRC 236	Laguna de Pedro Palo, Cundinamarca
<i>A. heterodermus</i> *	MRC 296	El Pato, Valle del Cauca
<i>A. tropidogaster</i>	MRC 238	Falán, Tolima
<i>A. tropidogaster</i> *	MRC 239	Falán, Tolima
<i>A. tropidogaster</i>	MRC 240	Falán, Tolima
<i>A. tropidogaster</i>	MRC 241	Falán, Tolima
<i>A. tropidogaster</i>	TRO 002	Falán, Tolima
<i>A. tropidogaster</i> *	TRO 005	Yacopí, Cundinamarca

**Anexo 5.** Código de campo y localidad de las secuencias de *Anolis antonii*, *A. mariarum* y *A. tolimensis* en la matriz B utilizada para ejecutar el algoritmo ABGD y para la reconstrucción de árboles filogenéticos. Se indica en un mismo color las secuencias que pertenecen a un mismo grupo cuando el algoritmo ABGD encontró 10, 14 y 17 grupos. Todas las secuencias están por someter en Genbank.

<b>Especie</b>	<b>Accesión / Código campo</b>	<b>Localidad</b>	<b>10 grupos</b>	<b>14 grupos</b>	<b>17 grupos</b>
<i>A. mariarum</i>	JAV208	Anorí – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC084	Anorí – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC182	Carolina del Príncipe – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC187	Carolina del Príncipe – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC190	Carolina del Príncipe – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC192	Carolina del Príncipe – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MAR001	Carolina del Príncipe – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC194	Belmira – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC198	Belmira – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC200	Belmira – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC202	Belmira – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MAR009	Belmira – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MAR011	Belmira – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC207	Alto de San Miguel – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC209	Alto de San Miguel – Antioquia – Colombia			

<i>A. mariarum</i>	MRC211	Alto de San Miguel – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MRC215	Alto de San Miguel – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MAR019	Alto de San Miguel – Antioquia – Colombia			
<i>A. mariarum</i>	MAR022	Alto de San Miguel – Antioquia – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC216	Jericó – Antioquia – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC218	Jericó – Antioquia – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC223	Jericó – Antioquia – Colombia			
<i>A. antonii</i>	ANT007	Jericó – Antioquia – Colombia			
<i>A. antonii</i>	ANT009	Jericó – Antioquia – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC264	Tatamá – Risaralda – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC266	Tatamá – Risaralda – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC267	Tatamá – Risaralda – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC269	Tatamá – Risaralda – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC282	El Dorado – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC283	El Dorado – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC107	El Dorado – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC104	El Dorado – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC285	Laguna de Sonso – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC286	Laguna de Sonso – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC293	Laguna de Sonso – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC294	Laguna de Sonso – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	ANT026	Laguna de Sonso – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	ANT027	Laguna de Sonso –			



		Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	ANT030	Laguna de Sonso – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC098	La Minga – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC299	El Pato – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC300	El Pato – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC301	El Pato – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC302	El Pato – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC303	El Pato – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC328	El Pato – Valle del Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	ANT045	Cajibío – Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	ANT047	Cajibío – Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC284	Cajibío – Cauca – Colombia			
<i>A. antonii</i>	MRC348	Cajibío – Cauca – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	TOLN003	Falán – Tolima – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	MRC242	Falán – Tolima – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	MRC244	Falán – Tolima – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	TOL018	Falán – Tolima – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	TOL019	Falán – Tolima – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	TOLN004	Yacopí – Cundinamarca – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	MRC248	Caparrapí – Cundinamarca – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	MRC251	Sasaima – Cundinamarca – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	MRC254	Sasaima – Cundinamarca – Colombia			
<i>A. tolimensis</i>	MRC255	Sasaima –			

<i>A. tolimensis</i>	MRC256	Cundinamarca – Colombia Sasaima –			
<i>A. tolimensis</i>	TOL025	Cundinamarca – Colombia Sasaima –			
<i>A. tolimensis</i>	TOL028	Cundinamarca – Colombia Sasaima –			
<i>A. tolimensis</i>	MRC226	Cundinamarca – Colombia Laguna de Pedropalo –			
<i>A. tolimensis</i>	MRC227	Cundinamarca – Colombia Laguna de Pedropalo –			
<i>A. tolimensis</i>	MRC232	Cundinamarca – Colombia Laguna de Pedropalo –			
<i>A. tolimensis</i>	TOL001	Cundinamarca – Colombia Laguna de Pedropalo –			
<i>A. tolimensis</i>	TOL002	Cundinamarca – Colombia Laguna de Pedropalo –			