

**Variabilidad genética y análisis poblacional de una especie de onicóforo en
dos localidades del flanco Occidental de la Cordillera Oriental de
Colombia**

Santiago Cote Rojas

Trabajo de Grado para optar al título de

Biólogo

Director

Jorge Hernández Torres Ph.D.

en Biología Molecular

Codirector

Oscar Yesid Hernández Lagos

M.Sc en Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas Escuela de

Biología Bucaramanga

2020

Agradecimientos

Quiero agradecer enormemente a todo aquel que apporto en mi formación como profesional y en la realización de este proyecto. A mis padres German Cote y María Eugenia Rojas por su incondicional amor y apoyo, a mi pareja Silvia Cubillos por siempre apoyarme en mis metas. A mi director Jorge Hernández-Torrez por sus enseñanzas y dirección. A mi codirector Oscar Hernández-Lagos por darme la oportunidad de estudiar el carismático mundo de los onicóforos. a Carlos Hernández-Jaimes por su especial dedicación y acompañamiento. A Sergio Porras por sus invaluable aportes durante la realización de este proyecto. A Nathaly Diaz por la donación de individuos al proyecto. A todos mis compañeros y amigos que durante la carrera han aportado a mi formación tanto profesional como personal. Finalmente agradecer a los onicóforos cuyas particulares características biológicas hicieron posible realizar este trabajo.

Introducción.....	9
1. Objetivos.....	11
1.1 Objetivo General.....	11
1.2 Objetivos específicos.....	11
2. Cuerpo del trabajo.....	11
2.1 Marco Referencial.....	11
2.1.2 Resultados.....	18
2.1.2.1 Discusión.....	25
3. Conclusiones.....	32
Bibliografía.....	34
Apéndices.....	41

Lista de Tablas

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de 13 haplotipos colectados más tres individuos colectados en las localidades del Rasgon, Piedecuesta y Guaca	22
Tabla 2. Haplotipos por coordenada de muestreo	24
Tabla 3. Parámetros poblacionales para Gen. nov. sp1	27

Lista de figuras

Figura 1 Imágenes del área de colecta.	16
Figura 2 Mapa de Santander en Colombia donde se muestra la distribución de los individuos colectados.	19
Figura 3 Micrografías de Características morfológicas de la especie en estudio obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido.	20
Figura 4. . Red de haplotipos estimada usando máxima parsimonia.	23

Lista de Apéndices

Apendice A. Matriz de distancia calculado con kimura 2p entre los 13 haplotipos41

Apendice B. Secuencias de nucleótidos de 13 haplotipos colectados. 42

Resumen

Título: VARIABILIDAD GENETICA Y ANALISIS POBLACIONAL DE UNA ESPECIE DE ONICOFORO EN DOS LOCALIDADES DEL FLANCO OCCIDENTAL DE LA CORDILLERA ORIENTAL DE COLOMBIA*

Autor: SANTIAGO COTE ROJAS**

Palabras Clave: ONYCHOPHORA, PERIPATIDAE, ONICÓFOROS NEOTROPICALES, DIVERSIDAD GENETICA, ESTRUCTURA POBLACIONAL.

Descripción: Los onicóforos son macroinvertebrados carnívoros terrestres asociados a microhábitats húmedos y oscuros. Existen registradas aproximadamente 183 especies válidas distribuidas en dos familias. La familia Peripatidae presenta una distribución circumtropical y la familia Peripatopsidae presenta distribución Austral. Son organismos nocturnos sensibles a la desecación, lo cual reduce su capacidad de dispersión y los hace susceptibles a perturbaciones en su ambiente. Por estas razones, se consideran de vital importancia para estudios en el ámbito de la filogeografía, genética poblacional y conservación. Con éxito, marcadores moleculares mitocondriales como los genes COI, 12S y 16S ADNr han revelado una alta diversidad taxonómica, endemismo localizado y especiación críptica, en diferentes especies de onicóforos, antes desconocidas. En Colombia, existe poca información sobre la diversidad y estado actual del grupo. Únicamente hay registro de 5 especies descritas hace más de 100 años y no existe voucher en colecciones nacionales; así mismo, las dinámicas de las poblaciones presentes en el país son desconocidas. Por esta razón, nos planteamos el objetivo de determinar la estructura poblacional y diversidad genética de dos poblaciones de onicóforos (Onychophora: Peripatidae). Nuestros resultados evidenciaron que i) los individuos muestreados en un mismo tronco se componen de diferentes genotipos; ii) ambas poblaciones presentan diversidad nucleotídica baja e índices de neutralidad negativos y significativos indicando que han sufrido procesos de pérdida de diversidad genética por cuello de botella, seguidos de expansiones demográficas recientes; iii) los valores de F_{st} fueron altos y significativos evidencian que la estructura poblacional entre las localidades es alta; y iv) el número efectivo de migrantes así como la ausencia de haplotipos compartidos indican que el flujo génico ha sido nulo entre ambas poblaciones. Los valores de θ -s de Watterson obtenidos sugieren que los tamaños de las poblaciones son mayores a lo esperado para organismos saproxílicos de baja vagilidad. Estos resultados constituyen el primer estudio poblacional para onicóforos en Colombia.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Hernández Torres Ph.D. Codirector: Oscar Yesid Hernández Lagos M.Sc

Abstract

Title: GENETIC VARIABILITY AND POPULATION ANALYSIS OF A SPECIES OF ONYCHOPHORA IN TWO LOCATIONS OF THE WESTERN SLOPE OF THE EASTERN ANDEAN MOUNTAINS IN COLOMBIA.*

Author: SANTIAGO COTE ROJAS **

Key Words: ONYCHOPHORA, PERIPATIDAE, NEOTROPICAL ONYCHOPHORES, GENETIC DIVERSITY, POPULATION STRUCTURE.

Description: Velvet worms are a group of soft-bodied terrestrial invertebrates associated with dark humid microhabitats. They are carnivorous organisms and there are 183 described species in 2 families. The family Peripatidae is located in tropical regions, such as the Neotropics, the Congo River Basin, and South East Asia, whereas the family Peripatopsidae can be found in Australia, New Zeland, Southafrica, and Chile. Their status as “living fossils” and their unique ecological and population dynamics make the group of key importance for research in areas such as phylogeography, population genetics, and conservational biology. Mitochondrial molecular markers have shown success in population genetics research on both Peripatidae and Peripatopsidae families, opening the possibility for a deeper understanding of their population dynamics and its application on conservational efforts. In Colombia, there is little information on the diversity and current status of the group. Our goal was to perform the first populational genetic analysis for a Colombian Velvet worm. 52 individuals of a species of onychophore of the Peripatidae family were collected from two municipalities of Santander, located on the western flank of the eastern Colombian separated by 20 km. To assess the genetic structure and diversity, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed and standard diversity indices were evaluated. Our results indicate that i) the individuals sampled in the same decomposing trunk are made up of different genotypes; ii) both populations have suffered processes of loss of genetic diversity due to bottlenecks, followed by recent demographic expansions; iii) the population structure between the localities is high; and iv) the gene flow has been null between both populations, as occurs in species with low dispersal capacity. The Watterson θ -s values obtained indicate that the population sizes are larger than expected for low-vagility saproxylic organisms. These results constitute the first population study for velvet worms in Colombia.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Hernández Torres Ph.D. Codirector: Oscar Yesid Hernández Lagos M.Sc.

Introducción

Los onicóforos son invertebrados terrestres que poseen un cuerpo de gusano y aspecto de terciopelo. Son organismos principalmente nocturnos, carnívoros y cazan a sus presas usando secreciones pegajosas producidas y almacenadas en glándulas especializadas, situadas a cada lado de la cavidad intestinal (Baer y Mayer, 2012). Son susceptibles a la desecación y presentan fototropismo negativo, lo cual los mantiene confinados a microhábitats húmedos y oscuros, lo que limita su dispersión (McDonald y Daniels, 2012; Bull et al., 2013; Daniels y Barnes, 2019). Debido a esto, se les ha reconocido como organismo modelo para estudiar los procesos de dispersión y recolonización en bosques fragmentados (Daniels y Barnes, 2019). Los onicóforos son reconocidos por su amplia importancia en ecosistemas forestales y saproxílicos, gracias a su potencial para resolver preguntas de ámbito filogeográfico, evolutivo y de conservación (Rockman, Rowell, y Tait, 2001; Bull et al., 2013; Murdock, Gabbott, Mayer y Purnell, 2014; Myburgh y Daniels, 2015; Oliveira et al., 2015). Además, son considerados bioindicadores de calidad en ecosistemas y de diversidad genética (Gerlach, Samways y Pryke, 2013; Bull y Sunnucks, 2014; Myburgh y Daniels, 2015). A pesar de esto, este enigmático grupo ha permanecido inexplorado y no ha sido incluido en planes de conservación, lo que sí ocurre con otros grupos como insectos y vertebrados tanto en Colombia como a nivel global (Grove, 2002; Myburgh y Daniels, 2015).

La pérdida de hábitat por uso antrópico ha sido reconocida como la mayor amenaza para la biodiversidad (WCMC). La continua fragmentación de los ecosistemas disminuye la migración e impide el proceso de recolonización, llevando a una disminución del flujo génico (Schmuki, Vorbürger, Runciman, MacEachern y Sunnucks, 2006). Por lo tanto, el uso de sistemas

agroforestales ha sido propuesto como herramienta para reducir el impacto humano, al servir como refugio y zona de tránsito entre fragmentos de bosque alejados (González-Valdivia et al, 2008; Mazo, Rubiano, y Castro, 2016). No obstante, el manejo inadecuado podría conducir a una mayor pérdida de diversidad, lo cual hace necesaria la elaboración de planes de manejo y monitoreo como estrategia para disminuir la pérdida de diversidad biológica en sistemas agroforestales (Schmuki et al., 2006; González-Valdivia et al., 2016).

Recientemente, el proyecto “Diversidad taxonómica y relaciones filogenéticas de los onicóforos (Onychophora: Peripatidae) presentes en el flanco occidental de la Cordillera Oriental de los Andes, Departamento de Santander”, en el cual se inscribe esta pasantía de investigación, describió las primeras tres especies para Colombia, abriendo la posibilidad de usarlas en diferentes campos de investigación como la genética poblacional. Por lo anterior, este estudio pretende realizar la primera evaluación de diversidad genética para una especie de onicóforos en Colombia, la cual es de gran importancia para comprender la dinámica poblacional. Además, estos datos servirán como preludeo para futuros estudios que pretendan responder preguntas en el ámbito de biogeografía y conservación, tal como se ha realizado en otras especies (Gleeson et al., 1998; Kunaka y Daniels, 2010; Daniels, 2011).

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar la estructura poblacional y diversidad génica de dos poblaciones de onicóforos (Onychophora: Peripatidae).

1.2 Objetivos específicos

1. Describir molecular y morfológicamente los especímenes colectados.
2. Estimar el tamaño efectivo poblacional.
3. Evaluar el flujo génico para los especímenes en el área de estudio.
4. Construir una red haplotípica con las secuencias obtenidas para el área de estudio.

2. Cuerpo del Trabajo

2.1 Marco Referencial

Los onicóforos o gusanos aterciopelados son un grupo de macroinvertebrados terrestres comúnmente asociados a microhábitats húmedos y oscuros como cuevas, piedras, epífitas, troncos en descomposición y hojarasca (Podsiadlowski, Braband, y Mayer, 2008). Son organismos principalmente nocturnos, depredadores de movimiento lento que carecen de una cutícula cerosa y de espiráculos en la tráquea. Estos rasgos suponen susceptibilidad a la desecación y limitan la capacidad de dispersión de los onicóforos. (McDonald y Daniels, 2012; Bull et al., 2013; Daniels y Barnes, 2019).

El registro fósil del grupo indica una morfología poco variable en los últimos 300 Ma (Murienne, Georg, y Gonzalo, 2014; Garwood et al., 2016). Además, datos filogenómicos asocian su diversificación con la aparición de los primeros bosques hace 382 Ma en el Devónico; por tanto, son considerados “fósiles vivientes”. (Stein, Mannolini, Hernick, Landing, y Berry, 2007; Murienne et al., 2014). Este Phylum presenta una morfología muy conservada y por mucho tiempo su taxonomía fue realizada usando caracteres “tradicionales” como la coloración dorsal y el número de extremidades, los cuales, a la luz de la taxonomía actual resulta ineficiente. Por lo tanto, la diversidad real del grupo ha permanecido subestimada (Oliveira et al., 2012a). Recientemente, el uso de marcadores moleculares y microscopía electrónica de barrido ha mejorado los criterios taxonómicos, lo que permite una clasificación más acertada (Daniels, Picker, Cowlin, y Hamer, 2009; Oliveira et al., 2010; 2011). Actualmente, se reconocen aproximadamente 200 especies en dos familias, Peripatopsidae de distribución austral y Peripatidae de distribución tropical (Oliveira, Read, y Mayer, 2012). No obstante, la mayoría de las especies necesitan revisión y verificación taxonómica empleando datos moleculares (Cunha et al., 2017).

Sus hábitos de vida especializados y su baja vagilidad los hace susceptibles a presiones externas y propensos a la pérdida de diversidad como consecuencia de extinciones locales (Myburgh y Daniels, 2015; Oliveira et al., 2015). El estudio de parámetros poblacionales tales como, la diversidad haplotípica (la frecuencia relativa de un haplotipo cualquiera con relación a la muestra) y diversidad nucleotídica (promedio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas al azar) es efectivo al momento de evaluar variaciones demográficas (Depaulis et al., 2003) Estudios poblacionales tanto en la familia Peripatidae (Lacorte et al, 2011), como en la familia

Peripatopsidae (Gleeson et al., 1998; Daniels, 2011; Myburgh y Daniels, 2015; Daniels et al., 2016; Daniels et al., 2017), han usado genes mitocondriales, mostrando alta efectividad para evaluar las relaciones evolutivas y la diversidad genética dentro de las poblaciones. Como resultado se han evidenciado altos niveles de diversidad genética, especiación críptica y endemismo (Lacorte et al., 2011; McDonald y Daniels, Oliveira et al., 2011; Daniels, 2011; Bull y Sunnucks, 2014; Daniels et al., 2016; 2017). Esta parece ser una constante dentro del phylum Onychophora e indica su potencial uso para estudiar cambios recientes en el ambiente (Lacorte et al., 2011).

Las características anteriormente enunciadas como la antigüedad del grupo, alta diversidad genética, alto grado de endemismo localizado y poca movilidad, hacen que este grupo sea de particular interés para la ciencia, ya que son potencialmente útiles para resolver preguntas poblacionales, evolutivas, biogeográficas, filogeográficas y de historia natural (Daniels et al., 2009; McDonald y Daniels, 2012; Bull et al., 2013; Daniels et al., 2016). Así mismo, algunas especies del grupo han sido denominadas especies bandera y han sido incluidas en el diseño de estrategias de conservación (Daniels, 2011; Oliveira et al., 2011; Oliveira et al., 2015; Sato, Buckman, Harvey, y Giribet, 2018) y organismo modelo, para probar hipótesis de dispersión y colonización en bosques fragmentados (Daniels & Barnes, 2019).

En Colombia existe registro de 5 especies de la familia Peripatidae (Oliveira, et al., 2012b); sin embargo, los reportes de localidad son inexactos y no existen especímenes en colecciones biológicas del país. Por lo tanto, la diversidad de onicóforos del país ha permanecido inexplorada y requiere un estudio riguroso. Las tres nuevas especies recientemente descritas en el macroproyecto “Diversidad taxonómica y relaciones filogenéticas de los onicóforos

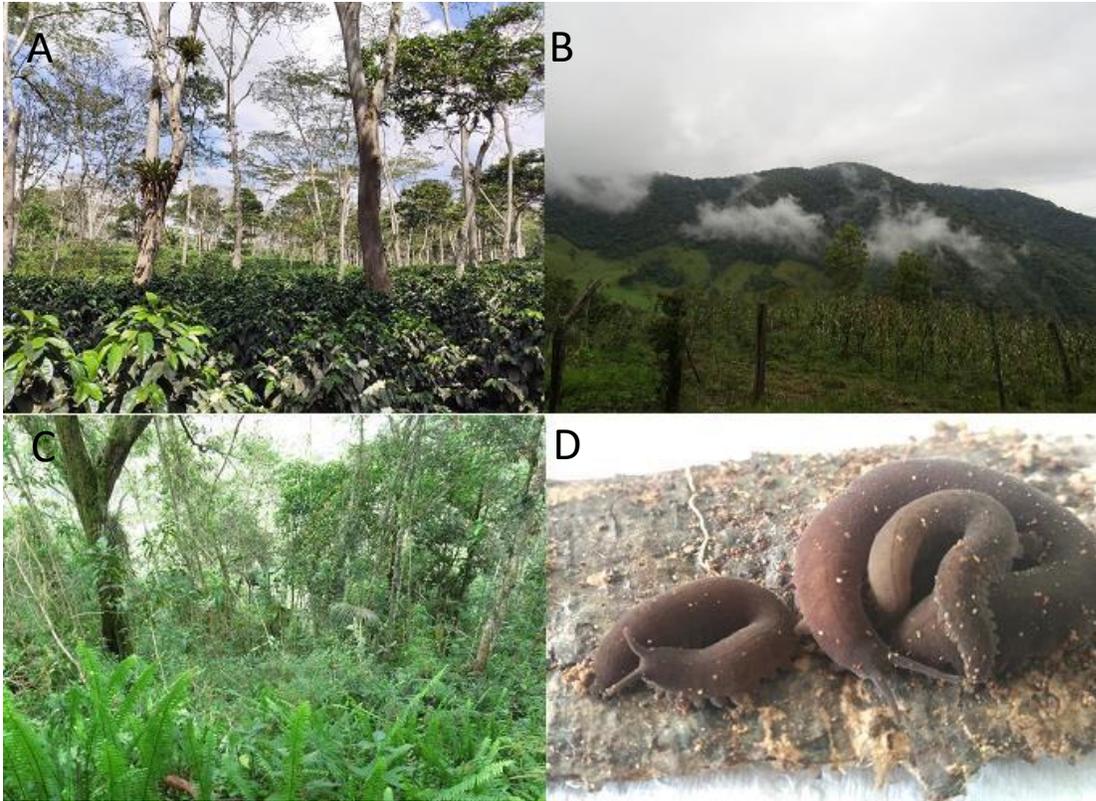
(Onychophora: Peripatidae) presentes en el flanco occidental de la Cordillera Oriental de los Andes, Departamento de Santander” abren la posibilidad de estudiar a fondo este grupo en Colombia, incluyendo la diversidad poblacional.

2.1.1 Materiales y métodos

Muestreo. Se realizaron búsquedas diurnas y nocturnas en todos los microhábitats disponibles en la zona (hojarasca, rocas, troncos en descomposición, entre otros). Se recolectaron 35 individuos en la localidad de Los Santos y 18 en Santa Bárbara (figura1). Los individuos colectados fueron georreferenciados; se tomó nota de la altitud, fecha del registro y número de ejemplar. Una vez colectados, los onicóforos fueron transportados vivos al laboratorio del Centro de innovación en biotecnología industrial y biología molecular (CINBIN), usando bolsas de tela con abundante musgo y hojarasca húmeda. En el laboratorio se realizó la eutanasia de los individuos usando 5% lidocaína, siguiendo el procedimiento estándar de la guía de Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal (Comité Asesor de Bioética, 2010)

Extracción de ADN total y amplificación de secuencias nucleotídicas. Muestras de tejido de las extremidades se fijaron en etanol absoluto y finalmente fueron criopreservadas en tubos crioviales a -20 °C. La extracción de ADN total se llevó a cabo por medio del kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit de Qiagen. Posteriormente, se realizó la amplificación de un fragmento de 710 pb, conocido como la región de Folmer o región de código de barras, perteneciente a la subunidad citocromo c oxidasa I (*COI*), cuya longitud total es de 1530 pb. Se estandarizó la PCR usando las siguientes condiciones: una primera desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de

35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 59 °C durante 45 s y extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72°C durante 5 min. Se utilizaron *primers* degenerados rediseñados por el macroproyecto, modificados a partir de los diseñados por Folmer *et al.*, (1994): Ony_COU_F 5'- TTTCTACTAATCATAAGGATATTGG -3' y Ony_COU_Rd 5'- TAAACCTCWGGRTGWCCAAAAACCA -3'. Las amplificaciones se realizaron en reacciones de 25 µL con una mezcla de 40 ng/µL de ADN total, TopTaq Buffer 1x (Qiagen®), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.18 mM *primers* y 1 U TopTaq ADN polimerasa (Qiagen®). La secuenciación de los productos de PCR fue contratada con la empresa Macrogen. Se aceptaron secuencias con un puntaje Phred superior al 90%; se eliminaron las secuencias de los *primers* y se verificó su secuencia codificante usando el programa Geneious 9.1.4.. Adicionalmente, se confirmó que las secuencias correspondieran con el fragmento de interés, mediante alineamientos con secuencias de referencia de las especies de Peripatidae *Epiperipatus biolleyi* (NC_009082) y *Oroperipatus* sp. (NC_015890) obtenidas de Genbank.

*Figura 1.**Imágenes del área de colecta*

A. Cafetal bajo sombra ubicado en la mesa de Los Santos **B.** cultivos mixtos y relictos de bosque andino en la localidad de Santa Bárbara **C.** interior de bosque en Santa Bárbara **D.** individuos colectados

Determinación taxonómica de especímenes. Dos individuos elegidos al azar fueron fijados en 4% formalina neutralizada y preservados en 70% etanol. Posteriormente, los especímenes fueron seccionados en tres regiones para facilitar su visualización. Las fracciones fueron deshidratadas mediante secado de punto y recubiertas en oro. Se tomaron micrográficas de las extremidades, la región cefálica y las zonas ventral, lateral, bucal y genital usando la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (microscopio QUANTA FEG 650). Los caracteres taxonómicos observados se contrastaron con los resultados morfológicos recogidos por el macroproyecto.

Para corroborar la identidad taxonómica de la especie de estudio, se realizó un análisis de delimitación de especies basado en distancias por medio del método GAP (Puillandre et al., 2011). En el programa ABGD, utilizando el servicio en línea <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd> siguiendo el umbral de 4% de variación específica, los parámetros definidos por el macroproyecto ($P_{min}= 0,001$, $P_{max}=0,1$, $steps=10$, $relative\ gap\ width=1.0$) (Hernandez, 2018) y el set de datos moleculares de las especies del género. Adicionalmente se realizó un análisis de distancia genética usando el modelo Kimura 2P. Las secuencias de los 53 individuos colectados fueron comparadas con las existentes para la especie en estudio, siguiendo el criterio de identidad nucleotídica de 3% empleado en el macroproyecto (Hernández, 2018).

Determinación de estructura poblacional, diversidad y flujo génico. Debido a la rápida tasa evolutiva del marcador mitocondrial empleado (COI) (Gerber, Loggins, Kumar, y Dowling, 2001), se evaluaron índices estándar de diversidad como: número de haplotipos (N_h) diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (π) y número de sitios polimórficos (N_p). Se determinó la estructura genética poblacional mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Las relaciones genéticas entre los haplotipos identificados fueron analizadas por medio de la construcción de una red de haplotipos usando el programa TCS v1.06, utilizando el parámetro estadístico de parsimonia (Clement, Posada, y Crandall, 2000). El tamaño efectivo poblacional fue estimado usando la fórmula para loci de herencia uniparental (θ)= $2N_e\mu$ (Tajima, 1993). El valor de theta (θ) de Watterson fue calculado a partir del número de sitios segregantes y el número de muestras, con base en el modelo de Watterson (1975) usando el programa DNAsp; ν es igual a la longitud

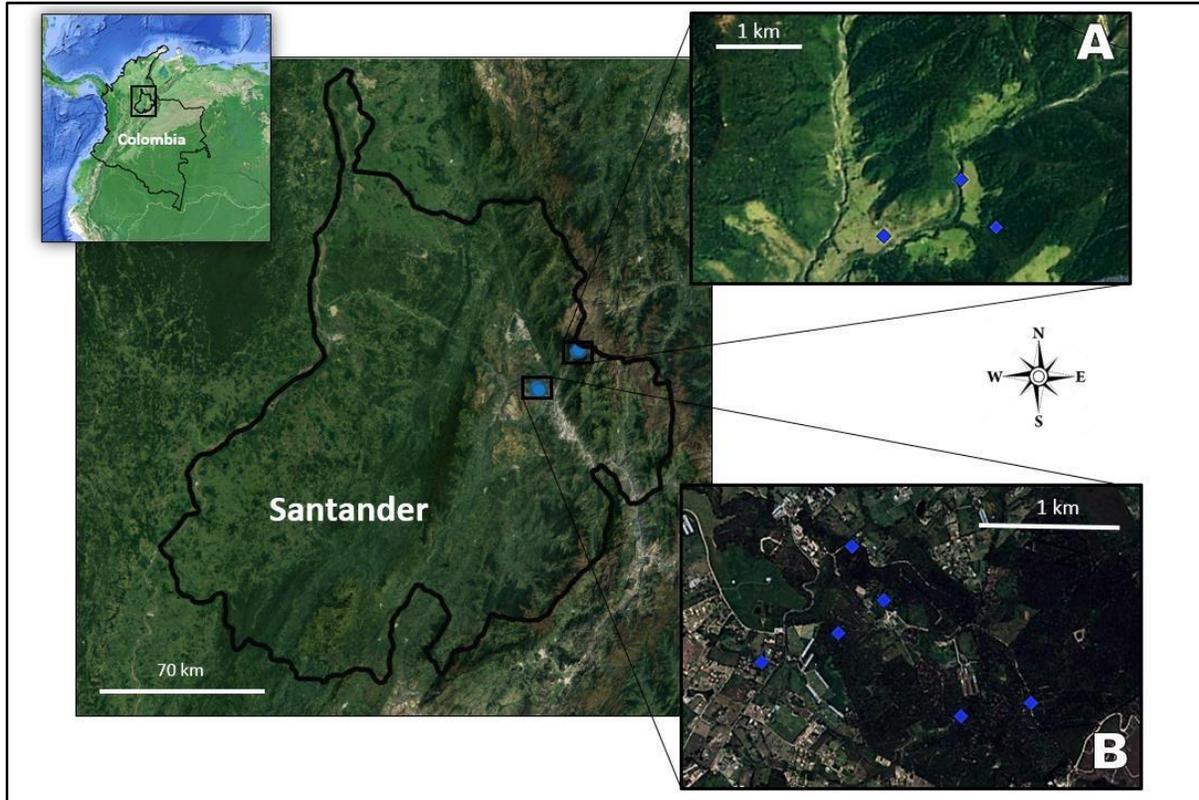
de la secuencia multiplicado por la tasa mutacional por generación ($v=m\mu$). Debido a que se desconoce la tasa mutacional para el gen COI en onicóforos, se calculó a partir de la tasa mutacional de divergencia propuesta por McDonald y Daniels (2012) y Myburgh y Daniels (2015) de 1.9% por Ma (1.5%-2.3%). Dicha tasa de divergencia está basada en una estimación, usando datos para otros miembros de Panarthropoda (Boyer, Baker, y Giribet, 2007; Brower, 1994).

2.1.2 Resultados

Recolección de individuos en campo. El muestreo se centró en dos localidades del Departamento de Santander: (i) un sistema agroforestal de café con sombrío de aproximadamente 350 Ha en el municipio de Los Santos (1660 m.s.n.m) y (ii) un relicto de Bosque Andino y pastos arbolados en el municipio de Santa Bárbara (2350 m.s.n.m) (Figura 1). Además, del macroproyecto se tomaron a las secuencias de tres individuos provenientes de 3 localidades distantes de las anteriores: una de Guaca y dos de Piedecuesta (Vereda Las amarillas y El Rasgón), las cuales han sido recientemente descubiertas y por tanto no hacen parte del muestreo. La especie de estudio fue caracterizada previamente por el macroproyecto y su descripción se encuentra en proceso de publicación (Hernández, 2018). Se recolectaron 53 individuos provenientes de 9 troncos muestreados los cuales conforman los puntos de muestreo. La localidad de Los Santos presento 35 individuos (20 hembras y 15 machos) muestreados en 6 troncos diferentes y la localidad de Santa Bárbara presentó 17 individuos (8 hembras y 9 machos) muestreados en 3 troncos diferentes. (Figura 2)

Figura 2

Mapa de Santander en Colombia donde se muestra la distribución de los individuos colectados



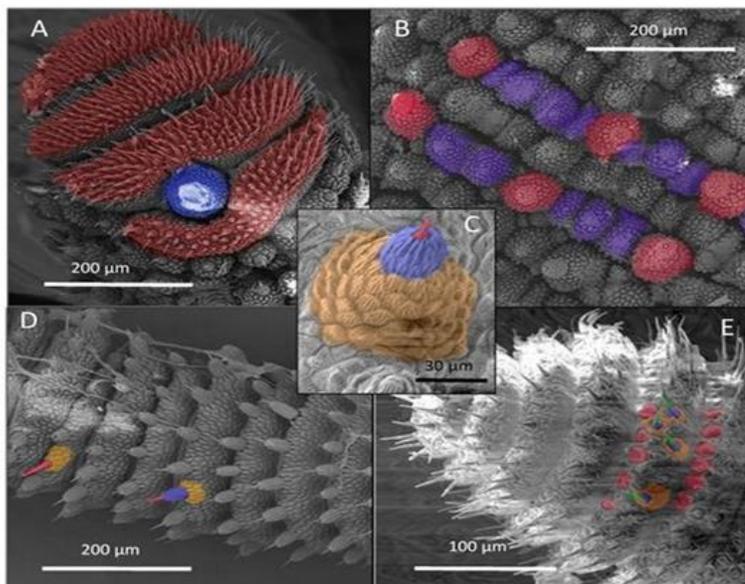
***A.** Santa Bárbara, vereda Esparta (Lat:7,014517, Long: -72,885632). pastizales para ganadería y cultivos de mora o maíz, rodeados de fragmentos de bosque secundario **B.** Los Santos, Hacienda el Roble (Lat:6,870278, Long:-73,053472). cultivo agroforestal de café bajo sombra nativa, con un área total aproximada de 350 Ha rodeada de una zona completamente deforestada e intervenida.

Descripción taxonómica de los especímenes. Una vez editadas las secuencias se obtuvo un alineamiento final de 643 pb a partir de los 53 individuos muestreados. El análisis de GAP recuperó 52 de las 53 secuencias dentro del mismo grupo de interés definido por el macroproyecto; igualmente, el de distancia genética evidenció una distancia máxima de 2,8% para 52 de las secuencias (Apéndice 1). Un individuo mostró una alta distancia genética en relación con el resto de las muestras (15%), sugiriendo que pertenece a un género distinto, por lo cual fue removido de la lista.

Los caracteres morfológicos identificados coincidieron con las descripciones del macroproyecto para la especie de interés: tubérculo nefridial entre la tercera y la cuarta almohadilla espinosa de las patas 4 y 5 (Figura 3A). Las papilas dorsales son compactas y exhiben un único tipo de papilas accesorias (Figura 3C). La distribución se da en dos órdenes: i) dos papilas secundarias seguidas por una papila primaria y ii) una papila primaria seguida por tres papilas secundarias, seguidas por una papila primaria (Figura 3B). Las antenas presentan dos tipos de sensilios en la zona ventral: uno grande fusiforme con una pieza apical cónica escamosa y uno sin la pieza apical, pero con una cerda larga en forma de aguja y con una base escamosa (Figura 3D). En la zona final de las antenas se observa un sensilio pequeño con una cerda larga en forma de aguja y una base en forma de disco; además, se observa un quimiorreceptor en forma de disco (Figura 3E).

Figura 3.

Micrografías de Características morfológicas de la especie en estudio obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido



***A**) Morfología de las almohadillas espinosas (rojo) y tubérculo nefridial (azul). **B**) papilas primarias (rojo), papilas accesorias (azul). **C**) Morfología de la papila primaria. Pieza basal (naranja), pieza apical (azul) y cerda sensorial (rojo). **D** y **E**) Sensilios fusiformes cónicos altos cubiertos por escamas en la parte ventral de las antenas

Análisis genético poblacional. La composición nucleotídica fue rica en A+T (A = 23,4%, T = 44,7%;) y baja en G+C (G=19,6%, C = 12,3%), como ha sido reportado en otras especies de onicóforos (Daniels et al.,2009; Daniels y Ruhberg, 2010; Daniels, 2011). Se detectaron un total de 25 mutaciones puntuales. Al traducir la secuencia nucleotídica a aminoácidos se identificaron siete sustituciones en la primera posición del codón, dos en la segunda y 16 en la tercera. Entre éstas, 17 sustituciones fueron silenciosas (tres en la primera posición del codón y 14 en la tercera posición), mientras que las 7 sustituciones restantes resultaron en un cambio de aminoácido (cuatro en la primera posición, dos en la segunda y uno en la tercera posición del codón). Adicionalmente, se observaron cambios de aminoácidos hidrofílicos por hidrofóbicos (e.g., Thr>Ile), hidrofóbicos por hidrofílicos (e.g., Met>Thr), y también entre aminoácidos con valores de hidrofobicidad cercanos (e.g., Val>Ile). En este último caso, se observó una Val en el residuo 159 de la población geográfica de Los Santos y una Ile en la misma posición en todas las secuencias de la población de Santa Bárbara, producto de una sustitución en la primera posición del codón. Adicionalmente, al igual que en Los Santos, las secuencias de las localidades de Guaca y Piedecuesta (Las Amarillas y El Rasgón) presentaron una Val en esta misma posición (Tabla 1).

Se identificaron 13 haplotipos (Apéndice B) a partir del análisis de diversidad genética de las 52 secuencias obtenidas (Figura 4). La presencia de un bucle fue corregida usando las reglas propuestas por Crandall y Templeton (1993). En total, 10 haplotipos fueron exclusivos para Los Santos y 3 para Santa Bárbara (Tabla 2). Ambas poblaciones difirieron por un total de 14 mutaciones. Los grupos de individuos encontrados en cada tronco en la localidad de Los Santos siempre estuvieron conformados por más de un haplotipo (Tabla

Tabla 1.

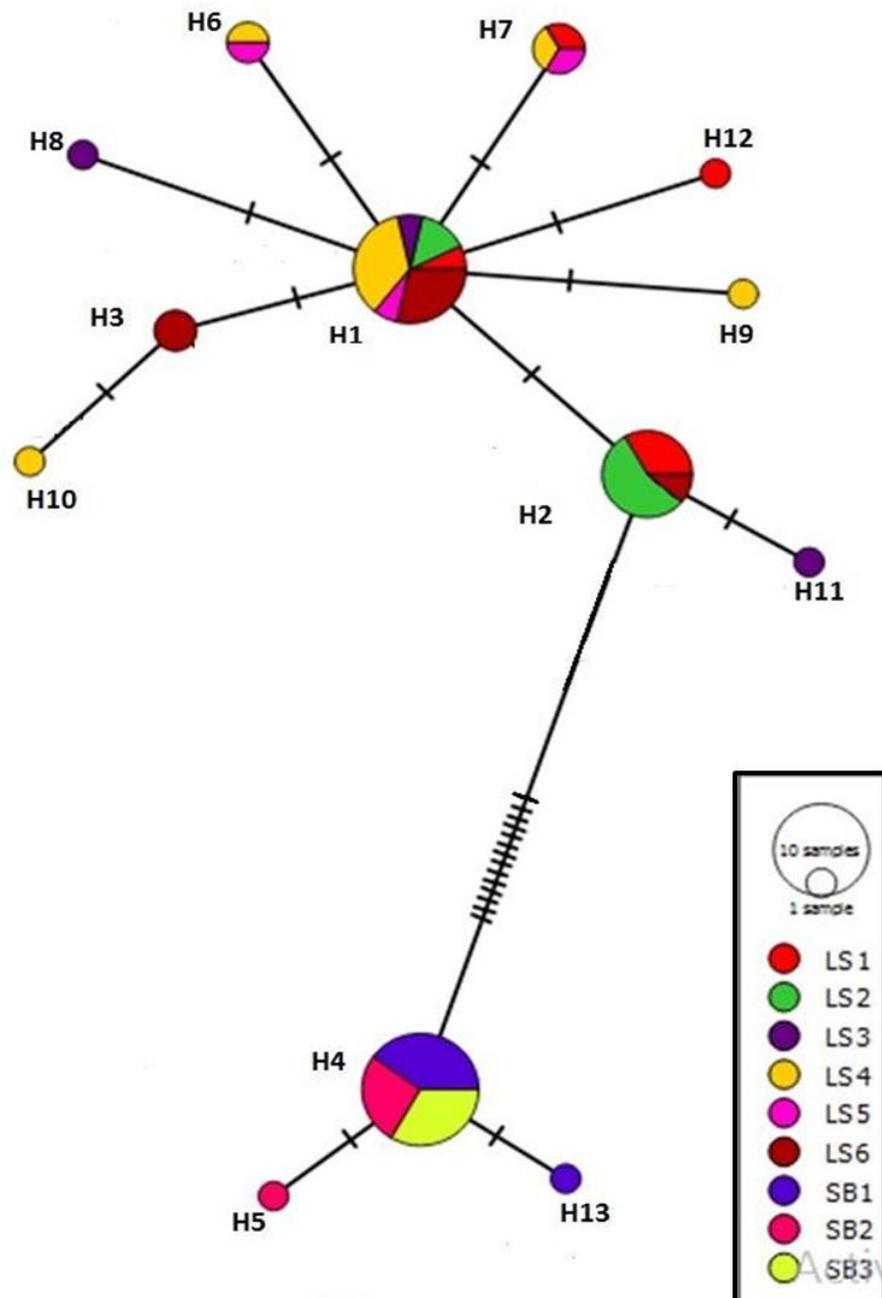
Secuencia de aminoácidos de 13 haplotipos colectados más tres individuos colectados en las localidades del Rasgon, Piedecuesta y Guaca. Colores resaltan mutaciones con sentido alterado usando escala de hidrofobicidad.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Consensus	YFIFGVWSAMVGTSLSLRLIRTELMVXGNLLGDDQLFNVIVITAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFFRLNLSFWLLPSPFFLLSSXVESGXGTG									
A_xerira_SAS69_ElRasgon_translation	M	M
A_xerira_SAS40_SB	M	M
A_xerira_SAS39_LS	M	M
A_xerira_SAS25_LS	M	M
A_xerira_SAS12_LS	M	M
A_xerira_SAS2_LS	M	M
A_xerira_OHL111_LS	M	M
A_xerira_OHL85_LS	M	M
A_xerira_OHL54_LS	M	M
A_xerira_IAvHI2646_SanAndres_translation	M	M
A_xerira_SAS37_LS	M	M
A_xerira_SAS1_LS	M	M
A_xerira_OHL97_SB	M	M
A_xerira_SAS26_LS	M	M
A_xerira_SAS49_SB	M	M
A_xerira_IAvHI2622_Piedecuesta_translation	M	M

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210
Consensus	WTVYFPLSXNLMHSGGSVDLTIPLSLHLAGVSSILGALNPITTVINKRTPGMXPERVPLFVWSVKITAXLLLSLPVLAGAITMLLTDRLNLTSPFDGAGGDPILYQ										
A_xerira_SAS69_ElRasgon_translation	G	M
A_xerira_SAS40_SB	S	M
A_xerira_SAS39_LS	S	M
A_xerira_SAS25_LS	S	M
A_xerira_SAS12_LS	S	M
A_xerira_SAS2_LS	S	M
A_xerira_OHL111_LS	S	M
A_xerira_OHL85_LS	S	M
A_xerira_OHL54_LS	S	M
A_xerira_IAvHI2646_SanAndres_translation	S	M
A_xerira_SAS37_LS	S	M
A_xerira_SAS1_LS	S	M
A_xerira_OHL97_SB	S	M
A_xerira_SAS26_LS	S	M
A_xerira_SAS49_SB	S	M
A_xerira_IAvHI2622_Piedecuesta_translation	G	M

Figura 4.

Red de haplotipos estimada usando máxima parsimonia. Cada círculo representa un haplotipo y su tamaño representa el número de individuos presentes.



*Los colores representan los puntos de muestreo dentro de las localidades de Los Santos (LS) y Santa Bárbara (SB). Barras laterales indican una mutación.

Los índices de diversidad estimados para ambas localidades se encuentran resumidos en la Tabla 3. El Análisis molecular de varianza (AMOVA) evidenció alta estructura genética presentando el 94,4% de la variación entre las poblaciones, 5,6% dentro de las poblaciones y un $F_{st} = 0,944$, ($p=0,00000$). El número efectivo de migrantes (N_m) calculado fue de 0,002966. La historia demográfica reciente fue evaluada usando las pruebas de neutralidad D de Tajima y F_s de Fu; en ambos casos, los valores fueron negativos como se espera de poblaciones con expansión demográfica reciente. Basados en la tasa de divergencia de 1,5% a 2,3%/Ma con una media de 1,9%/Ma, se estimó una tasa mutacional de $9,5e-9$ nt/año ($7,5e-9 - 1,15e-8$). El tamaño efectivo poblacional calculado para Los Santos fue de 178783 (226585- 152411) y de 48423 (61336-41257) para Santa Bárbar

Tabla 2.

haplotipos por coordenada de muestreo

Población/sitio de	Coordenadas		N	Haplotipos
Los Santos	Latitud	Longitud		
LS2	6,864866	-73.053549	3	H1, H2
LS3	6,865122	-73.054299	7	H1, H8, H11, H8, H11,
LS4	6,860971	-73,042789	9	H1, H6, H7, H9, H10,
LS5	6,863401	-73,058873	3	H1, H6, H7
LS6	6,870278	-73,053472	7	H1, H2, H3
Santa Bárbara				
SB2	7,014517	-72,885632	5	H4, H5
SB3	7,01949	-72,889324	5	H4

Discusión. En esta pasantía de investigación se hizo un primer estudio de variabilidad genética y análisis poblacional de una especie de onicóforo en dos localidades del flanco occidental de la Cordillera Oriental. La localidad de Los Santos está conformada por un cultivo agroforestal de café bajo sombra nativa, con un área total aproximada de 350 Ha, atravesada por una carretera de tierra. Externamente, el cultivo se encuentra rodeado de un área deforestada e intervenida, compuesta principalmente de pastizales para ganado, fincas recreativas y galpones. En contraste, la localidad de Santa Bárbara se compone principalmente de pastizales para ganadería y cultivos de mora (*Rubus ulmifolius*) o maíz (*Zea mays*), rodeados de fragmentos de bosque secundario (Figura 1). Como puede verse, los dos ambientes difieren considerablemente a nivel de cobertura vegetal disponible y topografía de la zona, lo cual podría afectar la capacidad de dispersión y estructura de las poblaciones presentes. Igualmente, diferentes actividades propias de la presión antrópica como lo es la remoción de cobertura vegetal pueden resultar en una disminución de microhabitats disponibles alterando procesos como la migración y recolonización, causando extinciones locales y pérdida de diversidad genética.

La población de onicóforos de Los Santos presentó una baja diversidad nucleotídica y una alta diversidad haplotípica (Tabla 3). El exceso de haplotipos únicos podría ser señal del potencial genético de la población para adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Xu, Mai, Hu, Yuan, Jashenko y Ji, 2019), lo cual es favorable en términos de la conservación de esta especie. Por otro lado, los índices de neutralidad, D de Tajima y F_s de Fu tuvieron valores negativos y fueron significativos. Esto indica que la población ha sufrido procesos de pérdida de diversidad genética por cuello de botella, seguidos de una rápida expansión demográfica. Es decir, la

mayoría de las mutaciones nuevas se mantienen en la población, resultando en un patrón de haplotipos tipo *starburst*. Este patrón se reconoce por la presencia de muchos haplotipos únicos o de baja frecuencia asociados a un haplotipo común o ancestral, con una o dos mutaciones de diferencia (Neubaum, Douglas, Douglas, y O'Shea, 2007; Fourdrilis y Backeljau, 2019; Xu *et al.*, 2019). Dentro de esta población, ningún tronco muestreado estuvo conformado por individuos con un único haplotipo. Por el contrario, cada grupo de onicóforos de un mismo tronco presentó una combinación de diferentes haplotipos, contrario a la composición monohaplotípica por tronco, reportada por Trewick (1999) para especies de Peripatopsidae. Adicionalmente, dentro de cada tronco muestreado se encontró igual proporción de machos y hembras, contrario a lo reportado por Reinhard y Rowell, (2005), quienes obtuvieron una mayor proporción de hembras en agregados sociales cercanos. La presencia de una alta diversidad haplotípica por tronco en fragmentos de bosque pequeños indica que la dispersión estaría ocurriendo a escalas pequeñas entre los nichos disponibles más cercanos (Daniels *et al.*, 2011), como se espera de organismos saproxílicos susceptibles a cambios ambientales (Grove, 2002a). Dados los resultados aparentemente contrastantes en cuanto a la proporción de sexos y diversidad haplotípica en agregados sociales de onicóforos, sería útil diseñar marcadores STR, o ADN de huella digital (Chambers, Curtis, Millar, Huynen, y Lambert, 2014), que permitan evaluar las relaciones de parentesco entre los individuos hallados en un mismo tronco o roca.

Tabla 3

Parametros poblacionales para *Gen. Nov. Sp1*

Población	N	Nh	S	Π (%)	Hd	θ_s	D	F
Los Santos	35	10	9	0.001772 +/- 0.001309	0.7782 +/- 0.0530	2.18542	-1.43780 P= 0.047	-5.62828 P=0.0000
Santa Barbara	17	3	2	0.000366 +/- 0.000497	0.2279 +/- 0.1295	0.59159	-1.50358 P=0.043	-1.68032 P= 0.006

*N= número de individuos; Nh= número de haplotipos; S= número de sitios polimórficos; Hd=diversidad haplotípica; θ_s = theta de Watterson; D= D.

Al igual que la población de Los Santos, la población de Santa Bárbara exhibió una baja diversidad nucleotídica, lo cual es típico de poblaciones aisladas que han sufrido procesos de cuello de botella. Los índices de neutralidad, D de Tajima y Fs fueron negativos y significativos indicando que la población actualmente se encuentra en expansión. En cambio, la diversidad haplotípica de Santa Bárbara se compone de tres haplotipos: un haplotipo común presente en 15 individuos y 2 haplotipos únicos. Estos datos podrían ser indicio de una estructura genética a un nivel geográfico mayor al estudiado o el resultado de un proceso de recolonización reciente (Alcaraz y Gholami, 2019). El nivel de diferenciación genética observada entre las poblaciones de Santa Bárbara y Los Santos fue notable, ya que no se detectaron haplotipos compartidos. Sin embargo, la falta de haplotipos compartidos podría ser efecto de un muestreo incompleto o sesgado, así como de tasas de mutación muy elevadas o procesos de selección. Se ha sugerido que el uso de marcadores mitocondriales con altas tasas de mutación como *COI* podrían encubrir la señal de flujo génico en estudios poblacionales, de manera que los esfuerzos de muestreo resultan siendo insuficientes para detectar haplotipos compartidos (Fourdrilis y Backeljau, 2019; Xu et al., 2019). Sin embargo, el caso de las poblaciones de la especie de estudio podría ser el resultado de aislamiento por distancia, dado que ambas localidades se encuentran separadas por

más de 20 Km lineales, y por barreras geográficas como el Cañón del Chicamocha y cadenas montañosas que imposibilitan el flujo génico.

Por otro lado, la detección de una mutación con sentido alterado en la posición 159, presente en todos los individuos de la población de Santa Bárbara y ausente en la localidad de Los Santos y en los individuos de las tres poblaciones geográficas adicionales (Guaca, Las Amarillas y El Rasgón), sugiere que esta sustitución no-silenciosa podría ser utilizada para identificar a nivel intraespecífico a individuos pertenecientes a esta población de onicóforos, como se ha hecho en otros grupos (e.g., Pappalardo, Federico, Sabella, Saccone, y Ferrito, 2015). Para corroborar si esta mutación solo se encuentra en la población de Santa Bárbara, se requeriría llevar a cabo un muestreo más exhaustivo, abarcando las cinco poblaciones geográficas actualmente conocidas para la especie. Esta mutación implicó el cambio de una Val por una Ile, ambos con una clasificación fisicoquímica similar (i.e., alifáticos e hidrofóbicos), lo cual es producto de la selección que permite mantener la función y estructura de la proteína (Ward y Holmes, 2007). No obstante, al igual que Pappalardo *et al.* (2015), algunas de las sustituciones de aminoácidos se dieron a cabo, por ejemplo, entre aminoácidos polares sin carga (Met) y aminoácidos alifáticos apolares (Ile), o entre aminoácidos hidrofílicos (Thr) e hidrofóbicos (Ile). Ya que el fragmento *barcode* de *COI* se ubica en la región transmembranal y enzimáticamente activa de la proteína citocromo oxidasa (Pentinsaari *et al.* 2016), los cambios no-sinónimos de aminoácidos podrían resultar en una mutación deletérea para la población. Estas sustituciones podrían ser de utilidad para estudiar las relaciones filogeográficas entre los linajes y poblaciones de onicóforos, así como aspectos evolutivos de su metabolismo, como se ha estudiado en algunos grupos de vertebrados (e.g., Dunn, Anı Akpınar, Sharma, y Box, 2019).

Nuestros resultados también indican que la población de onicóforos de Los Santos presenta una mayor diversidad genética que la de Santa Bárbara. A pesar de que ambas poblaciones exhiben diferentes grados de antropización, el área muestreada en la localidad de Los Santos presenta en la actualidad una matriz ambiental heterogénea y una cobertura vegetal continua, proporcionadas por plantas de café orgánico y plátano, árboles nativos, abundante hojarasca y troncos en descomposición. En términos generales, la heterogeneidad ambiental, entendida como el conjunto de factores climáticos, características de la vegetación, entre otros, se traduce en una alta diversidad genética (Xu *et al.*, 2019). De esta forma, nuestros resultados de análisis genético poblacional sugieren que la formación de nichos aislados durante la fragmentación de un ecosistema seguidos por eventos de recolonización y migración entre fragmentos de bosque cercano favorecen el aumento de diversidad en poblaciones de onicóforos. Resultados similares fueron reportados por Myburgh y Daniels (2015), encontrando mayor diversidad genética en regiones con bosque fragmentado, en comparación con bosques de mayor tamaño y continuidad. La baja diversidad nucleotídica para ambas poblaciones es señal de poblaciones aisladas que han sufrido pérdida de diversidad genética en el pasado (Lacorte *et al.*, 2011; Daniels y Barnes, 2019).

Las variables ecológicas y elementos del paisaje como la elevación, cuerpos de agua, carreteras, distancia geográfica, discontinuidad de hábitat, entre otros, actúan como barreras y estresantes fisiológicos que limitan la dispersión y el intercambio genético (Hillman, Drewes, Hedrick, y Hancock, 2014). Estas variables físico-ambientales son particularmente significativas para los onicóforos dada su susceptibilidad a la desecación, producto de un sistema traqueal abierto que conlleva una pérdida del ~70% de agua a través de la cutícula (Clusella-Trullas y Chown,

2008). Esto ocasiona que los individuos se refugien del calor y la exposición directa al sol, en microhábitats frescos y con una alta humedad (Newlands y Ruhberg, 1978), formando agregados sociales en función de la disponibilidad de estos refugios. Más importante aún, la vagilidad fisiológica de las especies afecta la distancia, el período y la duración de la dispersión de los individuos de una población, en función de factores como la masa corporal, modo de locomoción, temperatura corporal y capacidad metabólica (Hillman *et al.* 2014; Hancock y Hedrick, 2018). Esto llevó a que Hancock y Hedrick (2018) propusieran que la vagilidad fisiológica sea un buen predictor de la dispersión, estructura genética y capacidad migratoria de una especie. Por esta razón, se hace importante realizar estudios en onicóforos encaminados a evaluar la vagilidad fisiológica en este grupo, para contribuir al entendimiento de su capacidad de dispersión e intercambio genético.

Los valores de tamaño efectivo poblacional representan la primera estimación de este tipo para una población de onicóforos. No obstante, los valores obtenidos deben ser tomados con cautela debido a dos razones importantes. i) la tasa de divergencia usada para calcular la tasa mutacional del gen *COI* está basada en un promedio de las tasas mutacionales de otros miembros de Panarthropoda, los cuales no necesariamente representan de manera acertada la tasa mutacional en onicóforos (Thomas, Welch, Woolfit, y Bromham, 2006) y, ii) se desconoce el tiempo generacional promedio de los onicóforos. La falta de información con respecto a la tasa de mutación para onicóforos ha imposibilitado una correcta determinación de los tamaños poblacionales para este grupo. Sin embargo, los valores calculados de theta (θ) de Watterson nos indican que las poblaciones evaluadas podrían albergar un tamaño poblacional mucho mayor

que el esperado para especies de poca movilidad y necesidades microclimáticas estrictas (Lacorte *et al.*, 2011).

El valor de F_{ST} calculado fue significativo y muy alto (0,944; $p=0,0000$), basado en el criterio de diferenciación genética propuesto por Wright (1978). Valores igualmente altos han sido reportados previamente para diferentes especies de onicóforos como *Peripatopsis moseleyi*, *Peripatopsis sedgwicki* y *Opisthopatus amaxhosa* (Daniels *et al.*, 2017; Daniels y Barnes, 2019). Esto podría deberse a las características del marcador *COI*, por tratarse de un gen mitocondrial de herencia uniparental, ya que, en ese caso, el cálculo del F_{ST} depende únicamente de las diferencias entre las frecuencias haplotípicas de las poblaciones (Crochet *et al.*, 2003). Igualmente, la ausencia de haplotipos compartidos como ocurre comúnmente en onicóforos (Daniels y Ruhberg, 2010; Kunaka y Daniels, 2010; Daniels, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Lacorte *et al.*, 2011; Daniels y Barnes, 2019) podría afectar el valor de F_{ST} (Alcala y Rosenberg, 2017).

El marcador mitocondrial *COI* ha sido exitoso al evaluar la diversidad y estructura genética en poblaciones de onicóforos (Daniels, 2011; Lacorte *et al.*, 2011; Myburgh y Daniels, 2015; Daniels *et al.*, 2017; Daniels y Barnes, 2019). Por tratarse de una secuencia codificante, el gen *COI* presenta una tasa de mutación mucho mayor que otros marcadores mitocondriales como los ARNr 12S y 16S, lo cual es ideal para investigaciones genéticas a nivel de género y especie (Gerber *et al.*, 2001; Jansen, 2000). No obstante, la herencia uniparental del ADN mitocondrial, solo nos permite rastrear el linaje matrilineal. Se requiere el uso de marcadores nucleares que

puedan detectar diferencias en los patrones de dispersión que puedan existir entre los sexos como resultado, por ejemplo, de su comportamiento reproductivo (e.g., Dávalos y Russell, 2014; Li, X. Y., & Kokko, 2019). El diseño de marcadores multialélicos como los microsatélites ha demostrado ser particularmente difícil en onicóforos (Daniels, 2011; Daniels y Barnes, 2019), por lo que no existen en la actualidad marcadores de este tipo para la familia Peripatidae. Sin embargo, autores como Hillman *et al.* (2014), recomiendan el uso de marcadores que reflejen diferencias selectivas, en lugar de marcadores neutrales como los microsatélites, como un método más informativo para la cuantificación de la heterogeneidad entre poblaciones. Por último, se recomienda el diseño de marcadores genéticos de tipo oligonucleótido o de huella digital para onicóforos, los cuales han demostrado ser bastante informativos y aptos para estudiar poblaciones reducidas (Wan, Wu, Fujihara, y Fang, 2004; Chambers *et al.*, 2014;).

3. Conclusiones

El presente trabajo evaluó de manera preliminar la diversidad genética en dos poblaciones de una especie de onicóforo andino de la familia Peripatidae. La alta diferenciación genética encontrada entre ambas localidades de estudio, indica que estas pueden ser consideradas como poblaciones diferentes debido al aislamiento geográfico y la consecuente ausencia de flujo génico. Los microhábitats muestreados presentaron agregados sociales de individuos con diferente genotipo y de ambos sexos. El análisis del tamaño efectivo poblacional sugiere que estas poblaciones de onicóforos es potencialmente más grande de lo que se esperaba para este grupo, quizá debido al comportamiento críptico de los onicóforos. Ambas localidades evidenciaron pérdida de diversidad por procesos de cuello de botella seguidos de recientes expansiones

poblacionales. Igualmente, reportamos la presencia de una mutación con sentido alterado en la posición 159 de la secuencia de aminoácidos obtenida, el cual constituye el primer marcador poblacional conocido para esta especie. Nada se sabe acerca de la biología de los onicóforos que habitan los Andes colombianos, por lo cual, este estudio representa un primer acercamiento al entendimiento de la dinámica poblacional de este grupo.

Bibliografía

- Alcala, N., & Rosenberg, N. A. (2017). Mathematical constraints on FST: Biallelic markers in arbitrarily many populations. *Genetics*, 206(3), 1581–1600. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.199141>
- Alcaraz, C., & Gholami, Z. (2019). Diversity and structure of fragmented populations of a threatened endemic cyprinodontid (*Aphanius sophiae*) inferred from genetics and otolith morphology: Implications for conservation and management. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(1), 341–355. <https://doi.org/10.1111/jzs.12333>
- Baer, A., & Mayer, G. (2012). Comparative anatomy of slime glands in onychophora (velvet worms). *Journal of Morphology*, 273(10), 1079–1088. <https://doi.org/10.1002/jmor.20044>
- Boyer, S. L., Baker, J. M., & Giribet, G. (2007). Deep genetic divergences in *Aoraki denticulata* (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi): a widespread ‘mite harvestman’ defies DNA taxonomy. *Molecular Ecology*, 16(23), 4999–5016. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03555.x>
- Brower, A. V. (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6491–6495. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6491>
- Bull, J. K., Chester J. Sands, Ryan C. Garrick, Michael G. Gardner, Noel N. Tait, D.A., Briscoe, & David M. Rowell, P. S. (2013). Environmental complexity and biodiversity: the multi-layered evolutionary history of a log-dwelling velvet worm in montane temperate Australia. *PLoS ONE*, 8(2755), 57–65. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084559>
- Bull, J. K., & Sunnucks, P. (2014). Strong genetic structuring without assortative mating or reduced hybrid survival in an onychophoran in the Tallaganda State Forest region, Australia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 111(3), 589–602. <https://doi.org/10.1111/bij.12224>
- Chambers, G. K., Curtis, C., Millar, C. D., Huynen, L., & Lambert, D. M. (2014). DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. *Investigative Genetics*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-5->
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657–1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.01020.x>
- Clusella-Trullas, S., & Chown, S. L. (2008). Investigating onychophoran gas exchange and water balance as a means to inform current controversies in arthropod physiology. *Journal of Experimental Biology*, 211(19), 3139–3146. <https://doi.org/10.1242/jeb.021907>

- Crandall, K. A., & Templeton, A. R. (1993). Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, *134*(3), 959–969.
- Crochet, P. A., Chen, J. Z., Pons, J. M., Lebreton, J. D., Hebert, P. D. N., & Bonhomme, F. (2003). Genetic differentiation at nuclear and mitochondrial loci among large white-headed gulls: Sex-biased interspecific gene flow? *Evolution*, *57*(12), 2865–2878. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01527.x>
- Cunha, W. T. R., Santos, R. C. O., Araripe, J., Sampaio, I., Schneider, H., & Rêgo, P. S. (2017). Molecular analyses reveal the occurrence of three new sympatric lineages of velvet worms (Onychophora: Peripatidae) in the eastern Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology*, *40*(1), 147–152. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0037>
- Comité Asesor de Bioética (2010). *Aspectos bioéticos de la experimentación animal*. Santiago, Chile: Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnología
- Daniels. (2011). Genetic variation in the Critically Endangered velvet worm species *Opisthopatus roseus* (Onychophora: Peripatopsidae). *African Zoology*, *46*(2), 419–424. <https://doi.org/10.3377/004.046.0222>
- Daniels, S. R. & Barnes, A., (2019). On the importance of fine-scale sampling in detecting alpha taxonomic diversity among saproxylic invertebrates: A velvet worm (Onychophora: Opisthopatus amaxhosa) template. *Zoologica Scripta*, *48*(2), 243–262. <https://doi.org/10.1111/zsc.12338>
- Daniels, S. R., & Ruhberg, & H. (2010). Molecular and morphological variation in a South African velvet worm *Peripatopsis moseleyi* (Onychophora, Peripatopsidae): evidence for cryptic speciation. *Journal of Zoology*, *282*(3), 171–179. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2010.00722.x>
- Daniels, Savel R. (2011). Genetic variation in the Critically Endangered velvet worm *Opisthopatus roseus* (Onychophora: Peripatopsidae). *African Zoology*, *46*(2), 419–424. <https://doi.org/10.1080/15627020.2011.11407516>
- Daniels, Savel R., Dambire, C., Klaus, S., & Sharma, P. P. (2016). Unmasking alpha diversity, cladogenesis and biogeographical patterning in an ancient panarthropod lineage (Onychophora: Peripatopsidae: *Opisthopatus cinctipes*) with the description of five novel species. *Cladistics*, *32*(5), 506–537. <https://doi.org/10.1111/cla.12154>
- Daniels, Savel R., Dreyer, M., & Sharma, P. P. (2017). Contrasting the population genetic structure of two velvet worm taxa (Onychophora: Peripatopsidae: *Peripatopsis*) in forest fragments along the south-eastern Cape, South Africa. *Invertebrate Systematics*, *31*(6), 781–796. <https://doi.org/10.1071/IS16085>
- Daniels, Savel R., Picker, M. D., Cowlin, R. M., & Hamer, M. L. (2009). Unravelling evolutionary lineages among South African velvet worms (Onychophora: *Peripatopsis*) provides evidence for widespread cryptic speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, *97*(1), 200–216. <https://doi.org/10.1111/j.1095->

8312.2009.01205.x

- Dávalos, L. M., & Russell, A. L. (2014). Sex-biased dispersal produces high error rates in mitochondrial distance-based and tree-based species delimitation. *Journal of Mammalogy*, 95(4), 781–791. <https://doi.org/10.1644/14-mamm-a-107>
- Depaulis, F., Mousset, S., & Veuille, M. (2003). Power of Neutrality Tests to Detect Bottlenecks and Hitchhiking. *Journal of Molecular Evolution*, 57(0), S190–S200. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-0027-y>
- Dunn, C. D., Akpinar, B. A., & Sharma, V. (2020). An Unusual Amino Acid Substitution Within Hummingbird Cytochrome c Oxidase Alters a Key Proton-Conducting Channel. *G3*; Genes/Genomes/Genetics, g3.401312.2020. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401312>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994;3(5):294-299.
- Fourdrilis, S., & Backeljau, T. (2019). Highly polymorphic mitochondrial DNA and deceiving haplotypic differentiation: Implications for assessing population genetic differentiation and connectivity. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1414-3>.
- Garwood, R. J., Edgecombe, G. D., Charbonnier, S., Chabard, D., Sotty, D., & Giribet, G. (2016). Carboniferous Onychophora from Montceau-les-Mines, France, and onychophoran terrestrialization. *Invertebrate Biology*, 135(3), 179–190. <https://doi.org/10.1111/ivb.12130>
- Gerlach, J., Samways, M., & Pryke, J. (2013). Terrestrial invertebrates as bioindicators: An overview of available taxonomic groups. *Journal of Insect Conservation*, 17(4), 831–850. <https://doi.org/10.1007/s10841-013-9565-9>.
- Gerber AS, Loggins R, Kumar S, Dowling TE (2001). Does nonneutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes? *Annu Rev Genet* 35, 539-566. <https://doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.091106>.
- Gleeson, D. M., Rowell, D. M., Tait, N. N., Briscoe, D. A., & Higgins, A. V. (1998). Phylogenetic relationships among Onychophora from Australasia inferred from the mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10(2), 237–248. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0512>
- Grove, S. J. (2002). Tree basal area and dead wood as surrogate indicators of saproxylic insect faunal integrity: a case study from the Australian lowland tropics. *Ecological Indicators*, 1(3), 171–188. [https://doi.org/10.1016/s1470-160x\(01\)00016-4](https://doi.org/10.1016/s1470-160x(01)00016-4).

- Hancock, T. V., & Hedrick, M. S. (2018). Physiological vagility affects population genetic structure and dispersal and enables migratory capacity in vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 223(5), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.015>.
- Hillman, S. S., Drewes, R. C., Hedrick, M. S., & Hancock, T. V. (2014). Physiological vagility: correlations with dispersal and population genetic structure of amphibians. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(1), 105–112. <https://doi.org/10.1086/671109>
- Hernández, (2018). Diversidad taxonómica y relaciones filogenéticas de los onicóforos (Onychophora: Peripatidae) presentes en el flanco occidental de la Cordillera Oriental de los Andes, Departamento de Santander (tesis M. Sc). Universidad Industrial de Santander, Colombia.
- Jansen, R. P. S. (2000). Origin and persistence of the mitochondrial genome. *Human Reproduction*, 15(suppl 2), 1–10. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.1.
- J, Murienne., R., Daniels, S. R., Buckley T. R., Georg, M., & Gonzalo, G. (2014). A living fossil tale of Pangaean biogeography. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775), 20132648. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2648>.
- Kunaka C (2010) Systematics and conservation of a widespread velvet worm species *Opisthopatus cinctipes*: evidence for cryptic speciation. MSc thesis, Department of Botany and Zoology, Stellenbosch University, Matieland, pp 1–99 Lighton JRB
- Lacorte, G. A., Oliveira, I. S., & Fonseca, C. G. (2011). Population structure and demographic inferences concerning the endangered onychophoran species *Epiperipatus acacioi* (Onychophora: Peripatidae). *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 2775–2785. <https://doi.org/10.4238/2011.November.9.1>
- Lacorte, G. A., De Sena Oliveira, I., & Da Fonseca, C. G. (2011b). Phylogenetic relationships among the *Epiperipatus* lineages (Onychophora: Peripatidae) from the Minas Gerais State, Brazil. *Zootaxa*, 2755(1), 57. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2755.1.3>
- Li, X., Tetling, S., Winkler, U. K., Jaeger, K. E., & Benedik, M. J. (1995). Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Applied and environmental microbiology*, 61(7), 2674–2680
- Li, X. Y., & Kokko, H. (2019). Sex-biased dispersal: a review of the theory. *Biological Reviews*, 94(2), 721–736. <https://doi.org/10.1111/brv.12475>
- Lacorte, G. A., De Sena Oliveira, I., & Da Fonseca, C. G. (2011). Phylogenetic relationships among the *Epiperipatus* lineages (Onychophora: Peripatidae) from the Minas Gerais State, Brazil. *Zootaxa*, 2755(1), 57. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2755.1.3>

- Macip-Ríos, R., & Casas-Andreu, G. (2008). Los cafetales en México y su importancia para la conservación de los anfibios y reptiles. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (N.S.)*, 24(2), 143–159. <https://doi.org/10.21829/azm.2008.242710>
- Mazo, N. D. los Á., Rubiano, J. E., & Castro, A. (2016). Sistemas agroforestales como estrategia para el manejo de ecosistemas de Bosque seco Tropical en el suroccidente colombiano utilizando los SIG. *Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía*, 25(1), 65–77. <https://doi.org/10.15446/rcdg.v25n1.41993>
- Mcdonald, D. E., & Daniels, S. R. (2012). Phylogeography of the Cape velvet worm (Onychophora: *Peripatopsis capensis*) reveals the impact of Pliocene/Pleistocene *Journal of Evolutionary Biology*, 25(5), 824–835. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02482.x>
- Murdock, D. J. E., Gabbott, S. E., Mayer, G., & Purnell, M. A. (2014). Decay of velvet worms (Onychophora), and bias in the fossil record of lobopodians. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12862-014-0222-z>
- Myburgh, A. M., & Daniels, S. R. (2015). Exploring the impact of habitat size on phylogeographic patterning in the overberg velvet worm *Peripatopsis overbergiensis* (Onychophora: Peripatopsidae). *Journal of Heredity*, 106(3), 296–305. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv014>
- Neubaum, M. A., Douglas, M. R., Douglas, M. E., & O’Shea, T. J. (2007). Molecular ecology of the big brown bat (*Eptesicus fuscus*): Genetic and Natural History Variation in a Hybrid Zone. *Journal of Mammalogy*, 88(5), 1230–1238. <https://doi.org/10.1644/06-mamm-a-228r1.1>
- Newlands, G., & Ruhberg, H. (1978). Onychophora. *Biogeography and Ecology of Southern Africa*, 677–684. https://doi.org/10.1007/978-94-009-9951-0_17
- Oliveira, Ivo De Sena, Wieloch, Alfredo Hannemann, & Mayer, Georg. (2010). Revised taxonomy and redescription of two species of the Peripatidae (Onychophora) from Brazil: a step towards consistent terminology of morphological characters. *Zootaxa*, 2493, 16–34. <http://doi.org/10.5281/zenodo.195686>
- Oliveira, I. de S., Lacorte, G. A., Weck-Heimann, A., Cordeiro, L. M., Wieloch, A. H., & Mayer, G. (2014). A new and critically endangered species and genus of Onychophora (Peripatidae) from the Brazilian savannah – a vulnerable biodiversity hotspot. *Systematics and Biodiversity*, 13(3), 211–233. <https://doi.org/10.1080/14772000.2014.985621>
- Oliveira, I. de S., Franke, F. A., Hering, L., Schaffer, S., Rowell, D. M., Weck-Heimann, A., Mayer, G. (2012a). Unexplored character diversity in Onychophora (Velvet Worms): A comparative study of three peripatid species. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051220>

- Oliveira, I. de S., Read, V. M. S. J., & Mayer, G. (2012b). A world checklist of Onychophora (velvet worms), with notes on nomenclature and status of names. *ZooKeys*, 70(211), 1–70. <https://doi.org/10.3897/zookeys.211.3463>
- Oliveira, I. S., Lacorte, G. A., Fonseca, C. G., Wieloch, A. H., & Mayer, G. (2011). Cryptic speciation in Brazilian *Epiperipatus* (Onychophora: Peripatidae) reveals an underestimated diversity among the peripatid velvet worms. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019973>
- Pappalardo, A. M., Federico, C., Sabella, G., Saccone, S., & Ferrito, V. (2015). A COI nonsynonymous mutation as diagnostic tool for intraspecific discrimination in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus). *PLoS ONE*, 10(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143297>
- Pentinsaari, M., Salmela, H., Mutanen, M., & Roslin, T. (2016). Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. *Scientific Reports*, 6(March), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35275>
- Podsiadlowski, L., Braband, A., & Mayer, G. (2008). The complete mitochondrial genome of the Onychophoran *Epiperipatus biolleyi* reveals a unique transfer RNA set and provides further support for the Ecdysozoa hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, 25(1), 42–51. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm223>
- Pulgarín-R, P. C., & Burg, T. M. (2012). Genetic signals of demographic expansion in downy woodpecker (*Picoides pubescens*) after the last north american glacial maximum. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040412>
- Pullianre, N., Lambert, A., Brouillette, S., & Achaz, G. (2011). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2011.05239.x>
- Reinhard, J., & Rowell, D. M. (2005). Social behaviour in an Australian velvet worm, *Euperipatoides rowelli* (Onychophora: Peripatopsidae). *Journal of Zoology*, 267(01), 1. <https://doi.org/10.1017/s0952836905007090>
- Rockman, M. V., Rowell, D. M., & Tait, N. N. (2001). Phylogenetics of *Planipapillus*, lawn-headed onychophorans of the Australian alps, based on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(1), 103–116. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0990>
- Sato, S., Buckman-Young, R. S., Harvey, M. S., & Giribet, G. (2018). Cryptic speciation in a biodiversity hotspot: multilocus molecular data reveal new velvet worm species from Western Australia (Onychophora : Peripatopsidae : Kumbadjena). *Invertebrate Systematics*, 32(6), 1249. <https://doi.org/10.1071/is18024>
- Schmuki, C., Vorburger, C., Runciman, D., MacEachern, S., & Sunnucks, P. (2006). When log-dwellers meet loggers: Impacts of forest fragmentation on two endemic log-dwelling beetles in southeastern Australia. *Molecular Ecology*, 15(6), 1481–1492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02849.x>

- Stein, W. E., Mannolini, F., Hernick, L. V., Landing, E., & Berry, C. M. (2007). Giant cladoxylipsoid trees resolve the enigma of the Earth's earliest forest stumps at Gilboa. *Nature*, 446(7138), 904–907. <https://doi.org/10.1038/nature05705>
- Tajima, & F. (1993). Measurement of DNA polymorphism. *Mechanisms of Molecular Evolution, Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*, 37–59. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10013583690/en/>
- Thomas, J. A., Welch, J. J., Woolfit, M., & Bromham, L. (2006). There is no universal molecular clock for invertebrates, but rate variation does not scale with body size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(19), 7366–7371. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510251103>
- Trewick, S. A. (1999). Molecular diversity of *Dunedin peripatus* (Onychophora: Peripatopsidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 26(4), 381–393. <https://doi.org/10.1080/03014223.1999.9518201>
- Wan, Q.-H., Wu, H., Fujihara, T., & Fang, S.-G. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25(14), 2165–2176. <https://doi.org/10.1002/elps.200305922>
- Ward, R. D., & Holmes, B. H. (2007). An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 899–907. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01886.x>
- World Conservation Monitoring Centre (WCMC). Global biodiversity: Status of the earth's living resources. *Biological Conservation*, 66(2), 145. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(93\)90147-s](https://doi.org/10.1016/0006-3207(93)90147-s)
- Werger, M. J. A. (1978). Biogeographical division of southern Africa. *Biogeography and Ecology of Southern Africa*, 145–170 Monographiae Biologicae, vol 31. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-9951-0_7
- Wright, S., (1978) Evolution and the Genetics of Populations, Volume 4: Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Xu, Y., Mai, J. W., Yu, B. J., Hu, H. X., Yuan, L., Jashenko, R., & Ji, R. (2019). Study on the Genetic Differentiation of Geographic Populations of *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) in Sino-Kazakh Border Areas Based on Mitochondrial COI and COII Genes. *Journal of Economic Entomology*, 112(4), 1912–1919. <https://doi.org/10.1093/jee/toz112>

Apéndices

Apendice A. Matriz de distancia calculado con kimura 2p entre los 13 haplotipos muestreados

	A_xerira_OHL111_LS	A_xerira_OHL54_LS	A_xerira_OHL85_LS	A_xerira_OHL97_SB	A_xerira_SCR1_LS	A_xerira_SCR2_LS	A_xerira_SCR25_LS	A_xerira_SCR26_LS	A_xerira_SCR37_LS	A_xerira_SCR39_LS	A_xerira_SCR8_LS	A_xerira_STA10_SB	A_xerira_STA9_SB
A_xerira_OHL111_LS													
A_xerira_OHL54_LS	0,00156												
A_xerira_OHL85_LS	0,00156	0,00312											
A_xerira_OHL97_SB	0,02546	0,02384	0,02385										
A_xerira_SCR1_LS	0,00156	0,00312	0,00312	0,02712									
A_xerira_SCR2_LS	0,00156	0,00312	0,00312	0,02708	0,00312								
A_xerira_SCR25_LS	0,00312	0,00156	0,00468	0,02546	0,00469	0,00468							
A_xerira_SCR26_LS	0,00156	0,00312	0,00312	0,02708	0,00312	0,00312	0,00468						
A_xerira_SCR37_LS	0,00312	0,00469	0,00156	0,02550	0,00469	0,00469	0,00626	0,00469					
A_xerira_SCR39_LS	0,00156	0,00312	0,00312	0,02708	0,00312	0,00312	0,00468	0,00312	0,00469				
A_xerira_SCR8_LS	0,00312	0,00469	0,00469	0,02875	0,00469	0,00469	0,00626	0,00469	0,00626	0,00469			
A_xerira_STA10_SB	0,02546	0,02385	0,02385	0,00312	0,02712	0,02708	0,02546	0,02709	0,02550	0,02708	0,02875		
A_xerira_STA9_SB	0,02385	0,02223	0,02223	0,00156	0,02550	0,02546	0,02385	0,02546	0,02388	0,02546	0,02712	0,00156	

