



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES
DEL GÉNERO POMACEA (GASTROPODA,
AMPULLARIIDAE) MEDIANTE CÓDIGO DE
BARRAS GENÉTICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

DANIEL HERNÁNDEZ CARDOSO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA
FIGUEROA
2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Hernández
Cardoso
Daniel
56 18 96 93
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Carrera
308054422

2. Datos del tutor

Dr.
Alejandro Francisco
Oceguera
Figuerola

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Edna
Naranjo
García

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Brian
Urbano
Alonso

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Jazmín Deneb
Ortigosa
Gutiérrez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
María Berenit
Mendoza
Garfias

7. Datos del trabajo escrito.

Caracterización molecular de las especies del género *Pomacea* (Gastropoda, Ampullariidae) en México, mediante código de barras genético.

56 p.
2018

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias a los fondos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IA202016 y a la Red Temática Código de Barras de la Vida CONACYT-MEXBOL.

Luis García Prieto y Alejandro Ocegüera Figueroa por el apoyo en el procesamiento de ejemplares y facilidades en el Laboratorio.

Andrea Jiménez Marín y Ofelia Delgado Hernández por su ayuda en el trabajo de Biología Molecular en el Laboratorio de Biología Molecular de Zoología (LBMZ, LaNaBio) del Instituto de Biología, UNAM.

Laura Márquez Valdelamar y Nelly López Ortiz del secuenciador.

David Iván Guadalupe Hernández Mena, Christina Lynggaard, Uriel Garduño, Nallely Ruiz Torres por la recolecta de los ejemplares.

Agradezco a la Dra. Edna Naranjo y M. en C. Brian Urbano por ser parte de mi jurado y a la Dra. Deneb Ortigosa y la M. en C.M. Berenit Mendoza por sus comentarios en la revisión de este escrito.

Agradecimientos a título personal

Índice

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
Delimitación de especies	8
Código de barras genético	11
Herramienta de Taxonomía molecular	11
Marcador Molecular	13
Debate sobre el uso de Código de Barras Genético	15
Código de barras en animales	16
Grupo de estudio	18
Generalidades del grupo	18
<i>Pomacea catemacensis</i> (Baker, 1922)	24
<i>Pomacea flagellata</i> (Say, 1827)	26
Comparación de especies	28
OBJETIVO GENERAL	29
Objetivos Particulares	29
MÉTODO	30
Localidades muestreadas	30
Obtención de ADN	32
Recolecta y fijación de tejido	32
Extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación	32
Edición y Alineamiento de Secuencias	33
Análisis de Distancias (NJ)	33
Agrupaciones de terminales por distancias (ABGD)	34
Análisis filogenético	34
RESULTADOS	35
Determinación taxonómica con herramientas moleculares	35
Análisis de Distancias (NJ)	35
Agrupaciones de terminales por distancias (ABGD)	38
Análisis filogenético	40
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIÓN	45
Literatura Citada	46

RESUMEN

Actualmente se acepta la presencia de dos taxones del género *Pomacea* en México: *Pomacea flagellata* y *Pomacea catemacensis*. La taxonomía de los pomáceos es confusa y se ha basado principalmente en caracteres conchiliológicos, sin incluir caracteres moleculares. La herramienta del código de barras genético utiliza un fragmento del gen mitocondrial de la subunidad I de la Citocromo C Oxidasa para realizar determinaciones taxonómicas y evaluar la variabilidad genética inter e intraespecífica en animales. En este trabajo se obtuvieron códigos de barras genéticos para 18 ejemplares de caracoles provenientes de los estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas. En los análisis del vecino más cercano (*Neighbor Joining*) e inferencia filogenética (Parsimonia y Máxima Verosimilitud) Se obtuvieron cinco grupos: dos incluyen individuos de Tabasco (grupos A y B), otro a ejemplares de Chiapas-Panamá (grupo C) y el último a Veracruz (grupos D y E) con una distancia genética de 3.89% a 8.47% entre los grupos. En los resultados de este estudio no se recupera a *Pomacea flagellata* como un grupo monofilético, así como se amplía la distribución de *P. catemacensis* a Laguna Escondida, Veracruz. Se utilizó el método ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) para obtener agrupaciones más sólidas y corroborar las agrupaciones realizadas por el método de distancias genéticas.

INTRODUCCIÓN

Delimitación de especies

A pesar de los más de 250 años de clasificación taxonómica y de las más de 1,2 millones de especies descritas, se estima que aproximadamente el 86% (~7,5 millones) de las especies existentes en la Tierra son aún desconocidas para la ciencia (Mora *et al.*, 2011). Algunas estimaciones sugieren que el número total de especies podría oscilar entre 3 y 100 millones (May, 2010). Con el avance en las técnicas de biología molecular y el acceso a nuevas herramientas de procesamiento de datos y análisis de los mismos, es cada vez es más factible tener mayor y mejor conocimiento sobre la riqueza biológica en su totalidad (May, 2010). Para tener un mejor conocimiento sobre la biodiversidad, un problema fundamental es el diseño de herramientas analíticas para la delimitación de especies, principalmente cuando estas pertenecen a un mismo linaje y la interpretación de los datos puede dar resultados diferentes dependiendo de la forma de análisis (Sites y Marshall, 2004).

Debido a las dificultades propias de la delimitación de especies, se requiere que el problema sea evaluado desde perspectivas múltiples y complementarias (Padial y De la Riva, 2007). La denominada “Taxonomía integrativa” busca analizar la validez de las especies, las cuales son concebidas como hipótesis e intenta delimitarlas a partir de complementar conceptos y métodos basados en diferentes tipos de caracteres, como lo son: morfológicos, moleculares, fisiológicos, etológicos, entre otros (Avice, 2000; Sites y Marshall, 2003). Buscando con esto el desarrollo de estudios en sistemática y taxonomía que se respalden en diferentes e independientes tipos de caracteres y no exclusivamente en los morfológicos, evitando que solo se delimiten morfoespecies (Padial y De la Riva, 2007). Actualmente, el uso de la Taxonomía molecular como complemento a los estudios tradicionales es práctica común, este tipo de herramienta se ha vuelto importante, aunque no exclusiva, en la delimitación de especies (Avice y Ball, 1990).

Algunos de los problemas de la taxonomía no surgen solamente de los

métodos disponibles y de los tipos de caracteres utilizados, sino también del concepto de especie utilizado, un debate nunca terminado (Padial y De la Riva, 2007). Siempre que el concepto de especie empleado reconozca y delimite el resultado del proceso de especiación, estaremos ante grupos naturales, de lo contrario, la agrupación resultante tendrá una inclusión parcial o incluirá a organismos que no pertenecen a la misma entidad evolutiva (Ward, 1998).

Aun cuando los métodos de reconocimiento y delimitación de especies estén basados en la inferencia de especiación, estos pueden resultar en la inferencia de grupos que no son un fiel reflejo de las unidades evolutivas existentes al no considerar más de una presión selectiva, como lo es el flujo génico y la deriva génica (Flores, 2007). Esto se ejemplifica en los problemas que se describen a continuación:

Homoplasias en los caracteres analizados, ya sean morfológicos, conductuales, fisiológicos, bioquímicos, o en marcadores moleculares. Esto sucede en los casos en que los estados de carácter no son provenientes de un ancestro en común (Li, 1997). Un ejemplo son las convergencias evolutivas en el fenotipo, donde los caracteres convergen en forma y función independientemente de la relación ancestro-descendiente. De igual manera, los marcadores moleculares pueden experimentar convergencias evolutivas, además de evolución paralela y reversiones a estados ancestrales (Li, 1997).

El aislamiento reproductivo entre especies no presenta límites estrictos. Pueden existir especies con flujo génico entre sí (reproducción sexual desacoplada), el cual permanece aun cuando la variación genética y el aislamiento geográfico sea grande (Taylor *et al.*, 2000). El concepto biológico de especie pierde funcionalidad al analizar poblaciones en proceso de divergencia, entre las que puede existir flujo génico que origine híbridos (Rieseberg, 1997).

Un marcador molecular puede en algunos casos no ser representativo de la filogenia de la especie. Un árbol filogenético de especies contiene árboles más pequeños que descienden dentro de sus ramas: los árboles de genes. Se espera que exista congruencia entre un árbol de especies y un árbol de genes muestreados de estas especies, pero esto no es una regla ya que la evolución de un gen puede ser diferente a la evolución de las entidades biológicas (Maddison,

1997).

El uso de un solo marcador molecular en la inferencia filogenética puede presentar problemas adicionales, si este *locus* presenta una segregación de polimorfismos ancestrales (polimorfismos interespecíficos) podría arrojar una reconstrucción filogenética incorrecta. Esta segregación hace referencia a los alelos que permanecen en la población aún después de la especiación, al delimitar los grupos podría integrar a organismos que no pertenecen a la misma entidad evolutiva (Wu, 1991; Templeton, 2001).

Los problemas a los que nos podemos enfrentar al analizar la delimitación de especies pueden variar por muchos factores, como lo son los tipos de caracteres a utilizar en el análisis, los conceptos de especie y los métodos utilizados (Flores, 2007).

Código de barras genético

Herramienta de Taxonomía molecular

Los análisis genéticos permiten la identificación de formas de vida a través del análisis de secuencias de ADN cortas y altamente variables (Kurtzman, 1994; Wilson, 1995). El análisis de secuencias de ADN puede ser muy útil en la determinación y delimitación de especies, ya que las distancias genéticas en las secuencias son más bajas entre los individuos de una especie que entre especies estrechamente relacionadas (Moore, 1995; Avise y Walker, 1999; Hebert, *et al.* 2003b). Las distancias genéticas son sistemas de medida que reflejan la similitud entre poblaciones o especies asumiendo a priori o no un supuesto evolutivo (Demarchi, 2009).

Hebert *et al.* (2003a) propusieron el "Código de barras genético" (o Barcoding en inglés) con el objetivo de generar un inventario de secuencias cortas de ADN mitocondrial en animales, buscando gestionar la riqueza de especies e identificar cualquier ejemplar. Para lograr esto, eligieron un fragmento del gen mitocondrial, el Citocromo C Oxidasa subunidad 1 (COI o COX 1) como marcador para establecer un sistema de identificación viable y accesible para investigadores no especialistas en los distintos taxones (Hebert, *et al.* 2003a). Al determinar la

factibilidad de este marcador para establecer la diversidad inter e intraespecífica en animales, Hebert *et al.* (2004), propusieron como sistema de delimitación de especies un umbral donde la variación interespecífica sea al menos 10 veces más la variación intraespecífica, nombrándolo “*barcode gap*”. En 2007, Ratnasingham y Hebert formalizan el sistema de determinación y delimitación de especies mediante código de barras con la creación de *The Barcode of Life Data System* (BOLD System), una plataforma bioinformática que ha desarrollado un sistema de adquisición, almacenamiento, análisis y publicación de datos relacionados al código de barras de ADN, estableciendo la base de datos del código de barras genético (Ratnasingham y Hebert, 2007).

El código de barras genético se concibe como complemento a la taxonomía tradicional al funcionar con cualquier concepto de especie (Rach, *et al.*, 2008), ser útil en la tarea de asignar taxonómicamente especímenes no identificados y al promover la detección y descubrimiento de especies potencialmente nuevas (Hebert, *et al.* 2003a). Además, puede arrojar luz en el descubrimiento de especies crípticas (Knowlton, 1993, Jarman y Elliott, 2000), en taxones con plasticidad fenotípica y variabilidad genética o en los casos en que no existen claves taxonómicas con base en caracteres morfológicos para ambos sexos y para los diversos estadios del ciclo de vida, entre otros problemas (Hebert, *et al.* 2003a).

La información analizada por código de barras genético resulta de gran utilidad para detectar especies potencialmente nuevas (DeSalle *et al.*, 2005), y permite la formulación de hipótesis para futuras investigaciones en el campo de la sistemática (Hebert *et al.*, 2004). Sin embargo, esta herramienta no pretende sustituir otros métodos de determinación y delimitación de especies, ni mucho menos a los análisis de sus relaciones filogenéticas. Por el contrario, busca producir una herramienta de identificación simple basada en el conocimiento taxonómico que está integrada en la biblioteca de referencia de códigos de barras de ADN (Schindel y Miller, 2005) y aplicar este conocimiento en diferentes campos, como en la biomedicina: en la determinación de patógenos (Patel *et al.*, 2008), parásitos (Ferri *et al.*, 2009) y vectores (Ruíz-López *et al.*, 2012); en estudios de conservación: al realizar inventarios rápidos de biodiversidad para

estudios de impacto ambiental (Hajibabaei *et al.*, 2011) o la identificación de plagas (Barr *et al.*, 2009).

Para llegar a conclusiones más sólidas en la determinación y delimitación de especies empleando el código de barras genético, se recomienda realizar una recolecta que cubra la distribución geográfica del taxón de interés, con al menos 10 individuos por muestra poblacional, para evaluar convenientemente la variación a nivel intraespecífico (DeSalle *et al.*, 2005). Sumado a esto, investigaciones subsecuentes deberían poner a prueba las hipótesis previamente formuladas involucrando otros tipos de caracteres ya sea morfológicos, fisiológicos o ecológicos, entre otros (Baker *et al.*, 2003; McGovern y Hellberg, 2003).

Marcador Molecular

En 2005, en la primera reunión del *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) se propuso el uso de un fragmento del gen del citocromo “C” oxidasa o “COI” de aproximadamente 648 pares de bases como el marcador molecular para dicha iniciativa (Hebert *et al.*, 2003a). Este marcador fue elegido con base en varias consideraciones, destacando las siguientes:

- Cuenta con iniciadores (primers) universales y robustos que potencialmente funcionan en la mayoría de los *phyla* animales (Folmer *et al.*, 1994).
- Son raras las inserciones-delecciones (*indels*) en la secuencia, ya que de presentarse conducirían a un cambio en el marco de lectura, lo que genera generalmente mutaciones perjudiciales y deletéreas (Hebert *et al.*, 2003a).
- Carecen de intrones y tienen exposición limitada a la recombinación por su modo haploide de herencia línea materna (Saccone *et al.*, 1999).
- Sus nucleótidos en la tercera posición muestran una alta incidencia de sustituciones (Knowlton y Weigt, 1998), lo que le proporciona una buena señal filogenética (Hebert *et al.*, 2003b), permitiendo la discriminación no sólo de las especies estrechamente relacionadas, sino también de los

grupos filogeográficos dentro de una sola especie (Cox y Hebert, 2001; Wares y Cunningham, 2001).

- Tasa de evolución molecular mayor que la de otros marcadores, siendo aproximadamente tres veces mayor que los marcadores ARNr 12S y 16S (Knowlton y Weigt, 1998).

Los estudios de código de barras de Hebert *et al.* (2003a; 2004) proponen calcular los valores de distancia genética utilizando el modelo de evolución Kimura 2-parámetros (K2P). Este modelo asume dos tipos de sustituciones: transiciones y transversiones, también asume que las frecuencias de los cuatro nucleótidos es la misma y que las tasas de sustitución no varían entre los sitios (Kimura, 1980). Para generar los filogramas con distancias genéticas entre las secuencias, Hebert *et al.* (2003a) propone utilizar el método de Neighbor-Joining (NJ) usando el modelo de K2P. Este análisis produce un único filograma, bajo el principio de evolución mínima (Saitou y Nei, 1987). Se utiliza el modelo evolutivo K2P porque es relativamente sencillo y el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) porque realiza un análisis rápido para grandes bases de datos (Labarque, 2012).

En los últimos años se han utilizado diferentes métodos para poner a prueba las agrupaciones obtenidas empleando el código de barras, estos en su conjunto se denominan métodos de descubrimiento, los cuales analizan las agrupaciones de distancia, ej. *Hard-Gap ADN barcoding* (Ortiz y Francke, 2016) y *Automatic Barcode Gap Discovery* (Puillandre *et al.*, 2012), o bien se proponen grupos con base en árboles filogenéticos (Ortiz y Francke, 2016), ej. *Generalized Mixed Yule Coalescent* (Pons *et al.*, 2006) y *Poisson Tree Process* (Zhang *et al.*, 2013). Estos métodos se han popularizado recientemente, sin embargo no deben ser considerados como la solución final a los problemas de la taxonomía sino como un complemento de esta.

El método de agrupación de terminales por métodos de distancias genéticas: Descubrimiento automático del intervalo de códigos de barras (*Automatic Barcode Gap Discovery*, ABGD) clasifica las secuencias en “especies putativas” utilizando un rango de divergencia intraespecífica previamente definida y la técnica estadística de análisis multivariado: partición recursiva. Este método

detecta un umbral entre la variación intra e interespecífica (*Barcode gap*), donde la divergencia entre organismos pertenecientes a la misma especie sea menor que la divergencia entre organismos de diferentes especies, produce agrupaciones a nivel de especie a través de la inferencia de la detección del límite y lo aplica recursivamente a los grupos previamente obtenidos para obtener particiones más finas hasta que no haya ninguna división adicional (Puillandre *et al.*, 2012).

Debate sobre el uso de Código de Barras Genético

Aunque Hebert *et al.* (2003a; 2003b) argumentan sobre las virtudes del uso de un sistema de identificación basado en el gen COI para todos los animales, se han expresado ideas contrarias. Los críticos del código de barras genético consideran incorrecto que se tomen decisiones taxonómicas con base en la evidencia aportada por el gen COI para determinar a todas las especies (Hickerson *et al.*, 2006; Moritz y Cicero, 2004; Roe y Sperling 2007; Will *et al.*, 2005). Aún cuando su uso se restrinja a animales, existen limitantes inherentes al ADN mitocondrial: su herencia uniparental vía materna, ya que sólo evidencia parte de la historia evolutiva de la especie y podría conducir a resultados erróneos (Lanteri y Confalonieri, 2003). Por lo anterior se crítica que no se analicen de manera complementaria genes nucleares, indagando fenómenos evolutivos como hibridación interespecífica (Hurst y Jiggins, 2005) y fenómenos de introgresión, lo que podría resolver complejos de especies o especies ampliamente distribuidas con gran variación intra e interpoblacional (Markmann y Tautz, 2005; Saunders, 2005).

Bajo un modelo de especiación alopátrico, en el que se presenta una área de hibridación, el uso de un sólo gen para el descubrimiento de especies, como lo hace el código de barras, puede producir resultados erróneos los cuales no expresen los últimos tiempos de divergencia, lo que podría falsear la correspondencia entre poblaciones recientemente aisladas y los linajes reproductivamente aislados (= especies) sesgando la delimitación y determinación de la riqueza de especies (Hickerson *et al.*, 2006).

También se ha discutido el utilizar en todos los animales el *barcode gap* (Hebert *et al.*, 2004), umbral basado en distancias genéticas que delimita las especies. Sus opositores consideran que el código de barras no debería perseguir el objetivo de delimitar especies a partir de cálculos generalizados, ni esperar que estos cálculos sean constantes para los diferentes grupos (Lanteri, 2007).

Por otro lado, el modelo de evolución K2P no está fundamentado para este tipo de análisis. Utilizar el método de *Neighbor Joining* en lugar de métodos basados en caracteres (Parsimonia, Máxima Verosimilitud o Inferencia Bayesiana) se considera inadecuado por no estudiar los caracteres como tal (Srivathsan y Meier, 2012).

En síntesis, la tarea científica de delimitar todas las especies requiere de un muestreo exhaustivo, análisis multilocus con genes nucleares y mitocondriales, además de información biológica detallada y posteriores análisis con otros tipos de caracteres (Monaghan *et al.*, 2005). Pese a esto, el código de barras genético ha demostrado ser útil en la identificación de especies en ciertos grupos taxonómicos, como se ha reportado en peces (Ward *et al.*, 2005), aves (Hebert *et al.*, 2003b; Kerr *et al.*, 2007), lepidópteros (Hajibabaei *et al.*, 2006) y moluscos (Cooke *et al.*, 2012; von Proschwitz *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2012). Incluso se han elaborado propuestas con diferentes marcadores moleculares para la adaptación del método a otros grupos como briofitas (Liu *et al.*, 2010), plantas vasculares (Pawlowski *et al.*, 2012), hongos (Schoch *et al.*, 2012; Pawlowski *et al.*, 2012), protistas (Kress y Erickson, 2012) y procariontes (Links *et al.*, 2012).

Código de barras en animales

Salvo algunas excepciones, la divergencia intraespecífica en animales utilizando genes mitocondriales rara vez es superior al 2% y la mayoría de las veces es inferior al 1% (Avice, 2000). Hebert *et al.* (2003b) abordan este problema examinando la divergencia del gen COI entre 13,320 especies pertenecientes a 11 *phyla*, incluido el *phylum* Mollusca. Los resultados apoyan el uso de esta herramienta para discriminar especies estrechamente relacionadas en la mayoría de los grupos, con la excepción de las especies del *phylum*

Cnidaria, cuyos miembros mostraron distancias genéticas más bajas que cualquier otro grupo, lo cual era predecible al tener tasas de evolución mitocondrial excepcionalmente baja (France y Hoover, 2002). La mayoría de las especies del mismo género analizadas mostraron distancias genéticas entre 2 y 10%, lo que asegura su fácil diagnóstico (Hebert *et al.*, 2003b).

En el caso de las especies del *phylum* Mollusca, Hebert *et al.* (2003b) reportan una distancia genética del 11% entre las 1,155 especies de moluscos analizados, con más de la mitad de las especies (67.5%) en un rango del 8-16% de distancia genética (Herbert *et al.*, 2003b).

Diversos investigadores han usado el método de código de barras en moluscos, por ejemplo, en los siguientes estudios:

- Delimitación de especies de gasterópodos del género *Pupilla* (von Proschwitz *et al.*, 2009).
- Al analizar las distancias genéticas de la subfamilia Carychiidae (Weigand *et al.*, 2014).
- Establecimiento del número de especies del complejo *Clione limacina* (Yamazaki y Kuwahara, 2016).
- En una revisión taxonómica, analizando quitones del género *Mopalia* (Kelly *et al.*, 2007), y con los pulpos de aguas poco profundas en Japón (Kaneko *et al.*, 2011).
- Identificación de especies de gasterópodos y bivalvos ornamentales en el monitoreo de la introducción de especies invasoras y en la captura excesiva de especies raras (Ng *et al.*, 2016).
- Uso del gen 16S rRNA para la identificación de especies plaga del género *Arion* (Gastropoda) (Barr *et al.*, 2009).
- En trabajos sobre la conservación del hábitat de mejillones del género *Pleurobema*, concluyendo que los morfotipos de una región representan al menos tres taxones que se creían extintas localmente (Campbell *et al.*, 2008).
- Identificación de distintos estadios de desarrollo, al analizar huevos de gasterópodos marinos, confirmando las identificaciones al emplear

marcadores mitocondriales COI, 16S y 12S (Puillandre *et al.*, 2009).

- Meyer y Paular (2005) analizaron a los miembros de la familia Cypraeidae, y encontraron que la mayoría de los individuos (96% de estos caracoles) pueden ser identificados usando el Código de Barras Genético.
- En la implementación de diferentes herramientas del Código de Barras para la resolución de clasificaciones problemáticas, Zou *et al.* (2012) emplearon el sistema de organización *CAOS-barcoding* y el *barcode gap* en caracoles del género *Nassarius*, además de datos morfológicos, y determinaron la existencia de 17 especies, cuatro de ellas crípticas, concluyendo que el empleo del Código de barras basados en caracteres (*CAOS-barcoding*) es muy útil en la identificación de especies.

Por último, con respecto a los estudios en los que se utiliza el código de barras genético en gasterópodos del género *Pomacea*, Cooke *et al.* (2012) utilizan este método en la discriminación de *Pomacea canaliculata* de sus congéneres más comunes y reportan una distancia genética intraespecífica de 0-5% e interespecífica de 10% entre *Pomacea insularum* y *P. canaliculata* y de 17% entre *P. insularum* y *Pomacea bridgesii*. Además reportan una variación intraespecífica de 0-5% para *P. insularum*, *P. canaliculata* y *P. bridgesii*.

Qianqian *et al.* (2016) utilizan distancias genéticas y agrupaciones de distancia con un locus (ABGD) para diferenciar a *P. canaliculata* y *P. maculata*, especies invasoras en China y de gran similitud morfológica. Los autores reportan una distancia genética que va de 11.6% a 12.3% entre ambas especies y confirmaron con el software ABGD estos resultados al recuperar las secuencias de *Pomacea maculata*, *P. canaliculata*, *Pomacea lineata*, *Pomacea dolioides* y *Pomacea paludosa* como grupos independientes. Además, determinaron una variación intraespecífica de 0.2-5.3% para *P. canaliculata* y *P. maculata*.

Exceptuando los estudios señalados anteriormente, no existen trabajos que evalúen la variedad genética y morfológica de las especies del género *Pomacea*

y a la fecha no se ha realizado estudios que incluyan especies mexicanas, por lo cual el presente trabajo busca compensar esta deficiencia e iniciar los estudios sobre estos organismos desde el punto de vista molecular en nuestro país.

Grupo de estudio

Generalidades del grupo

Las especies de la familia Ampullariidae, comúnmente conocidos como caracoles manzana por la forma globosa de sus conchas, presentan un par de palpos labiales en el extremo de la probosis, la cual no es invaginada (Brenes, 1988). Los integrantes de esta familia forman un componente importante en la red trófica (Vázquez-Silva, *et al.*, 2011), además son de interés en acuicultura (Coelho *et al.*, 2012), agricultura (Morrison y Hay, 2011), como bioindicadores (Prado, 2016) y de importancia médica al comportarse como control biológico natural de gasterópodos del género *Biomphalaria*, hospederos intermediarios del tremátodo *Schistosoma mansoni* (Guimarães, 1983).

Las especies de la familia incluyen a diez géneros con aproximadamente 120 especies que exhiben una distribución pantropical (Berthold, 1991). La mayoría de estas especies pertenecen a tres géneros: *Pila*, *Lanistes* y *Pomacea*. Los siete géneros restantes son uniespecíficos o contienen pocas especies (Hayes *et al.*, 2015).

Hayes *et al.* (2009) analizaron las relaciones filogenéticas de la familia Ampullariidae con base en dos marcadores mitocondriales: 16s y COI, y tres nucleares: 18S rADN, Subunidad de histona H3 y Factor de elongación 1a (EF1a) mediante los análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud, Parsimonia y Análisis Bayesiano. Sus estudios sugieren una diversificación de los taxones del Nuevo Mundo después de la separación de África y América del Sur. Además, reportan que de los cinco géneros del Nuevo Mundo *Asolene*, *Felipponea* y *Pomella* son monofiléticos, mientras que *Marisa* y *Pomacea* son polifiléticos.

El género *Pomacea* incluye a un clado denominado “flagellata” (Fig. 1) conformado por *P. flagellata* recolectado en Colombia y *P.* de Panamá, además del taxón: *P. sordida* de Brasil (Hayes *et al.*, 2009). Es importante mencionar que

este el único trabajo de sistemática para el género *Pomacea* y en este no se incluyen ejemplares de México.

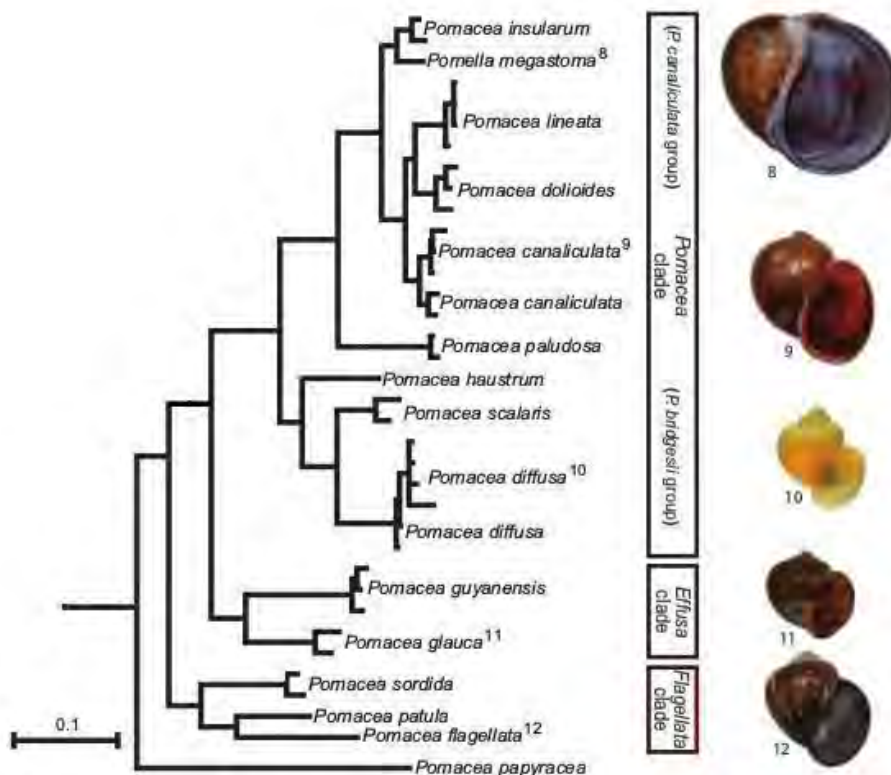


Fig. 1. Sistemática del género *Pomacea*. Modificado de Hayes *et al.*, 2009.

El género *Pomacea* incluye 96 especies que se caracterizan por presentar conchas con aberturas ovales amplias y el ombligo de la concha típicamente abierto y bien diferenciado (Vázquez-Silva, *et al.*, 2011). Este género se distribuye de manera natural en el continente americano, desde Estados Unidos hasta Argentina (Cowie y Thiengo, 2003) (Fig. 2). El género *Pomacea* ha sido reportado como exótico en África, siendo abundante hacia el centro del continente, así como en India, Sri Lanka y Tailandia (Perera y Walls, 1996).

Las diagnósis de las especies en el género *Pomacea* se basa en relativamente pocos caracteres morfológicos de la concha. Algunas especies se han descrito con base en organismos juveniles o especímenes raros (Rangel-Ruíz, 1988; Hayes *et al.*, 2015), lo que ha generado una taxonomía confusa, en la que históricamente se han propuesto diferentes criterios para delimitar especies. Los límites entre especies pueden ser poco claros en algunos casos, lo que dificulta

la identificación de las especies y ha generado una taxonomía confusa según Hayes *et al.* (2015) y Vázquez-Silva *et al.* (2011).



Fig. 2. Distribución del género *Pomacea* en gris. Tomado de Hayes *et al.*, 2015.

Actualmente, *Pomacea* se considera como el único género de la familia Ampullariidae distribuido en México. Después de diferentes tratamientos taxonómicos, actualmente se acepta la presencia de dos especies en nuestro país: *Pomacea flagellata* (Say, 1827), comúnmente llamado “tote” en Tabasco o “tango” en Chiapas (Rangel-Ruíz *et al.*, 2003). Habita desde el norte de Veracruz a la vertiente del Golfo de México, hasta la península de Yucatán, desciende por Chiapas y posiblemente Oaxaca, y continúa por Centroamérica hasta el Norte de Colombia (Naranjo-García y Meza, 2000). Y la otra especie *Pomacea catemacensis* (Baker 1922), conocido comúnmente como “teogolo”, molusco endémico del lago de Catemaco, Veracruz (Naranjo-García y García-Cubas, 1985).

La información publicada para las dos especies del género *Pomacea* de México está relacionada con su biología reproductiva (Carreón-Palau, *et al.*, 2003), estudios cariológicos (Diupotex-Chong *et al.*, 2004; Diupotex-Chong *et al.*, 2007); acuacultura (Bombeo-Tuburan *et al.*, 1995; García-Ulloa *et al.*, 2008; Santos-Soto, 1999; Iriarte-Rodríguez, y Mendoza-Carranza, 2016; Amador-del Ángel *et al.*, 2006), importancia económica (Vázquez Silva *et al.*, 2011) y en el caso particular de *P. catemacensis*, su utilización como bioindicador de toxinas producidas por cianobacterias (Berry y Lind, 2010). A la fecha no existen trabajos de sistemática para las especies mexicanas (Hayes *et al.*, 2009).

Los caracoles manzana tienen valor cultural en México ya que son aprovechados de diferentes formas, principalmente como una excelente opción alimenticia, siendo las especies de gasterópodos de mayor consumo en Veracruz y Tabasco desde la época prehispánica hasta nuestros días. Sus conchas también se emplean para la preparación de tortillas, tradición proveniente de la región de Los Tuxtlas, Veracruz (Naranjo-García, 2003). *Pomacea catemacensis* genera ingresos económicos y fuentes de trabajo al ocupar el cuarto lugar en la producción pesquera en el Lago de Catemaco, Veracruz. En contraste la pesca de *P. flagellata* se realiza para consumo a nivel familiar (Naranjo-García y García-Cubas, 1985; González-Soriano, *et al.*, 1997).

Tanto *P. catemacensis* como *P. flagellata* son especies anfibia, herbívoras, dioicas con fertilización interna y desarrollo ovíparo (Carreón-Palau, *et al.*, 2003). Sus huevos miden aproximadamente 3 mm de diámetro, tienen una cubierta calcárea y son depositados fuera del agua en racimos (Negrete-Yankelevich, 1998). Al igual que el resto de los pomáceos, presentan tres estructuras anatómicas básicas: la concha, el opérculo y la masa visceral. La primera se caracteriza por ser un caparazón calcáreo subgloboso, con una espiral que se desarrolla hacia la derecha (dextrógiro). El opérculo es una estructura dura, córnea y delgada que se presenta en la parte posterior del pie y cuya función es la protección ante cambios ambientales y defensa contra depredadores. Por último, la masa visceral contiene el complejo cabeza-pie, el aparato excretor que presenta un solo riñón de forma alargada, el aparato digestivo y el aparato reproductor (Rangel-Ruiz 1988; Rangel-Ruiz *et al.*, 2003).

Regiones biogeográficas

La distribución de los taxones mexicanos *Pomacea flagellata* y *catemacensis* se sitúa en la región Neotropical (Sclater, 1858), que comprende los trópicos americanos (Cabrera y Willink, 1973; Morrone, 2001a). La regionalización del Neotrópico que define el área de distribución de estas especies en México comprende cuatro niveles jerárquicos básicos (Fig. 3), la subregión Brasileña (Blyth, 1871), el dominio Mesoamericano (Savage, 1966), la provincia Veracruzana (Smith, 1941) con cuatro distritos y la provincia de Chiapas (Smith, 1941) con 6 distritos (Morrone, 2014).

La subregión Brasileña se ubica del centro y sur de México, América Central y noroeste de América del Sur (Morrone, 2014). El dominio Mesoamericano que abarca el sur y centro de México y gran parte de América Central: Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador y el norte de Nicaragua (Morrone, 2014).

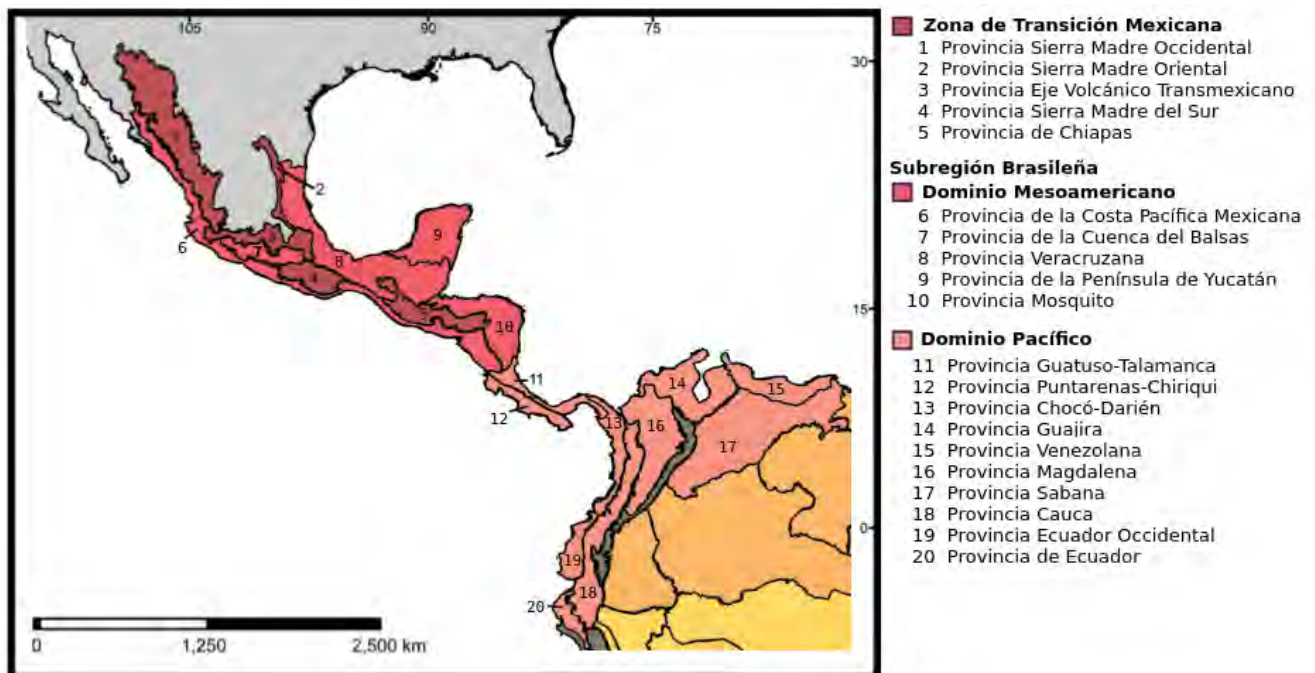


Fig. 3. Regiones Biogeográficas donde se distribuye *P. flagellata* y *catemacensis*. Modificado de Morrone, 2014.

La provincia Veracruzana comprende la costa del Golfo de México, en el este

de México (Campeche, Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz), además de Belice y el norte de Guatemala (Morrone 2001b, 2006). Las unidades anidadas identificadas y tratados como distritos dentro de esta provincia son cuatro: bosque caducifolio del norte de Veracruz, Los Tuxtlas, bosque pluvial sur de Veracruz-Tabasco y valle de Chiapas (Morrone, 2014).

La provincia de Chiapas comprende el sur de México, Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua; corresponde básicamente a la Sierra Madre de Chiapas, de 500 a 2,000 m de altitud (Morrone 2001b, 2006). Las unidades anidadas identificadas y tratados como distritos dentro de esta provincia son seis: Comitánico, Altiplano guatemalteco, Lacandoniense, Montañero nicaragüense, Sierra Madrea y Soconusco (Morrone, 2014).

Pomacea flagellata (Say, 1827) (Fig. 4)

Se distribuye desde el norte de Veracruz, a través de la vertiente del Golfo de México, hasta la península de Yucatán, desciende por Chiapas y posiblemente Oaxaca, y continúa por Centroamérica hasta el Norte de Colombia. Habita lagos, pantanos, arroyos y cenotes (Naranjo-García y García-Cubas, 1985; Rangel-Ruíz *et al.*, 2003).

Morfología: Concha globosa, altura 43-65 mm, diámetro 40-55 mm. Color pardo o pardo-verdoso. Tres a cuatro vueltas, ligeramente aplanadas en la parte superior. Sutura poco profunda. Ombligo pequeño y profundo. Vuelta del cuerpo con bandas espirales (Naranjo-García y Meza, 2000).

Concha de espiral dextrógira, las espiras cortas y la última vuelta del cuerpo está inflada o ensanchada y alargada. Ombligo poco profundo. De 25 a 30 bandas espirales pardas de diferente grosor, no constantes en todas las conchas. El eje de la abertura se encuentra a unos 16° del eje columelar de la concha. La abertura tiene aproximadamente tres cuartos de la altura de la concha y es estrecha y angulada en la parte anterior y redondeada en la parte posterior, por la continuación del borde columelar y el borde externo del peristoma, el labio externo de la abertura es simple. En algunas conchas el peristoma se encuentra

ligeramente engrosado. El opérculo es córneo, duro y delgado, concéntrico de color ámbar y más pequeño que la abertura, cóncavo del lado externo y presenta líneas marcadas de crecimiento que se extienden de un núcleo subcentral (Rangel-Ruiz, 1984).



Fig. 4. Concha de *Pomacea flagellata*: A) Vista ventral, B) Vista dorsal, C) Vista superior con el eje columelar en posición antero-posterior verticalmente; D) Vista umbilical. Barra de escala =5 cm. (Fotos tomadas de Millán-Narváez, 2012).

Antecedentes taxonómicos: *P. flagellata* fue descrita por Say (1927) con el estado de Veracruz como localidad tipo, dando una descripción muy somera y sin figuras (Rangel-Ruiz, 1988).

Pain en 1964 propone después de un análisis puramente conquiológico, la existencia de cuatro subespecies de *Pomacea flagellata*: *P. f. erogata* (Fischer y Crosse, 1890) distribuida en algunas regiones de Venezuela y Sureste de

Veracruz, *P. f. dysoni* (Hanley, 1854) distribuida en Honduras, *P. f. flagellata* (Say, 1827) distribuida desde México hasta Colombia y *P. f. livescens* (Reeve, 1856) distribuida en las regiones de Tabasco, Chiapas en México y en Lago de Peten en Guatemala, por lo que, siguiendo a este autor, habría tres presentes en México (Citado en Rangel-Ruíz, 1988).

Naranjo-García y García-Cubas (1985) analizaron ejemplares de *P. flagellata* del este y sureste del país, sin poder encontrar diferencia en rádula o en concha para justificar las cuatro subespecies propuestas por Pain (1964). Posteriormente, Rangel-Ruíz (1988) describe la anatomía interna y características de la concha de ejemplares recolectados en la región de “Los Tuxtlas”, Veracruz, México, en las localidades Laguna Escondida, El Zacatal y Laguna de Sontecomapan, sugiriendo que podría tratarse de la subespecie *P. f. flagellata*. Ambos estudios remarcan la necesidad de estudios de anatomía comparada, donde se considere anatomía interna, rádula y opérculo, al igual que análisis de biología molecular para examinar el estatus taxonómico y nomenclatural propuesto por Pain (1964).

Pomacea catemacensis (Baker, 1922) (Fig. 5)

Gasterópodo dulceacuícola endémico del Lago de Catemaco en Veracruz, México (Naranjo-García y García-Cubas, 1985).

Morfología: Concha globosa, delgada, altura 30-40 mm, diámetro 88-102 mm. Color café amarillo a verde olivo o marrón oscuro, con 25 a 40 bandas marrones en la espira. Espira muy baja. Cuatro a cinco vueltas que se expanden muy rápidamente. Ápice algo aplanado (Naranjo-García y Meza, 2000).

Antecedentes taxonómicos: *Pomacea catemacensis* se describió como una subespecie de *Ampullaria patula* Reeve 1856, descrita con base al contorno de la concha y sin establecer una localidad tipo, lo que lo hace una especie difícil de identificar y delimitar.

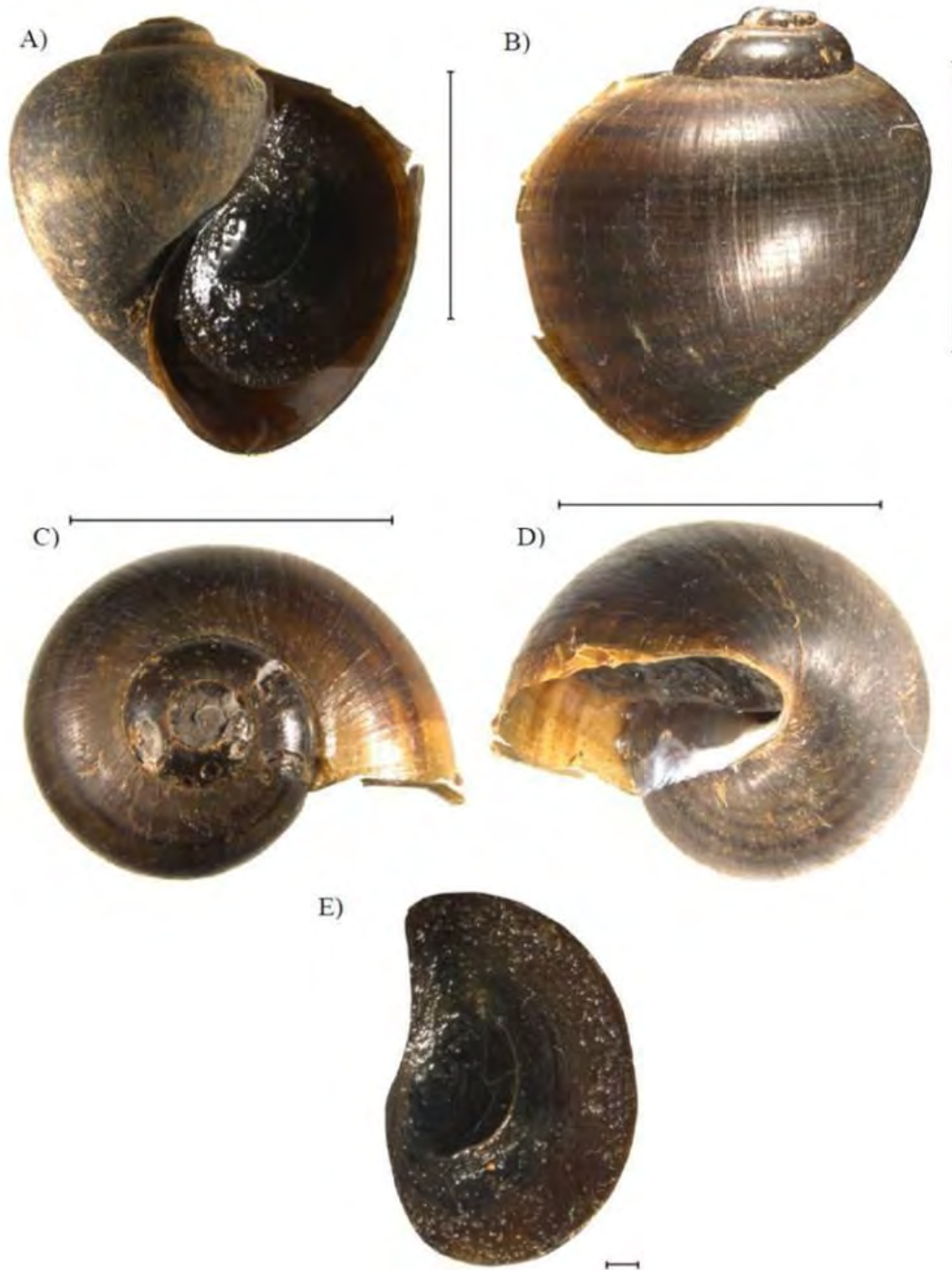


Fig. 5. Concha de *Pomacea catemacensis* (Barra de escala = 20 mm), A) Vista ventral, B) Vista dorsal, C) Vista superior con el eje columelar en posición antero-posterior verticalmente; D) Vista umbilical. E) Opérculo (Barra de escala = 3 mm). (Fotos tomadas de Millán-Narváez, 2012).

Inicialmente, Baker (1922) describe a *P. catemacensis* como subespecie (*Ampullaria patula catemacensis*) tras comparar material del Lago de Catemaco con dos conchas etiquetadas como *P. patula* (Reeve, 1856) recolectadas en México, sin especificar la localidad, y encuentra diferencias en la concha de la

subespecie en su diámetro, y en altura y diámetro de la apertura de la concha. Además, Baker (1922) realiza una comparación con la especie *Pomacea flagellata* y describe que la cúspide media del diente central de la rádula es mucho más grande y no tan puntiaguda en *P. catemacensis*. Así como presenta cúspides laterales más grandes, más definidas y con forma de espátula, mientras que las de *P. flagellata* son más cercanas a triangulares. Por último, *P. flagellata* puede o no presentar un labio externo engrosado, mientras que *P. catemacensis* lo presenta ligeramente engrosado y con el borde afilado (Baker, 1922).

Posteriormente, Thompson y Hulbert (2011) suben a categoría de especie a *P. catemacensis* al no considerar que haya una relación con *P. patula*.

Comparación de especies

Diupotex-Chong *et al.* (1994; 1997) analizaron el cariotipo de *P. flagellata* y de *P. catemacensis*, y reportan complementos haploides $n=13$ para ambas especies, mientras que para el resto de las especies del género presentan complementos haploides $n=14$ (Hayes *et al.*, 2015). En un estudio cariológico posterior, Diupotex-Chong *et al.* (2007) señalan que *P. catemacensis* presenta cromosomas significativamente más largos ($4.94 \mu\text{m}$) que cualquier población de *P. flagellata* ($4.03 \mu\text{m} \pm 0.58 \text{ SD}$). Asimismo, mediante análisis electroforético de las proteínas totales en homogenizado de pie, Diupotex-Chong *et al.* (2007) reportan a todas las poblaciones de *P. flagellata* con 17 bandas y a *P. catemacensis* con 15. Según estos autores, las muestras de *P. flagellata* no se agruparon siguiendo patrones geográficos, ni mostraron diferencias taxonómicamente útiles en los patrones electroforéticos que confirmen la discriminación subespecífica propuesta por Pain (1964).

Carreón-Palau *et al.* (2003) reportaron diferencias entre *P. catemacensis* y *P. flagellata* en el aparato reproductor masculino, *P. flagellata* presenta una vaina en el pene (Rangel-Ruíz, 1988), mientras que *P. catemacensis* presenta la vaina y un pliegue del manto en la base del mismo, sin que este pliegue tenga función de vaina, al no tener, ni rodear al canal del pene, semejante al reportado en *P. canaliculata* caracterizada por Andrews (1964).

El aparato reproductor femenino de *P. catemacensis*, presenta el ovario como una estructura alargada única que rodea a la columela en la zona interna de la glándula digestiva, por lo que difiere del ovario racimoso que se reporta para *P. flagellata* (Rangel-Ruiz, 1988), *P. canaliculata* (Lopes, 1956a; Andrews, 1964) y *P. lineata* (Lopes, 1956b).

Con respecto al aparato reproductor de *P. catemacensis*, las hembras producen la secreción de albúmina y carbonato de calcio en la glándula de la albúmina, característica en la que difiere de otras especies como *P. paludosa* y *P. canaliculata*, las cuales poseen además de la glándula de la albúmina, una glándula de la cápsula (Carreón-Palau, et al., 2003).

En este trabajo, consideramos que existen dos especies del género *Pomacea* en México: *Pomacea flagellata* y *Pomacea catemacensis* con base en lo expresado por Naranjo-García y García-Cubas (1985), Carreón-Palau et al. (2003), Diupotex-Chong et al. (2007) y Thompson y Hulbert (2011).

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la presencia de dos especies del género *Pomacea* (*Pomacea catemacensis* y *Pomacea flagellata*) en México con base en secuencias de ADN mitocondrial.

Objetivos Particulares

- Contribuir con el conocimiento general de los pomáceos de México
- Evaluar la diversidad genética de las especies del género *Pomacea* en México
- Corroborar las agrupaciones realizadas por el método de distancias genéticas mediante un método de descubrimiento (ABGD)

MÉTODO

Localidades muestreadas

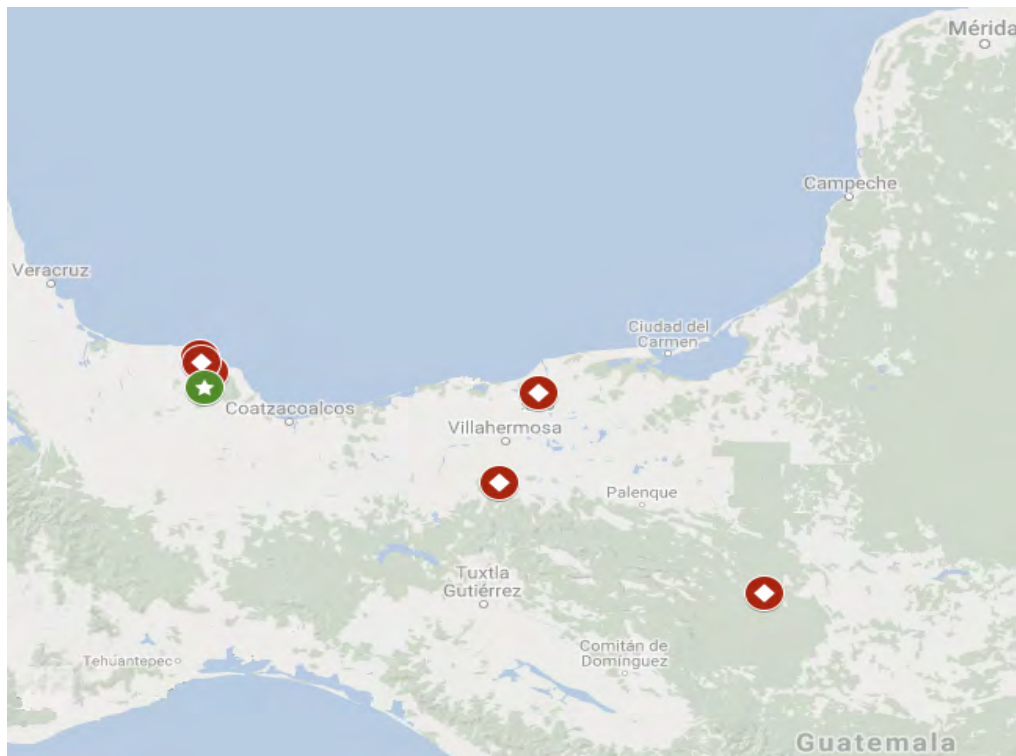


Fig. 6. Localidades muestreadas. Con rombo para *P. flagellata* y estrella para *P. catemacensis*.

Las muestras de ejemplares del género *Pomacea* analizadas en el presente trabajo se recolectaron en 7 localidades distribuidas en los Estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas (Fig. 6). Estas recolectas incluye miembros que por su distribución geográfica se asignaron a *Pomacea catemacensis* (endémico de Catemaco) y *Pomacea flagellata* (el resto del país).

Las muestras asignadas a *Pomacea catemacensis* fueron recolectadas en diciembre de 2015 en Catemaco, Veracruz. Adicionalmente, ejemplares producto de la actividad comercial fueron adquiridos diciembre de 2015 en el mercado central de la Ciudad de Catemaco.

Los individuos asignados a *Pomacea flagellata* se recolectaron en diciembre de 2015 en las localidades Sontecomapan, Montepío y Laguna Escondida en la región de los Tuxtlas del estado de Veracruz, en las localidades Laguna Llano Grande y Tabasquillo en Tabasco y en la localidad de Tres Lagunas, Chiapas.

Ejemplares representativos de cada localidad fueron empleados para la obtención de datos moleculares (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplares empleados para la obtención de datos moleculares

N.º de individuos	Especie	Estadio	Localidad	Coordenadas
2	<i>Pomacea catemacensis</i>	Adulto	Catemaco, Veracruz.	18.39943, -95.06764
1	<i>Pomacea flagellata</i>	Adulto	Sontecomapan, Ver.	18.53016, -95.02604
1	<i>P. flagellata</i>	Huevos	Montepio, Ver.	18.63555, -95.09638
5	<i>P. flagellata</i>	Huevos	Laguna Escondida, Ver.	18.52105, -95.02673
5	<i>P. flagellata</i>	Huevos	Llano Grande, Tabasco	17.68222, -93.00222
3	<i>P. flagellata</i>	Huevos	UMA, Tabasquillo, Tab.	18.36063, -92.72287
1	<i>P. flagellata</i>	Adulto	Tres Lagunas, Chiapas	16.84328, -91.14712

Obtención de ADN

Recolecta y fijación de tejido de las muestras

Los individuos recolectados, así como los huevos fueron fijados y preservados en alcohol al 96%. Parte del tejido del pie o una pequeña porción de huevos se empleó para la obtención del ácido desoxiribonucleico (ADN) total el cual se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Zoología (LBMZ, LaNaBio) del Instituto de Biología, UNAM.

Extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación

Para la obtención de ADN en los ejemplares adultos, se extrajo entre 1 y 2 mm³ de tejido muscular de la parte interna del pie. Cada fragmento de tejido se cortó en trozos pequeños para facilitar su posterior digestión y se colocaron en tubos de 1.5 MV con 180 µL de Proteinasa K y 20 µL buffer de lisis (ATL). Para las muestras de huevos, se tomo un volumen equivalente.

Se realizó la digestión del tejido y purificación de ADN siguiendo el protocolo del DNeasy Blood y Tissue Kit fabricado por QIAGEN®.

De cada muestra se amplificó un fragmento del gen mitocondrial citocromo C

oxidasa subunidad I (COI) mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers LCO1490, 5' - GGTCACAAATCATAAAGATATTGG - 3' y HCO2198, 5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA - 3' (Folmer *et al.*, 1994). La reacción de PCR para cada muestra se realizó con 0.12 µl de Taq polimerasa, 3 µl de buffer 5X, 0.2 µl de cada uno de los primers, 2 µl de ADN y se llevó a un volumen total de 15 µl con agua destilada. Los PCR se realizaron en una termocicladora de la marca Arktik™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific) usando el siguiente perfil térmico: 3 minutos a 94°C seguido de 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 45°C y 1 minuto a 72°C, con 35 ciclos adicionales de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. El producto obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% mediante la técnica de electroforesis usando el pigmento RedGel bajo luz UV, donde se confirmó la presencia de bandas con un tamaño aproximado a 600 pares de bases (pb). Las muestras se enviaron al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM para su lectura en un secuenciador de capilares.

Edición y alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron en el programa Geneious 5.1.7 (Biomatters Ltd. Auckland, New Zealand). Las secuencias consenso se usaron para realizar una determinación preliminar mediante su comparación con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Visitada el 15-ene-2017) y en BOLD Systems V3 (visitada el 15-ene-2017) con el fin de descartar secuencias producto de contaminación.

Con base en análisis previos (Hayes *et al.*, 2009), se seleccionó a *Saulea vitrea* como grupo externo al género *Pomacea* y se construyó una matriz de datos moleculares con 27 secuencias de COI de otras especies del género obtenidas de Genbank. Todas las secuencias en conjunto se alinearon con el programa MAFFT 7 (Kato y Standley, 2013) mediante la interfaz disponible en línea

(<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). La matriz final incluyó 806 caracteres alineados y 46 secuencias de las cuales 19 secuencias fueron generadas en el presente estudio (Anexo 1).

Análisis de Distancias genéticas

Se realizó un análisis de vecinos más cercanos o *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou y Nei, 1987), se calcularon las distancias genéticas pareadas con base en el modelo de sustitución de Kimura 2-parámetros (K2P) en el programa PAUP 4.0 (Swofford, 2003). La información se exportó a una hoja de cálculo para promediar las distancias genéticas por *cluster*.

Agrupaciones de terminales por distancias (ABGD)

Se utilizó el método de agrupación de terminales por métodos de distancias genéticas: ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) para confirmar los grupos obtenidos por código de barras genético. Este análisis se realizó usando como variante las distancias obtenidas bajo el modelo de evolución Kimura 2-parámetros con opciones predeterminadas (Pmin: 0,001, Pmax: 0,1, pasos: 10, Nb bins: 20). El ancho relativo de la separación (X) se evaluó a incrementos de 0,1 hasta 1 que es el valor en el que sólo se recupera un grupo (wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/, 15-feb-2017). Como los valores bajos de X producen resultados en los que se recuperan más grupos (una sobre estimación del número de grupos) se considerarán consistentes los resultados con valor de X que recuperen a las secuencias de *P. diffusa*, *P. bridgesi*, *P. maculata*, *P. insularum*, *P. doloides*, *P. caniculata*, *P. scalaris*, *P. paludosa*, y *P. haustum* como clusters respectivos.

Análisis Filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron con base en dos criterios: parsimonia y máxima verosimilitud. El análisis de parsimonia (P) se realizó con el programa TNT (Goloboff *et al.*, 2008) usando 20 réplicas con adición aleatoria de taxones y

el método de bisección y reconexión de árboles (Tree bisection-regrafting, TBR). Se obtuvieron valores de bootstrap mediante 100 pseudorréplicas de búsqueda tradicional en el mismo programa.

Los análisis filogenéticos basados en el criterio de máxima verosimilitud (MV) se obtuvieron con el programa RAxMV versión 7.2 (Stamatakis *et al.*, 2008) utilizando el modelo de sustitución GTR+GAMMA. Una topología generada al azar fue usada como árbol de inicio y se calcularon valores de soporte mediante el algoritmo de Rapid Bootstrap con 1000 pseudorréplicas (Sullivan y Joyce, 2005).

RESULTADOS

Determinación taxonómica con herramientas moleculares

Mediante las interfaces en línea de GenBank y BOLD Systems se obtuvo la determinación preliminar de las secuencias obtenidas en el presente trabajo. Los resultados obtenidos tanto con GenBank como con BOLD systems muestran a la secuencia de *P.* (Código de Gen Bank: FJ710326) de Panamá como la secuencia con mayor porcentaje de identidad con respecto a las secuencias problema. Las secuencias obtenidas en este trabajo y asignadas preliminarmente a *P. catemacensis* presentan un porcentaje de identidad de 93-94% con respecto a *P.* . De igual forma, las muestras generadas y asignadas a *P. flagellata* de las localidades de Tabasco muestran una identidad del 92% y las muestras de Veracruz muestran un 93-94% de identidad con respecto a *P.* respectivamente. Para la muestra recolectada en Chiapas la identidad con respecto a *P.* es del 99%.

Análisis de Distancias

El fenograma obtenido por el método del vecino más cercano (*Neighbor Joining, NJ*), así como las distancias genéticas obtenidas con el modelo de evolución Kimura 2P entre algunos de los grupos (*clusters*) encontrados se muestra en la Fig. 7.

Con respecto a las secuencias generadas en este estudio, todas ellas conforman un *cluster* incluyendo a *P.* de Panamá (FJ710326), la cual se encuentra más próxima a la secuencia asignada a *P. flagellata* de Chiapas, México (T70). *Pomacea flagellata* de Colombia (FJ710327) no se agrupa con ninguna de las muestras de México asignadas a esa especie y presenta una distancia genética de 16.11% con respecto a las secuencias aquí obtenidas.

El grupo conformado por las secuencias de pomáceos de México se conforma por cinco *clusters*, dos incluyen muestras de Tabasco (*cluster* A y B), otro a muestras de Chiapas-Panamá (*cluster* C) y otro a muestras del estado de Veracruz (*cluster* D y E) (Fig. 7).

La distancia entre la totalidad de las secuencias de México y la de *P.* de Panamá es de 5.93%. Al comparar las distancias genéticas entre *clusters* se encontró la mayor distancia genética es del 8.76% entre Chiapas-Panamá (*cluster* C) y el *cluster* A (Tabasquillo, Tabasco) (Tabla 2).

Tabla 2. Distancias Genéticas entre *clusters* de pomáceos en México-Panamá.

Grupo (o Cluster)	Tabasquillo, Tabasco	Llano Grande, Tabasco	Chiapas-Panamá	Catemaco-Laguna Escondida, Veracruz
Llano Grande, Tabasco	7.24%			
Chiapas-Panamá	8.76%	8.29%		
Catemaco-Laguna Escondida, Veracruz	8.32%	6.86%	6.35%	
Resto de Veracruz (Sontecomapan, Laguna Escondida y Montepío)	8.47%	8.02%	6.61%	3.89%

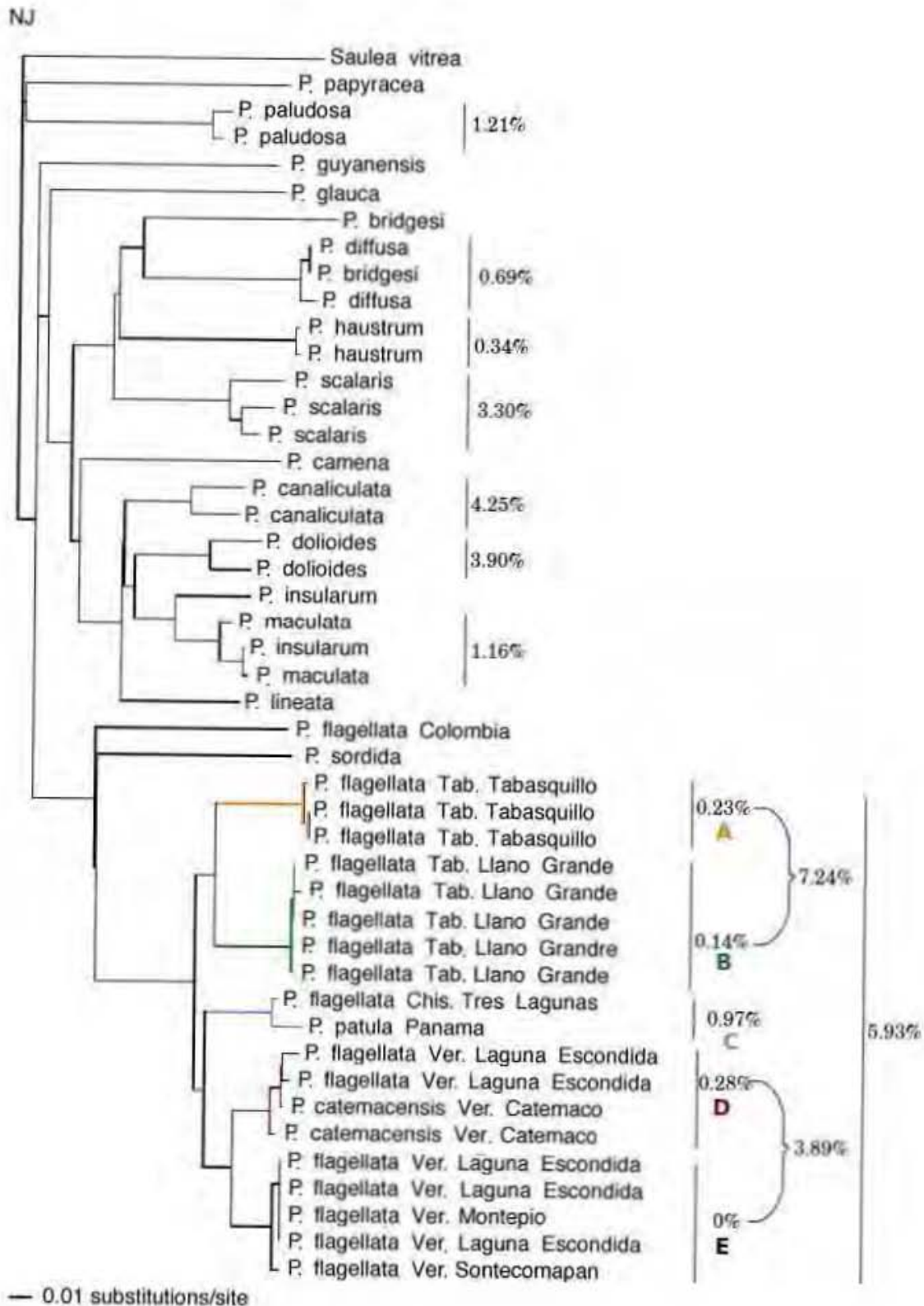


Fig. 7. Filograma obtenido por *Neighbor Joining*. A la derecha se muestran las distancias genéticas para las especies *P. catemacensis*, *P. flagellata*, *P. paludosa*, *P. diffusa*, *P. haustum*, *P. scalaris*, *P. canaliculata*, *P. dolioides* y *P. maculata*. *Cluster A*: Tabasquillo, *cluster B*: Llano Grande, *cluster C*: Panamá-Chiapas, *cluster D*: Catemaco-Laguna Escondida, Ver., *cluster E*: Lag. Escondida, Montepío y Sontecomapan.

Agrupaciones de terminales por distancias (ABGD)

Los resultados obtenidos por el software ABGD se muestran en la Fig. 8, en las columnas **a-e**. Se considera agrupación válida al resultado que recupere a las especies nominales: *P. doloides*, *P. caniculata*, *P. scalaris*, *P. paludosa*, y *P. haustum*. Se observó que *P. diffusa*, *P. bridgesi*, *P. maculata* y *P. insularum* son secuencias problemáticas, probablemente mal identificadas, así que se consideraron como dos especies: *P. diffusa-P. bridgesi* y *P. maculata-P. insularum*. Por tanto, en este estudio se trabajó con 7 especies nominales.

Para fines comparativos, se muestran los resultados de valores extremos de X en los que se sobre y subestima el número de especies en México.

Las columnas **c** y **d** que recuperan respectivamente 4 y 5 especies para México, son los resultados aceptados para ABGD al recuperar las 7 especies nominales. Las 5 agrupaciones obtenidas en la columna **d** corresponden a los grupos obtenidos por NJ e inferencia filogenética.

La columna **a** y **b** recuperan 4 de las 7 especies nominales y 6-5 especies, respectivamente, para México. Por último, la columna **e** recupera 2 especies nominales y agrupa a todas las secuencias problema como una sola especie.

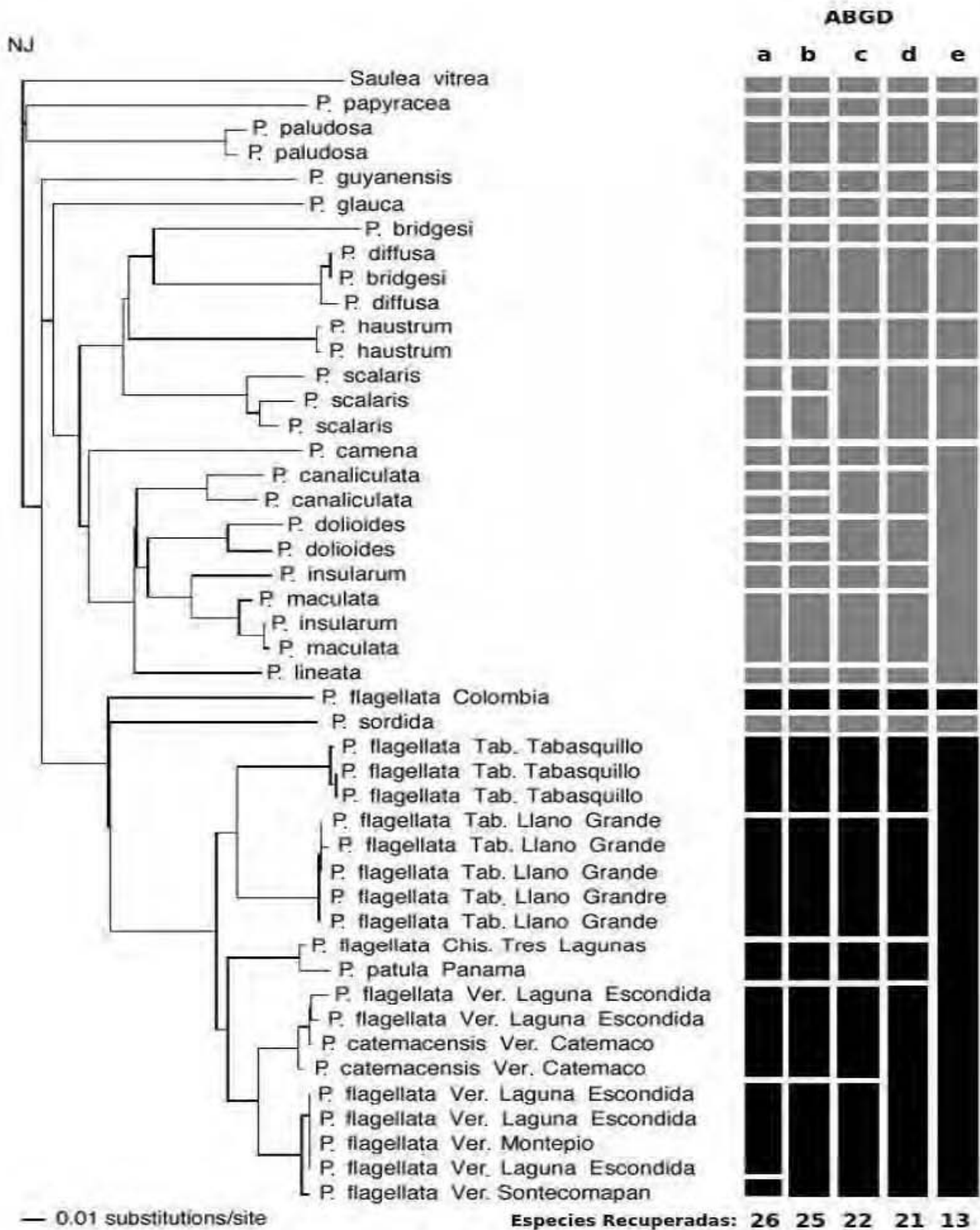


Fig. 8. Delimitación de especie por **ABGD**. Número de especies recuperadas por columna: a (26 especies), b (25 especies), c (22 especies), d (21 especies) y e (13 especies).

Análisis filogenético

El análisis de Parsimonia (P) originó 2 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 1066 pasos. En el árbol de consenso estricto (Fig. 9) se muestran los valores de soporte de ramas de bootstrap mayores a 75.

El árbol obtenido por Máxima Verosimilitud (MV) (Fig. 10) fue generado empleando el modelo de sustitución GTR+GAMMA, y el árbol óptimo tiene un log -5064.7647822.

Las hipótesis filogenéticas del género *Pomacea* obtenidas mediante los métodos de Parsimonia y Máxima Verosimilitud en general son congruentes entre sí. En los dos árboles, las muestras de México, más la muestra de *P.* de Panamá se agrupan en un clado bien soportado (bootstrap en P de 94 y MV de 91).

Ambos análisis muestran a los ejemplares de Tabasco formando un grupo, pobremente soportado en Parsimonia y con un valor de Bootstrap de 89 en MV. Esta agrupación a su vez está formada por dos clados, el clado A conformado por muestras de Tabasquillo (bootstrap en P de 100 y MV de 99) y el clado B por muestras de Llano Grande (bootstrap en P y MV de 100).

En los dos análisis el clado C está conformado por *P.* de Panamá y la muestra asignada *P. flagellata* de Chiapas (bootstrap en P de 97 y MV de 96).

Las muestras recolectadas en Veracruz forman dos clados: clado D por muestras de Catemaco y Laguna Escondida (bootstrap en P de 96 y MV de 98) y el clado E que agrupa muestras de Sontecomapan, Montepío y Laguna Escondida (bootstrap en P de 99 y MV de 99).

Las relaciones entre los clados para ambos análisis no es congruente ya que las posiciones relativas en el árbol cambian entre ambos métodos.

Parsimonia

Consenso estricto de 2 árboles (0 taxa excluidos)

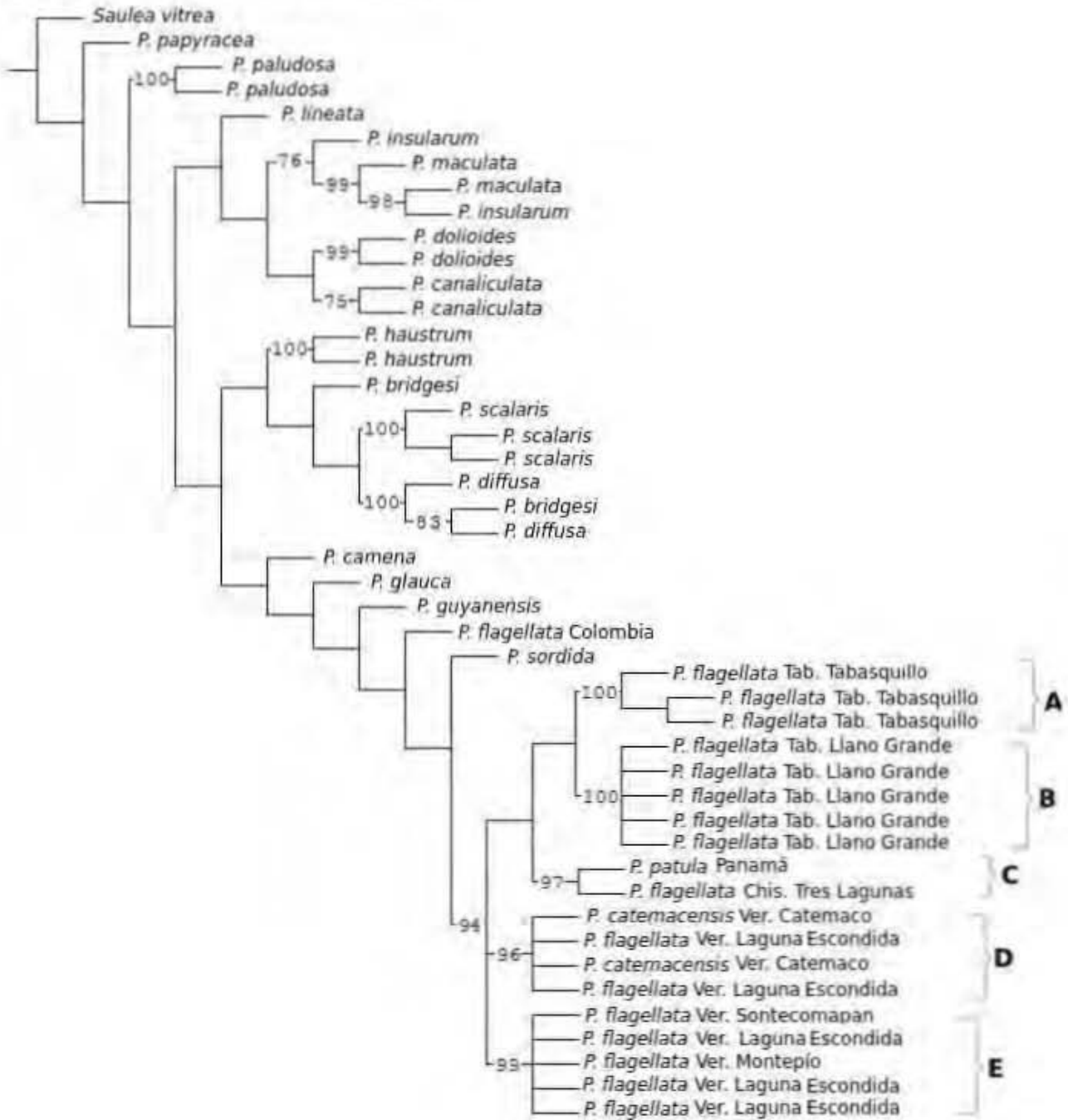


Fig. 9. Árbol consenso de los dos árboles más parsimoniosos, soporte de ramas mediante Bootstrap mayores a 75%. Clado A: Tabasquillo, clado B: Llano Grande, clado C: Panamá-Chiapas, clado D: Catemaco-Laguna Escondida, Ver., clado E: Lag. Escondida, Montepío y Sontecomapan.

Máxima Verosimilitud

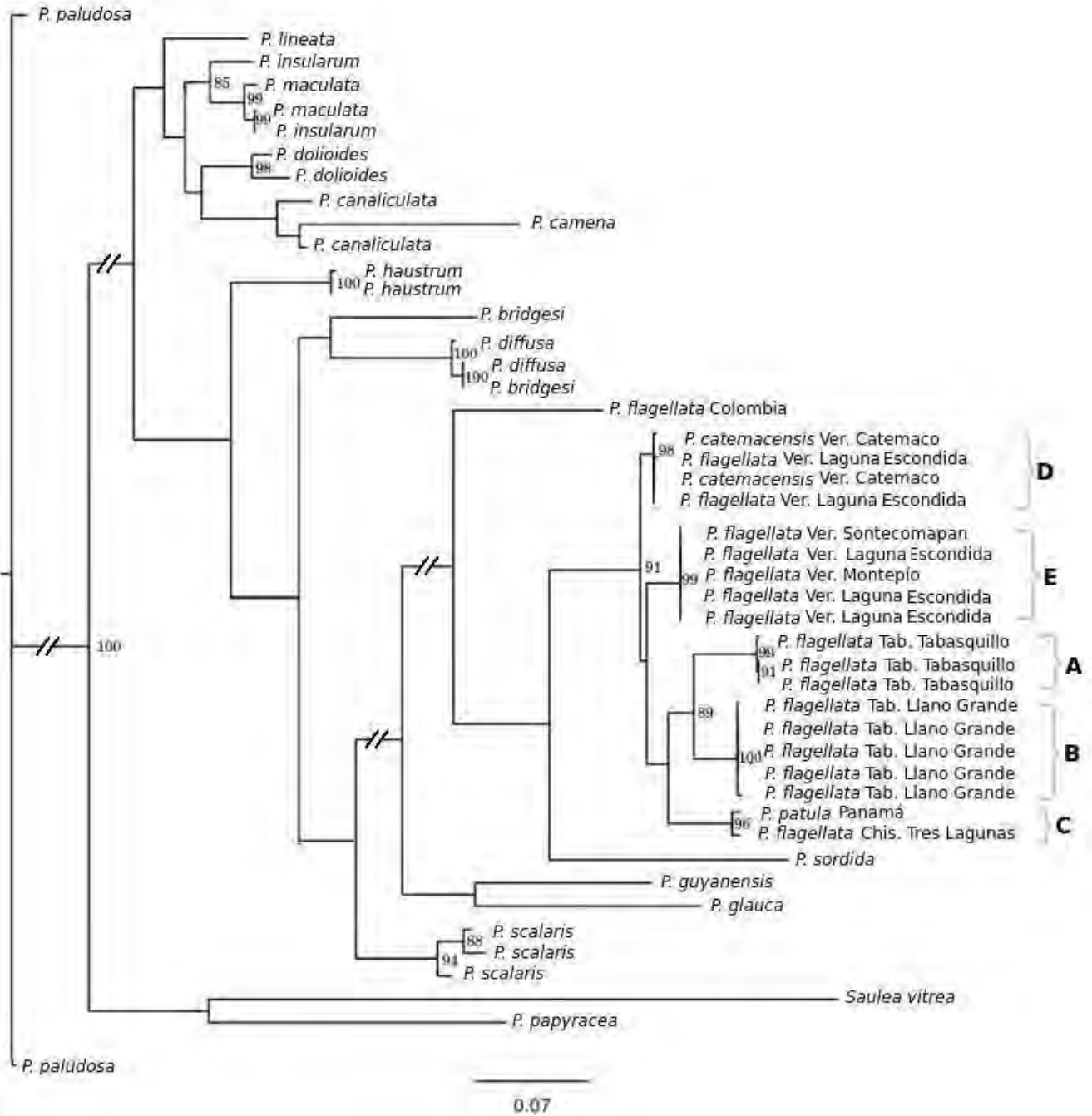


Fig. 10. Filogenia obtenida por Máxima Verosimilitud. Se señalan en los nodos únicamente aquellos con valores de *bootstrap* mayores a 75. Clado A: Tabasquillo, clado B: Llano Grande, clado C: Panamá-Chiapas, clado D: Catemaco-Laguna Escondida, Ver., clado E: Lag. Escondida, Montepío y Sontecomapan.

DISCUSIÓN

En el presente estudio los métodos utilizados para delimitar especies y los análisis de inferencia filogenética contradicen la existencia de dos especies para el género *Pomacea* en México, como se considera actualmente, sugiriendo la existencia de cinco especies en nuestro país que muestran cierta congruencia con su distribución geográfica. En ningún caso se recupera a *Pomacea flagellata* como grupo monofilético y se amplía la distribución de *P. catemacensis* a Laguna Escondida, Veracruz.

Al interior de cada uno de estos cinco *clusters* la distancia genética no supera el 1% lo que sugiere un aislamiento genético y, por tanto, reproductivo respecto a los demás grupos. Este valor se encuentra dentro de lo reportado por Qianqian *et al.*, (2016) quienes determinaron una variación intraespecífica de 0.2-5.3% para *P. canaliculata* y *P. maculata*, y lo reportado por Cooke *et al.*, (2012) del 0-5% para *P. insularum*, *P. canaliculata* y *P. bridgesii*.

Las agrupaciones A y B (Tabasquillo y Llano Grande, respectivamente) son grupos hermanos en todos los análisis con una distancia genética del 7.24%, un porcentaje alto a pesar de pertenecer a localidades geográficamente cercanas.

El grupo C está conformado por el ejemplar recolectado en Chiapas y por la secuencia correspondiente a *P. patula* de Panamá (FJ7110326). El ejemplar mexicano de este grupo, pertenece a la provincia biogeográfica de Chiapas, por lo que la Sierra Madre de Chiapas podría ser la evidencia geográfica que explique la divergencia de este linaje con respecto al resto de pomáceos en México, ya que es el único grupo que pertenece a otra entidad biogeográfica en el país (Morrone 2001b, 2006).

Por último, las muestras de Veracruz forman dos grupos (D y E) en los cuales el patrón geográfico es más complejo al presentarse en la localidad de Laguna Escondida miembros pertenecientes a los dos grupos. A pesar de que los métodos de inferencia filogenética y el análisis de distancias coinciden en la conformación de cinco grupos la relación entre ellos no está clara ya que los métodos postulan diferentes relaciones. Esto se debe a que únicamente se emplea un marcador molecular para estos análisis, por lo que se requiere

incluirse otras fuentes de información para generar una hipótesis filogenética más sólida.

Los dos ejemplares asignados a *Pomacea catemacensis* con base en su distribución geográfica aparecen en un solo grupo (grupo D), sin embargo, este no está restringido a las formas de Catemaco ya que dos muestras de Laguna Escondida se agrupan en el mismo, revelando que la distribución de este clado se amplía a la localidad de Laguna Escondida, Veracruz. Es importante notar, que a pesar de que el muestreo es reducido, en la localidad de Catemaco solo se distribuye una especie de *Pomacea*, la cual pudo haberse dispersado a Laguna Escondida, sin embargo, este patrón necesita ser investigado con la inclusión de más muestras y de otros estudios que involucren caracteres moleculares, fisiológicos y morfológicos.

Por otro lado, y tratándose de una correcta identificación taxonómica del ejemplar *P. patula* de Panamá (FJ7110326) en ninguno de los análisis es agrupada con *P. catemacensis*, lo que aporta argumentos a que nunca hubo relación entre estos taxones como lo indica Thompson y Hulbert (2011). De esta manera, los ejemplares de Tres Lagunas, Chiapas parecen ser los únicos realmente pertenecientes al grupo *P. patula*, por lo que la nomenclatura para *P. patula* requiere ser revisada.

En un esfuerzo por corroborar las agrupaciones realizadas por el método de distancias genéticas y obtener agrupaciones más sólidas, se utilizó el método ABGD al mostrar éxito en la corroboración de agrupaciones realizadas por Código de Barras en *Pomacea canaliculata* y *P. maculata* (Qianqian et al 2016). Este método utiliza matrices de distancia como datos de entrada para calcular una brecha (*gap*) entre la variación intraspecífica e interespecífica y crea grupos a partir de este valor. En este caso, se tomaron como referencia las secuencias de otras especies del género y se aceptó como válido el resultado que recuperara más especies nominales. En la Fig. 8 se observa que las columnas **c** y **d** son los resultados que recuperan las siete especies nominales utilizadas en el estudio, lo que resulta en 4 o 5 especies putativas para México, que corresponden a los *cluster* descritos en el análisis de *Neighbor Joining* e inferencia filogenética, demostrando que existe evidencia en los datos para aseverar que cada uno de

estos grupos comparte un acervo (*pool*) genético y que sus integrantes son genéticamente más similares entre ellos que con los demás grupos.

La secuencia correspondiente a *P. flagellata* de Colombia (FJ710327) no se agrupa con las muestras de México presentando una distancia genética del 16.11%, superior al umbral reportado por Hebert (2003b), por tanto, de tratarse de una correcta identificación taxonómica del ejemplar debe considerarse como una especie distinta a los pomáceos distribuidos en México.

CONCLUSIÓN

- El método *Barcode Gap* y el método ABGD sugieren la presencia de cinco especies para el género *Pomacea* en México.
- Las herramientas del código de barras, así como los métodos de inferencia filogenética empleados en este estudio amplían la distribución del taxón *Pomacea catemacensis* a Laguna Escondida, Veracruz.
- Al interior de cada uno de los cinco grupos (*clusters*) la distancia genética no supera el 1% lo que sugiere un aislamiento genético entre los *clusters*.
- El método ABGD mostró con éxito la corroboración de agrupaciones realizadas por Código de Barras en *P. flagellata* - *P. p. catemacensis*.
- Así como *P. flagellata* y *P. catemacensis* las especies *P. insularum*, *P. maculata*, *P. diffusa* y *P. bridgesii* requieren estudios más detallados de taxonomía molecular tomando en cuenta la totalidad de su distribución.
- Considerando correcta la identificación taxonómica de *P. flagellata* de Colombia (FJ710327), presenta una distancia genética del 16.11% con el resto de *P. flagellata*-*P. catemacensis* lo que indica la necesidad de analizar más ejemplares de *P. flagellata* con distribución centro y sudamericana.

Anexo 1

Especie	Código de GenBank	Localidad
<i>Saulea vitrea</i>	FJ710301	Swangeh, Sierra León
<i>P. papyracea</i>	FJ710328	Amazonas, Brasil
<i>P. paludosa</i>	KM612221	Ubicación no proporcionada
<i>P. paludosa</i>	EU528477	Ubicación no proporcionada
<i>P. guyanensis</i>	FJ710321	Pará, Brasil
<i>P. glauca</i>	FJ710323	Güigüe, Venezuela
<i>P. bridgesi</i>	EU528574	Ubicación no proporcionada
<i>P. bridgesi</i>	DQ093524	Ubicación no proporcionada
<i>P. diffusa</i>	KU318327	Ubicación no proporcionada
<i>P. diffusa</i>	EF515073	Brasil
<i>P. haustum</i>	EU528592	Florida, USA
<i>P. haustum</i>	EF515062	Florida, USA
<i>P. scalaris</i>	EU528585	Ubicación no proporcionada
<i>P. scalaris</i>	EU528577	Ubicación no proporcionada
<i>P. scalaris</i>	FJ710316	Mato Grosso, Brasil
<i>P. camena</i>	EF515059	Memo, Venezuela
<i>P. canaliculata</i>	AB433774	Ishigaki, Japón
<i>P. canaliculata</i>	AB433768	Japón
<i>P. dolioides</i>	EU528565	Ubicación no proporcionada
<i>P. dolioides</i>	FJ710312	Roraima, Brasil
<i>P. insularum</i>	FJ946819	No determinado
<i>P. insularum</i>	GU133205	Noroeste Mediterráneo, Europa
<i>P. maculata</i>	KR350499	Louisiana, USA
<i>P. maculata</i>	KX810826	Texas, USA
<i>P. lineata</i>	FJ710311	Río de Janeiro, Brasil
<i>P. sordida</i>	FJ710325	Río de Janeiro, Brasil
<i>P. patula</i>	FJ7110326	Colón, Panamá
<i>P. catemacensis</i>	No Asignado (T08)	Catemaco, Ver, México
<i>P. catemacensis</i>	NA (T20)	Catemaco, Ver, México
<i>P. flagellata</i>	FJ710327	Magdalena, Colombia

<i>P. flagellata</i>	NA (T41)	Tabasquillo, Tab, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T39)	Tabasquillo, Tab, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T40)	Tabasquillo, Tab, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T28)	Llano Grande, Tab, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T29)	Llano Grande, Tab, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T31)	Llano Grande, Tab, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T27)	Llano Grande, Tab, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T30)	Llano Grande, Tab, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T70)	Tres Lagunas, Chis, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T34)	Laguna Escondida, Ver, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T38)	Laguna Escondida, Ver, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T36)	Laguna Escondida, Ver, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T35)	Laguna Escondida, Ver, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T07)	Montepío, Ver, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T37)	Laguna Escondida, Ver, México
<i>P. flagellata</i>	NA (T02)	Sontecomapan, Ver, México

Literatura Citada

- Amador-del Ángel, L. E., Mugartegui-Esquiliano, J. A., Chin-Caña, F., Arcos-Pérez, A., y Cabrera-Rodríguez, P. (2006). Características del desove del Caracol de agua dulce *Pomacea flagellata livescens* (Reeve, 1985) en ambiente controlado. IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 916-921 p.
- Andrews, E. B. (1964). The functional anatomy and histology of the reproductive system of some pilid gastropod molluscs. *Journal of Molluscan Studies*, 36(2), 121-140.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Avise, J. C., y Ball, R. M. (1990). Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7 (7).
- Avise, J. C., y Walker, D. (1999). Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences*, 96(3), 992-995.
- Baker, H.B. (1922). The Molluscs Collected by the University of Michigan-Walker Expedition in Southern Vera Cruz, México. *IV. Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan* 106: 1-94.
- Baker, A. M., Bartlett, C., Bunn, S. E., Goudkamp, K., Sheldon, F., y Hughes, J. M. (2003). Cryptic species and morphological plasticity in long-lived bivalves (Unionoida: Hyriidae) from inland Australia. *Molecular Ecology*, 12(10), 2707-2717.
- Barr, N. B., Cook, A., Elder, P., Molongoski, J., Prasher, D., y Robinson, D. G. (2009). Application of a DNA barcode using the 16S rRNA gene to diagnose pest *Arion* species in the USA. *Journal of Molluscan Studies*, 75(2), 187-191.
- Berry, J. P., y Lind, O. (2010). First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea catemacensis*). *Toxicon*, 55(5), 930-938.
- Berthold, T. (1991). Vergleichende Anatomie, Phylogenic und Historische Biogeographie der Ampullaridae (Mollusca, Gastropoda). *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburgo*. Hamburg: P- Parey. 29: 256 p.
- Blyth, E. (1871). A suggested new division of the Earth into zoological regions. *Nature*, 3, 427-429.
- Bombeo-Tuburan, I., S. Fukumoto, y M. Rodriguez (1995). Use of the golden apple snail, cassava and maize as feeds for the tiger shrimp, *Penaeus monodon* in ponds. *Aquaculture* 131:91-100.
- Brenes, D. E. R. (1988). Estudio de la biología del caracol de agua dulce *Pomacea costaricana* (Marte, 1899), Gastropoda: Ampullariidae. (Tesis de Doctorado). Costa Rica. *Universidad de Costa Rica*. 121 p.
- Campbell, D. C., Johnson, P. D., Williams, J. D., Rindsberg, A. K., Serb, J. M., Small, K. K., y Lydeard, C. (2008). Identification of ‘extinct’ freshwater mussel species using DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 8(4), 711-724.
- Carreón-Palau, A., Uria-Galicia, E., Espinosa-Chávez, F., y Martínez-Jerónimo, F. (2003). Desarrollo morfológico e histológico del sistema reproductor de *Pomacea catemacensis* (Baker 1922) (Mollusca, Caenogastropoda:

- Ampullariidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 76(4), 665-680.
- Cabrera, A. L., y Willink, A. (1973). Biogeografía de América latina. OEA, *Serie de Biología*, Washington, D.C. Monografía 13.
- Coelho, A. R., Calado, G. J., y Dinis, M. T. (2012). Freshwater snail *Pomacea bridgesii* (Gastropoda: Ampullariidae), life history traits and aquaculture potential. *Aquaculture, Aquarium, Conservation y Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AACL Bioflux)*, 5(3).
- Cooke, G. M., King, A. G., Miller, L., y Johnson, R. N. (2012). A rapid molecular method to detect the invasive golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822). *Conservation Genetics Resources*, 4(3), 591-593.
- Cowie, R., y Thiengo, S. (2003). The apple snails of the Americas (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*), a nomenclatural and type catalog. *Malacología* 45(1), 41-100.
- Cox, A. J., y Hebert, P. D. (2001). Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10(2), 371-386.
- Demarchi, D. A. (2009). Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 11(1), 73-88.
- DeSalle, R., Egan, M. G., y Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1905-1916.
- Diupotex-Chong, M. E. (1994). Karyological analysis and "G" bands of *Pomacea flagellata* from southeast Mexico. *Western Society of Malacologists, Annual Report* 26: 5-7.
- Diupotex-Chong, M. E., Cazzaniga, N. J., Hernández-Santoyo, A., y Betancourt-Rule, J. M. (2004). Karyotype description of *Pomacea catemacensis* (Caenogastropoda, Ampullariidae), with an assessment of the taxonomic status of *Pomacea patula*. *Biocell*, 28(3), 279-285.
- Diupotex-Chong, M. E., Cazzaniga, N. J., y Uribe-Alcocer, M. (2007). Karyological and electrophoretic differences between *Pomacea flagellata* and *catemacensis*: Caenogastropoda: Ampullariidae. *Biocell*, 31(3), 365-373.
- Diupotex-Chong, M. E., Foster, N., Rubio, S.A. (1997). Some chromosomic and

- electrophoretic characteristics of the genus *Pomacea* (Gastropoda: Pilidae) from the southeastern Mexico. *Joint Meeting of the American Malacological Union and the Western Society of Malacologists*. Santa Barbara, USA. 1, 22-27.
- Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Guerrero, R., Ferté, H., Bandi, C., Martin, C. Martin y Casiraghi, M. (2009). Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology*, 6(1), 1.
- Flores, R. C. (2007). La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. En: L. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (Ed.), *Ecología Molecular de Plantas y Animales*, (pp. 325-349). CDMX, México: INE/Conabio.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294-299.
- France, S. C., y Hoover, L. L. (2002). DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia*, 471(1-3), 149-155.
- García-Ulloa, M., Gallo-García, M. D. C., Rodríguez-González, H., Gongora-Gómez, A., y Ponce-Palafox, J. T. (2008). Morphometric relationship of weight and length of cultured freshwater snail, *Pomacea* (Baker, 1922), at three different life stages. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(6), 842.
- Goloboff, P. A., Farris, J. S., y Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24(5), 774-786.
- González-Soriano, E, R. Dirzo y R.C. Vogt (1997) Historia natural de los Tuxtlas. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México-CONABIO, México. 647 pp.
- Guimarães, C. T. (1983). Biological control: *Pomacea haustum* Reeve, 1856 (Mollusca: *Pilidae*) over planorbids under laboratory conditions. *Revista de Saude Publica*, 17(2), 138-147.
- Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W., y Hebert, P. D. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 968-

971.

- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A., y Baird, D. J. (2011). Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One*, 6(4), e17497.
- Hayes, K. A., Burks, R. L., Castro-Vazquez, A., Darby, P. C., Heras, H., Martín, P. R., y Yusa, Y. (2015). Insights from an integrated view of the biology of apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacología*, 58(1-2), 245-302.
- Hayes, K. A., Cowie, R. H., y Thiengo, S. C. (2009). A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(1), 61-76.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., y Ball, S. L. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., y de Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1), S96-S99.
- Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., y Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10), e312.
- Hickerson, M. J., Meyer, C. P., y Moritz, C. (2006). DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology*, 55(5), 729-739.
- Hurst, G. D., y Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525-1534.
- Iriarte-Rodríguez, F. V., y Mendoza-Carranza, M. (2016). Validación del cultivo semi-intensivo de caracol Tote (*Pomacea flagellata*), en el trópico húmedo. *Revista AquaTIC*, (27), 16-30.
- Jarman, S. N. y Elliott, N. G. (2000). DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, "living fossils" from the Triassic.

- Journal of Evolutionary Biology* 13, 624-633.
- Kaneko, N., Kubodera, T., y Iguchis, A. (2011). Taxonomic study of shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodidae) in Japan and adjacent waters using mitochondrial genes with perspectives on *Octopus* DNA barcoding. *Malacology*, 54(1-2), 97-108.
- Katoh, K., y Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780.
- Kelly, R. P., Sarkar, I. N., Eernisse, D. J., y Desalle, R. O. B. (2007). DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). *Molecular Ecology Notes*, 7(2), 177-183.
- Kerr, K. C., Stoeckle, M. Y., Dove, C. J., Weigt, L. A., Francis, C. M., y Hebert, P. D. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 535-543.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120.
- Knowlton, N. (1993). Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 189-216.
- Knowlton, N., y Weigt, L. A. (1998). New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1412), 2257-2263.
- Kress, W. J., y Erickson, D. L. (2012). *DNA barcodes: methods and protocols* (pp. 3-8). Humana Press.
- Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, 10(13), 1727-1740.
- Labarque, F. M. (2012). *Evaluación de identificaciones taxonómicas mediante código de barras del ADN en un grupo tropical megadiverso*. (Tesis de Doctorado). Argentina, *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*.
- Lanteri, A. A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 66(3-4), 15-25.

- Lanteri, A. A., y Confalonieri, V. A. (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Llorente-Bousquets, J. y Morrone, J. J. (Ed.), *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía* (185-194 p.), México, UNAM.
- Li, W. H. (1997). Molecular Evolution. *Genetics Research*, 70(3), 267-271
- Links, M. G., Dumonceaux, T. J., Hemmingsen, S. M., y Hill, J. E. (2012). The chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables de novo assembly of metagenomic sequence data. *PloS One*, 7(11), e49755.
- Liu, Y., Yan, H. F., Cao, T., y Ge, X. J. (2010). Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). *Journal of Systematics and Evolution*, 48(1), 36-46.
- Lopes, H. D. S. (1956a). Sobre *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Mesogastropoda, Architaenioglossa, Mollusca). *Revista Brasileira de Biologia*, 15(3), 375-380.
- Lopes, H. D. S. (1956b). Sobre *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mesogastropoda, Architaenioglossa, Mollusca). *Revista Brasileira de Biologia*, 16, 375-80.
- Maddison, W. P. (1997). Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46(3), 523-536.
- Markmann, M., y Tautz, D. (2005). Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1917-1924.
- May, R. M. (2010). Tropical arthropod species, more or less?. *Science*, 329(5987), 41-42.
- Mcgovern, T. M., y Hellberg, M. E. (2003). Cryptic species, cryptic endosymbionts, and geographical variation in chemical defences in the bryozoan *Bugula neritina*. *Molecular Ecology*, 12(5), 1207-1215.
- Meyer, C. P., y Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422.
- Millán-Narváez, L. A. (2012). Patrón de distribución de los moluscos dulceacuícolas de los Tuxtlas, Veracruz. (Tesis de maestría). México, *Universidad Nacional Autónoma de México*. 125 p.
- Monaghan, M. T., Balke, M., Gregory, T. R., y Vogler, A. P. (2005). DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear

- markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1925-1933.
- Moore, W. S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 718-726.
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G., y Worm, B. (2011). How many species are there on Earth and in the ocean?. *PLoS Biology*, 9(8), e1001127.
- Moritz, C., y Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology*, 2(10), e354.
- Morrone, J. J. (2001a). A proposal concerning formal definitions of the Neotropical and Andean regions. *Biogeographica*, 77(2), 65-82.
- Morrone, J. J. (2001b). Toward a cladistic model for the Caribbean subregion: Delimitation of areas of endemism. *Caldasia*, 43-76.
- Morrone, J. J. (2006). Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Reviews Entomology*, 51, 467-494.
- Morrone, J. J. (2014). Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics*, 30(2), 202-214.
- Morrison, W. E., y Hay, M. E. (2011). Feeding and growth of native, invasive and non-invasive alien apple snails (Ampullariidae) in the United States: invasives eat more and grow more. *Biological Invasions*, 13(4), 945-955.
- Naranjo-García, E., (2003). Moluscos continentales de México: dulceacuícolas. *Revista de Biología Tropical*, 51, 495-506.
- Naranjo-García, E., y García-Cubas, A. (1985). Algunas consideraciones sobre el género *Pomacea* (Gastropoda: *Pilidae*) en México y Centro-América. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología*, 56, 603-606.
- Naranjo-García, E. y Meza, G. (2000). Moluscos En: Lanza, G., S. Hernández y J. L. Carbajal. (Ed.), Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores) (pp. 309-404), México. Plaza y Valdés.
- Negrete-Yankelevich, S. (1998). Contribuciones a la biología y ecología del caracol anfíbio *Pomacea flagellata* Say de la Reserva Ecológica El Edén. (Tesis de

- Licenciatura). México, *Universidad Nacional Autónoma de México*. 90 p.
- Ng, T. H., Tan, S. K., Wong, W. H., Meier, R., Chan, S. Y., Tan, H. H., y Yeo, D. C. (2016). Molluscs for sale: assessment of freshwater gastropods and bivalves in the ornamental pet trade. *PLoS One*, 11(8), e0161130.
- Ortiz, D., y Francke, O. F. (2016). Two DNA barcodes and morphology for multi-method species delimitation in *Bonnetina* tarantulas (Araneae: Theraphosidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101, 176-193.
- Padial, J. M., y De La Riva, I. (2007). Integrative taxonomists should use and produce DNA barcodes. *Zootaxa*, 1586(1), 67-68.
- Pain, T. (1964). The *Pomacea flagellata* complex in central America. *Journal of Conchology*, 25(6), 224-231.
- Patel, I. S., Premasiri, W. R., Moir, D. T., y Ziegler, L. D. (2008). Barcoding bacterial cells: a SERS-based methodology for pathogen identification. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39(11), 1660-1672.
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno y Holzmann, M. (2012). CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biology*, 10(11), e1001419.
- Perera, G., y Walls, J. G. (1996). Apple Snails in the Aquarium TFH Publications, Inc. *Neptune City, New Jersey*, 121.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W., y Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55(4), 595-609
- Prado, R. (2016). Determinación de Cadmio en los ríos Guayas, Daule y Babahoyo mediante el estudio de concentraciones en agua, sedimento y en el caracol manzana *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Caenogastropoda: Ampullariidae). (Tesis de Licenciatura). Ecuador, *Universidad de Guayaquil*. 125 p.
- Puillandre, N., Strong, E. E., Bouchet, P., Boisselier, M. C., Couloux, A., y Samadi, S. (2009). Identifying gastropod spawn from DNA barcodes: possible but not yet practicable. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1311-1321.

- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., y Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877.
- Qianqian, Y., SuWen, L., WeiDong, R., GuangFu, L., y XiaoPing, Y. (2016). Molecular identification of invasive golden apple snails in Zhejiang Province based on DNA barcoding. *Biodiversity Science*, 24(3), 341-350.
- Rach, J., DeSalle, R., Sarkar, I. N., Schierwater, B., y Hadrys, H. (2008). Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1632), 237-247.
- Rangel-Ruíz, L. J. (1984). Estudio taxonómico de algunos gasterópodos dulceacuícolas de la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México. (Tesis de Licenciatura). México, *Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México*. 69 p.
- Rangel-Ruíz, L. J. (1988). Estudio morfológico de *Pomacea flagellata* (Say, 1827) (Gastropoda: Ampullariidae) y algunas consideraciones sobre su taxonomía y distribución geográfica en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología*, 58(1), 21-34.
- Rangel-Ruíz, L. J., Gamboa-Aguilar, J., y Medina, R. U. (2003). *Pomacea flagellata* (Say, 1827) un gigante desconocido en México. *Revista de divulgación Kusulkab'*, IX, 5-9.
- Ratnasingham, S., y Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364.
- Reeve, L. A. (1856). Monograph of the genus *Ampullaria*. *Conchologia Iconica: or, Illustrations of the Shells of Molluscos Animals*, 10, 1-31.
- Rieseberg, L. H. (1997). Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28(1), 359-389.
- Roe, A. D., y Sperling, F. A. (2007). Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome C oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), 325-345.
- Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R. C., Conn, J. E., McKeon, S. N., Levin, D. M., Quiñones, M. L., y Linton, Y. M. (2012). DNA barcoding reveals both known and novel taxa

- in the Albitarsis Group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites y vectors*, 5(1), 44.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., y Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195-209.
- Saitou, N., y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Santos-Soto, A. (1999). Efectos de la temperatura y la intensidad luminosa sobre la producción intensiva de crías de caracol tegogolo *Pomacea* (Baker, 1922) (Tesis de Doctorado), México, *Universidad de Colima*. 132 p.
- Saunders, G. W. (2005). Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1879-1888.
- Savage, J. M. (1966). The origins and history of the Central American herpetofauna. *Copeia*, 719-766.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., y Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Schindel, D. E., y Miller, S. E. (2005). DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435(7038), 16-17.
- Sclater, P. L. (1858). On the general geographical distribution of the members of the class Aves. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2(7), 130-136.
- Sites, J. W., y Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology y Evolution*, 18(9), 462-470.
- Sites Jr, J. W., y Marshall, J. C. (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 35, 199-227.
- Smith, H. M. (1941). Las provincias bióticas de México, según la distribución geográfica de las lagartijas del género *Sceloporus*. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 2(1), 103-110.

- Srivathsan, A., y Meier, R. (2012). On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28(2), 190-194.
- Stamatakis, A., Hoover, P., y Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxMV web servers. *Systematic Biology*, 57(5), 758-771.
- Sullivan, J., y Joyce, P. (2005). Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 36, 445-466.
- Swofford, D. L. (2003). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0 b10.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., y Fisher, M. C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31(1), 21-32.
- Templeton, A. R. (2001). Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10(3), 779-791.
- Thompson, F. G. y Hulbert, R. C. (2011). An annotated checklist and bibliography of the land freshwater snails of Mexico and Central America. *University of Florida*. 903 p.
- Vázquez-Silva, G., Castro-Barrera, T., Castro-Mejía, J., y Mendoza-Martínez, G. D. (2011). Los caracoles del género *Pomacea* (Perry, 1810) y su importancia ecológica y socioeconómica. *Contactos*, 81, 28-33.
- von Proschwitz, T., Schander, C., Jueg, U., y Thorkildsen, S. (2009). Morphology, ecology and DNA-barcoding distinguish *Pupilla pratensis* (Clessin, 1871) from *Pupilla muscorum* (Linnaeus, 1758) (Pulmonata: Pupillidae). *Journal of Molluscan Studies*, eyp038.
- Ward, D. M. (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 1(3), 271-277.
- Ward, R. D., Zemvak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., y Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- Wares, J. P., y Cunningham, C. W. (2001). Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 55(12), 2455-2469.
- Weigand, A. M., Jochum, A., y Klussmann-Kolb, A. (2014). DNA barcoding cleans

- house through the *Carychiidae* (Eupulmonata, Ellobioidea). *American Malacological Bulletin*, 32(2), 236-245.
- Will, K. W., Mishler, B. D., y Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 844-851.
- Wilson, K. H. (1995). Molecular biology as a tool for taxonomy. *Clinical Infectious Diseases*, 20(2), 117-121.
- Wu, C. I. (1991). Inferences of species phylogeny in relation to segregation of ancient polymorphisms. *Genetics*, 127(2), 429-435.
- Yamazaki, T., y Kuwahara, T. (2016). A new species of *Clione* distinguished from sympatric *C. limacina* (Gastropoda: Gymnosomata) in the southern Okhotsk Sea, Japan, with remarks on the taxonomy of the genus. *Journal of Molluscan Studies*. 83(1), 19-26.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., y Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.
- Zou, S., Li, Q., y Kong, L. (2012). Monophyly, distance and character-based multigene barcoding reveal extraordinary cryptic diversity in *Nassarius*: a complex and dangerous community. *PloS One*, 7(10), e47276.