



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**BIOMONITOREO CON ADN AMBIENTAL Y REGISTROS POR ENCUENTRO
VISUAL PARA LA DETECCIÓN DE ANFIBIOS EN AMBIENTES ACUÁTICOS
DEL RÍO TENA, NAPO, ECUADOR**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: WALTER ARMANDO QUILUMBAQUIN ALBA

TUTOR: PhD. H. MAURICIO ORTEGA ANDRADE

CO-TUTORA: MSc. ANDREA GRETA CARRERA GONZÁLEZ

Napo - Ecuador

2022

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 22 de febrero de 2022

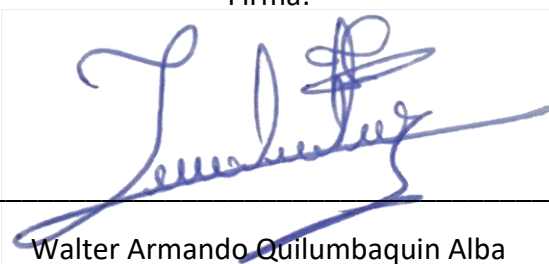
Yo, Walter Armando Quilumbaquin Alba con documento de identidad N° 1727021873 declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



Walter Armando Quilumbaquin Alba

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certificamos que el trabajo de integración curricular titulado: “Biomonitoreo con ADN ambiental y Registros por Encuentro Visual para la detección de anfibios en ambientes acuáticos del río Tena, Napo, Ecuador”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato artículo original, fue realizado por: Walter Armando Quilumbaquin Alba, bajo nuestra dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 22 de febrero de 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**HUGO
MAURICIO
ORTEGA
ANDRADE**

.....

H. Mauricio Ortega-Andrade

C.I: 1717270811

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**ANDREA
GRETA
CARRERA
GONZALEZ**

.....

Andrea Greta Carrera González

C.I: 1718343435

Índice general

Carátula	
Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad.....	II
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular.....	III
Índice general.....	IV
Índice de figuras.....	VI
Índice de tablas.....	VII
Resumen	VIII
Abstract.....	IX
Introducción.....	1
Materiales y métodos	4
Sitio de estudio.....	4
Permiso de colecta y procesamiento de muestras	4
Procesos de campo	5
Filtración de muestras ambientales.....	6
Procesamiento e identificación de especímenes colectados	6
Base de datos de referencia.....	7
Ensayos moleculares para muestras de tejidos	7
Ensayos moleculares para muestras ambientales	9
Análisis bioinformático y estadístico de datos metagenómicos.....	11
Resultados.....	11
Registros por Encuentro Visual (REV)	11
Base de datos de referencia local	12
ADN ambiental (eDNA) metabarcoding.....	12
Comparación eDNA vs REV	12
Discusión	16
Base de datos de referencia local	16

Selección de marcadores genéticos.....	17
eDNA metabarcoding vs REV	18
Beneficios y limitaciones de eDNA metabarcoding	21
Conclusiones	23
Agradecimientos	24
Conflictos de interés	24
Referencias	25
Gráficos y figuras	34
Material suplementario	35

Índice de figuras

Fig. 1. Área de estudio en la microcuenca del Río Tena, Napo, Ecuador con su respectiva elevación del terreno y los seis sitios de muestreo: charca y trancesos de río.	5
Fig. 2. Frecuencia relativa de la detección de especies de anfibios usando eDNA y REV durante seis meses de biomonitorio en la cuenca del río Tena, Napo, Ecuador...	13
Fig. 3. Probabilidad de detección para los métodos de biomonitorio REV y eDNA metabarcoding de cada especie detectada y todas las especies combinadas.....	15
Fig. 4. A) medición del perímetro de charcas. B) representación gráfica de los puntos de colecta de agua en charcas	34
Fig. 5. A) medición del ancho del río. B) representación gráfica de los puntos de colecta de agua en transectos de río.....	34
Fig. S1. Gel de agarosa 2% (m/v). Carril L. Marcador de peso molecular de 100 pb Ladder Biógena. Carriles 1-36: productos de PCR de ADN metagenómico.....	58
Fig. S2. Gel de agarosa 2% (m/v). Carril L. Marcador de peso molecular de 100 pb Ladder Biógena. Carriles 1-12: productos de PCR de controles negativos de transporte.....	59

Índice de tablas

Tabla S1. Localización geográfica de los sitios de muestreo en la microcuenca del río Tena	35
Tabla S2. Lista de especies registradas en la microcuenca del Tena y con sus respectivas secuencias. Estas secuencias se utilizaron para construir la base de datos de referencia local	37
Tabla S3. Lista de especies detectadas mediante el Registro de Encuentro Visual. Se especifica si fueron registradas en charcas o transectos de Río (T. Río) y el año de muestreo que fueron observadas.	54
Tabla S4. Registro de especies detectadas mediante eDNA metabarcoding con sus respectivos números de lecturas. Se especifica si fueron registradas en charcas o transectos de Río (T. Río) y el año que fue detectada.....	55
Tabla S5. Datos empleados para la creación del diagrama Sankey	57

Resumen

El declive de las poblaciones de anfibios es alarmante, debido a que cerca del 41 % de todas las especies se encuentran en peligro de extinción. Conocer la diversidad de especies y la composición de las comunidades de anfibios en áreas con alta biodiversidad requiere el uso de técnicas eficientes, de rápido diagnósticos y no invasivas. ADN ambiental (eDNA) metabarcoding se ha convertido en una herramienta rentable con alta sensibilidad y sus aportes son indispensables para la evaluación ambiental. En este estudio, se aplicaron técnicas de eDNA metabarcoding y Registros por Encuentro Visual (REV) para contribuir al conocimiento de la diversidad de anfibios acuáticos del río Tena. Ambas técnicas detectaron 33 especies, de las cuales el 61% son especies registradas para la microcuenca del río Tena. De manera individual, eDNA metabarcoding mostró una probabilidad de detección del 0.52 (CI =0.50-0.54) debido a que detectó 28 especies de anfibios, a diferencia de REV con una probabilidad del 0.21 (CI = 0.35-0.47) registró 20 especies. Adicionalmente, con REV se registraron dos especies *Allobates aff. insperatus* y *Cochranella resplendens* que fueron detectadas por primera vez para esta área. Mientras que, con eDNA metabarcoding se identificaron cuatro ranas de montaña *Pristimantis acerus*, *Pristimantis eriphus*, *Pristimantis mallii* y *Pristimantis sp. (HMOA2026)* en sitios con altitudes bajo los 600 m.s.n.m. En conclusión, estos resultados indicaron un mayor grado de detección de anfibios en ambientes acuáticos con eDNA metabarcoding en comparación de REV, pero la aplicación combinada de los dos métodos demostró mejorar la sensibilidad de detección de especies y generar información más robusta y detallada, esencial para el desarrollo de estrategias de conservación en la Amazonía ecuatoriana.

Palabras clave: Anfibios anuros, DNA Metabarcoding, biodiversidad, monitoreo, amazonia ecuatoriana

Abstract

The decline in amphibian populations is alarming, with about 41% of all species endangered. Knowing the diversity of species and the composition of amphibian communities in areas with high biodiversity requires the use of efficient, rapid diagnostic and non-invasive techniques. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding has become a cost-effective tool with high sensitivity and its contributions are essential for environmental assessment. In this study, eDNA metabarcoding and Visual Encounter surveys (VES) were applied to contribute to the knowledge of the diversity of aquatic amphibians of the Tena River. Both techniques detected 33 species, of which 61% are species registered for the Tena River micro-basin. Individually, eDNA metabarcoding showed a detection probability of 0.52 (CI = 0.50-0.54) since it detected 28 amphibian species, unlike VES with a probability of 0.21 (CI = 0.35-0.47) recorded 20 species. Additionally, VES recorded two species, *Allobates aff. insperatus* and *Cochranella resplendens* that were detected for the first time in this area. While, with eDNA metabarcoding, four mountain frogs *Pristimantis acerus*, *Pristimantis eriphus*, *Pristimantis mallii* and *Pristimantis sp. (HMOA2026)* were identified at sites with altitudes below 600 m.a.s.l. In conclusion, these results indicated a high degree of detection of amphibians in aquatic environments with eDNA metabarcoding compared to VES, but the combined application of the two methods demonstrated to improve the sensitivity of species detection and generate more robust and detailed information, essential for the development of conservation strategies in the Ecuadorian Amazon.

Keywords: Anuran amphibians, DNA Metabarcoding, biodiversity, monitoring, Ecuadorian Amazon

Biomonitoreo con ADN ambiental y Registros por Encuentro Visual para la detección de anfibios en ambientes acuáticos del río Tena, Napo, Ecuador

^{1*}Walter Armando Quilumbaquin Alba

¹Grupo de investigación en Biogeografía y Ecología Espacial, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Parroquia Muyuna, Kilómetro 7 vía a Alto Tena, Ecuador

*arman7085@gmail.com

Introducción

Los ecosistemas acuáticos brindan servicios relacionados con la biodiversidad, regulación del clima local, secuestro de carbono, entre otros beneficios [1,2]. En ellos interactúan poblaciones de diversos organismos que forman complejas redes ecológicas, que se han visto amenazadas por actividades antropogénicas y el cambio climático [3,4]. El caso de los anfibios es alarmante desde la perspectiva de conservación y ecología en estos ecosistemas, debido a que especies que eran frecuentemente observadas ahora se encuentran en peligro de extinción [5], varias de ellas a la espera de ser descritas taxonómicamente [6]; por lo que impera la necesidad de estudiarlas para entender su rol en el ambiente y sus potenciales aplicaciones [5,7,8].

Si bien las métricas existentes para el monitoreo de la diversidad de especies y composición de las comunidades de anfibios se basan en datos generados por técnicas tradicionales como Registros por Encuentro Visual (**REV**) o grabaciones bioacústicas [9–11], su aplicación requiere experticia en la identificación, múltiples visitas a los sitios de estudio y considerar que, en una región con alta diversidad, se reduciría la sensibilidad de detección, especialmente cuando se trata de especies con baja densidad poblacional [12]. Todos estos requisitos generan problemas para el desarrollo eficiente de estrategias de biomonitoreo, detección y conservación de anfibios, debido a que, se necesitaría invertir mucho tiempo y recursos para lograr cumplirlos [13,14]. Para complementar alternativas y atender estos problemas se pueden implementar técnicas basadas en ADN ambiental (**eDNA**), que son relativamente sencillas de aplicar, requieren

conocimientos básicos de biología molecular y taxonómicas, por lo que ha generado interés en los programas de monitoreo de biodiversidad [14–17].

La técnica de eDNA es una metodología emergente y no invasiva que usa trazas de ADN libre presente en el ambiente para la detección y monitoreo de varios organismos [15,18]. Todos los organismos vivos, independiente a su tamaño, forma o sistema ecológico al que pertenezca, liberan moléculas de ADN en forma intracelular o extracelular que llegan al ambiente a través de desechos orgánicos como heces, gametos, células de la piel, etc. [19,20]. Las muestras ambientales procedentes de suelo, agua o aire contienen información valiosa sobre la dinámica de un ecosistema, siendo hoy en día posible analizarlas; esto mediante los avances en las técnicas de preparación de muestras, a su relativo bajo costo y en el desarrollo de tecnologías de secuenciación de nueva generación más asequible y vanguardistas como Oxford Nanopore Technologies (ONT) y su secuenciador portátil MiniON [20–22].

A nivel mundial la eficiencia de eDNA metabarcoding ha sido evaluada para el monitoreo de especies invasoras, la detección de especies en peligro de extinción y en especies con baja densidad poblacional [17,23,24]. Fue utilizada por primera vez en el año 2008 por Ficetola et al. [25] para la detección de anfibios usando como fuente de ADN muestras de agua. Posteriormente, se ha documentado investigaciones enfocadas en el biomonitoreo de peces y anfibios en numerosos ambientes acuáticos [26,27], debido a que estos organismos liberan grandes cantidades de ADN al ambiente, lo que facilita su detección.

La persistencia en el ambiente de eDNA se ha estimado oscila entre 7 a 21 días, dependiendo de los factores bióticos y abióticos del entorno [28,29]. La aplicación de eDNA metabarcoding para el monitoreo de anfibios en ambientes acuáticos crece constantemente debido a la accesibilidad y disponibilidad de muestras ambientales. Estas pueden ser analizadas desde 15 mL hasta cientos de litros, dependiendo del diseño experimental y el taxón de interés [30–32]. Esta característica la convierte en una técnica idónea para el biomonitoreo de zonas con alta biodiversidad de anfibios y ricas en fuentes hídricas como, por ejemplo, las cuencas de la Amazonía ecuatoriana.

La cuenca de río Tena (provincia de Napo, Ecuador) localizada en la Amazonía ecuatoriana, es una zona con una gran riqueza hídrica, sus dos principales ríos son el Tena y el Pano que cuentan con varios afluentes que generan una red hídrica. Posee una variedad de ecosistemas que van desde páramo andino hasta selva tropical, en un rango altitudinal que va desde los 500 a 3 500 m.s.n.m. [33–35]. Los distintos hábitats identificados en esta cuenca están relacionados con una rica biodiversidad de anfibios [36].

Ecuador es el tercer país con mayor diversidad de anfibios en el mundo, con un total de 658 especies descritas, donde el 46.6% son endémicas [5,37]. A nivel de provincias amazónicas, la mayor riqueza de especies se encuentra en la provincia de Napo con 210 especies registradas [37,38]. En la cuenca del río Tena, donde se localiza una parte de la Reserva Colonso Chalupas se han registrado aproximadamente 50 especies [38–40]. Sin embargo, existen zonas inexploradas donde se estima que esta diversidad se incrementa alrededor de 180 especies [38,40]. En áreas como el campus Ikiam y las comunidades de Atacapi y Alto Tena, se han registrado alrededor de 25 especies de anfibios, aunque no todas están asociadas a ecosistemas acuáticos [37,38,40].

En Sudamérica, se han implementado programas de biomonitoreo con eDNA metabarcoding en la región amazónica de Bolivia y Brasil para la detección de anfibios [41,42]. En Ecuador, los estudios donde se aplica esta técnica para el biomonitoreo de especies son escasos, uno de ellos fue realizado en los Andes del norte del Ecuador y estaba dirigido para la detección *Procambarus clarkii*, un crustáceo considerado una especie invasora [24]. Asimismo, el uso de eDNA metabarcoding empieza a ganar interés mediante los proyectos de investigación que se desarrollan en la Universidad Regional Amazónica Ikiam [23]. Actualmente, la descripción y detección de anfibios en la cuenca del río Tena se lo ha realizado mediante captura, REV y grabaciones[43–45], por tal motivo, la implementación de eDNA permitirá mejorar los procesos de monitoreo de anfibios en esta zona.

Este es el primer estudio en la Amazonia ecuatoriana donde se usa eDNA para la detección de anfibios asociados a cuerpos de agua, con los siguientes objetivos: 1) Contribuir al conocimiento de la diversidad de anfibios acuáticos del río Tena aplicando técnicas de biomonitoreo como eDNA metabarcoding y REV. 2) Generar una colección

científica y una base de datos de referencia local tanto de manera taxonómica como genética de los anfibios presentes en ambientes acuáticos del río Tena. 3) Comparar el método eDNA metabarcoding versus REV, con la finalidad de conocer cuál de ellos, permite detectar el mayor número de especies de anfibios en los ambientes acuáticos del río Tena.

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El área de estudio está localizada en la microcuenca del río Tena (Provincia de Napo, Ecuador), en el piedemonte amazónico, a ocho kilómetros al oeste de la ciudad del Tena, en la parroquia de Atacapi (0°56'51"S; 77°51'37"W) [46]. Tiene un rango altitudinal que oscila entre 600 a 710 m.s.n.m. y una precipitación anual de 3 500 mm. Es una zona aledaña a la Universidad Regional Amazónica Ikiam que cuenta con numerosos cuerpos de agua, como ríos, riachuelos y charcas que alberga una alta biodiversidad de flora y fauna típica de los bosques piemontanos Andino-Amazónicos [47]; es una área perturbada debido a las actividades antropogénicas como la agricultura y piscicultura. Las colectas de especímenes y muestras para eDNA fueron realizadas en una sección del río Tena, la cual presentaba afluentes que podrían transportar ADN de sitios internos al área de interés y de charcas colindantes con aguas permanentes, es decir, aquellas que tienen agua durante todo el año **Fig. 1**.

Permiso de colecta y procesamiento de muestras

Este proyecto de investigación fue realizado mediante el Convenio Marco de Acceso a Recursos Genético Nro. MAATE-DBI-CM-2021-0177, dentro del proyecto titulado "Detección de especies clave de fauna (amenazadas, invasoras) y microorganismos (patógenos y microbiota) asociados a ecosistemas acuáticos del Ecuador, con técnicas moleculares de ADN ambiental y metabarcoding".

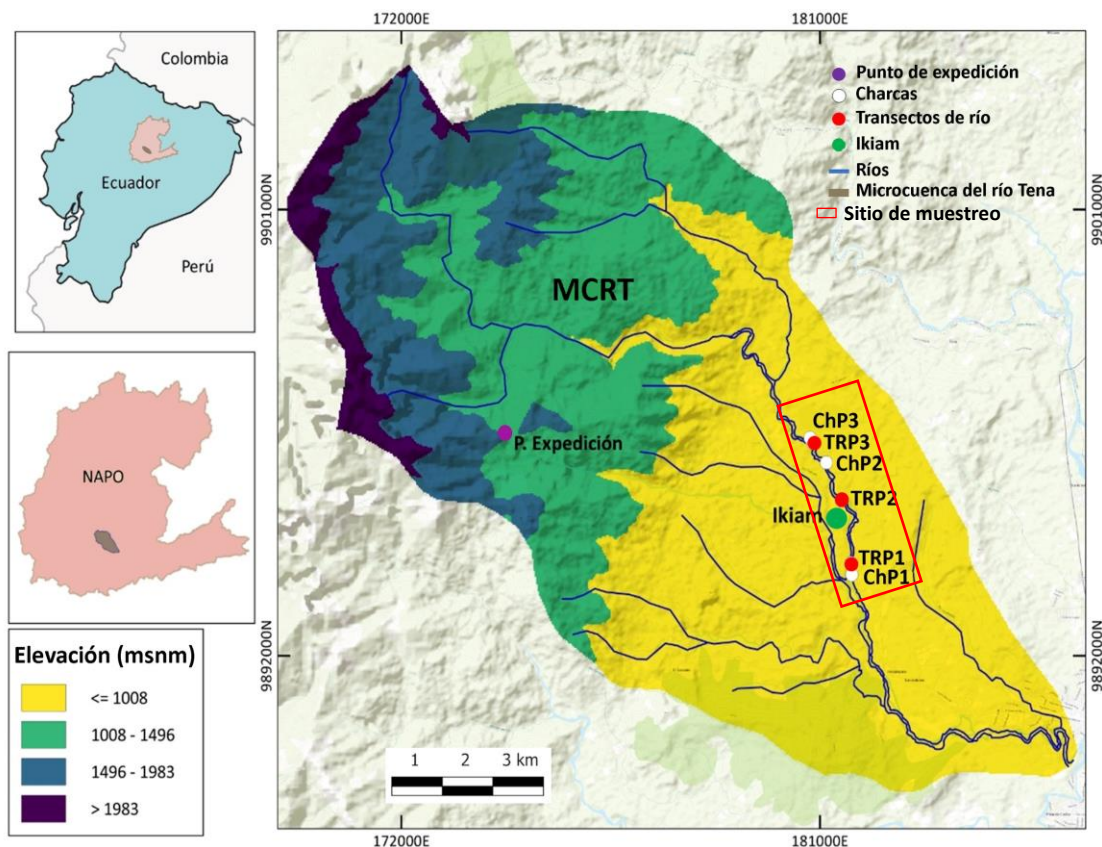


Fig. 1. Área de estudio en la microcuenca del Río Tena (MCRT), Napo, Ecuador y su elevación del terreno que evidencia la diferencia de altura que existe entre el sitio de muestreo y el punto de expedición. Consta de seis sitios de muestreo: tres en charca (ChP1, ChP2, ChP3, Blanco) y tres en transectos de río (TrP1, TrP2, TrP3, rojo). Tiene un sitio de exploración (morado) en la Reserva Colonso Chalupas, donde se realizó colecta de anfibios de montaña. Aledaña al área de muestreo se encuentra la Universidad Regional Amazónica Ikiam (verde). Localización geográfica detallada en tabla S1 (Material suplementario).

Procesos de campo

El método REV y la colecta de muestras de agua para eDNA fue realizada de manera simultánea entre los meses de enero a marzo en el 2020, y de febrero a abril en el 2021. Ambos procesos se realizaron una vez por mes en seis sitios: tres en charcas (ChP1-ChP3) y tres en transectos de río (TRP1-TRP3). Se aplicó el método REV en la noche (entre 20:00 a 00:00 hr) durante 30 min por sitio. La observación e identificación de anfibios en las charcas se efectuó mediante un desplazamiento lento (aprox. 2 metros/minuto) y aleatorio cubriendo la mayor área posible, y revisando vegetación, cuerpo de agua y suelo; para los transectos de río fue un proceso similar, pero el recorrido fue por las orillas. Con los registros obtenidos se creó una matriz de presencia (1) y ausencia (0) de especies para cada sitio.

Para obtener eDNA del sitio de interés, se colectaron muestras de agua en la mañana (entre 06:00 a 07:00 hr), Se midió el perímetro de cada sitio y luego se dividió en tres puntos, **Fig. 4-5**. En cada punto de colecta se tomaron 1 000 mL de agua en botellas de polietileno esterilizadas, realizando un barrido en zigzag tomando 250 mL cada dos metros, aproximadamente, con un volumen final para cada sitio de 3 000 mL. Para evitar la contaminación cruzada entre sitios se usaron guantes de nitrilos por cada muestra, procediendo a esterilizar los materiales con etanol al 70% antes del ingreso al siguiente punto de muestreo. A su vez, se adicionó al ensayo una botella con 1 000 mL de agua ultrapura como control, con la finalidad de conocer si existía contaminación entre muestras durante el transporte. Las muestras fueron transportadas en cajas térmicas plásticas, para mantener una cadena de frío a 10 °C y evitar la degradación del eDNA [48].

Filtración de muestras ambientales

Las muestras de agua para eDNA y controles de transporte fueron filtradas en la Universidad Regional Amazónica Ikiam, inmediatamente después de su llegada al laboratorio. Para este proceso empleamos un sistema de filtración de vidrio (Merck®) conectado a una bomba de vacío (GAST) y membranas de nitrocelulosa (PORAfil® NC), con un tamaño de poro de 0.45 µm y 47 mm de diámetro. Con la finalidad de generar una muestra compuestas y homogénea, se mezclaron los 1 000 mL de agua de cada punto de colecta (**Fig.4-5**) para obtener 3 000 mL por sitio muestreado. Luego, las muestras fueron filtradas hasta saturar los filtros, obteniendo entre 3 y 4 filtros por sitio que fueron almacenados en cajas petri a -20 °C, hasta su procesamiento con ensayos moleculares. Se incorporó el filtrado de agua destilada esterilizada como filtros de control negativo para detectar cualquier tipo de contaminación ambiental en el instrumental y filtros empleados. Estos controles siguieron los mismos procesos que las muestras ambientales.

Procesamiento e identificación de especímenes colectados

Los especímenes colectados con la técnica de REV fueron registrados fotográficamente y descritos con la finalidad de tener las características morfológicas en vida para su identificación taxonómica. Todos los especímenes fueron sacrificados, usando un anestésico local (Lidocaína al 2%) que fue colocado tópicamente sobre la piel de los

especímenes [49]. Posteriormente, se extrajo una muestra de tejido hepático y muscular de cada espécimen, las cuales fueron conservadas en microtubos de 2 mL con etanol al 96% en congelación (-20°C), hasta su procesamiento con ensayos moleculares. Finalmente, cada espécimen recibió un código único de colección científica y fueron identificadas usando claves dicotómicas de las características morfológicas de cada especie [39], mediante comparaciones con especies registradas en la plataforma Bioweb Ecuador [37] y la colección de referencia de anfibios de Ikiam. Todos los ejemplares reposan en la colección científica del Laboratorio de Biología Integrativa Ikiam-Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO).

Base de datos de referencia

Basado en muestreo en campo y reportes de literatura sobre la diversidad y distribución de especies de anfibios en la microcuenca del río Tena [37,38,40], se definió una lista de 54 especies de anfibios que podrían ser detectados mediante eDNA metabarcoding Tabla S2 (material suplementario). Para construir la base de datos de referencia del gen 16S rRNA, se realizó la secuenciación de al menos un individuo de cada una de las 54 especies. En el caso de no tener disponible el tejido, se optó por descargar su secuencia del NCBI. Se generaron 43 secuencias del gen 16S rRNA que correspondían a 20 especies para la base de datos local. Los tejidos fueron obtenidos a partir de los especímenes colectados mediante la técnica REV.

Para complementar la base de referencia local y cumplir el número de secuencias requeridas (>100) para una base de referencia [13], se extrajeron todas las secuencias de anfibios del gen 16S rRNA reportados en Ecuador de la base de datos NCBI. Además, se añadieron secuencias de peces, mamíferos, aves y bacterias con la finalidad de mejorar la asignación taxonómica de eDNA. Las secuencias fueron analizadas *in silico* empleando el programa ecoPCR [50], donde se simuló una PCR *In silico* para comprobar que todas las secuencias de referencia amplifican con los marcadores seleccionados Vert-16S-eDNA-F1 (5'-AGA CGA GAA GAC CCY dTG GAG CTT-3') y Vert-16SeDNA-R1 (5'-GAT CCA ACA TCG AGG TCG TAA-3') [13].

Ensayos moleculares para muestras de tejidos

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 5-10 mg de tejido hepático o muscular, dependiendo de la muestra disponible de cada espécimen, utilizando el kit

Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA) siguiendo el protocolo de fábrica (Material suplementario). Para determinar la pureza y cuantificar de ADN extraído se usó el equipo NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) empleando 2 µl de ADN genómico de cada muestra. La amplificación de fragmentos cortos (≈600 bp) del gen ARN ribosomal 16S (16S rRNA) se realizó utilizando el equipo termociclador miniPCR™ mini 16 (MiniPCR, Cambridge, USA), con un volumen final de 25 µl, usando 50 ng/µl de ADN extraído. La mezcla de amplificación se realizó empleando 2 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), agua libre de nucleasas, 1X de PCR Buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs Mix, 0.2 µM de los marcadores 16 SA-L (5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'), 0.2 µM de 16 Sb-H (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACGT-3') [51] y 50 ng/ µl de albúmina de suero bovino (BSA, Invitrogen, Carlsbad, USA). El perfil térmico programado fue una primera denaturación por 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 59 °C y 45s a 72 °C. A continuación, se realizó, una extensión final de 5 min a 72 °C y un enfriamiento a 4°C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en la cámara de electroforesis vertical BlueGel™ electrophoresis system (MiniPCR, Cambridge, USA) utilizando la tinción de Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, USA). Previo al procedimiento de secuenciación, los productos amplificados fueron purificados empleando el kit comercial Enzymatic PCR Cleanup using Exonuclease I and Shrimp Alkaline (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), usando el protocolo de fábrica. La secuenciación del gen 16Sr se realizó mediante el método Sanger enviando las muestras a la empresa Macrogen (Seoul, Corea del Sur) para su procesamiento. Los datos de los electroferogramas obtenidos mediante el método Sanger fueron alineados y editados usando el software libre Ugene V.41.0 (Unipro, Novosibirsk, Rusia, <http://ugene.net/>), para generar una secuencia consenso de cada especie.

Las secuencias obtenidas en este estudio formaron parte de la base de datos de referencia local (Tena) y fueron utilizadas para la identificación taxonómica molecular de los especímenes colectados considerando un porcentaje de similitud > 98%. Para ello, las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) a través del algoritmo Basic Local Alignment Search

Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de asignar el género y especie de cada individuo colectado.

Ensayos moleculares para muestras ambientales

Después del proceso de filtración, los filtros obtenidos de los controles negativos y de las muestras fueron cortados en pequeñas piezas cuidadosamente utilizando bisturís (N° 11) estériles. Los pedazos fueron colocados en microtubos de 1.5 mL estériles. A continuación, se realizó la extracción de ADN metagenómico empleando el método descrito en Baetens [30] con modificaciones de acuerdo a las condiciones del laboratorio (Material suplementario)[30]. Las muestras de ADN obtenidas fueron cuantificadas usando el equipo Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, USA) empleando 2 µl de ADN metagenómico. La amplificación de fragmentos cortos del gen ARN ribosomal 16S (16S rRNA) se realizó utilizando el equipo termociclador miniPCR™ mini 16 (MiniPCR, Cambridge, USA), con un volumen final de 25 µl, usando entre 15-30 ng/ µl ADN extraído. La mezcla de amplificación se realizó empleando 1 U de Taq DNA Polymerase (Bio Basic, Markham, Canadá), agua libre de nucleasas, 1X de Taq reaction Buffer, 2 mM de MgSO₄, 0.2 mM de dNTPs Mix, 0.2 µM de los marcadores Vert 16S eDNA F1 (5'-**TTT CTG TTG GTG CTG ATA TTG CAG** ACG AGA AGA CCC YDT GGA GCTT-3'), 0.2 µM de Vert 16S eDNA R1 (5'-**ACT TGC TCG CTC TAT CTT CGA** TCC AAC ATC GAG GTC GTAA-3') [52] y 50 ng/ µl de albúmina de suero bovino (BSA, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA). El perfil térmico programado fue una primera denaturación por 3 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30s a 94 °C, 60s a 58 °C y 90s a 72 °C; continuo con una extensión final de 10 min a 72 °C y un enfriamiento a 4°C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en la cámara de electroforesis vertical BlueGel™ electrophoresis system (MiniPCR, Cambridge, USA) utilizando la tinción de Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, USA). Cabe mencionar, que los marcadores utilizados para la amplificación fueron sintetizados añadiendo los adaptadores de Oxford Nanopore Technologies [53].

Previo a la preparación de librerías, se realizó una segunda amplificación con 36 muestras de eDNA más un control negativo que fueron visualizadas en gel de agarosa, se descartaron 6 muestras al no visualizarse la presencia de banda (**Fig. S1**). Las muestras

restantes (30) fueron utilizadas para preparar las librerías, una para cada muestra, para ello se empleó el kit empleando PCR Barcoding Expansion Pack 1-96 (EXP-PBC096, ONT, Oxford UK). El volumen final de la librería fue de 50 μ L y se realizó mezclando 1 μ L PCR Barcode (BC01 – BC32), 24 μ L de producto de PCR y 25 μ L LongAmp *Taq* 2X Master Mix (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). El perfil térmico programado fue una primera denaturación por 3 min a 95 °C, seguido por 15 ciclos de 15s a 95 °C, 15s a 62 °C y 30s a 65 °C, una extensión final de 10 min a 65 °C y un enfriamiento a 4°C. Todas las librerías fueron mezcladas en un microtubo de 1.5 mL usando 10 μ L de cada muestra. La purificación de la mezcla de librerías fue realizada con 1.8x Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA) y cuantificada con el equipo Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, USA). Posteriormente se diluyó la mezcla de librería a 1 μ g en 47 μ L de agua libre de nucleasas. La reparación de ADN y la ligación del adaptador fueron realizadas usando el protocolo PCR barcoding (96) amplicons SQK-LSK109 (ONT, Oxford, UK) y los kits NEBnext FFPE DNA Repair Mix (M6630), NEBNext Ultra II End repair / dA-tailing Module (E7546) y Ligation Sequencing Kit 1D (SQK-LSK109, ONT, Oxford UK). Finalizado la preparación de las librerías, la celda de flujo fue preparada utilizando el Flow Cell Priming kit (EXP-FLP002). La mezcla de carga tuvo un volumen final 75 μ L y fue realizada con 7.5 μ L de Sequencing Buffer (SQB), 25.5 μ L de Loading Beads (LB) y 35 fmol de librería de ADN en 12 μ L.

La secuenciación metagenómica se realizó empleando el secuenciador de cuarta generación llamado MinION (ONT, Oxford, UK) conforme las instrucciones del protocolo MinKNOW (ONT, UK, <https://n9.cl/7gjtj>). El equipo utilizó el software MinKNOW v21.06.0 (ONT) que tiene integrado el programa Guppy v5.0.11 (ONT) para controlar el secuenciador, coleccionar en tiempo real las secuencias, filtrar las lecturas por calidad > 8, realizar el Basecalling y demultiplexar las lecturas por barcode. El tiempo de secuenciación fue de 15 horas. Transcurrido el tiempo de secuenciación, se finalizaron los programas, se desconectó el equipo y se procedió a la limpieza de la celda de flujo (FLO MIN106 R9.4.1, ONT, Oxford, UK) con el kit de limpieza Flow Cell Kit (EXP-WSH004, ONT, Oxford, UK) siguiendo las instrucciones de fábrica, la celda fue guardada a -4°C.

Análisis bioinformático y estadístico de datos metagenómicos

Los archivos FastQ generados por el software MiniKNOW fueron procesados con el software Python v3.10.1. y Docker Desktop 4.1 (<https://docs.docker.com/>). El análisis se realizó de manera independiente para cada muestra secuenciada. Los archivos fueron descomprimidos y filtrados por calidad ($Q > 12$), con el paquete NanoFilt v2.5.0 (<https://github.com/wdecoster/nanofilt>) [54,55]. Para la generación de secuencias consenso de datos de eDNA metabarcoding se usó el programa Amplicon_sorter (https://github.com/avierstr/amplicon_sorter), siguiendo los pasos descritos en Vierstraete y Braeckman [56] configurando un rango de tamaño entre 200 a 500 pb. Se identificó la unidad taxonómica operativa (UTO) utilizando el algoritmo BLAST, donde se alinearon las secuencias consenso obtenida de eDNA con la base de referencia construida en este estudio [57]. Las UTOs que presentaron una similitud $< 97\%$ con respecto a la base de datos fueron eliminadas.

La probabilidad de detección de cada especie registradas por eDNA metabarcoding y REV fue estimada en base a modelos de sitio de ocupación [58,59] con el paquete UNMARKED usando R.4.1.2 (R Core Team 2021) [60]. Para la probabilidad de detección y la comparación de registros entre ambas técnicas aplicadas, se consideró como una unidad o un registro, a un taxon identificado (género o especie) para eDNA y una especie para REV. Se creó un diagrama Sankey para visualizar las especies y familias detectadas con eDNA y REV en los seis sitios de muestreo utilizando R.4.1.2 (R Core Team 2021) con el paquete networkD3 (<https://www.r-graph-gallery.com/sankey-diagram.html>). El grosor de las líneas de conexión en el diagrama corresponde al número de especies identificadas con la excepción de las líneas entre los nodos sitio-familia que corresponde a la proporción ((Número de especies detectadas para una familia por eDNA y REV/registro total de las especies de una familia en todo el muestreo) X número de especies detectadas de la familia un sitio) **Fig.2**.

Resultados

Registros por Encuentro Visual (REV)

Se realizaron 36 muestreos (18 en charcas y 18 en transectos de río) para el biomonitoreo mediante los métodos de REV y eDNA metabarcoding. Se registraron 248

especímenes que correspondían a 20 especies mediante REV. Además, se reportan 195 especímenes de anfibios en charcas y 53 en los transectos de río, siendo las especies más abundantes: *Boana punctata* (38) y *Dendropsophus bifurcus* (36) para charcas, y *Rhinella marina* (18) y *Scinax ruber* (15) para transectos de río. Durante el REV también observamos especies con un único registro como *Allobates aff. insperatus*, *Cochranella resplendens*, *Scinax cruentomma*, *Pristimantis variabilis* y *Adenomera andreae* Tabla S3 (material suplementario).

Base de datos de referencia local

La base de datos de referencia local de anfibios fue construida con 522 secuencias del gen 16S rRNA registradas en el Ecuador, de las cuales, 20 secuencias de diferentes especies fueron generadas en este estudio, 477 se extrajeron de la base de datos (NCBI) y 25 secuencias se generaron en el proyecto “Caracterización genética y ecológica de la herpetofauna en un Transecto Altitudinal en la Cuenca del Río Napo y la Reserva Colonso-Chalupas, Ecuador” de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. También se incluyeron secuencias de peces (5), mamíferos (5), aves (5) y bacterias (5) para polarizar el alineamiento con las secuencias consenso generadas por eDNA de anfibios. En total, la base de datos de referencia tiene 542 secuencias de varios grupos.

ADN ambiental (eDNA) metabarcoding

Las muestras de eDNA fueron secuenciadas generando un total de 2 704 000 lecturas. Después de la depuración y filtrado ($Q > 8$ / $Q > 12$) con los algoritmos de Minknow y Amplicon_sorter se obtuvieron 2 508 000 y 1 204 938 lecturas, respectivamente. Para anfibios se generaron 375 056 lecturas (326 630 para charcas y 48 426 para río). Las lecturas restantes correspondían a varios grupos: peces (479 972), mamíferos (121 731), aves (2 249) y bacterias y otros grupos (225 930). Finalizado el proceso de análisis, todos los controles de transporte, amplificación y secuenciación resultaron negativos **Fig. S2**. La lista de especies y lecturas se detallan en la Tabla S4 (material suplementario).

Comparación eDNA vs REV

Mediante el uso de eDNA metabarcoding y REV se detectaron en total 33 especies de anfibios en los seis sitios de muestreo, durante seis meses. De manera individual, eDNA

metabarcoding detectó 28 especies y REV 20 especies. Estas corresponden a 15/33 especies registradas por ambos métodos, 13/33 especies detectadas con eDNA que no fueron registradas con REV y 5/33 especies que eDNA no detectó, pero fueron observadas con REV. Del total de especies detectadas se identificaron seis familias de anfibios, siendo Hylidae la de mayor riqueza con 24 especies (13 eDNA, 11 REV), seguido por Strabomantidae con 12 especies (9 eDNA, 3 REV).

Todas las familias fueron detectadas con ambos métodos, excepto Aromobatidae que tuvo un único registro (*A. insperatus*) mediante REV **Fig. 2** y Tabla S5 (Material suplementario). Dentro de las detecciones con eDNA se identificó cuatro especies en particular: *Pristimantis acerus*, *Pristimantis eriphus*, *Pristimantis mallii* y *Pristimantis sp.* (HMOA2026). Estas especies son ranas de regiones de montaña registradas en el sitio de exploración dentro de la Reserva Colonso-Chalupas (0°56'07.0"S;77°55'36.6"W) a 1 518 m.s.n.m. **Fig. 1 y 2**.

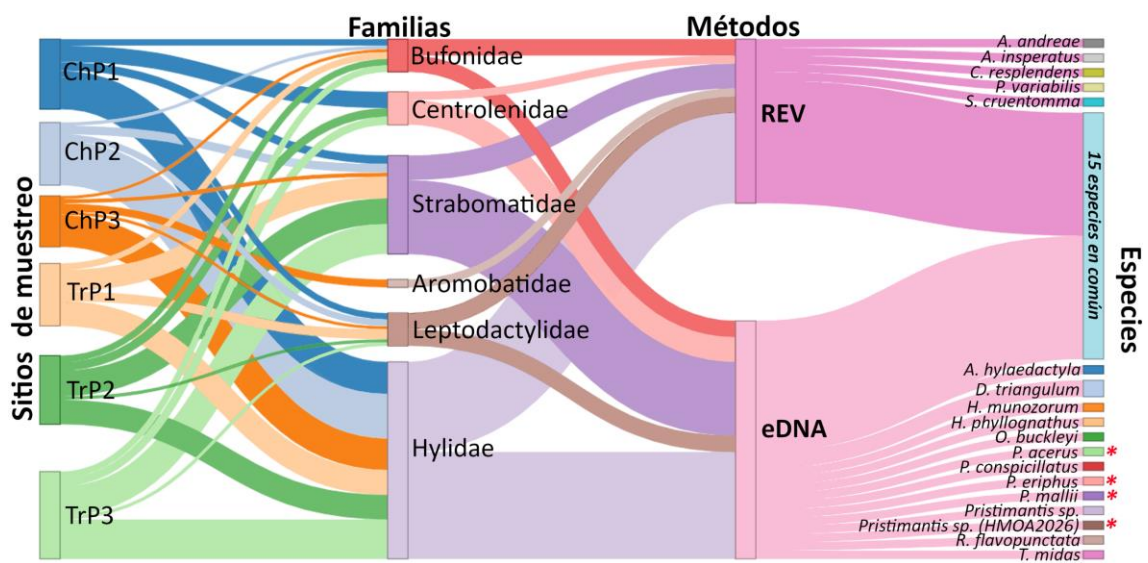


Fig. 2. Frecuencia relativa de la detección de especies de anfibios usando eDNA y REV durante seis meses de biomonitorio en la cuenca del río Tena, Napo, Ecuador. Se detallan los sitios de muestreo (Ch = charca, Tr = transecto de río), familias identificadas, métodos aplicados y especies de anfibios detectados por cada técnica. Las especies que presentan un asterisco (*) son especies de montaña.

La probabilidad de detección mediante eDNA tuvo un amplio rango de variación para cada especie, siendo la mínima para *Oreobates quixensis* con un $P = 0.29$ y la máxima

para *Rhinella marina* y *Scinax ruber* con $P = 1$. Esta diferencia puede deberse a que *O. quixensis* fue detectado en un único sitio (TrP2), mientras que *R. marina* y *S. ruber* fueron registradas en todos los sitios de muestreo. La probabilidad de detección para el método REV varió desde un $P = 0.06$ para las especies *O. quixensis* y *Pristimantis malkini*, que fueron observadas en dos ocasiones en el mismo sitio de muestreo (TrP2); Especies con un $P > 0.70$ fueron *Scinax ruber* ($P = 0.71$) y *R. marina* ($P = 0.79$), detectadas en distintos ambientes acuáticos durante los seis meses de monitoreo (ChP1, ChP2, TrP1, TrP2, TrP3). Las especies *Boana geographica* ($P = 0.39$), *Boana punctata* ($P = 0.49$) y *Scinax garbei* ($P = 0.58$) fueron observadas en el mismo sitio (ChP2) durante todo el tiempo de muestreo. Estas especies fueron las únicas que presentaron diferentes estados de desarrollo, desde huevos, juveniles en metamorfosis y adultos.

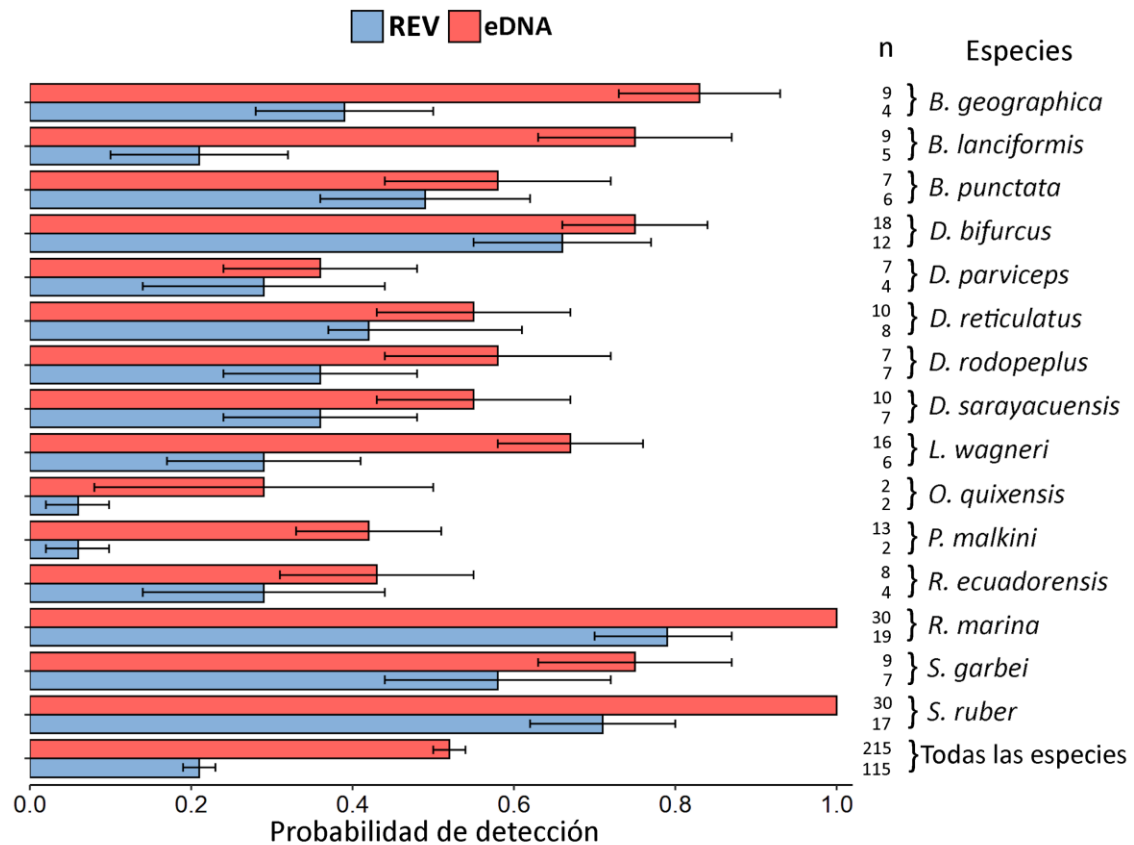


Fig. 3. Probabilidad de detección para los métodos de biomonitorio REV y eDNA metabarcoding de cada especie detectada y todas las especies combinadas. Las barras de error representa el intervalo de confianza (CI) del análisis y *n* hace referencia el número de detección de cada método, para cada especie y para todas las especies.

La probabilidad de detección de estas tres especies al usar eDNA metabarcoding corresponde a: *B. geographica* con $P = 0.83$, *S. garbei* con $P = 0.75$ y *B. punctata* con $P = 0.58$, se evidencia un aumento en su probabilidad de detección al comparar con la probabilidad obtenida en REV, esto es debido a que fueron detectados en varias charcas (ChP3, ChP2) y en algunos casos en río (TrP3, TrP2) **Fig. 3**. Al incluir todas las especies, la probabilidad de detección para eDNA metabarcoding fue de 0.52 (CI = 0.50-0.54) vs 0.21 (CI = 0.35-0.47) para el método REV. La aplicación de eDNA metabarcoding muestra una mayor eficiencia de detección en comparación de REV, pero al usar esta técnica se evidencia la presencia de ranas de montaña, previamente colectados en la zona alta de la microcuenca del río Tena. **Fig. 2**.

Discusión

Base de datos de referencia local

La información generada a partir del monitoreo de organismos mediante métodos tradicionales y emergentes son de relevancia tanto por cuestiones ecológicas y de conservación de los organismos y sus hábitats [42,49,61,62]. En este estudio, realizamos un monitoreo de comunidades de anfibios en ambientes acuáticos mediante las técnicas de REV y eDNA metabarcoding. Se construyó una base de datos de referencia que incluyó 20 secuencias nuevas generadas en este trabajo. Un dato importante de mencionar es que, la especie *Rhaebo ecuadorensis* no fue encontrada en la base de datos del NCBI, debido a un error de etiquetado. Esto se debió a que, cuando se realizó el alineamiento de nuestra secuencia con la base de datos obtuvimos un 99.9% de identidad con *Rhaebo glaberrimus* una especie de la cual *R. ecuadorensis* fue separada [63,64]. Con este ejemplo, se puede observar que no toda la información genética del NCBI está correctamente curada ya que se puede encontrar secuencias con información desactualizada [65]. Por tal motivo, el análisis previo de las secuencias que ingresan a nuestras bases de datos permite solventar estas discordancias.

Como se ha observado en otros estudios de Sudamérica [16,41,42], para efectuar un biomonitoreo de anfibios exitoso con eDNA metabarcoding en zonas con alta biodiversidad [38,66], y lograr recuperar la composición taxonómica de muestras ambientales a partir de miles de secuencias, es necesario construir una base de datos de referencia lo más completa posible, curada y de buena calidad, con la finalidad de priorizar una correcta identificación [13,67,68]. Varios reportes científicos detallan el efecto desfavorable sobre los análisis cuando una base de datos tiene errores de curación, lo que ocasiona omisiones en las identificaciones y genera el descarte de secuencias que serían consideradas como falsos positivos [13,15,69]. En este estudio, la base de datos fue diseñada para la detección de anfibios, por lo cual el 96.3% de las secuencias son de este grupo. Para la microcuenca del río Tena este trabajo aporta con el registro de 20 especies de anfibios, siendo *A. aff. insperatus* y *C. resplendens* documentadas por primera vez para esta área. Como menciona Angulo [49] los nuevos aportes referentes a la distribución de las especies son relevantes, especialmente en

área inexploradas, ya que esto permite completar los inventarios de biodiversidad de un lugar y a su vez genera información actualizada para el desarrollo de estrategias de conservación.

Selección de marcadores genéticos

Los marcadores genéticos son fundamentales para eDNA metabarcoding; su correcta selección permite amplificar las muestras ambientales que tengan fragmentos de ADN del grupo taxonómico de interés, descartando el resto [70–72]. Generalmente, para el monitoreo de comunidades biológicas se utilizan marcadores universales con regiones conservadas (donde se unen los marcadores) y sitios hipervariables entre especies (para la asignación taxonómica) [73]. Estos marcadores deben cumplir con una alta especificidad para el grupo de interés con una amplia cobertura intragrupo y un alto grado discriminatorio que garantice la identificación de los organismos [74,75].

Para este estudio, se utilizaron marcadores para vertebrados que permitieron detectar varias especies de anfibios asociados a ecosistemas acuáticos (Tabla S4), pero también otros grupos como peces, aves y mamíferos. En la mayoría de las muestras ambientales secuenciadas, hubo una mayor prevalencia de anfibios y peces; estos resultados concuerdan con los obtenidos en Vences et al. [52], quienes diseñaron los marcadores moleculares para la detección de peces y anfibios y lograron identificarlos hasta nivel de especies. De igual forma, Evans et al. [76] que utilizaron el mismo marcador Forward, pero diferente Reverse; lograron detectar la diversidad de especies de estos dos grupos en un mesocosmos. Estos resultados evidencian que, dependiendo del objetivo del estudio se puede utilizar marcadores generales para obtener resultados de varios grupos taxonómicos y dentro de ellos, nuestro grupo de interés.

Como se ha observado en este y otros trabajos [52,76], los marcadores para vertebrados tienen una alta especificidad, un alto poder discriminatorio y han sido utilizados para la detección de anfibios. A pesar de ello, algunas muestras ambientales procesadas en este trabajo no fueron amplificadas. Esto puede darse, por algunos factores ajenos a los criterios de selección de marcadores moleculares como: presencia de inhibidores naturales de la ADN polimerasa como el ácido húmico y fúlvico [77], cambios estructurales en las hebras de ADN [78], etc. Estos factores, pueden disminuir o

bloquear la actividad de los marcadores genéticos generando una baja eficiencia de unión ADN-marcador, lo cual puede desencadenar problemas de amplificación, presencia de falsos negativos [79] y fallos en la detección de especies, respectivamente [13,80,81].

La selección de marcadores moleculares confiables requiere, una evaluación *in silico* con la finalidad de estimar su especificidad y cobertura taxonómica e *in vitro* para conocer su rendimiento de amplificación [75]. En este estudio se realizó una evaluación inicial *in silico*, lo cual nos permitió tener un indicio de las especies que podrían ser detectadas mediante eDNA metabarcoding y a su vez se pudo determinar que los marcadores moleculares eran idóneos para la detección y monitoreo de comunidades de anfibios presentes en la microcuenca del río Tena.

eDNA metabarcoding vs REV

La aplicación simultánea de eDNA y métodos tradicionales en áreas con alta biodiversidad, ha sido analizada [41,42,82] y recomendada [83] en varios estudios, debido a que existe una compatibilidad entre estos dos enfoques al momento de evaluar la diversidad de macroorganismos [84]. El uso de múltiples técnicas durante el biomonitoreo de organismos puede generar información más completa y detalla en comparación de a un monitoreo mediante una única técnica debido a que cada técnica tiene su característica particular y metodología establecida para la detección de especies [16,49,82].

En el biomonitoreo de anfibios en la microcuenca del río Tena se utilizó eDNA metabarcoding y REV, en conjunto estas dos técnicas lograron registrar un total de 33 especies, es decir un 61% de las especies documentadas previamente en el área de interés. El 39% restante de las especies registradas en el área de estudio posiblemente no fueron detectadas debido a que muchos anfibios son susceptibles a contaminantes y áreas perturbadas, viven en diferentes hábitats (p.ej. el dosel del bosque), tiene una baja densidad poblacional, etc. [37,38,45,85]. Con eDNA se detectaron 28 especies y registro una probabilidad de detección del 52%, mientras que con REV se identificó 20 especies y tuvo una probabilidad del 21%. Estos resultados evidencian que eDNA tiene un mayor grado de detección en comparación que REV y esto concuerda con los resultados

mencionados en el metaanálisis realizado por Fediajevaite et al. [84] donde compararon 49 estudios que aplicaron estas dos técnicas mencionadas.

Si bien eDNA en promedio puede detectar más taxones que REV, hay especies que son registradas por ambas técnicas, esto depende de su abundancia y distribución en los ambientes acuáticos [82,86,87]. En este trabajo se registraron 15 especies de anfibios que fueron detectadas por las dos técnicas mencionadas, estos registros coinciden con las especies observadas en las zonas de amortiguamiento de la Reserva Biológica Colonso Chalupas [40]. De igual forma, estas especies frecuentemente han sido observadas asociadas a cuerpos de agua natural lénticos [37,88], donde se esperaría una mayor concentración de ADN y abundancia de especies, lo cual aumentaría la probabilidad de detección, tanto con eDNA metabarcoding y REV [20,30,89].

Por otra parte, se ha observado en diversos estudios la presencia de una fracción de especies que puede ser detectadas, bien por eDNA metabarcoding o por métodos tradicionales [16,84,90,91]. En nuestro caso, se registraron cinco especies que fueron observadas únicamente por REV; tres de estas especies son *A. andreae*, *A. insperatus* y *P. variabilis* que han sido detectadas en anteriores salidas a campo en la microcuenca del río Tena [38,40]. Como mencionan, Ron et al. [37], estas especies se caracterizan por ser ranas terrestres y diurnas, y usualmente son observadas perchando en hojarasca o debajo de árboles caídos. Por esta razón, al usar muestras de agua para el biomonitorio de estas poblaciones se esperaría una baja detección con eDNA metabarcoding debido a que no se cumpliría el criterio de inclusión en la relación muestra-organismo [13,37,80]. Con respecto a las dos especies restantes *C. resplendens* y *S. cruentomma*, estas especies no han sido registradas en colecciones científicas en nuestra área de estudio, ni en zonas aledañas, pero sí en la provincia de Napo [92,93]. Son especies asociadas a cuerpos de agua, pero son poco frecuentes en áreas disturbadas como nuestro sitio de muestreo [37]. El registro de *C. resplendens* es inesperado, ya que se considera como una especie raramente observada en ecosistemas Amazónicos perturbados. Las cinco especies referidas no fueron detectadas por eDNA metabarcoding, pudiendo ser el resultado de deficiencias en la captura de ADN ambiental durante este estudio.

Adicionalmente, 13 especies fueron únicamente detectadas mediante eDNA metabarcoding. Estas especies fueron previamente registradas en la provincia de Napo y en la microcuenca del río Tena [38,40,45]. Sin embargo, cuatro de ellas *P. acerus*, *P. eriphus*, *P. mallii* y *Pristimantis* sp. (HMOA2026) se caracterizan por ser ranas de montaña que fueron registradas en la zona de exploración dentro de la Reserva Colonso Chalupas (**Fig. 1**). En el área de estudio, estas especies fueron detectadas en la época lluviosa, en diferentes meses y puntos de muestreo. La especie *P. acerus* fue detectada en los puntos TrP1, TrP2 y TrP3 en una ocasión en enero 2020 y en dos en marzo del 2021. *P. mallii* fue detectado en los puntos TrP1, TrP2, TrP3 y ChP1 en una ocasión en enero 2020 y en tres ocasiones entre los meses de marzo y abril 2021. Asimismo *P. eriphus* fue detectado en los puntos TrP1 y TrP3 en dos ocasiones entre los meses de marzo y abril del 2021. Finalmente, *Pristimantis* sp. (HMOA2026) fue detectado en los puntos TrP2 y TrP3 en dos ocasiones en marzo del 2021.

La presencia de ADN de las ranas de montaña en los sitios de muestreo, pueden darse debido a las características geomorfológicas de la microcuenca del río Tena, ya que tiene una amplia red hídrica con un área de drenaje de aprox. 134.86 km², una pendiente promedio de 22.4% y una precipitación anual entre 3 500 – 4 000 mm [33]. Todas estas características pudiesen promover que el material genético de especies presentes en las regiones montañosas de la cuenca alta, viaje hacia el río y luego sea transportado corriente abajo hacia la zona de estudio (distancia aprox. 13.4 km). Esta afirmación se corrobora con el desplazamiento que tiene el material orgánico, incluyendo al ADN, en los ríos [94,95].

Al trabajar con eDNA metabarcoding en transecto de río, es necesario considerar que el eDNA no será exclusivamente de las especies del sitio, sino que, hay una probabilidad de detectar especies de regiones aledañas [96,97]. Las cuatro especies de montaña registradas en la parte baja de la microcuenca del río Tena, son falsos positivos para los ecosistemas estudiados. Esto concuerda con lo mencionado por Bohmann et al. [15], un falso positivo es cuando el eDNA detecta una especie que no está presente en el sitio. La identificación de este tipo de falsos positivos durante la asignación taxonómica es fundamental para no generar datos sesgados que en futuros estudios no puedan ser

corroborados. Estos desaciertos pueden ser distinguidos siempre y cuando tengamos una base de datos de referencia, curada taxonómicamente, con las especies cuyas distribuciones biogeográficas sean propias y correspondan a la región o área de estudio.

Beneficios y limitaciones de eDNA metabarcoding

eDNA metabarcoding es una prometedora técnica que presenta una alta eficiencia en el monitoreo de la biodiversidad, especialmente en zonas de difícil acceso que requieren un gran esfuerzo de muestreo, no necesita un contacto directo con el organismo de interés ya que utiliza como fuente de información muestras ambientales, es relativamente más económica y no invasiva. Sin embargo, dado que la técnica de eDNA utiliza únicamente secuencias de ADN tiene limitaciones para estimar la abundancia de organismos, así como otros aspectos de su biología (p.ej. edad, sexo). Para superar esta limitante es necesario complementar el monitoreo con colecciones científicas a partir de REV u otra técnica tradicional [11,90]. Asimismo, para la identificación de híbridos genéticos sería un verdadero reto, porque eDNA usa amplicones cortos que permite diferenciar entre especies divergentes, pero con limitaciones en la resolución de individuos de la misma especie [82].

La asignación taxonómica de secuencias realizada durante el análisis de datos de eDNA metabarcoding depende y está limitada a una base de datos de referencia local y de manera indirecta de la información que generan los métodos tradicionales [13,80]. Como se reportó en este estudio, todas las secuencias consenso obtenidas mediante eDNA necesitan ser comparadas para identificar las unidades taxonómicas operacionales (UTOs), además se requiere de información biogeográfica y ecológica de las especies detectadas, con la finalidad de poder discriminar las especies que se encuentran fuera de nuestra zona interés [13,15,96]. Un claro ejemplo de ello, son nuestros resultados donde se identificaron ranas de montaña que viven a partir de 1 500 m.s.n.m. en sitios con altitudes bajo los 600 m.s.n.m. Sin embargo, para tratar de superar esta limitante en eDNA, varios estudios proponen como alternativas el uso de un enfoque libre de taxonomía, el cual emplea un índice molecular calculado directamente de los datos de eDNA para no depender de una base de referencia [98,99]. El desarrollo de este enfoque podría mejorar la resolución taxonómica la cual es un problema en

eDNA dado que no todas las secuencias obtenidas se alinean con un porcentaje de identidad > 97%. Esto puede darse por varios factores como, por ejemplo, no tener una secuencia de referencia de la especie, contaminación durante los procesos de laboratorio o porque los marcadores utilizados no son específicos [72,100].

Replicar las condiciones ambientales *in vitro* es un verdadero reto tanto para eDNA como para otras técnicas, sin embargo, simular estas condiciones en laboratorio son requeridas para lograr estandarizar los protocolos y otros procesos indispensables antes de aplicar eDNA metabarcoding *in situ*. Por ejemplo, estimar la relación entre densidad y concentración de eDNA, que prácticamente se experimentan en condiciones controladas. *In situ* la realidad es muy distinta debido a que eDNA está expuesto a factores bióticos y abióticos, variación de hábitats y caudales, entre otros factores. Esto podría generar que la densidad de especies en campo solo sea un estimado y no la realidad [82,87]. El uso de protocolos estandarizados de campo y laboratorio en la aplicación de eDNA es una ventaja, ya que los procesos realizados en este u otro trabajo pueden ser replicados en diferentes zonas y para el monitoreo de diferentes taxones [19,101]. Asimismo, estos protocolos nos permiten disminuir los riesgos de contaminación en los sitios de muestreo y entre muestras, ya que todo proceso y material utilizado siguen estrictas normas de esterilización [13,82].

eDNA metabarcoding es un método de diagnóstico ecológico que ha ido revolucionado la manera de monitorear la biodiversidad de ambientes acuáticos [11,13,20,83]. Desde el 2008 que empezó a ser utilizada para el monitoreo de macroorganismos hasta la fecha, se ha documentado, su desarrollo y su compatibilidad con los métodos tradicionales, lo cual le ha permitido mejorar la detección de múltiples especies en varios ambientes a nivel global [42,87,102]. Su aplicación en ambientes con alta biodiversidad como la microcuenca del río Tena es necesario tanto para el monitoreo de especies que presentan baja densidad poblacional, especies invasoras y especies en peligro de extinción.

Conclusiones

Este estudio detalla que la técnica de eDNA metabarcoding presenta un mayor grado de detección de anfibios en ambientes acuáticos en comparación de REV. Sin embargo, se destaca la relevancia que tiene la información obtenida a partir de los métodos tradicionales como REV que se complementan con eDNA; esto con la finalidad de completar una base de datos propia de la zona y una colección científica de referencia.

Para la microcuenca del río Tena mediante salidas de campo y reportes de diversidad de anfibios se registró aproximadamente 54 especies, de las cuales en este estudio se logró detectar 33 especies mediante la aplicación de eDNA y REV. Sin embargo, la diversidad de anfibios es mucho mayor ya que cuenca con regiones inexploradas donde se desconoce la batracofauna que habita en estas zonas.

La disponibilidad de las muestras de agua y su interacción con varios organismos permiten mejorar el biomonitoreo de la biodiversidad de anfibios, pero no todas las especies están relacionadas con cuerpos de agua, por tal motivo es necesario considerar el empleo de varios tipos de muestras ambientales para ampliar el rango de detección de especies terrestres o habitantes de micro ecosistemas específicos (p.ej. bromelias, agujeros de árboles, hojarasca, etc.).

Los métodos tradicionales de monitoreo (REV) se han utilizado por décadas y han generado valiosa información de la biodiversidad en diversos ecosistemas. Con la aplicación de eDNA esta información puede ser obtenida de una manera más fácil y rápida, lo cual es importante para el desarrollo de estrategias de conservación de los organismos, a su vez se generan registros robustos y comprobables en áreas con altas biodiversidad como la microcuenca del río Tena.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por VLIR-OUS y el proyecto “DNA-based monitoring for assessing the effect of invasive species on aquatic communities in the Amazon basin of Ecuador”. De manera especial deseo agradecer a todas las personas quienes participaron en el trabajo de campo: María José Sánchez, Alex Arias, Álvaro Pérez, Keyko Loza, Karina Quizhpi, Yulissa Ugsha, Jomirá Yáñez, Viviana Cabrera, Miguel Gómez, Carlos Carrasco, Samanta Oña; en los procesos de laboratorio: Mónica Sánchez; en los análisis bioinformáticos: Alex Sánchez, Zane Libke y el diseño de mapas: Julieth Chancay y Elizabeth Naranjo. También deseo agradecer a dos revisores anónimos por sus comentarios.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no tener ningún posible conflicto de interés.

Referencias

1. Celi JE, Villamarín F. Freshwater ecosystems of Mainland Ecuador: diversity, issues and perspectives. *Acta Limnol Bras.* 2020;32. doi:10.1590/s2179-975x3220
2. Céréghino R, Boix D, Cauchie H-M, Martens K, Oertli B. The ecological role of ponds in a changing world. *Hydrobiologia.* 2014;723: 1–6. doi:10.1007/s10750-013-1719-y
3. Cushing CE, Allan JD. Biological Interactions in River Ecosystems. *Encyclopedia of Inland Waters.* Elsevier; 2009. pp. 387–394. doi:10.1016/B978-012370626-3.002064
4. Hassall C. The ecology and biodiversity of urban ponds. *Wiley Interdiscip Rev Water.* 2014;1: 187–206. doi:10.1002/wat2.1014
5. Ortega-Andrade HM, Rodes Blanco M, Cisneros-Heredia DF, Guerra Arévalo N, López de Vargas-Machuca KG, Sánchez-Nivicela JC, et al. Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. Lötters S, editor. *PLoS One.* 2021;16: e0251027. doi:10.1371/journal.pone.0251027
6. Pereira JL. La crisis biológica de los anfibios. *Ecologistas en acción de León.* 2014. Available: <https://issuu.com/ecologistasenaccion/docs/ee81>
7. Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, et al. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* (80-). 2004;306: 1783–1786. doi:10.1126/science.1103538
8. West J. Importance of Amphibians: A Synthesis of Their Environmental Function, Benefits to Humans, and Need for Conservation. *Bridgewater State University.* 2018.
9. Goldberg CS, Strickler KM, Pilliod DS. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biol Conserv.* 2015;183: 1–3. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.040
10. Shaw JLA, Clarke LJ, Wedderburn SD, Barnes TC, Weyrich LS, Cooper A. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biol Conserv.* 2016;197: 131–138. doi:10.1016/j.biocon.2016.03.010
11. Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob Ecol Conserv.* 2019;17: e00547. doi:10.1016/j.gecco.2019.e00547
12. Barata IM, Griffiths RA, Ridout MS. The power of monitoring: optimizing survey designs to detect occupancy changes in a rare amphibian population. *Sci Rep.*

2017;7: 16491. doi:10.1038/s41598-017-16534-8

13. Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. Oxford University Press; 2018. doi:10.1093/oso/9780198767220.001.0001
14. Civade R, Dejean T, Valentini A, Roset N, Raymond J-C, Bonin A, et al. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. Garcia de Leaniz C, editor. PLoS One. 2016;11: e0157366. doi:10.1371/journal.pone.0157366
15. Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP, Carvalho GR, Creer S, Knapp M, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. Trends Ecol Evol. 2014;29: 358–367. doi:10.1016/j.tree.2014.04.003
16. Lopes CM, Sasso T, Valentini A, Dejean T, Martins M, Zamudio KR, et al. eDNA metabarcoding: a promising method for anuran surveys in highly diverse tropical forests. Mol Ecol Resour. 2017;17: 904–914. doi:10.1111/1755-0998.12643
17. Ficetola GF, Manenti R, Taberlet P. Environmental DNA and metabarcoding for the study of amphibians and reptiles: species distribution, the microbiome, and much more. Amphib Reptil. 2019;40: 129–148. doi:10.1163/15685381-20191194
18. Pedersen MW, Overballe-Petersen S, Ermini L, Sarkissian C Der, Haile J, Hellstrom M, et al. Ancient and modern environmental DNA. Philos Trans R Soc London B Biol Sci. 2015;370: 20130383. doi:10.1098/rstb.2013.0383
19. Roh C, Villatte F, Kim B, Schmid RD. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. Appl Biochem Biotechnol. 2006;134: 97–112. doi:10.1385/ABAB:134:2:97
20. Harper LR, Buxton AS, Rees HC, Bruce K, Brys R, Halfmaerten D, et al. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. Hydrobiologia. 2019;826: 25–41. doi:10.1007/s10750-018-3750-5
21. Brozio S, Manson C, Gourevitch E, Burns TJ, Greener MS, Downie JR, et al. Development and Application of an eDNA Method to Detect the Critically Endangered Trinidad Golden Tree Frog (*Phytotriades auratus*) in Bromeliad Phytotelmata. 2017; 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0170619
22. Maestri S, Cosentino E, Paterno M, Freitag H, Garces JM, Marcolungo L, et al. A rapid and accurate minION-based workflow for tracking species biodiversity in the field. Genes (Basel). 2019;10. doi:10.3390/genes10060468
23. Van der Heyden C, Riascos L, Carrera-Gonzalez A, Apunte Ramos KE, Carbrera M, Espinosa R, et al. DNA-based monitoring for assessing the effect of invasive species on 1. Van der Heyden C, Riascos L, Carrera-Gonzalez A, Apunte Ramos KE, Carbrera M, Espinosa R, et al. DNA-based monitoring for assessing the effect of invasive species on aquatic communiti. ARPHA Conf Abstr. 2021;4.

doi:10.3897/aca.4.e65376

24. Riascos L, Geerts AN, Oña T, Goethals P, Cevallos-Cevallos J, Vanden Berghe W, et al. DNA-based monitoring of the alien invasive North American crayfish *Procambarus clarkii* in Andean lakes (Ecuador). *Limnologica*. 2018;70: 20–25. doi:10.1016/j.limno.2018.02.002
25. Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett*. 2008;4: 423–425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118
26. Wang J, Liu P, Chang J, Li C, Xie F, Jiang J. Development of an eDNA metabarcoding tool for surveying the world's largest amphibian. Jia Z-Y, editor. *Curr Zool*. 2021. doi:10.1093/cz/zoab094
27. Evans NT, Li Y, Renshaw MA, Olds BP, Deiner K, Turner CR, et al. Fish community assessment with eDNA metabarcoding: effects of sampling design and bioinformatic filtering. *Can J Fish Aquat Sci*. 2017;74: 1362–1374. doi:10.1139/cjfas-2016-0306
28. Barnes MA, Turner CR. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv Genet*. 2016;17: 1–17. doi:10.1007/s10592-015-0775-4
29. Seymour M, Durance I, Cosby BJ, Ransom-Jones E, Deiner K, Ormerod SJ, et al. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Commun Biol*. 2018;1: 4. doi:10.1038/s42003-017-0005-3
30. Baetens D. Ecological Monitoring of Amphibian Breeding Ponds in the Flemish Ardennes : From Hand Net. 2019; 2018–2019.
31. Deiner K, Walser J-C, Mächler E, Altermatt F. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol Conserv*. 2015;183: 53–63. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.018
32. Takahashi S, Sakata MK, Minamoto T, Masuda R. Comparing the efficiency of open and enclosed filtration systems in environmental DNA quantification for fish and jellyfish. Kalendar R, editor. *PLoS One*. 2020;15: e0231718. doi:10.1371/journal.pone.0231718
33. Hurtado-Pidal J, Acero Triana JS, Espitia-Sarmiento E, Jarrín-Pérez F. Flood Hazard Assessment in Data-Scarce Watersheds Using Model Coupling, Event Sampling, and Survey Data. *Water*. 2020;12: 2768. doi:10.3390/w12102768
34. Pombosa R, Bourrel L, Armijos E, Magat P. Cuenca del Río Napo en su parte Ecuatoriana. 2016. Available: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers17-09/010070565.pdf
35. Gobierno Provincias de Napo. PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL PROVINCIAL DE NAPO. Tena; 2015. Available: <https://odsterritorioecuador.ec/wp-content/uploads/2019/04/PDOT->

36. Lessmann J, Guayasamin JM, Casner KL, Flecker AS, Funk WC, Ghalambor CK, et al. Freshwater vertebrate and invertebrate diversity patterns in an Andean-Amazon basin: implications for conservation efforts. *Neotrop Biodivers.* 2016;2: 99–114. doi:10.1080/23766808.2016.1222189
37. Ron S, Merino A, Ortiz D. Anfibios del Ecuador. Museo de Zoología, Pontifica Universidad Católica del Ecuador. In: PUCE [Internet]. 2019. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>
38. Ordóñez L, Valle D, Veintimilla D. Descubriendo la fauna del bosque protector Colonso. 2011.
39. Ron SR, Merino-Viteri A, Ortiz DA. Anfibios del Ecuador. Version 2020.0. Quito; 2021. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>
40. Coloma LA, Tapia EE. Guía de anfibios de Ikiam y Reserva Colonso Chalupas. Tena; 2015. Available: https://issuu.com/centrojambatu/docs/_guia_anfibios_ikiam__colonso_chalu
41. Sasso T, Lopes CM, Valentini A, Dejean T, Zamudio KR, Haddad CFB, et al. Environmental DNA characterization of amphibian communities in the Brazilian Atlantic forest: Potential application for conservation of a rich and threatened fauna. *Biol Conserv.* 2017;215: 225–232. doi:10.1016/j.biocon.2017.09.015
42. Bálint M, Nowak C, Márton O, Pauls SU, Wittwer C, Aramayo JL, et al. Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Mol Ecol Resour.* 2018;18: 1415–1426. doi:10.1111/1755-0998.12934
43. Ortega-Andrade HM. DIVERSIDAD DE LA HERPETOFAUNA EN LA CENTRO AMAZONÍA DE ECUADOR. *Inst Ecol.* 2010. Available: https://multimedia20stg.blob.core.windows.net/publicaciones/Ortega_2010c.pdf
44. TAPIA DEL ÁGUILA C, LÓPEZ-ROJAS J, PÉREZ-PEÑA P. AMPHIBIAN AND REPTILE DIVERSITY IN THENAPO-PUTUMAYO-AMAZONAS INTERFLUVIUM, NORTHERN PERUVIAN AMAZON. *Folia Amaz.* 2020. doi:<https://doi.org/10.24841/fa.v29i2.530>
45. Heyer R, Maureen D, Roy M, Lee Ann H. Medición y monitoreo de la diversidad biológica: métodos estandarizados para anfibios. Editorial. Argentina; 2001.
46. GAD Parroquial de Muyuna. Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del GAD parroquial de Muyuna. Tena; 2019. Available: <https://odsterritorioecuador.ec/wp-content/uploads/2019/04/PDOT-PARROQUIA-MUYUNA-2014-2019.pdf>
47. Ministerio del Ambiente del Ecuador. Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Quito: Subsecretaría de Patrimonio Natural; 2013. Available: <http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/NIVEL>

48. Wang S, Yan Z, Hänfling B, Zheng X, Wang P, Fan J, et al. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Sci Total Environ.* 2021;755: 142622. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142622
49. Angulo A, Rueda-Almonacid JV, Rodríguez-Mahecha JV, Marca & E La. Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. *Conservacion Internacional.* 2006. Available: <https://www.amphibians.org/wp-content/uploads/2018/12/Monitoreo-de-anfibios-baja-final.pdf>
50. Ficetola G, Coissac E, Zundel S, Riaz T, Shehzad W, Bessière J, et al. An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics.* 2010;11: 434. doi:10.1186/1471-2164-11-434
51. Vences M, Thomas M, Van Der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool.* 2005;2: 1–12. doi:10.1186/1742-9994-2-5
52. Vences M, Lyra ML, Perl RGB, Bletz MC, Stanković D, Lopes CM, et al. Freshwater vertebrate metabarcoding on Illumina platforms using double-indexed primers of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Conserv Genet Resour.* 2016;8: 323–327. doi:10.1007/s12686-016-0550-y
53. Oxford Nanopore Technologies. Nanopore protocol: Four-Primer PCR (SQK-PSK004 or PBK004). 2019.
54. De Coster W, D’Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Berger B, editor. Bioinformatics.* 2018;34: 2666–2669. doi:10.1093/bioinformatics/bty149
55. Krehenwinkel H, Pomerantz A, Henderson JB, Kennedy SR, Lim JY, Swamy V, et al. Nanopore sequencing of long ribosomal DNA amplicons enables portable and simple biodiversity assessments with high phylogenetic resolution across broad taxonomic scale. *Gigascience.* 2019;8. doi:10.1093/gigascience/giz006
56. Vierstraete A, Braeckman B. Amplicon_sorter: a tool for reference-free amplicon sorting based on sequence similarity and for building consensus sequences. *Ecol Evol.* 2021. doi:10.22541/au.163370649.97330895/v1
57. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10: 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421
58. Schultz MT, Lance RF. Modeling the sensitivity of field surveys for detection of environmental DNA (eDNA). *PLoS One.* 2015;10: 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0141503
59. Furlan EM, Gleeson D, Hardy CM, Duncan RP. A framework for estimating the sensitivity of eDNA surveys. *Mol Ecol Resour.* 2016;16: 641–654. doi:10.1111/1755-0998.12483

60. Fiske I, Chandler R. unmarked : An R Package for Fitting Hierarchical Models of Wildlife Occurrence and Abundance. J Stat Softw. 2011;43. doi:10.18637/jss.v043.i10
61. Blake JG. Acoustic monitors and direct observations provide similar but distinct perspectives on bird assemblages in a lowland forest of eastern Ecuador. PeerJ. 2021;9: e10565. doi:10.7717/peerj.10565
62. Ministerio del Ambiente de Perú. Guía de inventario de la fauna silvestre. MINAM. Lima; 2015.
63. MUESES-CISNEROS JJ, CISNEROS-HEREDIA DF, MCDIARMID RW. A new Amazonian species of Rhaebo (Anura: Bufonidae) with comments on Rhaebo glaberrimus (Günther, 1869) and Rhaebo guttatus (Schneider, 1799). Zootaxa. 2012;3447: 22. doi:10.11646/zootaxa.3447.1.2
64. PRAMUK JB. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. Zool J Linn Soc. 2006;146: 407–452. doi:10.1111/j.1096-3642.2006.00212.x
65. Pentinsaari M, Ratnasingham S, Miller SE, Hebert PDN. BOLD and GenBank revisited – Do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? PLoS One. 2020. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231814
66. Yaguache R, Andi L, Andi V, Tanguila J. Diagnóstico socioeconómico y ambiental en las comunidades del área de amortiguamiento de la Reserva Biológica Colonso Chalupas. Tena; 2016. Available: <https://docplayer.es/76816599-Diagnostico-socioeconomico-y-ambiental-en-las-comunidades-del-area-de-amortiguamiento-de-la-reserva-biologica-colonso-chalupas.html>
67. Pawlowski J, Bonin A, Boyer F, Cordier T, Taberlet P. Environmental DNA for biomonitoring. Mol Ecol. 2021;30: 2931–2936. doi:10.1111/mec.16023
68. Weigand H, Beermann AJ, Čiampor F, Costa FO, Csabai Z, Duarte S, et al. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. Sci Total Environ. 2019;678: 499–524. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.247
69. Schenekar T, Schletterer M, Lecaudey LA, Weiss SJ. Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. River Res Appl. 2020;36: 1004–1013. doi:10.1002/rra.3610
70. Smith L. Biodiversity monitoring using environmental DNA: Can it detect all fish species in a waterbody and is it cost effective for routine monitoring? Grants Regist 2020. 2019; 315–316. doi:10.1057/978-1-349-95943-3_324
71. Brooker BK. Developing and assessing an environmental DNA protocol for detecting amphibian species in lentic systems in Alberta, Canada. 2016; 116. Available: http://www.southampton.ac.uk/oes/undergraduate/courses/geology/f601_msc

72. Deagle BE, Jarman SN, Coissac E, Pompanon F, Taberlet P. DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biol Lett*. 2014;10: 20140562. doi:10.1098/rsbl.2014.0562
73. Piñol J, Senar MA, Symondson WOC. The choice of universal primers and the characteristics of the species mixture determine when DNA metabarcoding can be quantitative. *Mol Ecol*. 2019;28: 407–419. doi:10.1111/mec.14776
74. Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, Coissac E. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2011;39: e145–e145. doi:10.1093/nar/gkr732
75. Zhang S, Zhao J, Yao M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. Gilbert M, editor. *Methods Ecol Evol*. 2020;11: 1609–1625. doi:10.1111/2041-210X.13485
76. Evans NT, Olds BP, Renshaw MA, Turner CR, Li Y, Jerde CL, et al. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour*. 2016;16: 29–41. doi:10.1111/1755-0998.12433
77. Uchii K, Doi H, Okahashi T, Katano I, Yamanaka H, Sakata MK, et al. Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA. *Environ DNA*. 2019;1: 359–367. doi:10.1002/edn3.37
78. Noll DM, Mason TM, Miller PS. Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chem Rev*. 2006;106: 277–301. doi:10.1021/cr040478b
79. Freeland JR. The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA. Adamowicz S, editor. *Genome*. 2017;60: 358–374. doi:10.1139/gen-2016-0100
80. Bruce K, Blackman R, Bourlat SJ, Hellström AM, Bakker J, Bista I, et al. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. Pensoft Publishers; 2021. doi:10.3897/ab.e68634
81. Díaz-Ferguson EE, Moyer GR, Díaz-Ferguson EE, Moyer GR, Díaz-Ferguson EE, Moyer GR. History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Rev Biol Trop*. 2014;62: 1273–1284. doi:10.15517/rbt.v62i4.13231
82. Herder J, Valentini A, Bellemain E, Dejean T, Delft J, Thomsen P, et al. environmental DNA a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Nijmegen; 2014.
83. Keck F, Blackman RC, Bossart R, Brantschen J, Couton M, Hürlemann S, et al. Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment. *Mol Ecol*. 2022. doi:10.1111/mec.16364

84. Fediajevaite J, Priestley V, Arnold R, Savolainen V. Meta-analysis shows that environmental DNA outperforms traditional surveys, but warrants better reporting standards. *Ecol Evol.* 2021;11: 4803–4815. doi:10.1002/ece3.7382
85. Ministerios del ambiente, PARG, Ikiam, Gef. Lista roja de los anfibios del Ecuador y su Plan de acción para la conservación. 2020. Available: <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2020/08/infografia-anfibios.pdf>
86. Polanco Fernández A, Marques V, Fopp F, Juhel J, Borrero-Pérez GH, Cheutin M, et al. Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes. *Environ DNA.* 2021;3: 142–156. doi:10.1002/edn3.140
87. Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2016;25: 929–942. doi:10.1111/mec.13428
88. Lacoursière-Roussel A, Dubois Y, Normandeau E, Bernatchez L. Improving herpetological surveys in eastern North America using the environmental DNA method1. *Genome.* 2016;59: 991–1007. doi:10.1139/gen-2015-0218
89. Petitot M, Manceau N, Geniez P, Besnard A. Optimizing occupancy surveys by maximizing detection probability: Application to amphibian monitoring in the Mediterranean region. *Ecol Evol.* 2014;4: 3538–3549. doi:10.1002/ece3.1207
90. Bálint M, Nowak C, Márton O, Pauls SU. Twenty-five species of frogs in a liter of water: eDNA survey for exploring tropical frog diversity. *bioRxiv.* 2017; 176065. doi:10.1101/176065
91. Li W, Song T, Hou X, Qin M, Xu C, Li Y. Application of eDNA Metabarcoding for Detecting Anura on a Tropical Island. *Diversity.* 2021;13: 440. doi:10.3390/d13090440
92. Duellman WE. A New Species of *Hyla* from Amazonian Ecuador. *Copeia.* 1972;1972: 265. doi:10.2307/1442487
93. GUAYASAMIN JM, BUSTAMANTE MR, ALMEIDA-REINOSO D, FUNK WC. Glass frogs (Centrolenidae) of Yanayacu Biological Station, Ecuador, with the description of a new species and comments on centrolenid systematics. *Zool J Linn Soc.* 2006;147: 489–513. doi:10.1111/j.1096-3642.2006.00223.x
94. Pozo J, Elozegi A, Díez J, Molinero J. Dinámica y relevancia de la materia orgánica. Fundación. Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Fundación. 2009. Available: https://www.fbbva.es/microsites/ecologia_fluvial/pdf/cap_10.pdf
95. Deiner K, Fronhofer EA, Mächler E, Walser J-C, Altermatt F. Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nat Commun.* 2016;7: 12544. doi:10.1038/ncomms12544
96. Shogren AJ, Tank JL, Andruszkiewicz E, Olds B, Mahon AR, Jerde CL, et al.

- Controls on eDNA movement in streams: Transport, Retention, and Resuspension. *Sci Rep.* 2017;7: 5065. doi:10.1038/s41598-017-05223-1
97. Nevers MB, Przybyla-Kelly K, Shively D, Morris CC, Dickey J, Byappanahalli MN. Influence of sediment and stream transport on detecting a source of environmental DNA. Doi H, editor. *PLoS One.* 2020;15: e0244086. doi:10.1371/journal.pone.0244086
 98. Apothéloz-Perret-Gentil L, Cordonier A, Straub F, Iseli J, Esling P, Pawlowski J. Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *Mol Ecol Resour.* 2017;17: 1231–1242. doi:10.1111/1755-0998.12668
 99. Apothéloz-Perret-Gentil L, Bouchez A, Cordier T, Cordonier A, Guéguen J, Rimet F, et al. Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Mol Ecol.* 2021;30: 2959–2968. doi:10.1111/mec.15646
 100. Shu L, Ludwig A, Peng Z. Environmental DNA metabarcoding primers for freshwater fish detection and quantification: In silico and in tanks. *Ecol Evol.* 2021;11: 8281–8294. doi:10.1002/ece3.7658
 101. Harper LR, Buxton AS, Rees HC, Bruce K, Brys R, Halfmaerten D, et al. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia.* 2019;826: 25–41. doi:10.1007/s10750-018-3750-5
 102. Zaiko A, Pochon X, Garcia-Vazquez E, Olenin S, Wood SA. Advantages and Limitations of Environmental DNA/RNA Tools for Marine Biosecurity: Management and Surveillance of Non-indigenous Species. *Front Mar Sci.* 2018;5. doi:10.3389/fmars.2018.00322

Gráficos y figuras

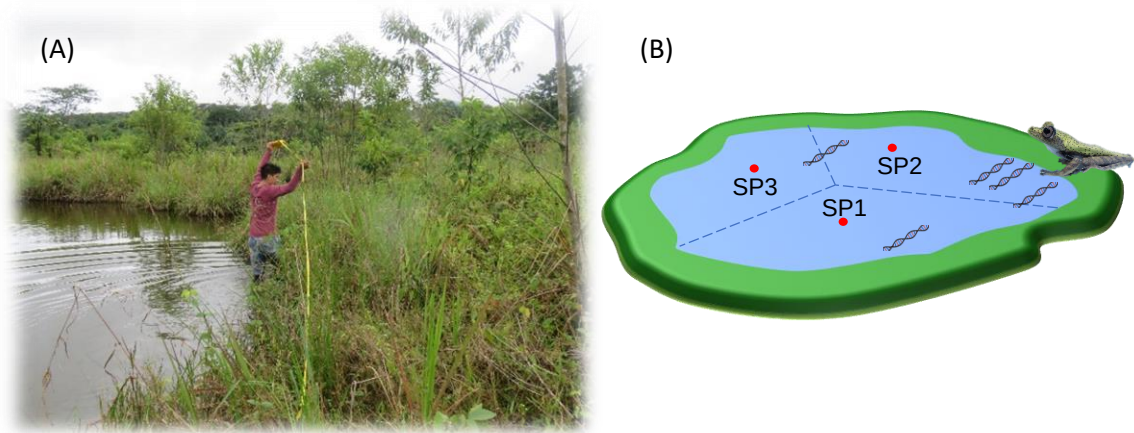


Fig. 4. A) medición del perímetro de charcas. B) representación gráfica de los puntos de colecta de agua en charcas. SP1, SP2 y SP3 hace referencia a las divisiones realizadas en el sitio de muestreo antes de la toma de muestras ambientales

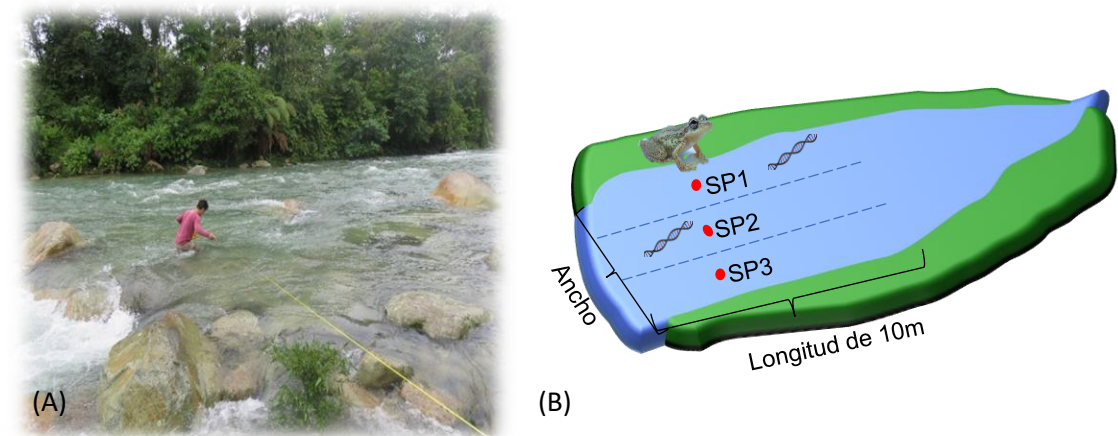


Fig. 5. A) medición del ancho del río. B) representación gráfica de los puntos de colecta de agua en transectos de río. SP1, SP2 y SP3 hace referencia a las divisiones realizadas en el sitio de muestreo antes de la toma de muestras ambientales.

Material suplementario

Tabla S1. Localización geográfica de los sitios de muestreo en la microcuenca del río Tena

Código	Localidad	Coordenada	Altura
ChP1	Charca	0°57'39"S; 77°51'34"W	569 m
ChP2		0°56'23"S; 77°51'54"W	635 m
ChP3		0°56'10"S; 77°52'03"W	649 m
TrP1		0°57'30"S; 77°51'36"W	574 m
TrP2		0°56'38"S; 77°51'49"W	615 m
TrP3		0°56'11"S; 77°52'06"W	645 m

Protocolos de extracción de ADN de muestras de tejido muscular o hepático

La extracción la realizamos en la Universidad Regional Amazónica Ikiam, con el kit comercial de Promega. Antes de la extracción se esterilizó el área de trabajo para que no exista contaminación cruzada de procesos anteriores. Primero, se preparó una solución de 120 µl de EDTA 0.5 M (pH=8) y 500 µl de Nucleic Lysis Solution (ENLS) para refrigerarla, estos volúmenes son para una muestra. Se utilizó entre 5-10 mg de muestra, esto depende de la cantidad de tejido disponible. La muestra fue colocada en un microtubo de 1.5 mL y se añadieron 300 µl de la solución preparada previamente, ENLS. Se maceraron las muestras empleando un micropistilo estéril hasta triturar por completo la muestra. Se añadieron 300 µl más de ENLS y se homogenizó por vórtex la muestra. Se añadieron 17.5 µl de proteinasa K y se incubó toda la noche a 50 °C. Antes de continuar el proceso se verificó que la digestión este completa, la muestra reposó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadieron 3 µl de RNase Solution y se incubó por 30 minutos a 37 °C, se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadieron 200 µl de Protein Precipitation Solution y se homogenizó mediante vórtex por 20 segundos. Las muestras fueron colocadas en hielo por 5 minutos y centrifugadas a 16 000 xg durante 5 minutos, se verificó que todo el pellet haya precipitado. Se retiró el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL nuevo y se descartó el pellet. Se añadieron 600 µl de isopropanol frío y se homogenizó gentilmente invirtiendo el tubo, se centrifugó a 16 000 xg por 2 minutos y se descartó el sobrenadante y se añadieron 600 µl de etanol al 70 % para lavar y precipitar el ADN. Se centrifugó nuevamente a 16 000 xg por 2 minutos

y se descartó el etanol. Se secó todo el etanol de la muestra toda la noche sobre una toalla. Finalmente, se rehidrató el ADN con 50 μ L de DNA rehydration solution, se homogenizó completamente la muestra y se almacenó a 4 °C, si es por un tiempo prolongado a -80 °C.

Extracción de ADN de muestras ambientales (agua)

La extracción del filtro que contiene el eDNA se realizó acorde a Baetens [30]. Las membranas obtenidas del filtrado fueron cortadas en pequeños trozos empleando bisturí, tijeras y pinzas previamente esterilizadas. Se colocaron las piezas pequeñas del filtro en un microtubo de 1.5 mL. Luego, se añadieron 300 μ L de Extraction buffer y se maceró empleando un micropistilo por 4 minutos. Se añadieron nuevamente 300 μ L de Extraction buffer y 2.5 μ L de solución proteinase K 20 μ g/ml y se realizó un vórtex fuerte por 2 minutos y se encubó toda la noche a 55 °C. La muestra fueron enfriadas a temperatura ambiente durante 5 min y se añadieron 175 μ L de MPC Protein Precipitation Reagent, vórtex por 20 segundos. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 12 minutos a 4 °C y se colocó en hielo por 1 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1.5 mL y se añadieron 3 μ L de solución RNase (5 mg/mL). Se homogenizó por pipeteo y se invirtió el tubo 25 veces. Luego se incubó a 37°C durante 10 min. Se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14 000 rpm por 6 minutos a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1.5 mL y se colocó la muestra en un bloque frío, añadiendo 500 μ L de isopropanol frío, se invirtió el tubo 30-40 veces. Se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 11 min y se decantó el isopropanol y se añadió 500 μ L de etanol al 70%, el tubo fue invertido para lavar el pellet cuidadosamente. Se centrifugó a 14000 rpm durante 3 min y se descartó el etanol, se dejó secar overnight el ADN obtenido. Finalmente, se añadieron 40 μ L de MilliQ esterilizada y se homogenizó el eDNA. Se almacenó el eDNA a -20°C o -80°C (para almacenamiento a largo plazo).

Información detallada de las tablas suplementarias

La información completa de todos los registros realizados mediante REV y eDNA metabarcoding se encuentra disponible en: https://1drv.ms/x/s!Avijs5KgxWlV7FpVU_uey2le2fAt?e=RV3GhB

Tabla S2. Lista de especies registradas en la microcuenca del Tena y con sus respectivas secuencias. Estas secuencias se utilizaron para construir la base de datos de referencia local

Especie	Código	Año muestreo	País	Secuencia
<i>Adenomera andreae</i>	TWQ_019	2020	Ecuador	CGCCTCTTGCCTCAAATAAGAGGTCCAGCCT GCCAGTGACACTGTTCAACGCCGCGGTA TCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCACTT GTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAAAGGC ATCACGAGAGTCATACTGTCTCTTTTCCA ATCAGTTAACTAATCTCCCGTGAAGAAGC GAGGATAATTCTATAAGACGAGAAGACCCT ATGGAGCTTTAAACAAATAACACTTACCTAC CCCCTCTTTAATTCAGAAAAATCTCCACT TTGGCATGATACTTATAAGTTTTGATTGGG GTGATCACGGAACAAAAACAACCTCCGCA ATGAAAGACACTCCCCTAACTAAGTTAAGAA CTACAGCTCTATACATCAACAAATTGACACT AATTGACCCAATATATTGATCAATGAACCAA GTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCTACTT CAAGAGCTCTATCGACAAGTGGGTTACG ACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCTAATG GTGTAGCCGCTATTAAAGGTTCTTTGTTCA ACGATTAACCCCTACGT
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	AY943240	2005		ATAAGAGGTCTAGCCTGCCAGTGACATTG TTCAACGCCGCGGTATCCTAACCGTGCGA AGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTAAATGAG GACTAGTATGAAAGGCATCACGAGAGTCAT ACTGTCTCTTTCTCTAATCAGTGAACTAAT CCCCCGTGAAGAAGCGGGGATAGAAATAT AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAAAC ACATAATATATGCCCTTTAACTTCAAATTCC AGAAAAATCTTATCTTGGTATAATACTA ATAGTTTTGGTTGGGGTGACCACGGAATA AAAAACAACCTCCACAATGAAAGATTCTCT TCACTAAGTTAAGGACTACAACCTATACAT CAATAAATTGACATAATTGACCCAACATATT GATCAATGAACCAAGTTACCCTAGGGATAA CAGCGCAATCCACTTTAAGAGCTTTATCGA CAAGTGGGCTTACGACCTCGATGTTGGATC AGGGTACCCAGTGGTGACGCCGCTACTAA AGGTTCTGTTTGTCAACGATTAAACCCCTAC GTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAG GTCAGTTTCTATCTATAAAGAGCTTTTTTAG TACGAAAGGACCAAAAAGCATGGCCAATG CTTCAATAAGCCATACCATTTATGAATT TAT
<i>Allobates aff insperatus</i>	TWQ_033	2020	Ecuador	AACATCGCCTCTTGACTAACATAAGAGGTC AAGCCTGCCAGTGACATTGTTCAACGCC GCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTA ATCACTTGTCTTTAAATAGGGACTAGTATG AATGGCTTACGAAAGCTATACTGTCTCTT TATTTAATCAGTAAACTAATTCCTCCGTGA AGAAGCGGGGATACCTATAAGACGAGA AGACCCTGTGGAGCTTTAAACACTTTTTAAA CATTTGAATTTACACTCTTATTCTATCTCTAC TAAATCACTCATTTTGTTTTAAAGTTTAGGTT GGGGTGACCACGGAATAAATTAACCTCC ACGTAGAAAGAACCTTATTTCTAAGCAAAA AATCACATTTTATGCATCAAAATATTGACC

			TAAATTGACCAATTTTTGATCAACGAACC AAGTTACCTAGGGATAACAGCGCAATCCG CTTTAAGAGCTCCTATCGACAAGCGGGCTTA CGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCAG TGGTGCAAGCACTACTAACGGTTCGTTTGT CAACGATTAACCCCTACGTGATCT
<i>Allobates femoralis</i>	KX044277	2016	ACATCGCCTCTTGATCAATTATAAGAGGTCA AGCCTGCCCAGTGACATTGTTCAACGGCCG CGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAA TCACTTGTCCTTTAAATAAGGACTAGTATGA ACGGCTTCACGAAGGCTATACTGTCTCCTTA ATCTAATCAATTAACCTAATCTCCCCGTGAA GAAGCGGGGATTCTGTATAAGACGAGAA GACCTATGGAGCTTTAAACATCTAAGACAC TTGATTTTACCCACTAACTTCATGTAACTTA TCATTTGTCTTAAGTTTGAAGTTGGGGTGA CCACGGAGAAAAATTAACCTCCACGTAGA AAGAAAAATTTCTTAAGCAAAGAGCCACA TCTTAACGCATCAACATATTGACTTAAATTG ACCCAATTTCTTGCTCAACGAACCAAGTTAC CCTAGGGATAACAGCGCAATCCGCTTAAG AGCTCCTATCGACAAGCGGGCTTACGACCTC GATGT
<i>Allobates zaparo</i>	AY263227	2003	AGGTCAAGCCTGCCAGTGACATTGTTCAAC GGCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAG CGTAATCACTTGTCCTTTAAATAAGGACTAG TATGAACGGCTTCACGAAGGCTATTCTGTCT CCCTTATCTAATCAGTTAACTAATCTCCCCG TGAAGAAGCGGGATTAACCTATAAGACGA GAAGACCTATGGAGCTTTAAATATCTAAG ACACTTGATTTTATTATTAACCTTCATGTAA CTATCATTATGCCTTAAGTTTGAAGTTGGG GCGACCGCGGAGAAAAATCGAACCTCCACG TAGAAAGAAAAATTTCTTCTAAGCAAAAAGA CACATCTTAACGCATCAATATATTGACCTAA ATTGACCAATTTCTTGCTCAACGAACCAAG TTACCTAGGGATAACAGCGCAATCCGCTTT GAGAGCTCCTATCGACAAGCGGGCTTACGA CCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCTAATGGT GCAGCAGCTATTAACGGTTCGTTTGTTC AAC GATTA AAC
<i>Ameerega bilinguis</i>	DQ502225	2006	AACATCGCCTCTTGCTAATTATAAGAGGTC CAGCCTGCCAGTGACTTTGTTCAACGGCCG CGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAA TCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGA ATGGCCCCACGAGGGCTGCACTGTCTCCTTT TTCTAATCAATGAACTAATCTCCCCGTGAA GAAGCGGGGATAATACTATAAGACGAGAA GACCTATGGAGCTTTAAACAACCTGAAACAT TTGCTTTTCTATCAACCTCTCCGAGCTCTTT ATATTACTTAAGCATTTTACTTCTAGTTTTA GGTTGGGGTGACCACGGAGCAAAATTAAC CTCCATGAAGAAATGAATACTTTTAAGCCAC AACTACTTTTTTAAGCATCAACAAATTGAC CTTCATTGACCAATATATTGATCAACGAAC CAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCT ACTTCAAGAGCTCATATCGACAAGTAGGTTT ACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCTA GTGGTGACGCCGCTACTAATGGTTCGTTTGT TCAACGATTAACCCCT
<i>Ameerega parvula</i>	AF124125	2000	GTCCAGCCTGCCAGTGACTTTGTTCAACGG CCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCG TAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTA TGAATGGCCCCACGAGGGCTGCACTGTCTC CTTTTTCTAATCAATGAACTAATCTCCCCGT GAAGAGGCGGGGATAGCCCTATAAGACGA GAAGACCTATGGAGCTTTAAACAACCTGAG ACACTTGCTTTTCTTTAATCTCCAGAGCT

			CTTTATTTTACTTAAGCATTTTTATCTCTAGTT TTAGGTTGGGGTGACCACGGAGCAAAATTA AACCTCCATGAAGAAATGACTTCTTTTAAAG CCACAACTACTCTTTTAAGCATCAACAAAT TGACCTTCATTGACCCAATATATTGATCAAC GAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCA ATCTACTTCAAGAGCTCATATCGACAAGTAG GTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATC CTAGTGGTGCAGCCGCTACTAATGGTTCGTT TGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGA GT
<i>Boana appendiculata</i>	MN921814	2020 (LSR)	TTAAATAGCGTCATAGCTTAAATATNNNN GCTCATTTNNTACCAATTTCAAAAACAATTT TTAACCCCTTAGTTNTTACCAGACTAATCTAT ANNAANTTATAGAACTAACAATGTTAAAC TAGTATCAAGAAGAAAACCTTCTCTTTAAT GTAAGTGAAGACAGAAAGGATAAACCTCT GCCAATTAGCATCTATGATTTAAAAATAAGTA ACGTAANCAAGAAAACCTTATATNTAGCA ATGTTAACTAACAAGAACATTTCAAGAA AGATTCAAAAAAAGAAGGAACTCGGCAA ACCTAACCTCGCCTGTTACCAAAACATN CGCCTCTTGANGNNTAAAAATAAGAGGTCCA GCCTGCCAGTGAAATNNATTTAACGGCC GCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTA ATCACTTGTTCTTTAATGAGGACTAGTATG AATGGCACCACGAGGGTCTACTGTCTCCTT TTTTAAATCAGTGNNAACTAATCTCCCGT GAAGAAGCGGGGATTTTTTATAAGACGAG AAGACCCTATGGAGCTTTAAACAAACNATC ATTTGCTGCACNANTANACACTTTTACNNN NNCTTCAATANNNNNNNNNAATATAGCAT TATGACCTNTTAGTTTTGATTGGGGTGATC ACGGAGTAAAAAGAACTCCACGCCGAAA GGGNNTTAACACCCTGAGCAAAANAGCCAC AACTTTAAGCACTAAAAAANTTAACGTANA CTTGACCCAATANTTTGATCAACGAACCAA GTTACCNCTAGGGATAACAGCGCAATCCAC TTCAAGAGNCTCCTATCGACAAGTGGGTTTA CGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCTAGT GGTGACCGCGCTACTAATGNGTTCGTTTGT CAACGATTAACCCCTACGTGATCTGAGTTC NAGACCGGAGTAATCCAGGTCAGTTTCTAT CTATANAAGGGNCTTTTTCTAGTACGAAAG GACCGAAAAAGCATGGCCAATAAACATTT AAGCCATNACTTATTNNATTTATGATTAATA CTAAATTAATAAATGACCTATTATTNNATC TCAACAATAGAGAAGTTAACGTAGCATAAC CTGGTTTTGCTAAAGATCTAAGCCCTTTTCAT AGAGGTTCAAATCCTCTCGTTAACCAATCC TCTCGTTAAC
<i>Boana boans</i>	KP148456	2014	CGCCTCTTGAATAAAATAAGAGGTCCAGCCT GCCAGTGAAATTATTCAACGGCCGCGGTA TCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCACTT GTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATGGC ACCACGAGGGTCTACTGTCTCTTTTTTAA TCAGTGAACTAATCTCCCGTGAAGAAGC GGGGATCTTTATATAAGACGAGAAGACCCT ATGGAGCTTTAAACAACCAACATTTGCTACA CCATAACATTTTCCCTAAAAGAAGTATAGC ATTATGATTATTAGTTTTCGATTGGGGTGAT CACGGAGTAAATATAACCTCCATGCCGAA AGGGTTTTACCCTGAGCAAAAAGCCACAGC TTAAGCACTAAAAATTAACGCAGTTTGAC CCAATATTTGATCAACGAACCAAGTTACCC TAGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAG CTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGA TGTTGGATCAGGATATCCAAGTGGTGAGC

				CGCTACTAATGGTTGTTTGTCAACGATTA AAACCCTA
<i>Boana geographica</i>	TWQ_009	2020	Ecuador	AACATCGCCTCTTGAGTAAAAAAGAGGTC CAGCCTGCCAGTGAAATTATTAACGGCCG CGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAA TCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGA ATGGCACCACGAGGGTTCTACTGTCTCCTTT TTTAAATCAGTGAACTAATCTCCCGTGAA GAAGCGGGGATTTTTTATAAGACGAGAAG ACCCTATGGAGCTTTAAACAAACATCATTG CTGCACATAACACTTTTACCTTTAATAAATAT AGCATTATGACCTTTAGTTTTTGATTGGGGT GATCACGGAGTAAATGAAACCTCCACGCC GAAAGGGTTAACACCTGAGCAAAAAGCCA CAACTTTAAGCACTAAAAAATTAACGTAAC TGACCAATATTTTGATCAACGAACCAAGTT ACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCACTTCA AGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGAC CTCGATGTTGGATCAGGGTATCCTAGTGGT GCAGCCGCTACTAATGGTTGTTTGTCAAC GATTAAACCTACGTG
<i>Boana lanciformis</i>	TWQ_1743	2020	Ecuador	AAAAACATCGCCTCTTGACAAAATATAAGA GGTCCAGCCTGCCAGTGACCTAGTTCAAC GGCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAG CGTAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAG TATGAATGGCACCACGAGGGTTAAGCTGTC TCCTTTTCTAATCAGTGAACTAATCTCCCC GTGAAGAAGCGGGGATTATATTATAAGACG AGAAGACCCTATGGAGCTTAAACAAATTA ACACTTGCTTCTGCCTGATTCATTCATGAAC TGACACATAAAGTATAGCACTGATTAAT AGTTTTCGATTGGGGTGATCATGGAGTAAA AAATAACCTCCACGACGAAAAGGGGCACCT CCCTGAGCCAAAAGCCACAACCTTTAAGCACT AAAAAATTGACGCACCTTGACCCAAATTTT GAGCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAA CAGCGCAATCACTTCAAGAGCCCTATCGA CAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC AGGGTGTCCTCAGTGGTGACCCGCTACTAA AGGTTGTTTGTCAACGATTAAACCCCTAC GTGA
<i>Boana punctata</i>	TWQ_0710	2020	Ecuador	CGCCTCTGACTAGTTATAAGAGGTATAGCC TGCCAGTGACACATGTTTAAACGGCCGCGG TATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCAC TTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGG CACCACGAAGGTTATACTGTCTCTTTCTTTA ATCAGTAAACTAATCTCCCGTGAAGAAG CGAGGATAAATTTATAAGACGAGAAGACCC TATGGAGCTTTAACTAACCAGCATTGCTT TATATAAATTTTAGCACTTTAAAGACATCT AGCCCTCTGACTGGTAGTTTTGATTGGGGT GATCACGGAACAAAAATAACCTCCGTGTC GAAAGGATATACCTGAGCAAAAAGCGACAG CTTCCGCACTAAAAAATTAACGTTTATTGA CCCAATATTTTGATCAACGAACCAAGTTACC CTAGGGATAACAGCGCAATCTACTTCAAGA GTCCCTATCGACAAGTAGGTTTACGACCTCG ATGTTGGATCAGGGTATCCAGTGGTGACG CCGCTACTAAAGGTTCTGTTTGTCAACGATT AAAACCCTA
<i>Bolitoglossa peruviana</i>	MG944406	2013		AAACATCGCCTTTTGAATATATACATAAAA GGTCTGCTGCCCAATGACTTGTTTTAATG GCCGCGGTATTATGACCGTGCAAAGGTAGC

				GTAATCATTTGTCTTCTAAATAAGACCAGT ATGAACGGCAAGACGAAAGCCTCACTGTCT CCCTAACCAATCAATGAAATTGATCTTCCC GTGCAGAAGCGGGAATAATAATATAAGACG AGAAGACCCTGCGGAGCTTTAAACCTGAT TAATAATTATTATTATCTTAATACCAAGTTTT AGGTTGGGGCGACCATGAGGCACAACATAA CCCTCAGATATATACCAAGAAGGACACTTC AAATAACTAAGCACTAGCACTTTGACCCAATA ATTGACCAACGAACCAAGTTACCCAGGGA TAACAGCGCAATCCGCTCAAAAAGTCCTTAT TAACGAGCAGGTTTACGACCTCGATGTTGG ATCAGGACACCAATAGTGCAACAGCCAT TAAAGGTTCTGTTTGTCAACGATTAAAGTCC TACGTGATCTGAGTTCCAGACCGGA
<i>Cochranella resplendens</i>	TWQ_035	2020	Ecuador	AACATCGCCTCTTGCTAAATATAAGAGGTC CAGCCTGCCAGTGACTCTGTTCAACGGCCG CGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAA TCATTGTTCTTTAAATGAGGACTGGTATGA ATGGCACCACGAAGGTTACTGTCTCCTCT TTTTAATCAGTGAACTAATCTCCCCGTGAA GAAGCGGGGATAAACATATAAGACGAGAA GACCCTATGGAGCTTTAACTATGTAACACT TGTAACCTAATAACAAATCCAGAAAAA TCCTCTACATCTATACAAGATTGTTGCCAGTT TTAGGTTGGGGTGACCACGGAGCAAAAAAC AACCTCCACATTGAAAGGAGTTTATTCCTTA ACCAAGAGCCACACCTCCACGTATCATTACA ATGACATTAATTGACCAATATATTGATCAA CGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGC AATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTG GGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTA TCCAGTGGTGACGCGCTACTAAAGGTTT GTTTGTCAACGATTAAACCTTAC
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	TWQ_1113	2020	Ecuador	AAAAACATCGCCTCTTGCAATATAAGAG GTCCAGCCTGCCAGTGACTTAGTTCAACGG CCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCG TAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTA TGAATGGCACCACGAGGGTTACACTGTCTC CTTTTCCAATCAATAAACTGATCTTCCCGT GAAGAAGCGGGAATTATAATATTAGACGAG AAGACCCTATGGAGCTTCAAACTATATAGCA YTGACTTTTACACTTTACTCTTCWGAGTCTT ACACTTATTCTGCTCTTTTACTATTAGTTT TGGGTTGGGGTGACCGCGGAGCAAGATT AACCTCCATGATGAACAAAACCGCTTTTGAA CCATAAGCCACAACCTTTAAGCACAATAAAT TGACATAAATTGACCCATTTTGGACCAACG AACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAA TCTACTTCAAGAGCCCTATCGACAAGTGGG TTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCC TAGTGGTGACGCGCTACTAAAGGTTCTGTT GTTCAACGATTAAACCTACGTGATCT
<i>Dendropsophus marmoratus</i>	MT503915	2020		AAAAACATCGCCTCTTGAACTTATAAGAG GTCCAGCCTGCCAGTGACTAAGTTCAACG GCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGC GTAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGT ATGAATGGCACCACGAGGGTGGTACTGTCT CCTTTCTTAATCAATGAACTGATCTCCCCG TGAAGAAGCGGGGATGAAATATAAGACG AGAAGACCCTATGGAGCTTTAAATCATAGA GCACTGACTTACTAATAACAAAGTTTCAGAA CACTAATAACCAAGTCTAGTCAGAATGACTAT AGATTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGAGAAA AAATTATCCTCCACATTGAACGGAGCTACTC CTGAGCAGAAAGCTACAACTTTAAGCACC ACAAATTGACATTAATTGACCAATATATTG ATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAAC

				AGCGCAATCTATCTCAAGAGCCCCTATCGAC AGGTAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCA GGGCATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAA GGTTCGTTTGTTCACGATTAAAGCCCT
<i>Dendropsophus parviceps</i>	TWQ_0304	2020	Ecuador	TTGCCTAAATATAAGAGGTCTAGCCTGCCA GTGACTTAGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAA CCGTGCGAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTT TAAATGGGGACTAGTATGAATGGCATCACG AGGGTTATGCTGTCTCTTTTCTAATCAATG AAACTGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGCAT AATAATATAAGACGAGAAGACCCTATGGAG CTTTAAACGATTATAGCACTGGCCCACTCAT TCCATGTTTCAGAACTACAACATTCACATATA GCCTTAATGACTATTAGTTTtaggttggggg GACCGCGGAGCAAAAATTAACCTCCACATT GAAAAGAACCTTTCTTGAGCCCAAAGCCAC AACTCAAGCACCATAAACTGACATACATT GACCAAGAAATTGATCAACGAACCAAGTT ACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCACTTCA AGAGCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGAC CTCGATGTTGGATCAGGGTATCCAGTGGC GCAGCCGCTACTAACGGTTCGTTTGTTCAC GATTAACCCCT
<i>Dendropsophus reticulatus</i>	TWQ_2131	2020	Ecuador	AAAAACATCGCCTCTTGATGATATAAGAG GTCTAGCCTGCCAGTGACCCAGTTCAACG GCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGC GTAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGT ATGAATGGCATCACGAGGGTTACACTGTCT CCTTTTCTAATCAATGAACTAATCTCCCG TGAAGAAGCGGGGATATGTACATAAGACG AGAAGACCCTATGGAGCTCAAACATTTAG CACTGGCTTTATATATCCCTACTTCAGAGTT TTTACACTATTCTAGCCTCTTGACTAATAGT TTTAGGTTGGGGTGACCACGGAGCAAAAAT TAACCTCCACGATGAACAGAGCTACTCTTGA ACCAAAGCCACAACCTTAAAGCACCATAAA CTGACACAAATTGACCCAATATTTGAACAA CGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGC AATCCACCTTAAGAGCCCTATCGACAGGTG GGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGATAT CCCAGTGGTGACGCCGCTACTAATGGTTCGT TTGTTCAACGATTAAACCCCTACGTGATCTG
<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	TWQ_0625	2020	Ecuador	ATCGCCTCTTGACCCTTTATAAGAGGTCCAG CCTGCCAGTGACTAAGTTCAACGGCCGCG GTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATC ACTTGTTCTTTAAATAAGGACTAGTATGAAT GGCACCACGAGGGTTACTGTCTCCTTTT CTAATCAATGAAACTGATCTCCCGTGAAGA AGCGGGGATAAATATATAAGACGAGAAGA CCCTATGGAGCTTCAAATGACATAGCACTG GCCCTTTCACCTCACATTTCAAAAACACTATA TTTAAACAAGCCAAAATGACTATTTATTTTA GGTTGGGGTGACCACGGAGCAAAAATAAC CTCCATGCTGAACGGAGCTACTCCTTAGCTA AAAGCTACAGCTTTAAGCAACAACAACTG ACACCAATTGACCCAATACTTTGATCAACGA ACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAAT CCATTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGT TTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCC

				AGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTCTGTTT GTTCAACGATTAACCCCT
<i>Dendropsophus sarayacuensis</i>	TWQ_0102	2020	Ecuador	TCGCCTCTTGAGCCCTATAAGAGGTCTAGCC TGCCAGTGACTTAGTTTAACGGCCGCGGT ATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCAC TTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATGG CATCACGAGGGTTCCACTGTCTCTTTTCCA ATCAATGAACTGATCTTCCGTGAAGAAG CGGGAATCTTAATATTAGACGAGAAGACCC TATGGAGCTTCAAATAAATAGCACTGGCTT TTCCCTATATACCTCAAGGGGTATTAACCC TTATTCTAGCCTTTTAACATTAGTTTTAGGT TGGGGTGACCGCGGAGCAAAATTAACCTC CACAATGAATAGCACTATTCTTGAGCCAAAA GCCACAACCTTAAGCACTAACAACTAACAT AAATTGACCAATATTTTGAACAACGAACCA AGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCT TCAAGAGCCCTTATCGACAAGTGGGTTTAC GACCTCGATGTTGGATCAGGATATCCAGT GGTGACGCCGCTACTAAAGGTTCTGTTTGTT AACGATTAAAACTCTACGT
<i>Dendropsophus triangulum</i>	MT503958	2020		AAAAACATCGCCTCTTGACCAATATAAGAG GTCCAGCCTGCCAGTGACCCAGTTCAACG GCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGC GTAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGT ATGAATGGCACCACGAAGGTTACACTGTCT CCTTTTCTAATCAATGAACTAATCTCCCG TGAAGAAGCGGGGATTAAATATAAGACGA GAAGACCCTATGGAGCTTCAAATAAATAG TATTGGCTTTATCCATTTACACCTCCGGGG CCTCATACTAAGCTAGCCTTTTAACATTAG TTTTGGGTTGGGGTGACCGCGGAGCAAAAA TTATCCTCCATGATGAATAGAGCTACTCTTG AGCCAAAAGCCACAACCTTAGGCACCAATA AACTGACATAAATTGACCAATATTTGAGC AACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGC GCAATCCATCTCAAGAGCCCTATCGACAG GTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGG GTATCCAGTGGTGCAGCCGCTACTRAAGG TTCGTTTGTTCAACGATTAAACCCCT
<i>Engystomops petersi</i>	KY814625	2017		TCTTGCTTACNCCNNGAAAAATGTATGTGAA AACCATACCGTTTTGAGCTAAAACTTAGCC TTACCCCTACAATTATATTACCTATTTTAC TTACACAAAATAAAACATTCTTTAAGCTTAG TAAAGGAGATAAAAAAGTTTTTTAGAGCTA TAAAAATAAGTACCGCAAGGGAAAAATGAAA TAAAAATGAAACAAAATTCAAGCATAATATA GTAGAGTTTTCCCTCGTACCTTTTGCATCAT GATTCAACTAGTTTAACCAAGCAAAAAAGAAT TTAAGTTTGACTTCCCGAACTAAGTGAGCT ACTTCAGGGCAGCTAAATGAGCCAACCCGT CTCTGTTGCAAAAGAGTGGGATGACCCTTA AGTAGAGGTGATAAACCTAACGAACCTTAGT GATAGCTGGTTATTCAGGAAAAAGAAATTTTA GTTCAACTTAAAAATTACATAAATAAAATAA ATAAAATTTTAATTTTAAAGCAATTCAAATA AGGTACAGCCTATTTGAAATAGAATACAATC TAAACTATAGGGTAAATATAAAAAATTAATG

			TAATAAAGTAGGCCTAAAAGCAGCCAACCT TAAATAGCGTCAAAGCTTACTTCCATAATT TTTTAATACTATTATTACAATGAACCTTTA TTTTTACTGAATATTTCTATAAAGTTATAGAA CCTTTTATGTTGAACTAGTAACAAGAAGTT AAACTTCTCCTCAATATAAGTATAAGTCGAC TAGGATAAACCATCGACAATTAACGCTTAAA TTAAATGTATTAACCCACAAGAAAACTTA CATTACCCACGTTNNTCTTACACCAG
<i>Gastrotheca testudinea</i>	KR270430	2015	CGCCTCTTGAGAAGCATAAGAGGTCCAGCC TGCCAGTGACAATGTTCAACGGCCGCGGT ATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCAC TTGTCCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATGG CACCACGAGGATTATACTGTCTCTTTTCCA ATCAGTGAAACTAATCTTCCGTGAAGAAGC GGAAATACATCTATAAGACGAGAAGACCTT ATGGAGCTTTAAACGAAACATCATTGCTAT AGCACACACTAATCCAGGAAATCAACCTTT ATTTTAGCATTATAATTGTTAGTTTTAGGTTG GGGTGACCGCGGAGTAAAAAATAACCTCCA CAATGAACTGGGGAACCTCCCTAAACAAAA AACCACAACCTTTATGTATCAATAAATTGACA TCAATTGACCCAATATTTTGATCAACGAAAC AAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCA CTTTGAGAGCCCATATCGACAAGTGGGTTTA CGACCTCGATGTTGGATCAGGGTACCCAG TGGTGCAGCCGCTACTAAAG
<i>Hemiphractus bubalus</i>	DQ679412	2006	AAAACATCGCCTCTTGTCTAAACCATAAGAG GTCCAGCTGCCAGTGATACTATTCAACGG CCGCGGTATTTTAACCGTGCAAAGGTAGCG CAATCACTTGTCCTTTAAATGCGGACTAGTA TGAACGCGACCACGAAAGTTAAACTGTCTC CTTTTTCTAATCAGTGAACTAATCTCCCGT GAAAAAGCAGGGATAAATATATAAGACGA GAAGACCCTATGGAGCTTTAAATATTAACAA CAATTGCCACAACCTATGATTGTTAATTTT AGGTTGGGGCGACCGGAGTAAACCCA GCCTCCATGCCAAATATAGCAAAATCTACA ACTTTAAGCATCATTAAATTGACACTTATTG ACCCAATATTTTGATCAACGAACCAAGTTAC CCTAGGGATAACAGCGCCATCCACTCAAG AGCCCATATCGACAAGTGGGCTTACGACCT CGATGTTGGATCAAGGTACCCAGTGGCGC AGCCGCTACTAAAGGTTCTGTTTCAACGA TTAA
<i>Hemiphractus scutatus</i>	MG011479	2018	GGTCCAGCCTGCCAGTGACTTTATTCAACG GCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGC GTAATCACTTGCCCTTTAAATAAGGACTAGT ATGAACGGCATCACGAAGGTTAACTGTCT CCCTTTTAAATCAGTGAACTATCCCCCG TGAAGAGTCGGGGATATATCTACAAGACGA GAAGACCCTATGGAGCTTTAAATTCTAACAA CAATTGCTCTAAATATATTAGCATTATGA TTGTTAATTTTAGGTTGGGGCGACCGGA GAAAAACCTAACCTCCATGCTGACATAGTAA AACTACAATTTTAAATACCATTAAATTGGCAT CCATTGACCAATATTTTGATCAACGAACCA AGTTACCCTAGGGATAACAGCGCCATCCACT TCAAGAGCTCATATCGACAAGTGGGTTTAC

			GACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCCAGT GGTGCAGCCGCTACTAAA
<i>Hyalinobatrachium munozorum</i>	JF266570	2011	AATATAGAAGATATTATGTTAAACTAGTAA CAAGAAGAAGAACTTCTCTACAATGCAAG TGTAATCAGACAGGACACCCCACTGATAA TTAACACCAATGAACATAAAATAGCAACCCA ACAAGAAAACCTACTACACCATATGTTAAA CTGACACCAGAGCATTTCAGAAAGATTTA AAGAAAAAGAAGGAACTCGGCAAAACATTAA CCTCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTT GAATAAGTATAAGAGGTCCAGCCTGCCAG TGACAATGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAAC CGTGCGAAGGTAGCGTAATCACTTGTTCTTT AAATAAGGACTGGTATGAACGGCACCACGA AGGTTATACTGTCTCCTCTTTCTAATCAGTGA AACTAATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATA AGAATATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGC TTTAACTACAAGGCACTTGCCCCACATAAC CGAATTCAGAAAACTACTACCAACCCAGGCA ATATTGACCCTTAGTTTTAGGTTGGGGTGAC CGCGGAGCAAAAAGAACCTCCACATTGAA AGGAGAACTCCTTAGCCAAGAGCCACAC CTCTAAGCACCAACAAAAGACATTAATTGA CCCAATATTTGATCAACAACCAAGTTACCC TAGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAG CTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGA TGTTGGATCAGGGTACCCGGTGGTGACGC CGCTACCAAGGTTTCGTT
<i>Hyloscirtus phyllognathus</i>	KT279545	2015	CACATAAACCCCTTTATTACCACTAGACAAT TCTATATAACTATAGAAATTATTTGTTAAAA CTAGTAACAAGAAATAAACCTTCTCTTTAAT ATAAGTATATGCCAGAAAGGATAAACCACT GGCCATTAACATACTTGAAAAATTAAGCAGC AACACCACAAGAGAACCCTGCCTATATGTAT GTAAATTTTACATAAAACATTTCAAGAAAG ATTAAGAAAAAGAAAGGAACTCGGCAAAAC ATAAATCTCGCCTGTTTACCAAAAACATCGC CTCTTGAAACCTATATAAGAGGTCACGCCTG CCCGGTGACTCATGTTTAACGGCCGCGGTAT CCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCACTT GTTCTTTAATAAGGACTAGTATGAATGGCC ACACGAAGATTTTACTGTCTCTTTTCTAAT CAGTGAACTAATCTCCCGTGAAGAAGCG GGGATAAAATATAAGACGAGAAGACCCTA TGGAGCTTTAAACACAGCAGCACTTGTTAAC CTTCAAACCTTTCAAATAAACTTATACATCAT GACTGCAAGTTTTAGGTTGGGGTGACCACG GAGCAAAAAATAACCTCCATGTAGAACAGA TTTTTCCATGAGCAAAAACCTCAACTTTAT GCACCAACAAATTGACTTCTATTGACCCAAT ATTTTGATCAACGAACCAAGTTACCTAGGG ATAACAGCGCAATCCACTTTAAGAGCCCTA TCGACAAGTGGGCTTACGACCTCGATGTTG GATCAGGGTACCCTAGCGGTGTAGCCGCTG CTAATGGTTCGT

<i>Hyloxalus yasuni</i>	MF624236	2017		AACATCGCCTCCTGATACTCCCATAGGAGGT CCAGCCTGCCAGTGACATTGTTCAACGGCC GCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTA ATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATG AACGGCTTACGAGGGCTATACTGTCTCTC TTTCTAATCAATGAACTAATCTCCTCGTGA AGAAGCGAGGATAAACCTATAAGACGAGA AGACCCATGGAGCTTTAAACAAGTAAAT ACTTGCTTACAACCTCTTAACCTCCCGAAAAC ACTATTCAACTAAGCACTTTATTCATAGTTTT AGGTTGGGGTGACCACGGAGCATAAATCCA CCTCCATGCTGAAAGAAGGTTCTCTTCTTAT CAAAGAGCTTCAGCTCAATGCATTAATAAAT TGAATCCCATGACCCCAATATTTTATCAAC GAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCA ATCTATTTCAAGAGCTCATATCGACAAATAG GTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATC CTAGTGGTGACGCCGCTACTAACGGTTCGTT TGTTCAACGATTAACCCCT
<i>Leptodactylus knudseni</i>	KP149492	2011		CGCCTCTTGCACTACCTATAAGAGGTCCAGCC TGCCAGTGACTCTGTTCAACGGCCGCGGT ATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCAC TTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATGG CATCAGCAAGGTTATTTCTGTCTCTTTCCA ATCAGTGAACTAATCTCCCGTGAAGAAG CGGGGATAACTCTATAAGACGAGAAGACCC TATGGAGCTTTAACTAAGAATCAACTGACT TCCCACTTTTAAATTCAGAAAACTAATTTT ACCAAGACACTCTGATTCTAGTTTTAGGTT GGGGTGACCACGGAGTAAAACTAACCTCC GCAATGAACGGGGATCTTCCCTTAACCAAG GACCACAACCTAAGAATCAACACATTGACA TCAATTGACCCAAAAATTTGATCAATGAACC AAGTTACCTAGGGATAACAGCGCAATCCA CTTTAAGAGCCCATATCGACAAGTGGGTTTA CGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCAG TGGTGACGCCGCTACTAATGGTTCGTTTGT CAACGATTAACCCCTA
<i>Leptodactylus wagneri</i>	TWQ_2940	2020	Ecuador	GGAACCCATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGT GACCCTGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAACC GTGCGAAGGTAGCGTAATCACTTGTTCTTTA AATGAGGACTAGTATGAATGGCACCACGAA GGTTATACTGTCTCTTCTCTAATCAGTGA AACTAATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATA AGCCTATAAGACGAGAAGACCCATATGGAGC TTTAAACACAGTAATAAATGCCCCCCCCCT TTTTCTATTCAAATCTCCGAAAACTACTTTA TCTGAGCATCTATTTACAAGTTTTAGGTTG GGGTGACCGCGGAGTAAAAATAACCTCCA CAGTGAATGGAATCTTTTCTAACTCAGG GCCACAACCCATAAAATCAATAAATGACAC CCATTGACCCAATATTTTATCAATGAACCA AGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCAC TTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTAC GACCTCGATGTTGGATCAGGGTACCCAGT GGTGACGCCGCTGCTAAAGGTTTCGT
<i>Lithodytes lineatus</i>	AY326012	2004		ATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACTCTG TTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCGA AGGTAGCGTAATCACTTGTTCTTTAAATAAG GACTAGTATGAAAGGCACCACGAGGGTTGC ACTGTCTCTTTCTCTAATCAGTGAACTAAT CTTCCCGTGAAGAAGCGGGAATAAAAAAT AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAAAC TAAATAATAATAGCCTACTCATTTACACAAC TCCAGATGAATACTTTACCCTGGCTCGATAA TTATTAGTTTTGGTTGGGGTGACCACGGAG AAAAAGAAACCTCCGCAATGAAAGACTCT CCTTCTAGTTTAGGACTACTTTCCTACGCAT

				CAATAAATTGACACATATTGACCCAACAACG TTGATCAATGAACCAAGTTACCCCTAGGGATA ACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCTATCG ACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT CAGGGTATCCAGTGGTGCAGCCGCTACTA AAGGTTGTTGTTCAACGATTAAC
<i>Oreobates quixensis</i>	TWQ_037	2020	Ecuador	AAAACATCGCCTCTTGTCTAAATAAGAGGT CCAGCCTGCCAGTGACTTGTTAACGGCCG CGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAA TCACTTGTTTTTAAATAAAGACCTGTATGA AAGGCACCACGAGAGCCAACTGTCTCCTTT TTCCTATCAGTGAACTAATCTTCCCGTGAA GAAGCGGGAATTTTTAATAAGACGAAAAAG ACCCTATGGAGCTTTAACTTCACAACACCT GTTTCTCAATCTTAAATATTCTCTTAAACAC CCTGTTTATGAACCTTCGGTTGGGGCGACCA CGGAGAATAACTCACCTCCGTAAAGAGTA ACAAAAAGCAACAACCTTATTCATCAGTAAA ACTGACATCCATTGACCCAAATCTTGATCA ACGAACCAAGTTACCTAGGGATAACAGCG CTATCCACTTTAAGAGCCCTATCGACAAGT GGGCTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT ATCCTGGTGGTGACCCGCTACTAACGGTTC GTTTGTCAACGA
<i>Osteocephalus buckleyi</i>	KF002027	2013		TATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACTTTG TTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCGA AGGTAGCGTAATCACTTGCTTTTAAATGAG GACTTGATGAATGGCATCACGAGGGTTAT ACTGTCTCTTTCTCTAATCAGTGAACTAAT CTTCCCGTGAAGAAGCGGGAATAAGAATAT AAGACGAGAAGACCTATGGAGCTTTAAAC TCAATAACAAATACTAACCTTACTTTAACTC CAGAACATTGACACTAATCTTAGTACTATGA TTATTAGTTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGA GTAAAAATTAACCTCCACATTGAACAGGACC TTTCTTGAGCTAAGAGCTACAACCTTAAAC ACCAACAAATTGACATTAATTGACCCAATAT TTTGATCAACGAACCAAGTTACCTAGGGAT AACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATC GACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGA TCAGGGTATCCAGTGGTGACCCGCTACT AAAGGTTGTTTGTCAACGATTAACCCCT
<i>Pristimantis altamazonicus</i>	MF118696	2003		ATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGATCTATT CAACGGCCGCGGTATTCTAACCGTGCGAAG GTAGCGTAATCACTTGCTTCTAAATAAAGA CCAGTATGAAAGGCATCACGAAGACTAAGC TGCTCCTCTCTCAATCAGTGAACCTAATCT CCCCGTGAAGAAGCGGGGATCCAATTATAA GACGAGAAGACCTATGGAGCTTTAAACAT CGTAACATCTGCCACCGCTTACCCACTCC GGTGTACCCCTAAACGGCACCTGATTACA TGTTTTTGTTGGGGTGATCGCGGAGAAAA ACTCATCTCCACAATGAAAGGGACCTCCCC TAAACAATAAGTTACAACCTTATGTATCAAG AAATTGACATCCATTGACCCAATAACTGATT AACGAACCAAGTTACCTAGGGATAACAGC ACAATCCACTTTGAGAGCCGTATCGACAA GTGGGCTTATGACCTCGATGTTGGATCGGG ATATCCAGTGGTGCAACCGCTACTAAAGG TTCGTTTGTCAACGATTAACCC

<i>Pristimantis brevicrus</i>	MF118702	2017		ATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACTCATT CAACGGCCGCGGTATACTAACCGTGCGAAG GTAGCGTAATCACTTGTCTTCTAAATAAAGA CCAGTATGAAAGGCATCACGAAGGCTAAAC TGTCTCCTCTCCAATCAGTGAACCTAATCT CCCCCTGAAGAAGCGGGGATCCCATTATAA GACGAGAAGACCCCATGGAGCTTAAACAC CATAACACCTGCCCAATTCTCAACCACTCC GATGTTTCCATGTAACGCGACCCCTGATTATG TGTTTTGGTTGGGGTGACCGCGGAGAAAA ACTCATCTCCACAATGAAAGGGGCCCTCCC CTAAACAATAAGTTACAACCTTATATATCAA AAAATTGACATTCACTGACCAACAATAATGA TTAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACA GCACAATCCACTTTGAGAGCCCTATCGACA AGTGGGCTTATGACCTCGATGTTGGATCGG GATATCCTAGTGGTGAACCGCTACTAAAG GTTCGTTTGTCAACGATTAATAATCCCACGT GATC
<i>Pristimantis conspicillatus</i>	MH516169	2018		GAGGTCCAGCCTGCCAGTGACGTTCAACG GCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGC GTAATCACTTGTCTTTAAATAAAGACTAGT ATGAAAGGCACACGAGAATTAACTGTCT CCTTTTCCAATCAATGAACCTAATACCCCG TGAAGAAGCGGGGATTTTACAATAAGACGA GAAGACCCTATGGAGCTTTAAACAATTATAT GTTTTTGGTTGGGGTGACCGCGGAGAAAA CCTATCCCCGCGATGAAAAACAAGCCACA ACTTATGTATCAACAAATTGACACCATTGA CCCAATATATTGATTAAACGAACCAAGTTACC CTAGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGA GCTCTATCGACAAGTGGGCTTACGACCTCG ATGTTGGATCAGGGTATCCTAGTGGTGACG CCGCTACTAAGGGC
<i>Pristimantis kichwarum</i>	EU130603	2007		CAGTGACTTTATTCAACGGCCGCGGTATCCT AACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTC CCCTAAATAGAGACCAGTATGAAAGGCATC ACGAGGGCTAACTGTCTCCTTTTCTAATC AGTGAACCTAATCTCCCGTGAAAAAGCGG GGATCCCCCTATAAGACGAGAAGACCTAT GGAGCTTAAACATAACAATACCTGCCTCAC CTAATATACCCAGATTTTCCCTCCCTCCAG TTCTTATTGTGTGTTTTGGTTGGGGCGACC GCGGAGAAAAACCTATCCTCCTCAATGAAA TGGGACTCCCTAAACAACAAGCTACAACCTT TAAGTATCAAAAAATTGACATCCCTTGACCC AATAAATTGATTAAATGAACCAAGTTACCTA GGGATAACAGCACAATCCACTTTGAGAGCT CCTATCGACAAGTGGGCTTATGACCTCGATG TTGGATTAGGGTATCCTAGTGGTGACGCCG CTAATAAGGTTTCGTTTCAACGATTAATA ACCCCACGTGATCT
<i>Pristimantis lanthanites</i>	HMOA1942	2018	Ecuador	CGGCCGCGGAACCCTAACCGTGCGAAGGTA GCGTAATCACTTGTCTATAAATGAGGACTA GTATGAAAGGCTTACGAGGGCTAACTGT CTCCTTCTTCTGATCAGTAAACCTAATCTCCC CGTGAAAAAGCGGGATTAACCACATAAGAC GAGAAGACCCCATGGAGCTTAAACACTTC TACACTTGTACAAACCTATAATAACTACTA TGACACCCTGTTAAATGTTTTCGGTTGGGG TGACTCGGGGAATAACTAAACCCCGCGA TGAAAGGGTACATCCCTAACTATAAGTTAC AACTTTAAATATCAGAAAACGACATCTTTG ACCCAATTATTTGATCAACGAACCAAGTTAC CCTGGGGATAACAGCGCAATCCACCTCAAG AGCCCTTATCGACAGGTGGGCTTACGACCTC GATGTTGGATCAGGGTATCCTAGTGGTGCA

				GCCGCTACTAAAGGTTCTGTTTGTTCACGAT TAAAACCTACGTGATCTGAGTTCAGACCG
<i>Pristimantis librarius</i>	JN991451	2011		CACCTTTTGATAAGAGGCCAGCCTGCCAG TGACGTTCAACGGCCGCGTATTCTAACCGT GCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTTCTAAA TAAAGACTAGTATGAAAGGCACCACGAGGA CTAAACTGTCTCCTTTTCTAATCAGTGAATC TAATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAA ATATAAGACGAGAAGACCTGTGGAGCTTA AAACATTTAAACACTTGCATCCTGATTCAT GTTTTTGGTTGGGGTGACCGCGGAGAAAAA CCTATCCTCCACAGTGAACAGCAATAAGTTA CAACCTTGCGCATTAAAAAATTAACACTATT GACCCAATATTTTGTCAATGAACCAAGTTA CCCCAGGGATAACAGCACAATCCACTTCGA GAGCCCCTATTGACAAGTGGGCTTATGACCT CGATGTTGGATCGGGGTATCCTAGTGGTGC AGCCGCTACTAAAGGTTCTGTTTGTTCACGA TAAAACCTC
<i>Pristimantis malkini</i>	TWQ_016	2020	Ecuador	AACATCGCCTCTTGACTCTTATAAGAGGTCT AGCCTGCCAGTGACCTAGTTCAACGGCCG CGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAA TCACTTGTCTTCTAAATAAGACTAGTATGA AAGGCACCACGAGAACTAACTGTCTCCCTT TTCCAATCAGTGAACCTAATGCCCCCGTGA GAAACGGGGATTTTACAATAAGACGAGAAG ACCCTATGGAGCTTTAAACATCATAATCACC TGCCCTACTAAACCAAGATACTCAGGTCCCC ACCCAAACCATGATGATTATATGTTTTGG TTGGGGTGACCGCGGAGAAAAACACATCCC CCGCGATGAAAGCCCACCCAAACAACAGC CACAGCTTTATGTATCAACAAATTGACACTA TTGACCCAATATATTGATTACGAACCAAGT TACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCACTTCA AGAGCCCCTATCGACAAGTGGGCTTACGAC CTCGATGTTGGATCAGGGTATCCTAGTGGT GCAGCCGCTACTAAGGGCTCGTTTGTTCAC GATTAAACCTACGTGA
<i>Pristimantis variabilis</i>	TWQ_018	2020	Ecuador	TCGCCTCCTGTTCTCATAGGAGGTCCAGCCT GCCAGTGACTTAATTTAACGGCCGCGGTAT CCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCACTT GTCTTCTAAATAAGACTTGTATGAAAGGCA TCACGAGGGCTTAAGTGTCTCTTTCTCCAA TCAGTGAACCTAATCTCCCCGTGAAGAAGC GGGGATAACTATATTAGACGAGAAGACCTT ATGGAGCTTTAAATACTATAACATATGCTTT CCCCCTATATACCGAGGTGCCTCACCTTT CACAGCTAATTGATTATATTTTTGGTTGG GGTGACCGCGGAGAAATAAACCATCTCCAC AATGAATGGGGATCCCCCAATAAACAG CCACAACCTTACCATCAATAAATTGACTCTC ATGACCCAATATTTGATCAACGAACCAAGTT ACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCACTTTAA GAGCTCTATCGACAAGTGGGCTTACGACC TCGATGTTGGATCAGGGTATCCTAGTGGTG CAGCCGCTACTAAAGGTTCTGTTTGTTCACG ATTAACCTACGTGAT

<i>Rana palmipes</i>	DQ347321	2006		CGCCTCTTGACAAAATATAAGAGGTCCAGC CTGCCAGTGATAAATTTACGGCCGCGGT ATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCATAATCATT TGTTCTTTAAATGGGGACTTGTATCAACGGC ACCACGAGGGCCACTGTCTCCTTTCTCTA GTCAGTGAAACTGATCTCCCCGTGAAGAAG CGGGGATTTAACTATTAGACGAGAAGACCC CATGGAGCTTAAAACTCACTATATAATTCTG TACCTCATATCACCTTAATTGAGATCCTATA TGCTAGTTTTAGGTTGGGGGACCTCGGAG TATAATTTAACCTCCATAACAAATGGGCTAA TACCCTTATCCAAGATAAACACCTCTAAGAA TTATTAAATTAATGTTTAAAGACCCGATATAT TCGATCAATGAACCAAGTTACCCTGGGGAT AACAGCGCAATCTACTTCAAGAGTCCATATC GACAAGTAGGTT
<i>Ranitomeya variabilis</i>	JN651262	2011		TAGCGTAATCACTTGTTCTTTAATTGAGGAC TAGTATGAACGGCCCCACGAGGACTACACT GTCTCCTTTTTCTAATCAATGAACTGATCTC CTCGTGAAGAAGCGAGGATGAATATATAAG ACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAAACAAC CGGAGTACTTGCTATTCATTTTATATCTTCTG AGAACTAAACAAATTAAGCATCTTACTCCC AAGTTTTAGGTTGGGGTGACCAAGGAGAAA AAATTAACCTCCACGCTGTAAGAAGTTCACC ATCTTCTAAGCTTAGAGTCACATCTCCAAGC ATCAACACATTGACTCCCATTGACCCAATAA TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGAT AACAGCGCAATCTACTTTAAGAGCTCATATC GACAAGTAGGTTACGACCTCGATGTT
<i>Ranitomeya ventrimaculata</i>	JN635822	2011		TAGCGTAATCACTTGTTCTTTAATTGGGGAC TAGTATGAACGGCCCCACGAGGACTACACT GTCTCCTTTTTCTAATCAATGAACTGATCTC CTCGTGAAGAAGCGAGGATAATTATATAAG ACGAGAAGACCCTATGGAGCTTCAAACAAC CGGGATACTTGCTGATTCTTAATCTATTTCCT GAAAACTAAACAAATTAAGCATCTTACCCC CTAGTTTTAGGTTGGGGTGACCAAGGAGAA AAAATTATCCTCCACGCTGTAAGAAGCCTCC CATCTTCTAAGCTAAGAGATTACACTCTCTA AGCATCAACACATTGACTCCCATTGACCCAA TAATTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGG GATAACAGCGCAATCACTTTAGAGCTCATAT CGACAAGTAGGTTACGACCTCGATGTT
<i>Rhaebo ecuadorensis</i>	TWQ_3639	2020	Ecuador	ACATCGCCTCTTGATTAGTTATAAGAGGTCC AGCCTGCCAGTGACCTGTTCAACGGCCG CGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAA TCACTTGTTCTTTAAATAAGGACTAGTATGA ATGGCACCACGAGGGCTACACTGTCTCCTTT TTCTAATCAGTGAACCTAATCTCCCGTGAA GAAGCGGGAATAAACCTATAAGACGAGAA GACCCTATGGAGCTTTAAACAATATAGCATT TGCCATATAACATAAAAAATTTCCGAATATTC ACTTCTAAAGCAGTATGACTATAAGTTTTT GGTTGGGGTGACCGCGGAGCATAACACAAC CTCCATGTTGAATGAAGATTATTCTAAGCCG CGAACCACACTTCTAAGCATCAAAATACTGA CACCAATTGACCCAATATATTTGAACAACGA ACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAAT CCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGT TTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTCTCCC AGTGGTGTAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTT GTTCAACGATTAAACCTACGTGATC
<i>Rhinella dapsilis</i>	KR012641	2015		GCTCAATTTACAAACATTATCTTAATCCTCC ATCTTTATTGAGTAATTCTATAATTTTATAGA AAATTTTATGTTAAACTAGTAACAAGAAGA AGACCTTCTCTTAATGTAAGTGCAATCAG AAAGGACAAACCACTGATATTTAATCACT

				GAACCAAAACAGTAACTCATCAAGAAAT CCTGTTTTATTTATGTTAACCTAACACAAGA GCATTCTAAGAAAGATTAAGAAAAAGAA GGAACCTCGGCAATATTAACCTCGCCTGTTT ACCAAAACATCGCCTCTTGAACCTTATAAG AGGTCCAGCCTGCCAGTGAAGCTGTTCAAC GGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAGGAGTAG CGTAATCACTTGTCTTTAAATGCGGACTAG TATGAATGGCACTACGAGGTTTACTGTCT CCTTTTCTAATCAGTGAACTAATTTCCCG TGAAGAAGCGGAATATACTATAAGACGA GAAGACCCTATGGAGCTTTAAACAACCCAG CAATTACTTCTAAAATTGTAATTTTCAAGAT ATTCATTTCTNTAAGTAATGTGTCTGCAAGT TTTTGTTGGGGTGACCATGGAGAATAACA TAACCTCCATATTGAATGAATTCCTTCTAA GCTGAGAATTACCAATTGAAGCATCAACAC ACTGACATCTATTGACCAATATATTTGATC AACGAACCAAGTTACCTAGGGATAACAGC GCAATCCACTTCAAGAGCCCTATCGACAAG TGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGG TATCCAGTGGCGCAGCCGCTACTAAAG
<i>Rhinella festae</i>	KR012624	2015		TTATAGAATATTTATGTTAAACTAGTAAC AAGAAAANGACTTTCTCTTAAATGCAACTAT AAATCAGAAAGGACAAACCACTGATATTTA ACATCATTGAACCGAAAGTAAAACTCATCA AGAAAACCTACTCTCATTATGTTAACCTA ACACAAGAGCATTACAAGAAAGATTAAAG AAAAAGAAGGAACTCGGCAATATTAACCT CGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGAA TCCTATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACT TTGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGC GAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTAAATA AGGACTAGTATGAATGGTCCACGAAGGTT ATACTGTCTCTTTTCTAATCAGTGAACTA ATCTCCCGTGAAGAAGCGGGAATACTAAT ATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTAAA ATAACTCAACATTTGCTTANAACATTAAGAA TTTCAGAACTTTGACTTCTACTAGCAATATG ATTGTAATTTTTGTTGGGGTGACCACGG AGAACAATACAACCTCCATGCAGAAAGAAT TTTCTTCTAAGCTAAGAATTACTGTCTAAGC ATCAACACATTGACATTCCTGACCCAATAT AATTGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGG ATAACAGCGCAATCTACTTCAAGAGCTCCTA TCGACAAGTAGGTTTACGACCTCGATGTTG GATCAGGGTATCCAGTGGTGTAGCCGCTA CTAAA
<i>Rhinella margaritifera</i>	HMOA1973	2018	Ecuador	AAAAACATCGCCTCTTGAACCTTATAAGAGG TCCAGCCTGCCAGTGACTCTGTTCAACGGC CGCGGTATCCTAACCGTGCAGGAGTAGCGT AATCACTTGTCTTTAAATGCGGACTAGTAT GAATGGCACTACGAGGTTTACTGTCTCCT TTTTCTAATCAGTGAACTAATTTCCCGTGA AGAAGCGGGAATATACTATAAGACGAGAA GACCCTATGGAGCTTTAAACAACCCAGCAAT TACTTCTAAAATTGTAATTTTCAAGATATTCA TTTCTTAAGTAATGTGTCTGCAAGTTTTGG TTGGGGTGACCATGGAGAATAACATAACCT CCATATTGAATGAATTCCTTCTAAGCTGAG AATTACCAATTGAAGCATCAACACTGACA TCTATTGACCAATATATTTGATCAACGAAC CAAGTTACCCTAGGATAACAGCGCAATCC ACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTT ACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCCA GTGGCGCAGCCGCTACTAAAGGTTCTGTTG TTCAACGATTAAACCTACGTGATCTG

<i>Rhinella marina</i>	TWQ_2728	2020	Ecuador	CATCGCCTCTTGACTCTTATAAGAGGTCCAG CCTGCCAGTGACCATGTTCAACGGCCGCG GTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATC ACTTGTCTTTAAATRCGGAAGTATGAAT GGCACCACGAAGGTTATACTGTCTCTTTT CTAATCAGTGAACTAATCTCCCGTGAAGA AGCGAGGATAYACCTATAAGACGAGAAGAC CCTATGGAGCTTTAAACAACACAGCAATTAC CTGCTAAACTAAGAAGTTTCTGAACATTTTC AATCTTTTAAGTAATCTGACTGCAAGTTTTT GGTTGGGGTGACCACGGAGCATAACACAAC CTCCAYGTTGAAAGAAATCTTTCTAAGCCAA GAACAACCTTTCTAAGCATCAATATATTGAC ATCCATTGACCCAATACATTTGACCAACGAA CCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC CACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTT TACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCCA GTGGTGACGCCGCTACTAA
<i>Rulyrana flavopunctata</i>	HMOA1986	2018	Ecuador	AAAAACATCGCCTCTTGAACAAATATAAGA GGTCCAGCCTGCCAGTGACTCTGTTCAACG GCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGC GTAATCACTTGTTCTTTAAATAAGGACTAGT ATGAATGGCACCACGAAGGTTATACTGTCTC CTCTTTTAATCAGTGAACTAATCTCCCGT GAAGAAGCGGGGATAAACTATAAGACGA GAAGACCCTATGGAGCTTTAAACCATGTAG CACTTGCACCTATCAAACACAAATTTAGAA AAATACACTTCACCCATGCAAGATTGCTGCC AGTTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGAGCAAA AATAAACCTCCACATTGAAAGGAACCCACTC CTTAGCCAAGAGTTACACCTCTACGCACCAT AAAAATGACATTAATTGACCAATAATTGGA TCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACA GCGCAATCCACTTTAAGAGCTCCTATCGACA AGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAG GGTATCCCGTGGTGACGCGCTACCAAAG GTTGTTTGTCAACGATTAACCCCTACGT GATCT
<i>Scinax aff cruentomma</i>	TWQ_012	2020	Ecuador	CGTAATCACTTGTTCTTTAAATGGGACTAG TATGAATGGCACCACGAGGGTTATACTGTCT CCTTTCTCTGATCAGTGAACTAATCTCCCC GTGAAGAAGCGGGGATACAGCTATAAGAC GAGAAGACCCTATGGAGCTTTAAATCTCTTT TCAAACGCTAAAATACTTATACAAGTCCCAG ACTTACCCTCACACTTACCTAGCGCCATGAA AATGATTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGAGC ACAAAAAACCTCCACGCTGAACCTAGACGT CCAAACCTTGAGCTAAGGGCTACGACCCGA TGCACTAAAAAATTAACACCAATTGACCCAA TATTTATTTGATCAACGAACCAAGTTACCCT AGGGATAACAGCGCAATCCATTCAAGAGT CCATATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGAT GTTGGATCAGGGTCTCCAGTGGTGACGCC GCTACTAATGGTTCGTTTGTCAACGATTAA AACCTTA
<i>Scinax garbei</i>	TWQ_008	2020	Ecuador	AAAAACATCGCCTCTTGCCATAAATAAGAG GTCCAGCCTGCCAGTGACACATGTTCAACG GCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGC GTAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGT ATGAATGGCATCACGAGGGTTATACTGTCTC CTTTTTCTAATCAGTGAACTAATCTCCCGT GAAGAAGCGGGGTTGAAATATAAGACGA GAAGACCCTATGGAGCTTTAAATTTCCACTC AAATGCTTATTAACCTTTATACTTCTTAGTAT TATTAATAAGTACCTTAGCATTATGAGCCAA AATTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGAGTACA AAATAACCTCCACATTGAAACAGGCTTACAA ACCCTGAGCAACGGACAACATCCTATGCA

					CTAAAAAACTAACATCCATTGACCCAAGTTT TTGATCAACGAACCAAGTTACCTAGGGAT AACAGCGCAATCCTCTTCAAGAGTTCCTATC GCCAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGA TCAGGGTATCCAGTGGTGCAGCCGCTACT AATGGTTCGTTTGTCAACGATTAACCCCT ACGTGATCT
<i>Scinax ruber</i>	TWQ_2022	2020	Ecuador		AAAACATCGCCTCTTGAACAAAAATAAGAG GTCCAGCCTGCCAGTGACTAATGTTCAACG GCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGC GTAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGT ATGAATGGCACCACGAGGGTTATACTGTCT CCTCTTTCTAATCAGTGAACTAATCCCCC GTGAAGAAGCGGGGATTAACTATAAGAC GAGAAGACCCTATGGAGCTTTAAATTTACCC TCAAACGCCAAAATCATACAGCAAGTTTAA ACTTCACCACACGAACCTTCGCGCATGAGG GCAACTTTTAGGTTGGGGTGACCATGGAGT ATAAAATAACCTCCATACTGAACAGGCCTCC AAGCCTCGAACCAAGAGCCACGACCCGCG CACTAAATATTAACATCCATTGATCCAATG TATTTTGATCAACGAACCAAGTTACCTAGG GATAACAGCGCAATCTACTTCAAGAGTTCCT ATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTT GGATCAGGGTGTCCAGTGGTGCAGCCGCT ACTAATGGTTCGTTTGTCAACGATTAAC CCTAC
<i>Teratohyla midas</i>	MT225195	2020			CCCTAAAGAACCTCAAATAATACTGAGTA ATTCTATATTTATATAGAAGATTTATGTTAA AACTAGTAACAAGAAGAAGAACTTCTTACAT AATGCAAGTGTAACCAAGACAGGACACCCC ACTGACAATTACCACCAATGAAGAAAAAGT AGCAACTCCACAAGAAAACCTACTAAACCA AGTGTTAACCTAACACCAGAGCATTACAAAA AAGATTAAGAAAGAGAAGGAACCTCGGC AAATATTAACCCCGCCTGTTTACCAAAACA TCGCCTCTTGATAAAATATAAGAGTCCAGC CTGCCAGTGACTCTGTTCAACGGCCGCGGT ATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCAC TTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATGG CACCACGAAGGTTATACTGTCTCCTCTTCC AATCAGTGAACTAATCTCCCGTGAAGAA GCGAGGATAAACCTATAAGACGAGAAGACC CTATGGAGCTTTAAACCAAGTAGCACTTGCA TCAGTTTAATATAAATTCAGAAAAACCTCA CCCACCATGCAAGATTATTACTAGTTTTAG GTTGGGGTGACCGCGGAGCAAAAGACAAC CTCCACATTGAAAGGAACCACTCCTCAGCC AAGAGTTACACCTCTATGCACATTATAATG ACATTAATTGACCAATATTTTGATCAACGA ACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAAT CCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGT TTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCC AGTGGTGTAGCCGCTACTAATGGTTCGTT

Tabla S3. Lista de especies detectadas mediante el Registro de Encuentro Visual. Se especifica si fueron registradas en charcas o transectos de Río (T. Río) y el año de muestreo que fueron observadas.

	Familia	Especies	Registros	Sitio	Año
1	Leptodactylidae	<i>Adenomera andreae</i>	1	T. Río	2020
2	Aromobatidae	<i>Allobates aff. Insperatus</i>	1	Charca	2020
3	Hylidae	<i>Boana geographica</i>	10	Charca	2020-2021
4	Hylidae	<i>Boana lanciforme</i>	6	Charca	2020-2021
5	Hylidae	<i>Boana punctata</i>	38	Charca	2020-2021
6	Centrolenidae	<i>Cochranella resplendes</i>	1	T. Río	2020
7	Hylidae	<i>Dendropsophus bifurcus</i>	36	Charca	2020-2021
8	Hylidae	<i>Dendropsophus parviceps</i>	12	Charca	2020
9	Hylidae	<i>Dendropsophus reticulatus</i>	21	Charca	2020-2021
10	Hylidae	<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	15	Charca	2020-2021
11	Hylidae	<i>Dendropsophus sarayacuensis</i>	11	Charca	2020-2021
12	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus wagneri</i>	9	Charca y T. Río	2020-2021
13	Craugastoridae	<i>Oreobates quixensis</i>	2	T. Río	2020
14	Craugastoridae	<i>Pristimantis malkini</i>	2	T. Río	2020
15	Craugastoridae	<i>Pristimantis variabilis</i>	1	T. Río	2020-2021
16	Bufonidae	<i>Rhaebo ecuadorensis</i>	6	T. Río	2020-2021
17	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	26	Charca y T. Río	2020-2021
18	Hylidae	<i>Scinax cruentomma</i>	1	Charca	2020
19	Hylidae	<i>Scinax garbei</i>	18	Charca	2020-2021
20	Hylidae	<i>Scinax ruber</i>	31	Charca y T. Río	2020-2021
		Total	248	Charca y T. Río	2020-2021

Tabla S4. Registro de especies detectadas mediante eDNA metabarcoding con sus respectivos números de lecturas. Se especifica si fueron registradas en charcas o transectos de Río (T. Río) y el año que fue detectada.

	Familia	Especies	Lecturas	Sitio	Año
1	Leptodactylidae	<i>Adenomera hylaedactyla</i>	3	charca	2020
2	Hylidae	<i>Boana geographica</i>	786	charca y T. Río	2020-2021
3	Hylidae	<i>Boana lanciforme</i>	1304	charca y T. Río	2020-2021
4	Hylidae	<i>Boana punctata</i>	4341	charca y T. Río	2020-2021
5	Hylidae	<i>Dendropsophus bifurcus</i>	4067	charca y T. Río	2020-2021
6	Hylidae	<i>Dendropsophus parviceps</i>	1132	charca y T. Río	2020-2021
7	Hylidae	<i>Dendropsophus reticulatus</i>	2621	charca y T. Río	2020-2021
8	Hylidae	<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	2858	charca y T. Río	2020-2021
9	Hylidae	<i>Dendropsophus sarayacuensis</i>	1369	charca y T. Río	2020-2021
10	Hylidae	<i>Dendropsophus triangulum</i>	35	charca	2021
11	Centrolenidae	<i>Hyalinobatrachium munozeorum</i>	432	charca y T. Río	2020-2021
12	Centrolenidae	<i>Hylorctus phyllognatus</i>	255	T. Río	2020-2021
13	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus wagneri</i>	2720	charca y T. Río	2020-2021
14	Craugastoridae	<i>Oreobates quixensis</i>	52	T. Río	2020-2021
15	Hylidae	<i>Osteocephalus buckleyi</i>	348	charca y T. Río	2020
16	Craugastoridae	<i>Pristimantis acerus</i>	145	T. Río	2020-2021
17	Craugastoridae	<i>Pristimantis conspicillatus</i>	43	T. Río	2020-2021
18	Craugastoridae	<i>Pristimantis eriphus</i>	835	T. Río	2021
19	Craugastoridae	<i>Pristimantis malkini</i>	782	charca y T. Río	2020-2021
20	Craugastoridae	<i>Pristimantis mallii</i>	729	T. Río	2020-2021
21	Craugastoridae	<i>Pristimantis sp.</i>	486	charca	2020-2021
22	Craugastoridae	<i>Pristimantis sp.aff. HMOA2026</i>	85	T. Río	2021
23	Bufonidae	<i>Rhaebo ecuadorensis</i>	2138	charca y T. Río	2020-2021

24	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	292620	charca y T. Río	2020-2021
25	Centrolenidae	<i>Rulyrana flavopunctata</i>	10	T. Río	2020
26	Hylidae	<i>Scinax garbei</i>	6877	charca y T. Río	2020-2021
27	Hylidae	<i>Scinax ruber</i>	47973	charca y T. Río	2020-2021
28	Centrolenidae	<i>Teratohyla midas</i>	10	T. Río	2021
		Total	375056	charca y T. Río	2020-2021

Tabla S5. Datos empleados para la creación del diagrama Sankey

Fuente (inicio)	Blanco (Llegada)	Valor (grosor de conexión)
Primer nodo: Sitios de muestreo-Familias		
ChP1	Bufonidae	0.8
ChP1	Centrolenidae	1
ChP1	Strabomantidae	1.04
ChP1	Hylidae	3.91
ChP1	Leptodactylidae	0.8
ChP2	Bufonidae	0.4
ChP2	Strabomantidae	1.04
ChP2	Hylidae	5.4
ChP2	Leptodactylidae	0.8
ChP3	Aromobatidae	1
ChP3	Bufonidae	0.4
ChP3	Strabomantidae	0.52
ChP3	Hylidae	3.9
ChP3	Leptodactylidae	0.4
TrP1	Bufonidae	0.8
TrP1	Strabomantidae	2.6
TrP1	Hylidae	2.86
TrP1	Leptodactylidae	1.2
TrP2	Bufonidae	0.8
TrP2	Centrolenidae	1.04
TrP2	Strabomantidae	3.13
TrP2	Hylidae	1.98
TrP2	Leptodactylidae	0.4
TrP3	Bufonidae	0.8
TrP3	Centrolenidae	1
TrP3	Strabomantidae	3.65
TrP3	Hylidae	3.96
TrP3	Leptodactylidae	0.4
Segundo nodo: Familias – Métodos		
Bufonidae	REV	2
Bufonidae	eDNA	2
Centrolenidae	REV	1
Centrolenidae	eDNA	3
Strabomantidae	REV	3
Strabomantidae	eDNA	9
Hylidae	REV	11
Hylidae	eDNA	13
Leptodactylidae	REV	2
Leptodactylidae	eDNA	2
Aromobatidae	REV	1
Tercer nodo: Métodos-especies		

REV	<i>A.andreae</i>	1
REV	<i>A.insperatus</i>	1
REV	<i>C.resplendens</i>	1
REV	<i>P.variabilis</i>	1
REV	<i>S.cruentomma</i>	1
REV	<i>Especies en común</i>	15
eDNA	<i>Especies en común</i>	15
eDNA	<i>A.hylaedactyla</i>	1
eDNA	<i>D.triangulum</i>	1
eDNA	<i>H.munozorum</i>	1
eDNA	<i>H.phyllognathus</i>	1
eDNA	<i>O.buckleyi</i>	1
eDNA	<i>P.acerus</i>	1
eDNA	<i>P.conspicillatus</i>	1
eDNA	<i>P.eriphus</i>	1
eDNA	<i>P.mallii</i>	1
eDNA	<i>Pristimantis sp.</i>	1
eDNA	<i>D.triangulum</i>	1
eDNA	<i>Pristimantis sp. aff. HMOA2026</i>	1
eDNA	<i>R.flavopunctata</i>	1
eDNA	<i>T.midas</i>	1
Especies en común		
1	<i>Boana geographica</i>	2
2	<i>Boana lanciforme</i>	2
3	<i>Boana punctata</i>	2
4	<i>Dendropsophus bifurcus</i>	2
5	<i>Dendropsophus parviceps</i>	2
6	<i>Dendropsophus reticulatus</i>	2
7	<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	2
5	<i>Dendropsophus sarayacuensis</i>	2
9	<i>Leptodactylus wagneri</i>	2
10	<i>Oreobates quixensis</i>	2
11	<i>Pristimantis malkini</i>	2
12	<i>Rhaebo ecuadorensis</i>	2
13	<i>Rhinella marina</i>	2
14	<i>Scinax garbei</i>	2
15	<i>Scinax ruber</i>	2

Figuras suplementarias

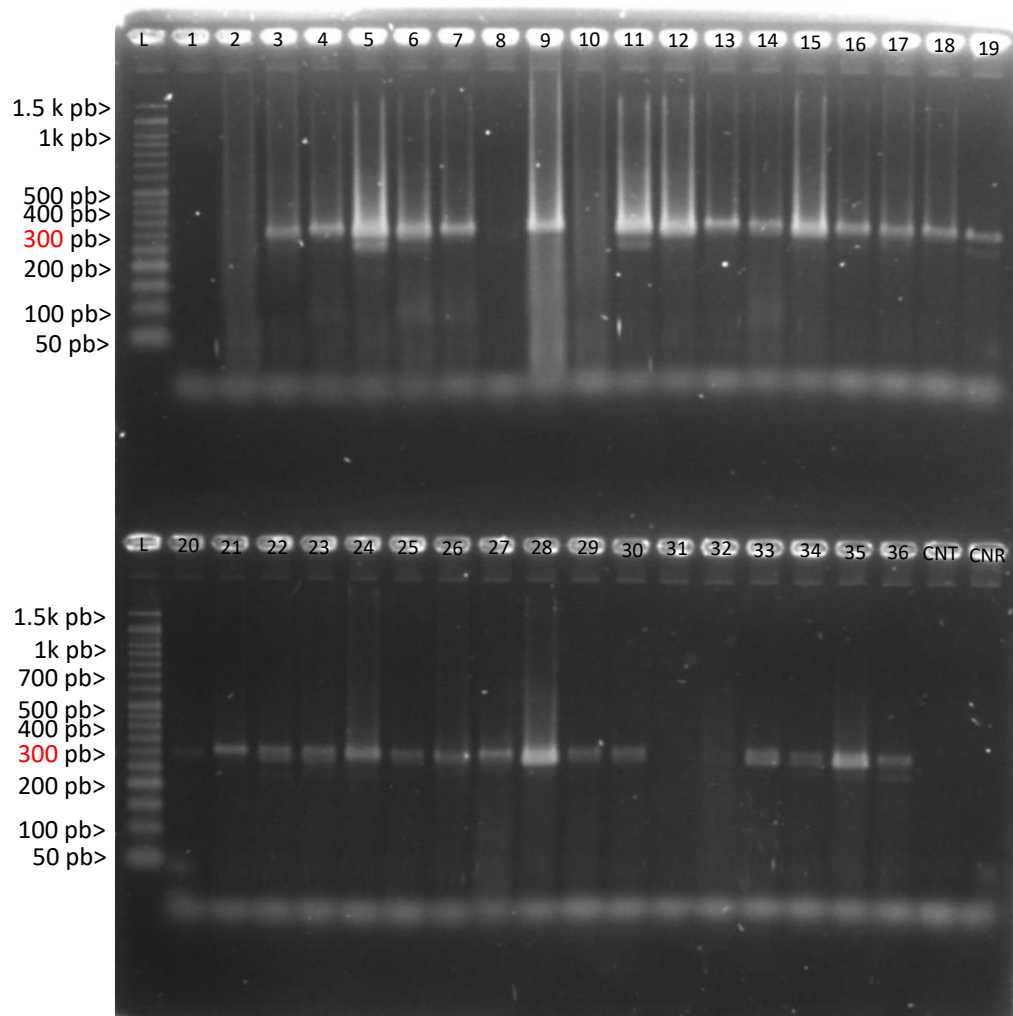


Fig. S1. Gel de agarosa 2% (m/v). **Carril L.** Marcador de peso molecular de 100 pb Ladder Biógena. **Carriles 1-36:** productos de PCR de ADN metagenómico con primers Vert 16S eDNA F1/R1 con adaptadores para ONT aprox. 300 pb. **Carril CNT:** control negativo de transporte. **Carril CNR.** Control negativo de reacción.

Muestras amplificadas del 2020

Carril L: Ladder; **Carril 1:** EchP3
Carril 2: EchP2; **Carril 3:** EchP1
Carril 4: ETrP3; **Carril 5:** ETrP2
Carril 6: ETrP1; **Carril 7:** FchP3
Carril 8: FChP2; **Carril 9:** FChP1
Carril 10: FTrP3; **Carril 11:** FTrP2
Carril 12: FTrP1; **Carril 13:** MchP3
Carril 14: MChP2; **Carril 15:** MChP1
Carril 16: MTrP3; **Carril 17:** MTrP2
Carril 18: MTrP1; **Carril 19:** FChP3

Muestras amplificadas del 2020

Carril L: Ladder; **Carril 20:** FChP2
Carril 21: FChP1; **Carril 22:** FTrP3
Carril 23: FTrP2; **Carril 24:** FTrP1
Carril 25: MchP3; **Carril 26:** MChP2
Carril 27: MChP1; **Carril 28:** MTrP3
Carril 29: MTrP2; **Carril 30:** MTrP1;
Carril 31: AChP3; **Carril 32:** AChP2
Carril 33: AChP1; **Carril 34:** ATrP3
Carril 35: ATrP2; **Carril 36:** ATrP1;
Carril CNT: Control negativo 1
Carril CNR: Control negativo 2

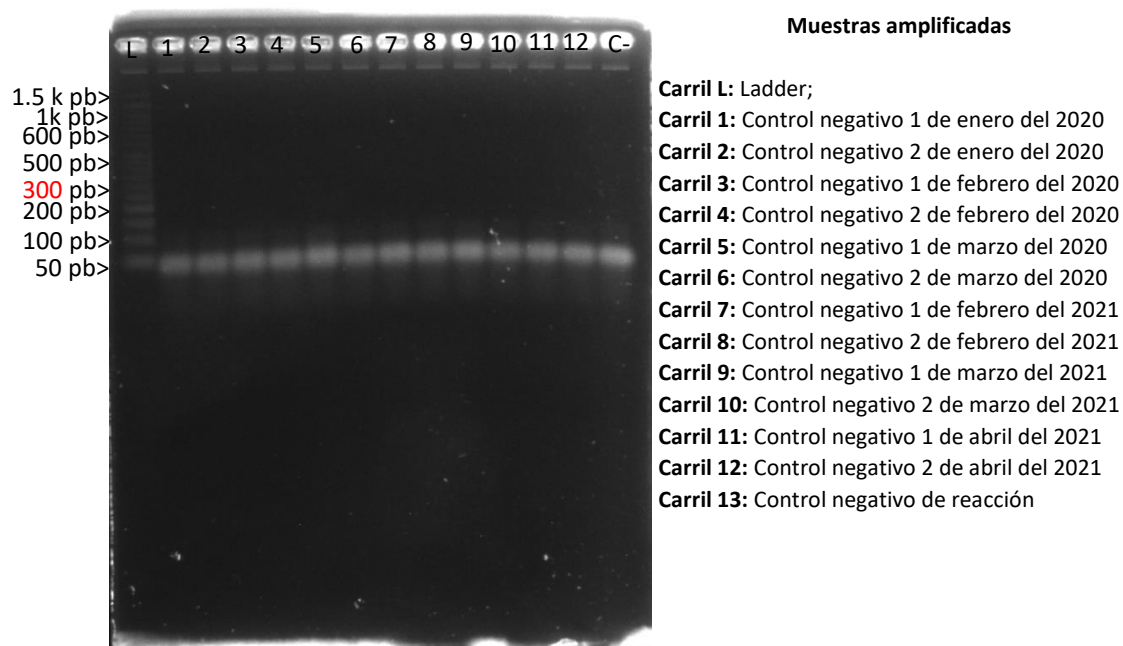


Fig. S2. Gel de agarosa 2% (m/v). **Carril L.** Marcador de peso molecular de 100 pb Ladder Biógena. **Carriles 1-12:** productos de PCR de controles negativos de transporte de los seis meses de muestreo con primers Vert 16S eDNA F1/R1 con adaptadores para ONT aprox. 300 pb. **Carril 13:** control negativo de reacción.