

1-1-2016

Caracterización tradicional y molecular del estatus taxonómico de individuos del orden Lepidóptera en una zona de Subpáramo del PNN Chingaza

Juan Diego Duque Zapata
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>

Citación recomendada

Duque Zapata, J. D. (2016). Caracterización tradicional y molecular del estatus taxonómico de individuos del orden Lepidóptera en una zona de Subpáramo del PNN Chingaza. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/13>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Caracterización tradicional y molecular del estatus taxonómico de individuos del orden
Lepidóptera en una zona de Subpáramo del PNN Chingaza

Juan Diego Duque Zapata



UNIVERSIDAD DE LA SALLE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
PREGRADO EN BIOLOGÍA
NOVIEMBRE, 2016

Caracterización tradicional y molecular del estatus taxonómico de individuos del orden
Lepidóptera en una zona de Subpáramo del PNN Chingaza

Juan Diego Duque Zapata

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo.

Tutora:

Astrid Muñoz Ortiz

Bióloga, PhD

Cotutora:

Adriana Vitolo López

Bióloga, MSc

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
PREGRADO EN BIOLOGÍA
NOVIEMBRE, 2016

Agradecimientos:

A mis padres y hermana por su apoyo y motivación para finalizar este proceso, a Astrid Muñoz Ortiz y Adriana Vitolo López por su compromiso y dedicación para llevar a cabo esta investigación, a Luis Ernesto Beltrán Forero, Lina María Tarazona, al Parque Nacional Natural Chingaza, a los funcionarios y guardabosques del Parque que me brindaron su ayuda y compañía en el desarrollo de la investigación en la fase de campo, a los laboratorios de la Universidad De La Salle, donde se realizaron los análisis de las muestras y al programa de biología de la Universidad De La Salle por su apoyo financiero en la secuenciación de las muestras.

Título: Caracterización tradicional y molecular del estatus taxonómico de individuos del orden Lepidóptera en una zona de Subpáramo del PNN Chingaza

Title:

Traditional and molecular taxonomic status characterization from Lepidoptera individuals of a subparamo region in the *Chingaza Natural National Park*

Juan Diego Duque Zapata

RESUMEN

La generación de planes de manejo y conservación de la biodiversidad, así como el monitoreo y medición de los cambios ambientales que la están transformando y modificando, son una prioridad principalmente en áreas o ecosistemas poco explorados. Como un primer paso a la solución de esta problemática es necesario conocer y catalogar la biodiversidad usando algún método de identificación taxonómica. Este trabajo determinó mediante el uso de taxonomía integrada el estatus taxonómico de individuos del orden Lepidóptera, en una zona poco estudiada como lo es el subpáramo. Los individuos fueron colectados en el área de subpáramo en tres diferentes rangos altitudinales cerca de la Quebrada Calostros en el Parque Nacional Natural Chingaza. Estos especímenes fueron identificados taxonómicamente por métodos tradicionales y moleculares (análisis de Barcoding). Adicionalmente se implementaron herramientas filogenéticas y el algoritmo ABGD para corroborar la taxonomía. Los individuos capturados fueron asignados a 10 géneros, siendo en un 95% individuos pertenecientes a lepidópteros nocturnos. En este estudio se registran para Colombia por primera vez el 70% de los géneros identificados en la base de datos BoldSystem. Los resultados

obtenidos por los diferentes métodos implementados: tradicionales, moleculares, filogenéticos y ABGD, fueron altamente coherentes y congruentes, demostrando que el uso de la taxonomía integrada conduce a una acertada identificación de los individuos.

PALABRAS CLAVE: Barcoding, Lepidóptera, Parque Nacional Natural Chingaza, subpáramo, taxonomía integrada.

ABSTRACT

Generation of management plans and biodiversity conservation, as well as the monitoring and measurement of environmental changes that are altering and modifying it, are a priority especially in areas or ecosystems not very well explored. A first step to solve these problems, is to know and to catalogue the biodiversity by means of a taxonomic identification method. The aim of this work was to use integrated taxonomy to determine the taxonomic status of individuals in the order Lepidoptera in a poorly studied area as it is the subparamo. The specimens were collected in the subparamo area at three different altitudinal ranges near to the Calostros watercourse in the Chingaza natural national park. Captured individuals were taxonomically identified by traditional and molecular methods (Barcoding analysis). Furthermore, phylogenetic tools and ABGD algorithm were implemented to corroborate the taxonomy. The capture individuals were assigned to 10 genera, where 95% of the individuals belonged to nocturnal Lepidoptera. This study registers for the first time 70% of the identified genera in the BoldSystem database for Colombia. The obtained results through the different implemented methods: traditional, molecular, phylogenetic and ABGD, were highly coherent and congruent, demonstrating that the use of integrated taxonomy leads to a precise identification of individuals.

KEY WORD: *Barcoding*, Chingaza Natural National Park, Lepidoptera, phylogeny, subpáramo, taxonomy.

INTRODUCCIÓN

El aumento acelerado en la pérdida de especies, ha priorizado la necesidad de conocer y catalogar la diversidad de los diferentes ecosistemas, como una línea base en el manejo y conservación de la biodiversidad (Costello *et al.*, 2013), así como en el monitoreo y medición de los cambios ambientales que están transformando y modificando la vida en el planeta (Costello *et al.*, 2013; Hebert *et al.*, 2003). Dadas estas necesidades, es fundamental hacer uso de las herramientas ofrecidas por la Taxonomía, entendida como el área de la Ciencia que busca clasificar la biodiversidad y establecer parámetros que permitan diferenciar a los organismos y agruparlos en diferentes categorías (por ejemplo: familias, géneros, especies). El sistema taxonómico tradicional fue propuesto por el botánico Carl Nilsson Linnæus en 1758 y se basa principalmente en la clasificación de los individuos a partir de sus características morfológicas (Linnæus, 1758; Guerra *et al.*, 2008). Aunque el sistema de Linneo se ha mantenido dado que es altamente acertado, se han detectado dificultades a la hora de implementarlo en organismos pertenecientes a especies crípticas, en las cuales los caracteres morfológicos son muy similares o casi idénticos (Mayr, 1942). En estos casos, el uso de claves o guías de identificación y clasificación tradicional (bajo el método del sistema taxonómico Linneano) es poco apropiado, dado que conduce a identificaciones inadecuadas (Laurito *et al.*, 2013), como las reportadas en especies de Lepidóptera (Hebert *et al.*, 2004), *Hymenoptera* (Bickford *et al.*, 2007) y Díptera (Foster *et al.*, 2013). Adicionalmente a la dificultad de clasificar organismos de especies crípticas, el uso y aplicación del método del sistema de tradicional, requiere un alto nivel de experiencia y conocimiento en el grupo de estudio,

lo que en algunos casos limita la identificación taxonómica por este método (Hebert *et al.*, 2003).

En la actualidad, la oferta de nuevas herramientas y métodos para el análisis de otro tipo de caracteres, como los moleculares, han fortalecido y complementado la identificación y clasificación de las especies (Medellin, 1988; Hebert *et al.*, 2003). Uno de los métodos moleculares más usados en la última década para facilitar el reconocimiento e identificación de especies es el denominado *Barcoding* (Sourakov and Zakharov, 2011; Web *et al.*, 2012) Este método ha sido implementado como parte de la ejecución del proyecto mundial *Barcode of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>), el cual es una iniciativa internacional que promueve el uso de secuencias cortas del genoma, llamadas códigos de barras de ADN y que están presentes en todos los organismos, para establecer un catálogo de la biodiversidad (Hebert *et al.*, 2003). La implementación de los códigos de barras tiene el potencial para reconocer, descubrir y describir especies, buscando y asignando a una muestra desconocida, una especie o estatus taxonómico que se encuentre dentro de este catálogo o base de datos. Uno de estos códigos de barras es un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I - COI (Hebert *et al.*, 2003), el cual hace parte del conjunto de marcadores moleculares incluidos en el proyecto código de barras de ADN (Hajibabaei *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2009). Este fragmento del gen COI está presente en más del 95% de las especies de animales descritas hasta el momento y es lo suficientemente variable para establecer diferencias entre especies (Hajibabaei *et al.*, 2006), convirtiéndose en uno de los códigos de barras más utilizado para la identificación molecular en animales (Hebert *et al.*, 2003). Este método ha aportado a la identificación de especies, como lo refleja un estudio en aves donde 60 parejas de especies hermanas provenientes de 10 ordenes diferentes, fueron correctamente identificadas y

asignadas por el método *Barcoding* implementado el marcador *Barcode* COI (Tavares and Baker, 2008). En insectos se ha evaluado la eficiencia de este método para la identificación taxonómica y se demostró que de 521 especies nominales analizadas, el 97.9% de ellas reflejaron una secuencia *Barcode* distintiva, lo que contribuyó a su correcta identificación taxonómica (Hajibabaei *et al.*, 2006). La eficiencia de este método ha sido evaluada también en vertebrados como peces, en los cuales el método *Barcoding* reconoce e identifica adecuadamente el 98% y 93% de las especies descritas de peces marinos y de agua dulce, respectivamente (Ward *et al.*, 2009).

Sin embargo, así como el método tradicional para la identificación y clasificación taxonómica presenta dificultades, los métodos moleculares como *Barcoding* también las exhiben. Una de ellas está asociada a que para que este método sea altamente efectivo en la identificación taxonómica, la secuencia de algún individuo de la especie de estudio debe estar registrada en las base de datos adscritas al proyecto *Barcode of Life* (Meyer and Paulay, 2005), otra dificultad está asociada en su eficiencia para reconocer especies en las cuales eventos recientes como hibridación, introgresión y radiación adaptativa han ocurrido (Ward *et al.*, 2009). Para poder disminuir las dificultades de cada método y de esta manera lograr una buena identificación taxonómica, algunos investigadores sugieren realizar estudios de taxonomía integrada, la cual se puede entender como la unión de diferentes tipos de datos, resultados y métodos para la identificación taxonómica de especies, optimizando las ventajas de cada método utilizado, llevando así a una mayor y mejor aproximación a la realidad taxonómica (Dayrat, 2005). Adicionalmente, complementar los métodos de identificación taxonómica (tradicional y molecular) con herramientas filogenéticas puede contribuir al conocimiento de la diversidad y clasificación taxonómica de los organismos. Esto fue demostrado por Hajibabaei *et al.* en

2006, donde se encontraron cinco casos de insectos que poseían especies crípticas (morfológicamente similares), que fueron visualizadas y asignadas con precisión a su agrupación respectiva al realizar un árbol filogenético con sus secuencias *Barcode* (Hajibabaei *et al.*, 2006).

En Colombia, uno de los ecosistemas que posee pocos registros sobre su biodiversidad es el páramo (Greenpeace, 2009), siendo así un excelente ecosistema candidato para la implementación de taxonomía integrada. Este ecosistema es reconocido por ser corredor biológico de diferentes especies y por ser un importante proveedor de servicios ecosistémicos hídricos (Holzenthal and Flint, 1995). Una de las principales características que posee, es que muchas de sus especies tienen un alto grado de endemismo dadas las adaptaciones específicas que han desarrollado para sobrevivir en este hábitat (Hedberg, 1992; Dirnböck *et al.*, 2011). Sin embargo, diferentes actividades antropogénicas así como cambios ambientales han provocado transformaciones en las condiciones iniciales del páramo, generando cambios en el área de distribución de algunas de las especies y en algunos casos un incremento en el riesgo de extinción de algunas de ellas (Greenpeace, 2009). Una vía para entender el grado e impacto de los cambios ambientales sobre estos ecosistemas tropicales, es el estudio de grupos de organismos altamente sensibles a estas transformaciones de los ecosistemas como lo son los Lepidópteros (Yáñez, 2008).

El orden Lepidoptera posee una alta diversidad a nivel mundial, mucha de ella desconocida en el Neotrópico y con una gran cantidad de casos propuestos como especies crípticas, dificultando su identificación y clasificación taxonómica (Hebert *et al.*, 2004; Friberg *et al.*, 2008), características que lo convierten en un grupo ideal para la implementación del método *Barcoding* y del sistema de taxonomía integrada (Hebert *et*

al., 2004; Liu *et al.*, 2014). El uso de este método en Lepidóptera, ha permitido asignar un *Barcode* específico al 98% de individuos estudiados de la familia Geometridae en el estado de Bavaria, Alemania (Hausmann *et al.*, 2011). En los Andes tropicales, esta herramienta junto con nueva información morfológica, permitió identificar una especie y dos subespecies nuevas del género *Adelpha* (Willmott and Hall, 2013). El método *Barcoding* también fue implementado en colecciones de Lepidóptera del *Royal Museum for Central Africa* en donde para la familia *Lymantriidae* se demostró que este método es capaz de distinguir especies sin importar el deterioro físico de la muestra. En el mismo estudio se demostró que el carácter usado como diagnóstico morfológico entre *Stracena promelaena* y *Stracena flavescens*, es poco confiable ya que especímenes de estas dos especies presentaron la misma secuencia *Barcode* (Nagy *et al.*, 2010).

Aunque Colombia es reconocido como el segundo país con mayor número de lepidópteros a nivel mundial (Rangel, 2005), en algunos hábitats como el páramo se desconoce mucho de las especies que los habitan (Andrade y Álvarez, 2000). Esta investigación busca no solo demostrar y evaluar la utilidad de la taxonómica integrada para la determinación del estatus taxonómico de individuos del orden Lepidóptera, sino también contribuir al conocimiento de la biodiversidad en una zona de subpáramo del Parque Nacional Natural Chingaza.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

La colecta de individuos del Orden Lepidóptera se llevó a cabo en el Parque Nacional Natural Chingaza (PNN Chingaza;) en el sector de la quebrada Calostros (4°39' N, 73°52'

W), durante 8 días de los meses de julio de 2014 y de junio de 2015. Se designaron tres zonas de muestreo en el área de subpáramo que comprenden diferentes rangos altitudinales: zona 1 (3000 - 3200 m s. n. m.), zona 2 (3200 - 3400 m s. n. m.) y zona 3 (3400 - 3700 m s. n. m.).

COLECTA Y PRESERVACIÓN

La captura y colecta de los individuos de Lepidóptera se realizó con trampas Van Someren-Rydon diariamente. En cada uno de las zonas de muestreo se ubicaron seis trampas adaptadas con luz LED, de forma aleatoria para cubrir cada uno de los rangos altitudinales. El tórax de los individuos colectados se preservó en alcohol absoluto para su posterior análisis molecular, mientras que las alas fueron guardadas en sobres de papel milano para su posterior identificación, clasificación e ingreso a la colección de Lepidóptera del Museo La Salle.

CARACTERIZACIÓN DEL ESTATUS TAXONÓMICO

Caracterización a nivel morfológico

La identificación tradicional de los ejemplares se realizó con base en la consulta de las guías de identificación taxonómica: *Borror and Delong's Introduction to the study of Insects* (Triplehorn and Johnson, 2005), la guía: *Los insectos de África y de América Tropical, Clave para la identificación de las Principales Familias* (Delvare et al., 1989), así como la clave pictórica *Manuales de identificación: Mariposas diurnas y nocturnas* (Carter, 1993). Adicionalmente, las alas de los especímenes fueron fotografiadas en el Museo La Salle con una cámara Nixon D7000.

Caracterización a nivel molecular

El ADN genómico de los individuos colectados fue aislado usando el kit comercial DNesy (QIAGEN, Inc.). Posteriormente, se amplificó el segmento *Barcode* del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) con la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con los *primers* degenerados: LCO1490 (5'–GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG–3') y HCO2198 (5'–TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA–3') (Altschul *et al.*, 1997; Meyer and Paulay, 2005). La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 30µL que incluían 12.8µL de agua, 6µL de buffer 6X, 3µL de dNTPs 10µM, 3µL de cloruro de magnesio (MgCl₂) 25µM, 1.5µL de cada uno de los *primers* 10µM, 0.2µL de Taq polimerasa y 2µL de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por dos minutos, 34 ciclos de anillamiento a 94°C por 40s (segundos), 48°C por 30s, 72°C por un minuto y finalmente un período de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron enviados para limpieza y secuenciación con el método Sanger a los laboratorios de Macrogen, Corea (<http://www.macrogen.com/>).

Las secuencias se limpiaron y editaron con el software GENEIOUS versión 9.1.4 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012) y se alinearon inicialmente con el software MUSCLE (<http://www.drive5.com/muscle/>); Edgar, 2004) con una revisión posterior al ojo, que busco verificar el alineamiento realizando la traducción ADN a proteína de las secuencias alineadas. Posteriormente, cada secuencia fue comparada con las secuencias disponibles en dos bases de datos. La primera base fue la asociada al proyecto *Barcode* denominada *BoldSystem* (<http://www.BoldSystems.org/>), en esta plataforma se escogió la opción comparar con *All Barcodes Record Database* la cual hace la comparación con todas las secuencias COI disponibles en la base. Por otro lado,

las secuencias fueron comparadas también con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (Genbank-NCBI), empleando el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* -BLAST (Altschul *et al.*, 1990) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), en esta plataforma se escogió la opción de comparar con *Nucleotide collection* y se realizó un MegaBlast, posteriormente se empleó como criterio de escogencia el porcentaje más alto de identidad (columna *Ident*). Para cada descripción taxonómica obtenida, se realizó la búsqueda fotográfica en la base de datos *BoldSystem* con la que se realizó una comparación y corroboración fotográfica de los individuos colectados.

Las secuencias fueron cargadas y depositadas en un proyecto de la base de datos de *Barcode* (<http://www.BoldSystems.org/>) bajo el nombre de: *Butterflies of Colombia* con las siglas MDC, los ejemplares en esta base de datos son encontrados con los números de identificación (ID): MDC001-16 a MDC020-16.

Adicionalmente, se implementó el Algoritmo *ABGD Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation* (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>), el cual asigna dentro de grupos hipotéticos (potenciales especies) a las muestras de un alineamiento, estimando un “*Barcode gap*” en la distribución de diferencias por pares o *pairwise differences*. Los siguientes parámetros fueron tomados en cuenta para la implementación de este método: valor máximo de divergencia intraespecífica entre 0.001 y 0.1 con 10 pasos recursivos dentro de la partición primaria y un ancho de gap de 1.0 (Guarnizo *et al.*, 2015). Como modelo de sustitución nucleotídica se usó Kimura dos parámetros (K2P), este parámetro junto con los anteriores fueron escogidos a partir de revisiones en estudios previos, en donde se propone que su implementación permite una agrupación acertada y congruente con la clasificación taxonómica (Guarnizo *et al.*, 2015)

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para el análisis filogenético, un individuo de *Leptinotarsa decemlineata* fue empleado como *outgroup* o grupo ajeno (código Genbank: KM450707), el *outgroup* fue escogido utilizando los datos obtenidos en la identificación taxonómica, y pertenece a un orden diferente a lepidóptera, pero a la misma clase taxonómica. El análisis consistió en una reconstrucción filogenética, empleando las secuencias objeto de estudio, bajo los criterios de máxima verosimilitud (ML) y máxima parsimonia (MP). Para la reconstrucción del árbol ML se utilizó el modelo evolutivo *General Time Reversible* (GTR + G), este modelo presento el mejor valor bajo el criterio de información bayesiana (BIC) en la prueba de selección del modelo evolutivo, implementada en el programa jModelTest 2.1 (Darriba *et al.*, 2011). Los siguientes parámetros fueron tomados en cuenta para la reconstrucción del árbol con el algoritmo ML: una distribución gamma así como una eliminación completa de los *gaps*, como método heurístico se implementó el *Nearest Neighbor Interchange* (NNI) junto con un Neighbor- Joining como árbol inicial, finalmente no se utilizó ningún filtro para el intercambio de ramas. Los parámetros usados en el árbol MP fueron: una eliminación completa de los *gaps* así como el método de búsqueda *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR), 10 árboles iniciales con un valor de uno como nivel de búsqueda, el número máximo de árboles para retener fue de 100. Para cada reconstrucción del árbol se realizaron 1000 repeticiones *bootstrap* para asegurar una mayor fiabilidad en los nodos creados. Las reconstrucciones se hicieron con ayuda del programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

RESULTADOS

Un total de 25 individuos fueron colectados y analizados en este trabajo. Se observó que a medida que aumentaba la altitud, la cantidad de individuos disminuía, capturándose 15 individuos en la zona uno (más baja elevación), nueve en la zona dos (elevación intermedia) y uno en la zona tres (más alta elevación).

Los ejemplares fueron debidamente montados, etiquetados e ingresados a la colección de Lepidóptera del Museo La Salle bajo los números de identificación ID: MLS 50676 a MLS 50689 (Tabla 1). De los 25 individuos colectados, 14 fueron aceptados para ser ingresados a la colección del Museo La Salle, los demás no ingresaron dado el mal estado en el que se encontraban.

Tabla 1. Identificación taxonómica con los métodos tradicional y molecular. Se muestra los números de identificación (ID) para cada individuo en la base del colector, la colección Lepidóptera del Museo La Salle y en la base de datos de *BoldSystem*. El estatus taxonómico descrito en el método molecular fue el establecido bajo el criterio de porcentajes de similitud o identidad mayores a 95%. La sigla NA hace referencia a no asignado.

Número de identificación (ID)			Métodos de clasificación	
Colector	Museo La Salle	<i>BoldSystem</i>	Tradicional	Molecular
JDN 1	MLS 50681	MDC003-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Agylla</i>

JDN 2	MLS 50680	MDC004-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Eupithecia</i>
JDN 3	MLS 50687	MDC005-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Megalopyge</i>
JDN 4	NA	MDC006-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 5	MLS 50689	MDC007-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 6	MLS 50685	MDC008-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Dargida</i>
JDN 7	MLS 50684	MDC009-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Isochromodes</i>
JDN 8	MLS 50683	MDC010-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Lomographa</i>
JDN 9	NA	MDC011-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Lomographa</i>
JDN 10	NA	MDC012-16	Familia: Erebidae	Género: <i>Lophocampa</i>
JDN 11	MLS 50679	MDC013-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Eupithecia</i>
JDN 12	NA	MDC014-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 13	NA	NA	Género: <i>Agylla</i>	NA

JDN 14	NA	MDC015-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 15	MLS 50676	MDC001-16	Familia: Saturniidae	Género: <i>Meroleuca</i>
JDN 16	MLS 50686	MDC016-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Megalopyge</i>
JDN 17	MLS 50682	MDC017-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Aragua</i>
JDN 18	MLS 50688	MDC018-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Isochromodes</i>
JDN 19	NA	MDC019-16	Orden: Lepidóptera	Género: <i>Podanotum</i>
JDN 20	MLS 50677	MDC002-16	Familia: Saturniidae	Género: <i>Meroleuca</i>
JDN 21	MLS 50675	MDC020-16	Familia: Saturniidae	Género: <i>Meroleuca</i>
JDN 22	NA	NA	Género: <i>Agylla</i>	NA
JDN 23	NA	NA	Orden: Lepidóptera	NA
JDN 24	NA	NA	Género: <i>Agylla</i>	NA
JDN 25	NA	NA	Orden: Lepidóptera	NA

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA TRADICIONAL Y MOLECULAR

El método tradicional permitió identificar cuatro de los especímenes hasta el nivel de Familia, tres hasta nivel de género y los otros fueron catalogados hasta el Orden Lepidóptera (Tabla 1), haciendo evidente la dificultad para identificar especímenes con el uso de claves taxonómicas. Por otro lado, en 20 de los 25 individuos colectados fue posible implementar el método de caracterización molecular, amplificando el segmento de gen COI con un tamaño de 658 pb.

Al contrastar las secuencias de los individuos colectados con las almacenadas en las bases de datos *BoldSystem* y NCBI, en ninguna de ellas se obtuvo 100% de similitud o identidad (Tabla 2). Esta observación evidencia que la información molecular para estos grupos taxonómicos no ha sido cargada previamente a estas diferentes plataformas.

En la base de datos de NCBI, algunos individuos obtuvieron dos resultados diferentes es decir dos especies diferentes con idéntico porcentaje de similitud, así mismo se observa que algunos individuos también tuvieron resultados diferentes en ambas bases de datos (Tabla 2). En este estudio, el criterio para determinar cuál de los resultados para cada espécimen era el más acertado fue la comparación fotográfica entre los individuos capturados y las fotografías de la base de datos de *BoldSystem* (estos son los resultados mostrados en la Tabla 1).

Tabla 2. Comparación de las secuencias de estudio con las bases de datos y agrupación asignada por el análisis de ABGD. En la columna de la base de datos de NCBI, se muestran los resultados diferentes con porcentaje idéntico de similitud. En la última columna se muestra los 11 grupos obtenidos por el análisis ABGD, en donde cada letra indica una agrupación distinta (A- K). La sigla NA hace referencia a no asignado.

ID	Base de datos de <i>BoldSystem</i>			Base de datos de NCBI			Grupo- ABGD
	Genero	Especie	Similitud (%)	Genero	Especie	Similitud (%)	
JDN1	<i>Agylla</i>	NA	93.18	<i>Agylla</i>	NA	91.00	A
				<i>Apistosia</i>	<i>A. judas</i>	91.00	
JDN12	<i>Agylla</i>	NA	93.88	<i>Apistosia</i>	<i>A. judas</i>	92.00	A
JDN14	<i>Agylla</i>	NA	94.19	<i>Apistosia</i>	<i>A. judas</i>	92.00	A
JDN4	<i>Agylla</i>	NA	94.19	<i>Apistosia</i>	<i>A. judas</i>	92.00	A
JDN5	<i>Agylla</i>	NA	97.25	<i>Agylla</i>	NA	94.00	D
JDN2	<i>Eupithecia</i>	NA	93.27	<i>Eupithecia</i>	NA	93.00	B
JDN11	<i>Eupithecia</i>	NA	93.43	<i>Eupithecia</i>	NA	93.00	B
JDN3	<i>Megalopyge</i>	NA	90.67	<i>Megalopyge</i>	NA	90.00	C
JDN16	<i>Megalopyge</i>	NA	91.00	<i>Megalopyge</i>	NA	93.00	C
JDN6	<i>Dargida</i>	<i>D. pyrosoma</i>	96.18	<i>Anarta</i>	<i>A. myrtilli</i>	96.00	E
JDN7	<i>Isochromodes</i>	NA	96.64	<i>Isochromodes</i>	NA	96.00	F

JDN18	<i>Isochromodes</i>	NA	96.48	<i>Isochromodes</i>	NA	96.00	F
JDN8	<i>Lomographa</i>	NA	96.33	<i>Lomographa</i>	NA	96.00	G
JDN9	<i>Lomographa</i>	NA	97.25	<i>Lomographa</i>	NA	97.00	G
JDN10	<i>Lophocampa</i>	<i>L. hyalinipuncta</i>	98.17	<i>Lophocampa</i>	<i>L. griseidorsata</i>	95.00	H
JDN15	<i>Meroleuca</i>	NA	99.54	<i>Meroleuca</i>	<i>M. carpishiana</i>	90.00	I
				<i>Gamelia</i>	<i>G. remissoides</i>	90.00	
JDN20	<i>Meroleuca</i>	NA	99.39	<i>Meroleuca</i>	<i>M. carpishiana</i>	90.00	I
JDN21	<i>Meroleuca</i>	NA	99.39	<i>Meroleuca</i>	<i>M. carpishiana</i>	90.00	I
				<i>Meroleuca</i>	<i>M. nievasiana</i>	90.00	
JDN17	<i>Aragua</i>	<i>A. bistonaria</i>	96.31	<i>Aragua</i>	<i>A. bistonaria</i>	96.00	J
JDN19	<i>Podanotum</i>	<i>P. vanewrighti</i>	99.85	<i>Symbiopsis</i>	<i>S. tanais</i>	95.00	K
				<i>Callophrys</i>	<i>C. polios</i>	95.00	

Las comparaciones realizadas con la base de datos de *BoldSystem*, permitieron identificar 16 de las secuencias hasta el nivel de Género y 4 secuencias hasta el nivel de Especie. Por otra parte, en la base de NCBI se lograron identificar 9 de las secuencias hasta el nivel de Género y 11 secuencias hasta el nivel de especie (Tabla 2), haciendo en este punto más eficiente en la identificación taxonómica por comparación a la base de NCBI.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por ambos métodos: tradicional y molecular, podemos concluir que los organismos de Lepidóptera colectados en este estudio tuvieron la siguiente distribución: en la zona uno, más cercana al bosque montano, se encontraron individuos pertenecientes a los géneros *Agylla*, *Aragua*, *Dargida*, *Isochromodes*, *Lomographa*, *Meroleuca* y *Podanotum*; en la zona dos (altitud intermedia) individuos pertenecientes a los géneros *Agylla*, *Eupithecia*, *Isochromodes*, *Lophocampa*, *Megalopyge* y *Meroleuca*. Finalmente, el individuo capturado en la zona tres (mayor altitud), es perteneciente al género *Agylla*, siendo este último género el que se encontró en las tres zonas de muestreo.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los árboles filogenéticos consenso obtenidos por ambos criterios, ML (Fig.1) y MP (Anexo 1) para los 20 individuos del orden lepidóptera secuenciados, mostraron una gran similitud en las relaciones entre los clados, siendo idénticos en el caso de los géneros: *Agylla*, *Eupithecia*, *Isochromodes*, *Lomographa*, *Lophocampa*, *Megalopyge* y *Meroleuca*. Así mismo en casos como *Agylla* y *Meroleuca* se observa que sus miembros no poseen secuencias idénticas, sugiriendo que aunque los individuos son del mismo género, podrían ser de especies diferentes o poseer alta variación intraespecífica. Los valores del consenso *bootstrap* mostrados en los árboles de ML y MP, pueden ser

considerados como confiables ya que la mayoría de los soportes sobrepasan el 50% (Holmes, 2003).

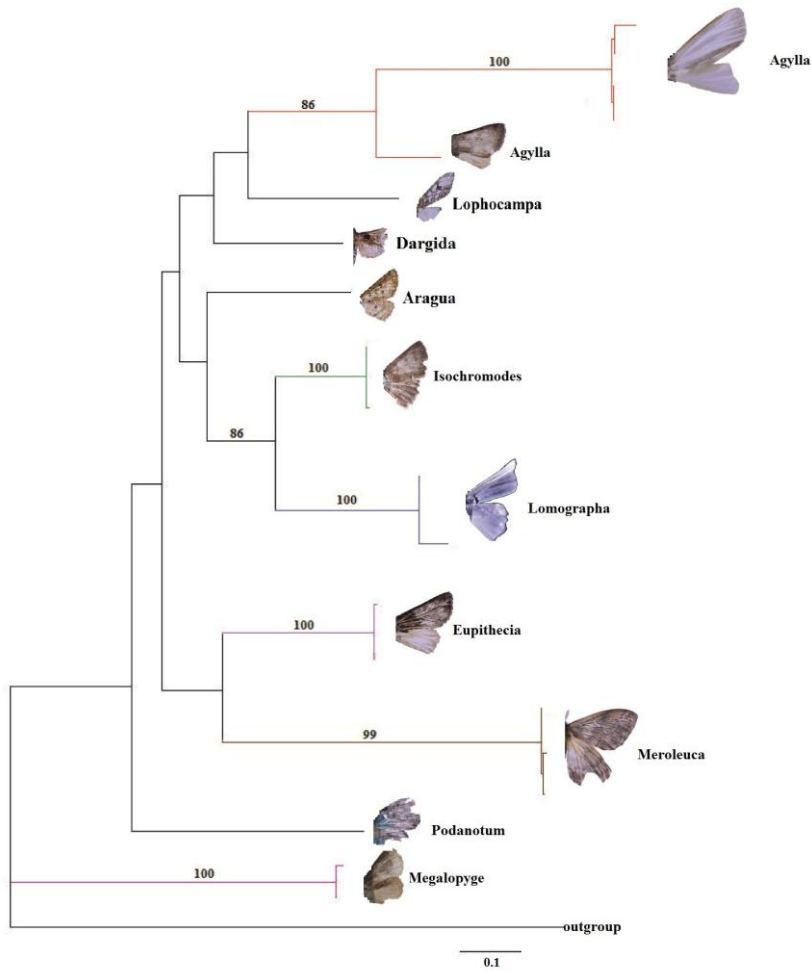


Figura 1: Filogenia consenso bajo el criterio de Máxima Verosimilitud para el fragmento *Barcode* COI. Los números sobre las ramas son los soportes de *bootstrap* mayores a 50%. Los nombres corresponden a los géneros identificados a través del método molecular *Barcoding*.

Resultados más detallados permiten observar las relaciones filogenéticas de los individuos de Lepidóptera colectados, como es el caso de los individuos asignados a los géneros *Isochromodes* y *Lomographa* los cuales tienen un alto soporte de *bootstrap* y confirman su alta relación como miembros de la familia Geometridae (Fig. 1 y Anexo 1).

Los árboles obtenidos por ML y MP fueron congruentes con los resultados obtenidos a partir de las identificaciones taxonómicas tradicionales y moleculares, ya que los grupos formados en cada árbol reflejan los asignados con la identificación taxonómica, como es el caso de *Agylla*, en la cual cinco individuos fueron asignados a este género, y estos mismos individuos aparecen altamente relacionados en los árboles (Fig. 1 y Anexo 1).

DELIMITACIÓN DE ESPECIES BAJO EL ALGORITMO ABGD

Los resultados del análisis con ABGD arrojaron 11 diferentes “grupos” hipotéticos, ya que el algoritmo estableció que las secuencias de los individuos colectados podían ser agrupadas dentro de 11 *clusters* (Fig. 2 y Tabla 2).

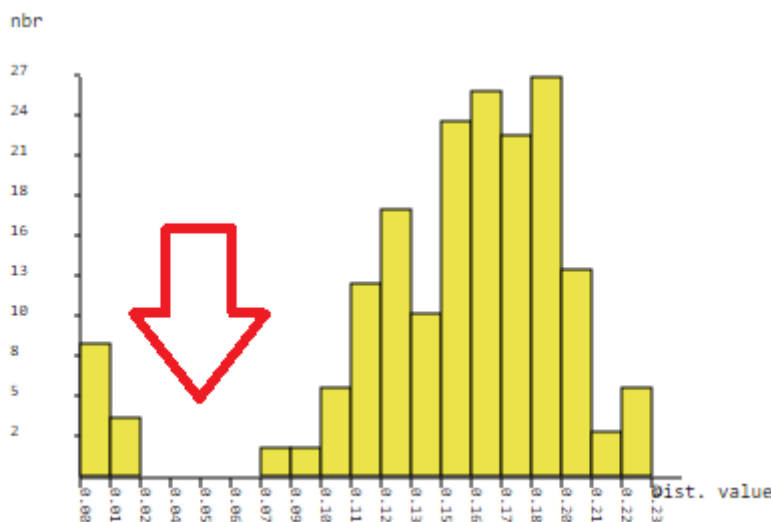


Figura 2: Histograma de la distribución distancia genética entre parejas comparando todas las muestras. Frecuencia de los valores de distancia por pares de

secuencias COI. La flecha indica el *gap* o umbral seleccionado como separación de la variación genética dentro de las especies y la divergencia entre las especies. Esta grafica fue realizada por ABGD online:

<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>

Los *clusters* determinados por ABGD muestran una alta congruencia con la identificación taxonómica, en la cual los 10 géneros establecidos por esta última corresponden a 10 de los *clusters* de ABGD (Tablas 1 y 2). El *cluster* extra en ABGD, grupo D, fue clasificado dentro del género *Agylla* en la identificación taxonómica y en los arboles filogenéticos es el menos relacionado con los individuos del mismo género, sugiriendo que para el género *Agylla* hay individuos de más de una especie.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los registros de captura en las diferentes zonas, la disminución en la cantidad de individuos dependiendo la elevación en la que se encuentran, sugiere de manera exploratoria, que en el subpáramo la abundancia de individuos del Orden Lepidóptera se ve afectada por cambios en la altitud, tendiendo a disminuir a medida que se asciende en el gradiente altitudinal. Este mismo patrón ha sido observado en estudios realizados en Lepidópteros en las regiones de Norte de Santander (Carrero *et al.*, 2013) y Llanos Orientales (Fraija y Medina, 2006). Este cambio en la diversidad puede estar asociado a la alta especificidad de este Orden hacia sus plantas nutricias, que pueden variar según el gradiente altitudinal (Carrero *et al.*, 2013). Para este caso, la zona uno de muestreo posee conectividad con fragmentos de bosque, la cual disminuye gradualmente

a medida que se asciende en el gradiente hasta llegar a la zona tres donde la vegetación predominante es compuesta por frailejones enanos. Por otro lado, algunos de los géneros identificados dentro de los individuos analizados no habían sido reportados en el rango altitudinal descrito en este estudio, este es el caso de *Agylla*, la cual había sido reportada en gradientes altitudinales entre los 1400 y 2000 m s. n. m. (Muñoz y Amarillo, 2010) y en este estudio, *Agylla* fue el género encontrado en las tres zonas de muestreo entre 3000-3600 m s. n. m.; el género *Dargida* ha sido reportado a unos 2560 m s. n. m. (Rodríguez y Angulo, 2005), en este estudio se encontró entre los 3000-3200 m s. n. m.; los géneros *Isochromodes* y *Lomographa* registrados entre los 1950-2005 m s. n. m. (Brehm and Fiedler, 2005), acá fueron encontrados entre los 3000 - 3200 m s. n. m. Estas observaciones preliminares sugieren que el rango de distribución de estos géneros se ha movido o extendido a mayores elevaciones.

Así mismo, estudios previos sobre la diversidad de Lepidópteros en el páramo, afirman que la familia más abundante es la Nymphalidae (Montero y Ortiz 2013; Andrade y Álvarez, 2000), en contraste, los resultados de este estudio no asignaron ningún individuo a esta familia. Esta observación pudo deberse al método de colecta, dado que los estudios previos se enfocaron en la diversidad de lepidópteros diurnos, usando como método de muestro principal jamas entomológicas, mientras que en esta investigación dado que las trampas eran de luz, la mayoría de individuos capturados fueron lepidópteros nocturnos (95% del total de individuos analizados).

Al implementar los métodos de identificación taxonómica, el 16% de los individuos capturados pudieron ser identificados por medio del método tradicional hasta familia (Tabla 1). La falta de precisión en la implementación de este método, pudo deberse a que en el momento de la identificación tradicional la mayoría de individuos solo contaban con

sus pares de alas, impidiendo que caracteres de identificación morfológicos como antenas o tórax pudieran ser tomados en cuenta. Adicionalmente, la coloración de las alas se va perdiendo gradualmente en el estado adulto de los lepidópteros (Nagy *et al.*, 2010), lo que genera que el uso de claves pictóricas no siempre sea de gran ayuda. Finalmente, las guías de identificación usan un lenguaje técnico al referirse a caracteres, formas o coloraciones, lo que impidió o dificultó identificar de mejor manera a los individuos.

Por otra parte, todas las secuencias analizadas en las bases de datos *BoldSystem* y NCBI lograron ser identificadas taxonómicamente hasta un nivel mínimo de género, lo que demuestra que el uso de herramientas y metodologías con datos moleculares como el *Barcode* fueron más rápidas y eficientes para la identificación taxonómica de los individuos en este estudio. Sin embargo, ninguna secuencia obtuvo un 100% de similitud o identidad con las registradas en las dos bases de datos, incluso ocho de estas, pertenecientes a los géneros *Agylla*, *Eupithecia* y *Megalopyge*, obtuvieron un bajo porcentaje de similitud (<95%) (Romero y Ramirez, 2011). La falta de identidad o similitud en un 100% deja en manifiesto no solo que aún las bases de datos se encuentran incompletas y que sus resultados están sujetos a la información que previamente ha sido cargada en ellas (Meyer and Paulay, 2005), sino que también es necesario aumentar el esfuerzo por el estudio de estos géneros en el páramo Colombiano y en la diversidad de lepidópteros en general del país. Adicionalmente, en la base *BoldSystem* algunos de los géneros asignados son por primera vez reportados para Colombia, como el género *Agylla*, *Eupithecia*, *Megalopyge*, *Isochromodes*, *Lomographa*, *Lophocampa* y *Dargida*.

Por otro lado la mayor eficiencia de la base de NCBI pudo deberse a que aunque ambas bases trabajan bajo el mismo algoritmo BLAST, la base de NCBI tiene un campo de

búsqueda más amplio, ya que no solo utiliza los datos cargados a Genbank si no que además usa los datos disponibles en otras bases como lo es *BoldSystem*.

La relación filogenética entre los individuos de *Agylla* y *Lophocampa*, se puede deber a que *Agylla* es perteneciente a *Arctiidae* y que según lo afirmado por Zahiri *et al* en 2011 poseen una alta relación con subfamilias de *Erebidae* a la cual el género *Lophocampa* pertenece. Por otro lado, los resultados corroboran que la implementación de herramientas filogenéticas si ayudan a una corroboración de los resultados obtenidos por medio de la identificación taxonómica ya que los clados formados en cada árbol reflejan los armados con los resultados taxonómicos.

La implementación de ABGD fue un complemento en la corroboración de los resultados del análisis de resultados filogenéticos así como de identificaciones taxonómicas. Esta misma observación se estableció en los resultados de ABGD en la identificación de anuros en la Cordillera Oriental (Guarnizo *et al.*, 2015), validando la eficiencia de esta herramienta.

Como síntesis, se observó que los resultados obtenidos por el método tradicional no brindan una información amplia y suficiente para una buena identificación, en comparación a los resultados de identificación molecular. Sin embargo, todos los resultados obtenidos tanto por métodos tradicionales, moleculares y filogenéticos, muestran entre ellos una gran coherencia y congruencia, es decir evidencian que el uso de la taxonomía integrada fue de gran ayuda para una acertada identificación. Debido a esto, se sugiere que para estudios de identificación taxonómica en ecosistemas poco estudiados como lo es el páramo del cual no existen guías de identificación taxonómicas

específicas, no solo se tenga en cuenta la morfología de las especies, si no que estos estudios sean acompañados por pruebas moleculares y filogenéticas.

Finalmente, el objetivo planteado para esta investigación fue alcanzado satisfactoriamente, logrando a partir de una combinación de métodos una identificación taxonómica de individuos del orden lepidóptera en una zona de subpáramo, aportando al conocimiento de este grupo en el país, que potencialmente puede ser usado en el planteamiento de estrategias de conservación para ecosistemas tan importantes como lo es el Páramo.

CONCLUSIÓN

El uso de diferentes herramientas y la implementación de taxonomía integrada en individuos del orden lepidóptera permitió aportar al conocimiento de este grupo en el ecosistema de Páramo. Es importante resaltar que cuando los grupos no han sido tan bien estudiados, métodos de identificación molecular como *Barcoding* pueden tener una mayor eficacia (nivel taxonómico alcanzado) en comparación a los métodos tradicionales.

La creación del grupo *Butterflies of Colombia* y el registro de las secuencias en *BoldSystem* aseguran que en futuras investigaciones realizadas en Colombia sobre *Barcoding* en lepidópteros, los investigadores puedan encontrar similitudes mayores en sus individuos de estudio así como aportar a un registro más completo sobre la diversidad de lepidópteros en el país.

BIBLIOGRAFÍA

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E and Lipman D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Altschul S, Madden T. L, Schäffer A. A, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402

Andrade G y Álvarez J. (2000). Las mariposas de las áreas de Paramo en Colombia In: Colombia Diversidad Biótica III ed. Bogotá: Editorial Unibiblos, Andrade-C. Guía Campo de insectos de Santafé de Bogotá y alrededores. pp.177.

Bickford D, Lohman D. J, Sodhi N. S, Meier R, Winker K, Ingram K and Das I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22: 148-155

Brehm G and Fiedler K. (2005). Diversity and community structure of geometrid moths of disturbed habitat in a montane area in the Ecuadorian Andes. *Journal of Research on the Lepidoptera*, 1999(38), 1–14.

Carrero D. A, Sánchez L. R y Tobar D. E. (2013). Diversidad y distribución de mariposas diurnas en un gradiente altitudinal en la región nororiental andina de Colombia. *Boletín científico Centro de museos, Museo de Historia Natural* 17(1), 168–188.

Carter D. (1993). *Manuales de identificación: Mariposas diurnas y nocturnas*. Edit OMEGA

Costello M. J, May R. M and Stork N. E. (2013). Can We Name Earth's Species? January, 413–416.

Darriba D, Taboada G. L, Doallo R and Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8), 772.

Dayrat B. (2005). Towards integrative taxonomy. Biol. J. Linn. Soc. 85:407-415

Delvare G, Aberlenc H, Michel B y Figueroa A. (1989) Los insectos de Africa y de America Tropical, Clave para la identificación de las Principales Familias. Francia., Centre De Coopération Internationale En Recherche Agronomique Pour Le Développement (CIRAD)

Dirnböck T, Essl F and Rabitsch W. (2011) Disproportional risk for habitat loss of high-altitude endemic species under climate change. Global Change Biology, 17: 990-996

Fraija N. F y Medina G. F. (2006). Caracterización de la fauna del orden lepidóptera (Rhopalocera) en cinco diferentes localidades de los llanos orientales colombianos. Acta Biológica Colombiana.11 (1); 55 – 68

Friberg M, Vongvanich N, Borg-Karlson A, Kemp D. J, Merilaita S and Wiklund C. (2008). Female mate choice determines reproductive isolation between sympatric butterfly species. Behav. Ecol. Sociobiol. 62: 873–886.

Foster P. G, Bergo E. S, Bourke B. P, Oliveira T. P, Nagaki S. S, Sant'Ana D. C and Sallum M. (2013). Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (Nyssorhynchus). PLoS ONE 8: 54063

Greenpeace. (2009). El cambio climático: futuro negro para los páramos.
http://www.greenpeace.org/colombia/Global/colombia/informes/informe_todo3.pdf

Guarnizo C. E, Paz A, Muñoz-Ortiz A, Flechas S. V, Méndez-Narváez J and Crawford A. J. (2015). DNA *Barcoding* Survey of Anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the Impact of the Andes on Cryptic Diversity. PLoS ONE 10(5): e0127312. doi:10.1371/journal.pone.0127312

Guerra J, Espinosa F and García J. (2008). Trends in Taxonomy today: an overview about the main topics. 1130-4251 (2008), vol. 19, 15-49

Hajibabaei M, Janzen D. H, Burns J. M, Hallwachs W and Hebert P. D. (2006). DNA *Barcodes* distinguish species of tropical Lepidoptera. Proc. Natl Acad. Sci. USA 103:968–971.

Hausmann A, Haszprunar G and Hebert P. D. (2011). DNA *Barcoding* the geometrid fauna of bavaria (lepidoptera): Successes, surprises, and questions. PLoS ONE, 6(2), 1–9.

Hebert P. D, Cywinska A, Ball S. L and deWaard J. R. (2003) Biological identifications through DNA *Barcodes*. Proc. R. Soc. Lond. B 270:313–321

Hebert P. D, Penton E. H, Burns J. M, Janzen D. H and Hallwachs W. (2004). Ten species in one: DNA *Barcoding* reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14812– 14817

Hedberg, O. (1992) Afroalpine vegetation compared to paramo: convergent adaptations and divergent differentiation. Paramo: an Andean ecosystem under

human influence (edited by H. Balslev y J. L. Luteyn), pages 15–30, Academic Press London.

Holmes S. (2003). Bootstrapping Phylogenetic Trees . Statistical Science Vol. 18 (2), 241–255.

Holzenthal R. W and Flint J. R. (1995). Studies of Neotropical Caddisflies, LI: Systematics of the Neotropical Caddisfly Genus *Contulma* (Trichoptera: Anomalopsychidae). Smithsonian Contributions to Zoology 575: 1–59.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P and Drummond A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-164

Kumar S, Stecher G, and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7).

Laurito M, Oliveira T, Almirón W. R and Sallum M. A. (2013). COI *Barcode* versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. 108, 110–122

Linnæus C. (1758). *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata.* – pp. [1–4], 1–824.

Liu X. F, Yang C. H, Han H. L, Ward R. D and Zhang AB. (2014). Identifying species of moths (Lepidoptera) from Baihua Mountain, Beijing, China, using DNA *Barcodes*. *Ecology and Evolution*, 4(12), 2472–2487.

Mayr E. (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia Univ. Press, New York.

Meyer C. P and Paulay G. (2005). DNA *Barcoding*: error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biol*. 3:e422.

Montero A. F y Ortiz P. M. (2013). Aporte al conocimiento para la conservación de las mariposas (Hesperioidea y Papilionoidea) en el páramo del Tablazo, Cundinamarca (Colombia). *Boletín Científico Del Museo de Historia Natural de La Universidad de Caldas*, 17(2), 197–226.

Muñoz A y Amarillo A. (2010). Variación altitudinal en diversidad de Arctiidae y Saturniidae (Lepidoptera) en un bosque de niebla Colombiano. *Revista Colombiana de Entomología*, 36(2), 292–299.

Nagy Z, Breman F and Dall’Asta U. (2010). DNA *Barcoding* of museum specimens of Lymantriidae preserved in the Royal Museum for Central Africa. *Entomologica Romanica*, 15(August 2016), 11–16.

Rangel-CH. (2005). “Biodiversity of the Colombian Paramo Region and Relationships with the Antropogenic Influence”, Special issue of *Global Mountain Biodiversity Assesment*, Suiza.

Rodríguez M. A y Angulo A. O. (2005). Catalogo Crítico Y Nominal Del Genero *Dargida* Walker 1856 (Lepidoptera, Noctuidae, Hadeninae). Gayana (Concepción), 69(1), 10–21.

Romero P y Ramirez R. (2011). Divergencia intraespecífica y código de barras de ADN en *Systrophia helicycloides* (Gastropoda, Scolodontidae). Revista Peruana de Biología, 18(2), 201–208.

Sourakov A and Zakharov E. V. (2011). “Darwin's butterflies” DNA *Barcoding* and the radiation of the endemic Caribbean butterfly genus *Calisto* (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae) Comparative Cytogenetics.

Tavares E. S and Baker A. J. (2008). Single mitochondrial gene *Barcodes* reliably identify sister-species in diverse clades of birds. BMC Evol. Biol. 8:81.

Triplehorn C and Johnson N. (2005) Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects, Brooks Col., p. 7th Edition.

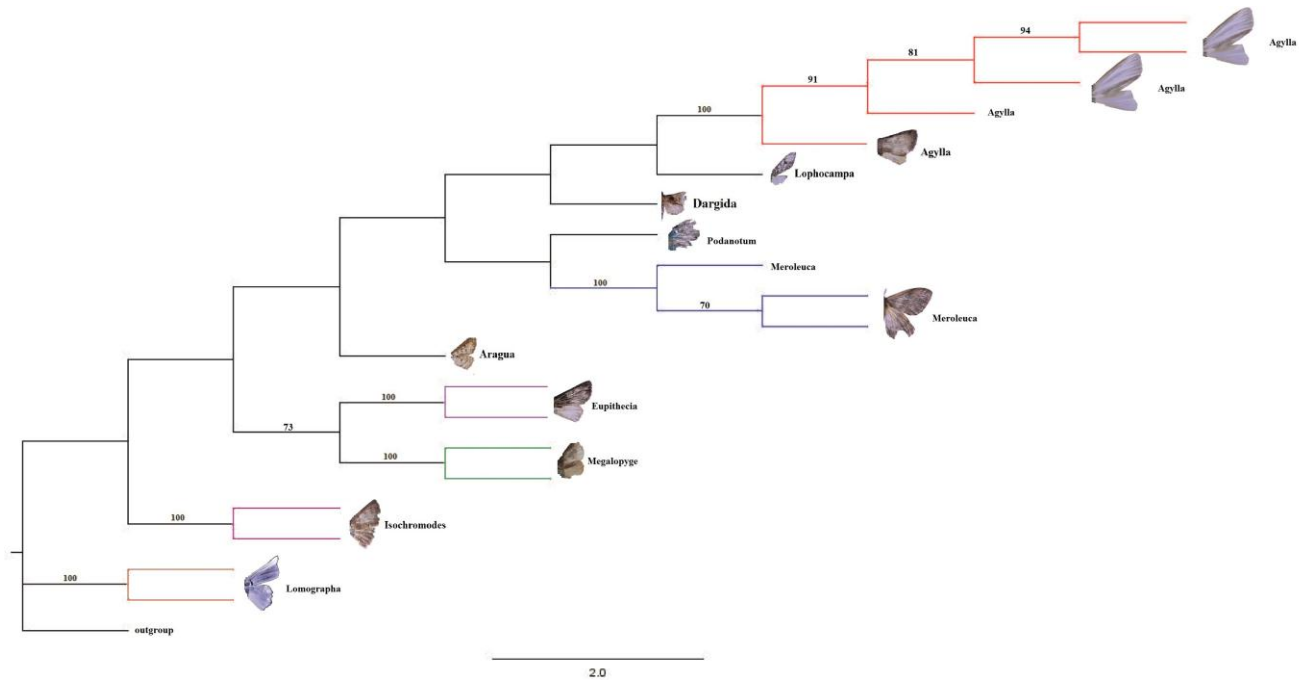
Ward R, Hanner R and Hebert P. D. (2009). The campaign to DNA *Barcode* all fishes, FISH-BOL. J. Fish Biol. 74:329–356.

Willmott K. R and Hall J. P. (2013). A New Species and two new subspecies of *Adelpha hübner*, [1819] From The Tropical Andes (Nymphalidae: limenitidinae). Journal of the Lepidopterists' Society 67(4), 2013, 241–252

Yáñez N. (2008). Mecanismo De Información De Páramos (MIP). Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina, Proyecto Páramo Andino

Zahiri R, Holloway J. D, Kitching I. J, Lafontaine J. D Mutanen M and Wahlberg N.
(2011). Molecular phylogenetics of Erebidae (Lepidoptera, Noctuoidea). *Systematic Entomology*, 37,102–124

ANEXOS



Anexo 1: Filogenia consenso bajo el criterio de Máxima Parsimonia para el fragmento *Barcode* COI. Los números sobre las ramas son los valores de soporte de *bootstrap* mayores a 50. Los nombres corresponden a los géneros identificados por a través del método molecular *Barcoding*.