



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**ANÁLISIS DEL IMPACTO DEL USO DE
HERRAMIENTAS MOLECULARES EN LA
DELIMITACIÓN DE ESPECIES.**

T E S I N A

Para obtener el título de:

B I Ó L O G O

Que presenta:

Omar Alfonso Sosa Pérez

Dr. Elías Piedra Ibarra

Director de tesina

Los Reyes Iztacala, Estado de México. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

Quiero agradecer a cada una de las personas que han formado parte de mi camino. Sin alguno de ustedes no solo no habría logrado nada, sino que estaría perdido.

A Dios. Gracias por todo, siempre he sabido que estás ahí.

A mi padre Alfonso Apolinar Sosa Sampedreño. Gracias por sostenerme en cada uno de los pasos que he dado, ayudarme de manera incondicional y siempre enseñarme a convertirme en un excelente hombre como lo eres tú, nunca acabare de aprender de ti y de agradecer todo lo que haces por mí.

A mi madre, Ma. Teresita Perez Páramo Paramo. Muchas gracias por ser siempre la madre amorosa y comprensiva que siempre necesité. Sin tu ayuda, consejos y apoyo esto no habría sido posible. Gracias por escucharme siempre, muchas veces eso es todo lo que me hace falta.

A mi hermano Marco Antonio Sosa Perez. Gracias por ser mi cómplice, mi amigo y consejero en la vida. Por soportarme siempre y acompañarme en cada paso que doy. Sin ti estoy seguro que no sería lo que soy ahora.

A mis mejores amigas de la carrera y la vida (equipo tlacuache): Fernanda Antares, Janik, Elizabeth & Rubí. Muchas gracias por las grandes vivencias que tuvimos juntos. Gracias por todos los ánimos que me dieron, por todas las veces que no me dejaron darme por vencido y por mostrarme una de las partes más bonitas de la vida, la amistad. Por favor permítanme ese privilegio muchos años más.

A mi mejor amigo Daniel Mendiola Martínez, gracias por tu paciencia para siempre escuchar y aconsejarme cada vez que entro en pánico. Por brindarme una de las amistades más longevas y valiosas que tengo. Gracias, soy afortunado de tener un amigo como tú.

A Alejandra González Hernández. Gracias por creer en mí siempre, tu amor es una gran motivación y una de las cosas más valiosas que tengo. Gracias por iluminar mi vida desde que estas en ella, quédate conmigo siempre. Te amo.

Al Dr. Elías Piedra. Muchas gracias por darme las mejores clases que jamás había tomado y recordarme la pasión que tengo por la biología, por la ayuda, los consejos, la sabiduría y la paciencia recibida para que este trabajo llegara a buen puerto y que hasta el último día me proporciono.

A mis profesores que ejercieron como mi comité sinodal. Muchas gracias por su esfuerzo, tiempo y paciencia al revisar mi trabajo. Sin duda han sido fundamentales en este proceso. Les estaré agradecido siempre.

A todos ustedes gracias les estaré agradecido infinita y eternamente.

Índice

Índice	3
Resumen.....	4
Introducción	5
Hipótesis.....	10
Objetivo general.....	11
Objetivos particulares	11
Métodos de trabajo.....	12
Capítulo I. Las herramientas moleculares como recurso para la identificación biológica	12
Capitulo II. Trabajos en invertebrados y como abordaron los cambios taxonómicos	19
Capitulo III. Trabajos con vertebrados: el impacto del uso de las nuevas técnicas.	23
Capitulo IV. Inconvenientes encontrados durante el uso de herramientas moleculares.....	27
Capitulo V. Las nuevas propuestas.....	28
Discusión y conclusiones	30
Referencias bibliográficas.	33
Bibliografía	39

Resumen

Delimitar una especie siempre ha representado una tarea problemática para la biología, la especie, a pesar de ser la unidad fundamental en la conformación taxonómica, no es fácil de definir. La tarea enfrenta una serie de problemas que inician con que los criterios morfológicos, a menudo usados para delimitarlas, no son muy precisos.

Con la propuesta de incluir información genética se vislumbraba una resolución del conflicto en la delimitación de muchos grupos y una posible definición del concepto. Especialmente cuando los trabajos con *barcoding* y *metabarcoding* probaron su efectividad para resolver conflictos en algunos grupos como el reconocimiento de especies nuevas, de complejos de especies crípticas, la ampliación de la zona de distribución de una especie, entre muchos otros.

Sin embargo, en diversos grupos biológicos surgieron conflictos, derivados principalmente de la utilización de una sola fuente de información: la información genética derivada del mtDNA.

En años recientes, se ha propuesto la utilización de varios tipos de información para resolver los problemas en la delimitación de las especies (la taxonomía integrativa), este nuevo acercamiento pretende incluir de manera holística, información de carácter molecular, datos morfológicos, morfométricos y ecológicos. De esta manera se pretende que los resultados sean más robustos y, por tanto, más confiables, así estaríamos más cerca de resolver el problema lo que repercutiría tanto en el manejo como en la conservación de las especies.

Introducción

La especie, además de representar el nivel de integración básico en la naturaleza y de proveer las bases para la descripción de los procesos que operan en ella (p. ej. Competencia, adaptación y especiación), es una herramienta para caracterizar la diversidad orgánica y la unidad básica de las clasificaciones taxonómicas (Coyne & Orr, 2004). Por tanto, es importante aplicar al concepto de especie (y su delimitación), lo mejor de nuestro conocimiento actual (Sites & Marshall 2004). Dado que el descubrimiento y la descripción de especies sigue siendo una prioridad fundamental en la investigación taxonómica se requiere de una reflexión crítica de la práctica actual (Yeates *et al.*, 2011). Tradicionalmente, la diagnosis de especies se basaba principalmente en la descripción y comparación de caracteres morfológicos, sin embargo, con el avance de la tecnología, el acceso a los genomas y su caracterización, los criterios en la determinación de especies se han diversificado (Zachos, 2016). De manera que actualmente en la clasificación y categorización taxonómica de las especies, se consideran atributos morfológicos, genéticos, de comportamiento y ecológicos como fuentes de información prioritarios (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005; De Queiroz 2007; Yeates *et al.*, 2011).

El concepto biológico de especie, muy útil para delimitar especies simpátricas y sincrónicas, considera que las especies son grupos de poblaciones naturales, reales o potencialmente entrecruzables que se aíslan reproductivamente de otros grupos similares (Dobzhansky, 1935; Mayr, 1957; Mayr 1970). Sin embargo, la consideración de estos atributos, presenta varios inconvenientes serios. Por ejemplo, no es aplicable a organismos que presentan reproducción asexual y difícilmente en aquellos que alternan tipos de reproducción durante su ciclo de vida. Debido a este y otros inconvenientes, en diferentes disciplinas biológicas se ha tenido la necesidad de utilizar otros criterios para establecer los límites entre las especies e incluso se han creado conceptos de especie particulares. Derivado de esta problemática tenemos que actualmente no existe un concepto de especie aplicable en todas las disciplinas biológicas, generando así confusión al momento de definir los límites.

Un ejemplo de esta problemática lo encontramos con el concepto sucesional de especie, usado en paleontología, donde la imposibilidad de aplicar el concepto biológico conduce a la necesidad de solo tomar en cuenta los estadios anagenéticos arbitrarios de un tipo morfológico (Wilkins, 2006) y no se considera el aislamiento reproductivo debido a la obvia imposibilidad de demostrarlo.

Desde que se propuso el uso de la información genética para evidenciar el proceso de divergencia entre poblaciones y como herramienta útil en las clasificaciones taxonómicas, la creciente capacidad de secuenciar biomoléculas ha repercutido en el reconocimiento de las entidades taxonómicas dado que es una manera relativamente fácil y sencilla, así rápidamente se ha constituido en una herramienta fundamental (Tautz *et al.*, 2003). A partir de la década de 1960, la información aportada por distintas técnicas moleculares ha sido empleada en la sistemática; la separación por electroforesis y la secuenciación de proteínas, constituyeron las primeras estrategias. Una de las primeras proteínas analizadas en los estudios de sistemática molecular es el citocromo C, una proteína de la cadena transportadora de electrones. La comparación de la secuencia de aminoácidos de esta molécula proveniente de varios organismos, permitió determinar el número de residuos variables en un par de secuencias y construir hipótesis sobre las relaciones filogenéticas de las especies considerando que cuanto mayor es el número de aminoácidos distintos, mayor debe ser el tiempo de divergencia a partir del ancestro común. A partir de entonces se han desarrollado una gran cantidad de herramientas que prometen ser parte de la solución en cuanto a los criterios para delimitar a las especies, se ha propuesto, por ejemplo, usar el material genético mitocondrial dado que muestra diferencias entre organismos estrechamente relacionados, además que permite la elaboración de propuestas filogenéticas con organismos pertenecientes a niveles taxonómicos superiores (Bromham & Penny, 2003).

El DNA contenido en las mitocondrias (mtDNA), presenta un modo materno de transmisión (herencia materna), una alta tasa de mutación y nula recombinación. Estas características permiten hacer propuestas en torno a las relaciones dentro de una especie y entre distintas entidades valorando sus pautas de cambio. Los

polimorfismos del mtDNA se han utilizado ampliamente en análisis filogenéticos y de diversidad genética, inclusive algunos marcadores de mtDNA han sido útiles para la detección de hibridación entre especies o subespecies (Nijman *et al.*, 2003).

Así, el genoma mitocondrial, o más específicamente algunos marcadores contenidos en él, se han constituido en los últimos veinte años, en una de las herramientas más utilizadas en trabajos relacionados con la reconstrucción filogenética o en la delimitación de especies. Particularmente, en el proyecto denominado *barcoding* (o código de barras), se buscaron regiones de DNA presentes en todas las especies y que tuvieran una secuencia de nucleótidos única para cada especie. Así analizando secuencias de varios organismos se estableció la región del DNA (marcador) útil en la determinación taxonómica. Determinando la secuencia de esos marcadores y comparándolos con los depositados en las bases de datos especializadas, es posible asignar la identidad específica a un organismo cuando la secuencia de ese marcador presenta similitud entre 97-100% (el límite varía entre grupos de organismos). Se han identificado diversos marcadores moleculares para diferenciar otros taxones; es decir, hay marcadores moleculares útiles para el nivel de especie o cepa, mientras que otros son útiles para otro grupo taxonómico (género, familia, orden, clase, filo o reino). De esta manera se propuso utilizar la secuencia de los genes que codifican la citocromo oxidasa I (COI I) en animales, el espaciador transcrito interno (ITS) (Fajarningsih, 2016), en hongos y la maturasa K (MATK) y ribulosa bifosfato carboxilasa oxidasa de cadena larga (rclb) en plantas (Heckenhauer *et al.*, 2016; Hollingsworth *et al.*, 2009; Hollingsworth *et al.*, 2011). La comparación de las secuencias (alineamientos), permite determinar los porcentajes de variación dentro o entre poblaciones, entre especies u otros grupos y así determinar índices de divergencia o de diversidad como el número de linajes maternos sin depender de caracteres morfológicos (Hebert, 2003; Zachos, 2016).

A partir de los trabajos pioneros, se han desarrollado alternativas para el tratamiento de los datos moleculares que pretenden lograr de una manera más fiable la delimitación de las especies. El método llamado PTP (poisson tree processes) es

un modelo que construye y analiza un árbol filogenético enraizado para delimitar los grupos monofiléticos con base en las sustituciones aportadas por los datos de un único locus (16S, 18S o ITS), mientras que el método conocido como GMYC (generalized mixed yule-coalescent) también considera datos derivados de un locus pero utiliza un árbol filogenético ultramérico y otros como el ABGD (*automatic barcode gap discovery*) que utilizan los gaps en los códigos de barras para la delimitación de especies. Esto permite eliminar los sesgos que se tienen al delimitar especies, ya que la construcción y manejo de datos no estaría dada de manera arbitraria sino delimitada por la sensibilidad de los métodos. (Fujizawa *et al*, 2013; Puillandre *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2013).

Las aplicaciones de estas herramientas en investigación han sido innumerables, Hebert y su equipo en el 2003 destacaron las ventajas de este sistema y sugirieron desarrollar un proyecto llamado sistema global de bioidentificación (SGB), el que en su opinión, ayudaría a rebasar los problemas impuestos por la identificación de especies con caracteres morfológicos, sin la necesidad de una inversión tan grande como la de proyectos como el del genoma humano.

Actualmente se desarrollan muchos proyectos que usan herramientas moleculares, por ejemplo, el *barcoding* es una herramienta utilizada ampliamente en la delimitación de especies, inclusive se ha implementado una plataforma de acceso gratuito llamada Barcode of Life Data Systems (BOLD) que consiste en una base de datos encargada del almacenamiento, análisis y publicación de registros de códigos de barras de DNA (Ratnasingham & Hebert, 2007). Estos recursos son ampliamente utilizados en trabajos de taxonomía molecular, sistemática y ecología evolutiva, debido a que han ayudado a solventar los problemas impuestos por fenómenos biológicos tales como la plasticidad fenotípica, la especiación críptica, la cuantificación de la variabilidad y divergencia genética (entre otros).

Los trabajos dedicados a estas áreas de la investigación biológica se han beneficiado de otras tecnologías desarrolladas más recientemente, entre las más destacadas están las técnicas de secuenciación de alto rendimiento o HTS, las cuales reducen costos, facilitan la labor de los profesionales que las implementan y,

lo que es más importante, permiten el estudio en gran escala de la diversidad e interacciones biológicas, lo que en el pasado reciente era complicado (Kennedy *et al.*, 2020).

Otra herramienta fundamental basada en el análisis molecular, es el llamado *metabarcoding* con DNA ambiental (eDNA). Consiste en la obtención de material genético procedente de una muestra de células, tejidos, gametos o desechos de organismos de una muestra ambiental (suelo, agua, aire o nieve) (Taberlet *et al.*, 2012) con el cual por medio de PCR se amplifican ciertos marcadores usando primers o cebadores universales, y produciendo un conjunto de secuencias que analizadas en plataformas de alto rendimiento nos ayudan a identificar a un grupo de taxones de manera simultánea. Esta estrategia permite caracterizar la diversidad de especies con alta eficiencia, además evidencia especies poco abundantes, esquivas y/o en peligro de extinción (Bohmann *et al.*, 2014 Valentini *et al.*, 2009).

El *metabarcoding*, aunque no es utilizada directamente en la delimitación de las especies, ofrece grandes avances, debido a que proporciona datos para cuantificar la diversidad alfa, beta y la abundancia sin necesidad de otros indicadores biológicos que pueden ser manipulables o no son tan robustos, además, su uso en el biomonitorio de especies es ventajoso, ya que posibilita la detección de especies crípticas, en algún estadio difícil de identificar o simplemente de usar la información genética de un ejemplar dañado que no sea posible identificar morfológicamente (Gibson *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2013). En la práctica, una de las aplicaciones de este método ha sido la identificación de las especies que constituyen la dieta de un organismo (contenido estomacal), y es especialmente útil cuando se trata de dietas que son muy diversas o están muy degradadas, de manera que ha sido efectivo para establecer sus relaciones tróficas de una variedad de organismos (Pompanon *et al.*, 2011). Esta técnica perfeccionada, en la opinión de algunos como Deiner y colaboradores (2017), está en camino de convertirse en la técnica estándar con la que los futuros profesionistas complementarían los métodos tradicionales y de esta manera se acelerará nuestro entendimiento de la biodiversidad del planeta.

Finalmente, los protocolos basados en el uso de información derivada de análisis molecular han sido útiles para resolver uno de los problemas que más preocupaba a los taxónomos: el de las especies crípticas, es decir, especies que son consideradas como una debido a caracteres morfológicos similares. En las que la semejanza morfológica puede ser aparente o real, es decir, deberse a que la información utilizada en dichas determinaciones proviene de fuentes sensoriales con errores de percepción, o bien, debida a que las condiciones ambientales han impuesto presiones de selección que han estabilizado la morfología, o porque el modo de discriminación de organismos coespecíficos consiste en feromonas o llamadas de apareamiento no visuales (Bickford *et al.*, 2007). Cualquiera que sea la razón, las especies crípticas mantienen encubiertos o atenuados los indicadores de diversidad de especies y han sido encontradas en muchos grupos biológicos (Pfeninger & Schwenk, 2007).

Así, las herramientas desarrolladas para el estudio de las interacciones biológicas en el nivel molecular se han constituido como protocolos fundamentales también para la delimitación de especies y han repercutido de manera importante en las estimaciones de biodiversidad. Por lo que este trabajo se propone recopilar evidencias de ese impacto.

Hipótesis

El uso de las herramientas moleculares, incrementa el número de especies de una gran variedad de grupos biológicos. Por tanto, su implementación ha incrementado los estimadores de diversidad y ha resuelto problemas taxonómicos derivados de la utilización de caracteres morfológicos.

Objetivo general

Analizar el impacto del uso de herramientas moleculares en la delimitación de las especies.

Objetivos particulares

- Revisar trabajos realizados con invertebrados e identificar como abordaron los cambios taxonómicos utilizando las herramientas moleculares.
- Revisar trabajos realizados con vertebrados e identificar como abordaron los cambios taxonómicos utilizando las herramientas moleculares.
- Identificar y analizar los inconvenientes encontrados durante el uso de herramientas moleculares.
- Examinar las nuevas propuestas con métodos de biología molecular para la determinación de especies y su uso en diversas áreas biológicas.

Métodos de trabajo

Se hizo una revisión bibliográfica en diversas revistas científicas sobre el concepto de especie, con un énfasis en los métodos moleculares usando para dicha búsqueda las palabras *barcoding*, *metabarcoding*, taxonomía y especies crípticas, se consideraron los artículos en los que el uso de las herramientas moleculares antes mencionadas mostraron tener un impacto en la taxonomía del grupo estudiado. Se incluyeron las publicaciones desde el año 2003, cuando se publicó el artículo de Hebert hasta el 2021, se usaron principalmente los motores de búsqueda de artículos NCBI pubmed, Google académico y los recursos electrónicos existentes en la BIDIUNAM, se analizó, el impacto del uso de las herramientas moleculares en algunos grupos de organismos para evaluar el impacto que estas han tenido en la resolución de conflictos de delimitación. Es decir, en la elaboración de nuevas propuestas para ampliar grupos taxonómicos, resolver controversias respecto a su asignación a algún grupo taxonómico o cuando se carecía de información suficiente para asignar a algún grupo taxonómico a cierto individuo.

Capítulo I. Las herramientas moleculares como recurso para la identificación biológica

El problema conocido como “impedimento taxonómico”, es resultado de los huecos en la taxonomía, la escasez de profesionales dedicados a ello y la falta de técnicas disponibles en la identificación biológica. Este problema o impedimento afecta, entre otras cosas, las medidas y programas para el manejo y conservación de las especies biológicas. Como ya se ha dicho, las herramientas desarrolladas en biología molecular, se han constituido en protocolos fundamentales para resolver ese impedimento. De acuerdo con autores como Domínguez & Vásquez, 2009; Tautz *et al* 2002; 2003; Templeton, 1994 & Wilson, 1995, en el pasado reciente se propuso hacer la diagnosis de especies mediante el análisis de secuencias de DNA un método adicional y estandarizado que funcionan como un código de barras de DNA. Esta herramienta, según los proponentes, presenta un valor mayor o al menos equivalente al de la identificación basada en caracteres morfológicos.

Las herramientas utilizadas en la delimitación morfológica de las especies, pueden ocultar varias unidades evolutivas (Cerritos, 2008), por lo cual, como se pretende demostrar a continuación, los aportes generados por uso de estas técnicas (ver Figura 1) en diversos taxones biológicos han provocado cambios taxonómicos importantes. Dado que estas herramientas permiten identificar linajes que son utilizados para establecer probables relaciones filogenéticas, establecer grupos monofiléticos, y que los límites estén basados básicamente en porcentajes de divergencias, los trabajos recientes han resultado en la identificación de nuevas unidades taxonómicas operacionales moleculares (MOTUs). Así pues, la integración de resultados de análisis por *barcoding*, *metabarcoding* o técnicas de metagenómica, con criterios como los morfológicos y/o los datos ecológicos, han dado como resultado la determinación de nuevas especies.

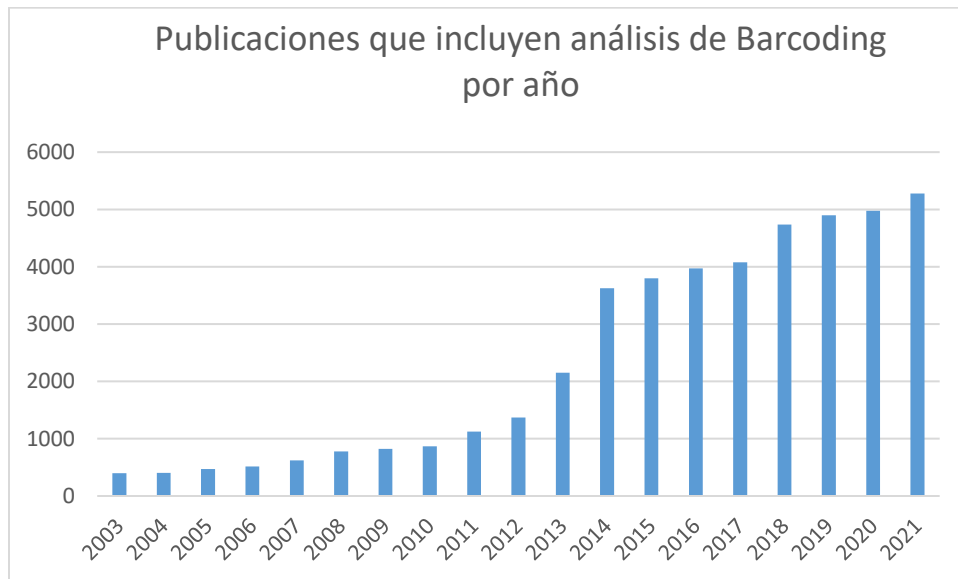


Figura 1 Número de publicaciones que incluyen análisis de *barcoding* a partir de 2003. Los datos fueron obtenidos del National Center for Biotechnology information utilizando el término “barcoding” para la búsqueda.

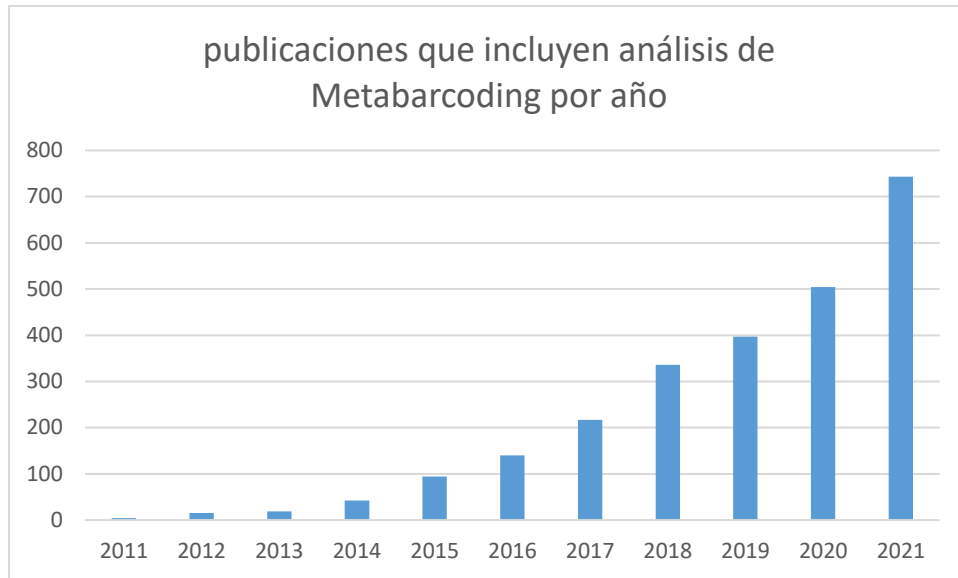


Figura 2 Número de publicaciones que incluyen análisis de *metabarcoding* a partir de 2011. Los datos fueron obtenidos del National Center for Biotechnology information utilizando el término “Metabarcoding” para la búsqueda.



Figura 3. Publicaciones que incluyen análisis metagenómicos a partir de 2004. Los datos fueron obtenidos del National Center for Biotechnology information utilizando el término “Matagenomic” para la búsqueda

Los avances en las tecnologías de secuenciación han llevado a un mayor uso de la secuenciación de alto rendimiento para caracterizar comunidades. La metagenómica se utiliza cada vez más para definir grupos taxonómicos (figura 3)

alcanzando su mayor uso en los últimos años (figuras 3, 6 y 9). Para el análisis son fundamentales los algoritmos de ensamblaje de secuencias capaces de reconstruir genes y genomas, a partir de mezclas complejas de los datos metagenómicos. Así el ensamblaje implica nuevos desafíos computacionales debido a las características de los datos, y es necesario desarrollar software, capaz de evitar las fuentes de contaminación y manejar robustas bases de datos, para que esta estrategia se mantenga accesible, se continúe utilizando como hasta ahora y para que sus beneficios se vean reflejados en la caracterización taxonómica (Ye *et al*, 2019).



Figura 4. Publicaciones que incluyen el uso de *barcoding* en trabajos con especies crípticas a partir de 2004. Los datos fueron obtenidos del National Center for Biotechnology information utilizando el término “Barcoding and cryptic species” para la búsqueda

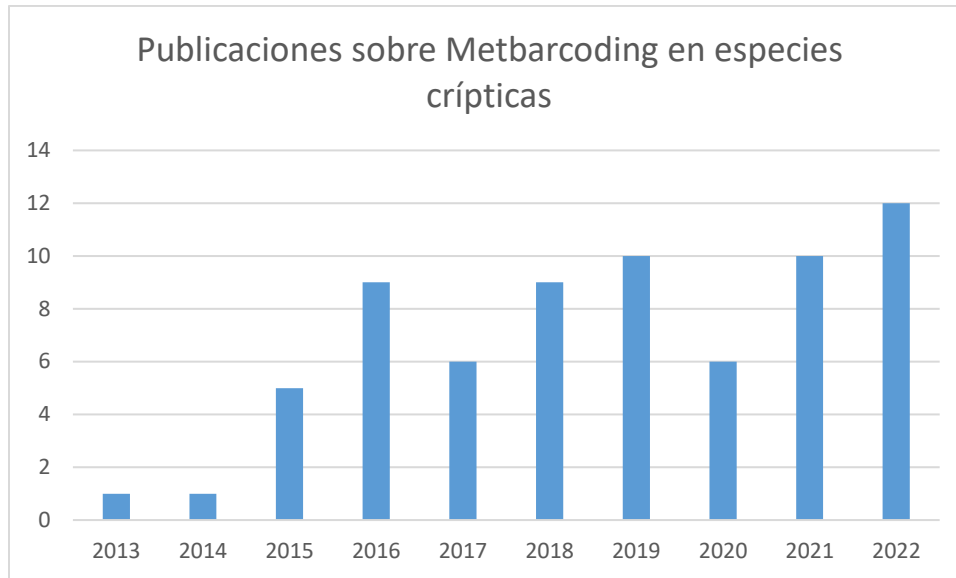


Figura 5. Publicaciones que incluyen *metabarcoding* en trabajos sobre especies crípticas a partir de 2004. Los datos fueron obtenidos del National Center for Biotechnology information utilizando el término “Metabarcoding and cryptic species” para la búsqueda

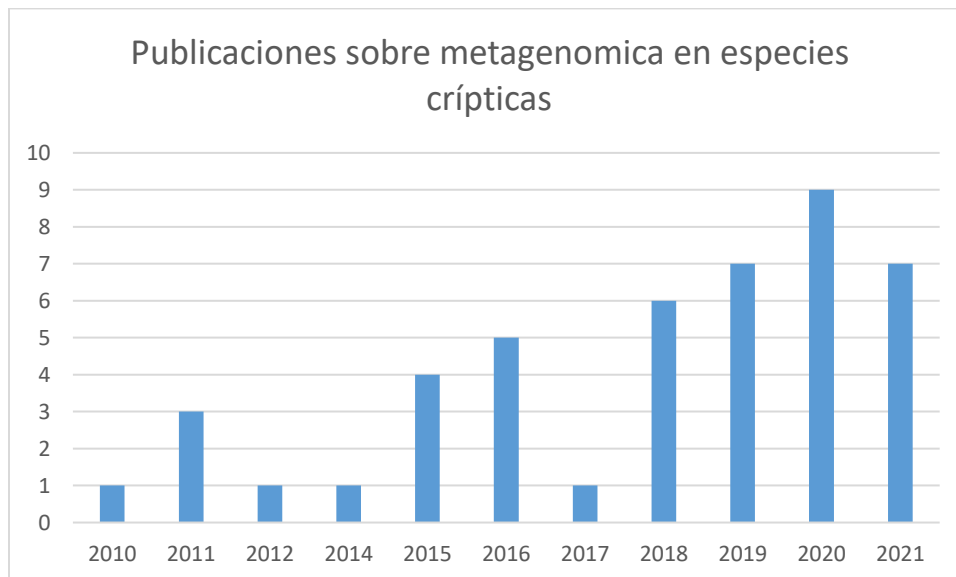


Figura 6. Publicaciones que incluyen estudios metagenómicos para trabajos sobre especies crípticas a partir de 2010. Los datos fueron obtenidos del National Center

for Biotechnology information utilizando el término “Metagenomic and cryptic species” para la búsqueda.

Las herramientas moleculares han sido utilizadas cada vez más en el estudio de especies crípticas dado que evitan omitir la detección de una especie debido a su similitud morfológica. La especiación críptica ha sido un proceso evolutivo frecuente en microorganismos protistas planctónicos (De Luca *et al*, 2021), por lo que las herramientas moleculares son especialmente útiles para distinguir especies de este grupo de organismos que no han divergido lo suficiente morfológicamente, que comparten una morfología ancestral o que tienen convergencias morfológicas. Así, el *barcoding* ha sido de gran utilidad en la delimitación de especies mientras que ha crecido el uso del *metabarcoding* y metagenómica, convirtiéndose en la norma para aquellos que estudian una supuesta especie cosmopolita, así como para quienes realizan estudios de carácter taxonómico.

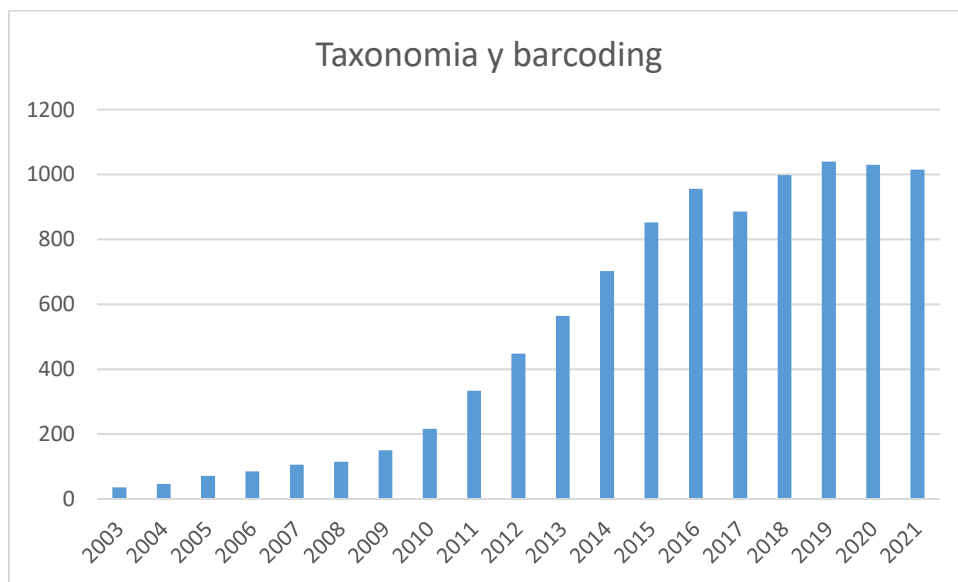


Figura 7. Publicaciones en taxonomía que incluyen *barcoding* a partir de 2003. Los datos fueron obtenidos del National Center for Biotechnology information utilizando el término “*barcoding* and taxonomy” para la búsqueda.

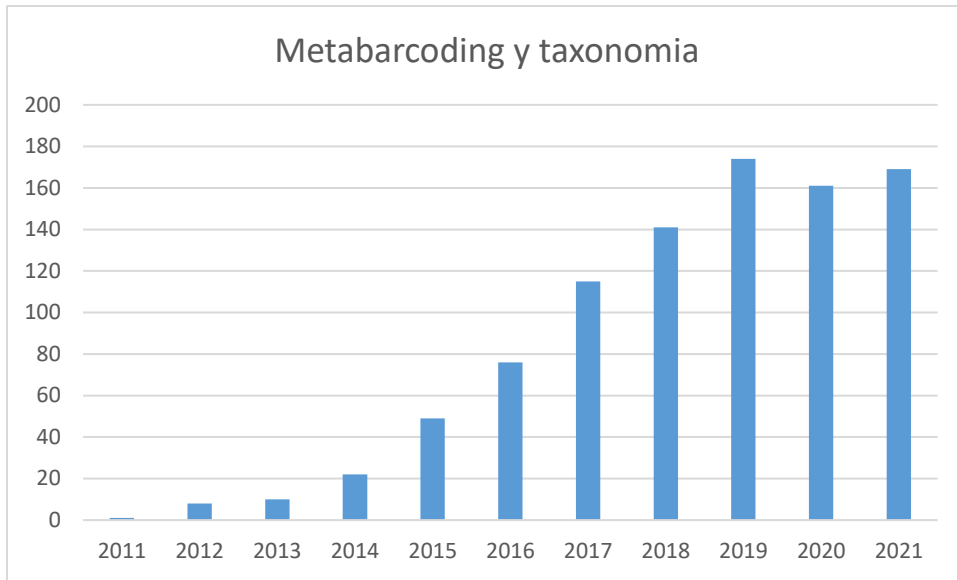


Figura 8. Publicaciones en taxonomía que utilizan *metabarcoding* a partir de 2011. Los datos fueron obtenidos del National Center for Biotechnology information utilizando el término “Metarcoding and taxonomy” para la búsqueda.

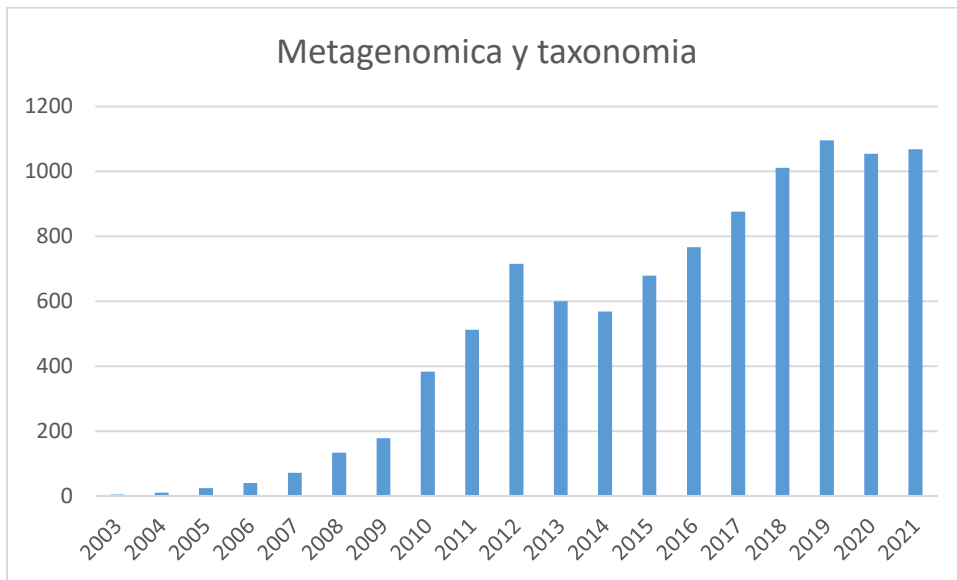


Figura 9. Publicaciones en taxonomía que incluyen metagenómica a partir de 2003. Los datos fueron obtenidos del National Center for Biotechnology information utilizando el término “Metagenomic and taxonomy” para la búsqueda.

Capítulo II. Trabajos en invertebrados y como abordaron los cambios taxonómicos

Uno de los grupos de organismos donde se han registrado más cambios taxonómicos gracias al uso de las herramientas moleculares es el de los invertebrados. Dentro de estos, el grupo de los rotíferos nos ofrece un panorama amplio del impacto que los datos obtenidos con herramientas de biología molecular han tenido en la identificación de especies. En este grupo las herramientas moleculares han sido especialmente útiles dado que estos organismos presentan un tamaño pequeño y una plasticidad fenotípica compleja debido a variaciones asociadas a condiciones ambientales específicas o asociadas a estadios de vida. Un ejemplo del impacto de las herramientas moleculares en la taxonomía de estos organismos lo encontramos en el trabajo realizado por Zhang y colaboradores (2021) quienes estudiaron rotíferos colectados en cuerpos de agua dulce en el sur de China y utilizando el *barcoding* con el marcador COI I encontraron evidencia que organismos clasificados como *Keratella cochlearis* y *Brachionus calyciflorus* presentaban una tasa de divergencia mayor al 5%, resultando por tanto que ambas especies constituyen un complejo críptico de especies. De esta manera, los resultados indican que la zona estudiada contiene una diversidad de especies de rotíferos mayor que las consideradas previamente, esto, según los autores, derivará en consideraciones ecológicas para la conservación de la zona debido a la importancia de este grupo en el flujo de energía en ambientes dulceacuícolas.

Un ejemplo con impacto sorprendente con el mismo grupo es el reportado por Mills y colaboradores en el 2015, quienes dan una muestra de cuán profundo puede ser el problema de las especies crípticas, ellos proponen la existencia quince nuevas especies de rotíferos, a partir de un complejo antes conocido como *Brachionus plicatilis*, analizando secuencias COI e ITS1 evaluaron la divergencia genética, la cual les permitió establecer modelos filogenéticos comparativos. Adicionalmente los autores explican cómo diversas estrategias para analizar los datos aportados por el análisis del DNA pueden conducir a estimaciones sobre la diversidad.

Anteriormente en un estudio realizado por Alcantara-Rodriguez *et al*, en el 2012 con *Brachionus plicatilis* colectado en los lagos de cráter del centro de la República Mexicana, analizaron secuencias de COI, y mostraron evidencias de plasticidad fenotípica de estos organismos para este ambiente salino, donde el bajo flujo genético y la baja salinidad de estos lagos produjeron una adaptación local en un tiempo relativamente corto, y propusieron una nueva especie para México.

Por otro lado, Fontaneto *et al* en el 2008, analizaron secuencias parciales de COI y mostraron que un rotífero bdelloideo, *Philodina flaviceps*, hasta entonces considerado una sola especie morfológica, en realidad ha diversificado en al menos nueve entidades evolutivas distintas, con distancias genéticas entre linajes comparables con aquellas entre diferentes especies tradicionales dentro del mismo género. Así, descubrieron que la coexistencia local de linajes independientes es muy común: encontraron cuatro linajes en un mismo arroyo, y tres en una sola muestra de musgo de 5 cm² de tal manera que la distribución espacial de los linajes proporcionó evidencia de patrones micro-filogeográficos. Finalmente concluyen que si la diversidad de mtDNA indica linajes independientes y especies crípticas simpátricas dentro de *P. flaviceps*, entonces puede esperarse que la diversidad bdelloidea real sea mucho mayor que la reconocida.

Da cruz y colaboradores (2021) trabajaron con organismos marinos y usando *barcoding* pudieron corroborar que un individuo macho, un copépodo del cual no se tenía registro, pertenecía a *Caromiobenella brasiliensis*, contribuyendo a tener las características de ambos sexos y completando la información reproductiva de esta especie. O bien, trabajos sobre la divergencia genética entre especies de partes continentales e insulares como el trabajo de Cervantes y colaboradores (2020) donde reportan que el copépodo *Mastigodiatomus ha* que había sido encontrado en una isla, era fenotípica y genéticamente similar a otros que se encuentran en Mérida debido a que la separación de estos es relativamente reciente y las poblaciones aun no divergen lo suficiente para ser linajes separados.

Así mismo, estas herramientas han sido usadas para confirmar la presencia de organismos en zonas donde no se encontraban registrados, como en el trabajo realizado por Lobo-Arteaga y sus colaboradores (2021), quienes reportan el primer registro del cangrejo *Pyromaia tuberculata* en el noreste Atlántico a partir de una dispersión relativamente reciente detectada con *barcoding*.

En nuestro país, los estudios de diversidad biológica mediante herramientas moleculares con rotíferos también se han incrementado en los años recientes, García-Morales & Elias-Gutierrez en el 2013, reportan uno de los primeros estudios realizado con *barcoding* de rotíferos monogonontos de agua dulce y salobre en México, usaron la secuencia de la citocromo oxidasa I y examinaron patrones de divergencia entre 417 especímenes pertenecientes a 63 taxones morfológicos de rotíferos. La divergencia media entre individuos de rotíferos conoespecíficos fue del 0.75 %, mientras que la divergencia media entre taxones congéneres fue del 20.8 %. Los códigos de barras además de discriminar todas las morfoespecies identificadas, revelaron la presencia de posibles especies crípticas en *Ascomorpha ovalis*, *Lecane bulla*, *L. cornuta*, *L. curvicornis*, *L. crepida*, *L. lunaris*, *L. hastata*, *Platyias quadricornis*, *Keratella cochlearis*, *Brachionus calyciflorus* y *Testudinella patina*, así como en algunas formas y variedades como *B. quadridentatus* F. *brevispinus*, *B. quadridentatus* F. *cluniorbicularis* y *Mytilina ventralis* var. *macracantha*. El análisis de códigos de barras también permitió identificar algunas formas y variedades de especies comunes como especies separadas. Con estos resultados, fue posible respaldar revisiones taxonómicas, como el reconocimiento del género *Plationus* y la presencia de especiación críptica en *L. bulla*. Finalmente, este trabajo mostró que el código de barras de DNA identifica especies de manera efectiva, su utilidad en la identificación de especies crípticas y su importancia para resolver controversias taxonómicas.

Las herramientas moleculares han sido utilizadas no solo para resolver problemas asociados a la especiación críptica, también han sido útiles para abordar estudios de diversidad biológica en distintas zonas de nuestro país. Garcia-Moreno *et al*

presentaron en el 2021, un trabajo donde exploran la diversidad escondida de monogontos del genero *Keratella* logrando describir tres especies nuevas, mediante la combinación de los resultados del análisis de secuencias COI con el marcador nuclear ITS1 y los métodos de delimitación ABGD, PTP y GMYC para identificar las unidades evolutivas significativas, poniendo así la muestra de cómo la representación correcta de las especies debe apoyarse en los métodos de la biología molecular junto con análisis morfológicos y morfométricos.

En otro trabajo Valdez-Moreno y colaboradores (2021) utilizaron el DNA de 1037 especímenes que incluían ácaros, crustáceos, insectos y larvas de peces de 13 ambientes acuáticos cercanos o dentro de la reserva de Sian Ka'an en Yucatán. Obtuvieron 167 BIN (*barcoding index number*), de los cuales lograron identificar 43 especies. Además, utilizaron DNA ambiental (eDNA), para analizar las comunidades de peces adultos y otros vertebrados en cuerpos de agua de la reserva, así encontraron 25 especies de peces. La comparación de la composición de la comunidad entre los sistemas les permitió concluir que cada cuerpo de agua es único. Esta información, en la opinión de los autores, representó el primer paso para elaborar programas destinados a detectar cambios en esos ecosistemas, incluidas especies invasoras, monitorear el estado de las poblaciones y para mejorar el conocimiento del zooplancton de agua dulce.

Las herramientas moleculares también han sido de utilidad en la delimitación o identificación de especies de otros invertebrados. Solo algunos ejemplos: Binkiené y colabores (2021) describieron tres nuevas especies de nemátodos (de la familia *Filaroidea*) que parasitaban algunas especies de aves de la familia *Onchocercidae* (géneros *Acrocephalus* y *Sylvia*), además de la descripción de las especies, la relevancia de este trabajo se debe a que la identificación fue resultado del análisis conjunto de datos moleculares y caracteres morfológicos. Adicionalmente, la muestras de sangre fueron tomadas directamente del sistema circulatorio de las aves, ya que estos organismos se encontraban en fase de microfilaria, y gracias a

las herramientas moleculares no se requirió de una disección del huésped y minimizando así el daño a la vida silvestre durante la investigación.

El uso de estas herramientas ha evidenciado la necesidad de actualizar las claves para la determinación morfológica; Mugasa y colaboradores (2019) estudiaron organismos de la familia *Tabanidae*, un grupo de dípteros de importancia médica y veterinaria en todo el mundo, pero especialmente en el este de África. Utilizando I COI, encontraron que había al menos dos especies (*Chrysops dispar* y *Tabanus striatus*) conformando un complejo críptico de especies, y realizaron una redescrición morfológica de las especies. Los autores discuten que dada la importancia médica de estos organismos, estos datos deben ser integrados a otras matrices que integren datos ecológicos, su prevalencia y capacidad para transmitir enfermedades para tener un mejor conocimiento y elementos para tener tomar medidas de control.

Finalmente, como ya se ha comentado, los resultados con estas herramientas han puesto de manifiesto que en muchas de las especies “cosmopolitas” en realidad se agrupan una serie de unidades con niveles de divergencia genética considerable (en algunos casos suficientes para considerarlas como distintas especies). Así Kolbasova y colaboradores en el 2020, basados en criterios morfológicos y genéticos (16S, 18 y 28S) describieron una nueva especie (*Bathypolaria kondrashovi* sp. Nov) de la familia Polynidae, y un nuevo género (*Bathypelagobia*) de Lopadorrhynchidae. Los análisis de los datos moleculares permitieron sugerir que donde había “especies cosmopolitas” en realidad existe un complejo de especies.

Capítulo III. Trabajos con vertebrados: el impacto del uso de las nuevas técnicas.

Algunos de los primeros estudios con carácter taxonómico que demostraron la valía de las técnicas de la biología molecular se dieron en el grupo de los peces. En este grupo dado que algunas especies presentan plasticidad fenotípica, se dificulta su identificación, en otros casos, los individuos presentan una combinación de caracteres a través de los distintos estadios de desarrollo, lo que conduce a suponer

que son especies distintas o simplemente, los caracteres no son lo suficientemente claros en las claves de identificación para poder distinguir una especie de otra. De manera que aquí las herramientas moleculares proporcionaron información que se ha convertido en un complemento imprescindible (Teletchea, 2009).

Wibowo *et al* en el (2021), usaron como modelo de estudio a las anguilas (*Anguilla spp.*), colectadas en Indonesia. Estos organismos catádromos son un grupo que se encuentra muy amenazado debido a diversos acontecimientos: dos terceras partes de las especies están en riesgo debido a la sobreexplotación y la fragmentación del hábitat. Por otro lado, la identificación de estos organismos es difícil en estadios tempranos de su desarrollo por lo que en este estudio se elaboró el *barcoding* de las especies de anguilas de Indonesia utilizando un fragmento de 652 pares de bases del marcador COI I. Así fue posible diferenciar, siete de las nueve especies registradas, mientras que *A. nebulosa* y *A. bengalensis* no presentaron diferencias significativas para reconocerse como especies separadas. Basados en estos resultados los autores destacan que esta información es importante para dirigir esfuerzos de conservación y preservar la diversidad genética.

En esta misma línea se encuentran trabajos como el de Cañedo-Apolaya y colaboradores (2021) quienes trabajaron con diferentes especies de tiburones ángel (*Squatina spp.*) mediante herramientas de biología molecular dado que estos organismos tienen una distribución incierta y los datos morfológicos no permiten hacer una identificación certera. El estudio es relevante dado que algunas especies se encuentran en la lista de especies amenazadas y es urgente contar con herramientas de identificación precisas. En su reporte, los autores discuten la importancia de establecer MOTUs usando *barcoding* mediante COI y RNA 16S como marcadores, y encontraron evidencias que les permiten establecer que no eran solo dos especies con un amplio rango de distribución sino más bien 4 MOTU donde 1 es probablemente una nueva especie.

Vallejo en el 2019 realizó un análisis de la estructura genética y fitogeográfica de la especie *Girardinichthys multiradiatus* en dos cuencas hidrológicas del Estado de México. Encontró que la distribución de los haplotipos era privada para cada una de

las cuencas, es decir que no se compartían. Además reportó que el hecho que una población que era más divergente genéticamente de las otras, podría ser explicado por el modelo de Jerarquía de corriente, proponiendo además para el trabajo la existencia de dos nuevas unidades evolutivamente significativas (ESU).

De la misma manera son notables los casos donde algún carácter fenotípico novedoso aparece en poblaciones y conduce a considerar que se trata de un taxón diferente debido a que esas especies están bien caracterizadas por medios tradicionales. En esos casos, las herramientas de biología molecular pueden reducir costos y disminuir los errores de identificación. Tal es el caso que reporta Stagličić y sus colaboradores (2019), quienes colectaron un organismo de la familia Trachinidae, con aparente coloración anómala. En esta familia, la coloración de los organismos es un carácter con importancia ecológica además que cumple diversas funciones como reconocimiento de parejas, eludir la depredación, camuflaje, fotoprotección y comunicación visual, entre otras. Los miembros de este grupo presentan una coloración marrón oscura, sin embargo en este caso la coloración era amarilla/rojiza y no había sido reportada en ningún miembro de esta familia, así se consideró que esta variante podría corresponder con un género distinto de la misma familia. Sin embargo, al utilizar la secuencia de COI I para determinar la divergencia genética se determinó que se trataba de la especie *Trachinus radiatus* y evidenció que la variabilidad fenotípica de la especie es mayor que la considerada, dado que nunca antes se había encontrado un registro de xantocromismo ni siquiera en algún otro género de la misma familia.

Así mismo se puede usar esta herramienta para monitorear especies exóticas en un territorio, en especial cuando existe una especie o especies locales con las que se comparten caracteres, por ejemplo en el estudio realizado por Panprommin *et al* (2018), se utilizó el *barcoding* como elemento fundamental para detectar 4 especies de cíclidos invasores en Tailandia, lo que es fundamental para su control y manejo en aquel país.

Sarmiento-Camacho & Valdez-Moreno (2018), encontraron en el *barcoding* una herramienta para la determinación de especies que se comercializan en mercados

de México, donde la sustitución de una especie por otra más barata es una práctica común dado que no se cuenta o se confunden sus características observables. Así, lograron identificar que el dieciocho por ciento de las especies son sustituidas, y que la especie *Pangasianodon hypophthalmus* es la más usada para sustituir a otras de mayor valor económico. Además reportaron que entre las especies identificadas, hay algunas de la lista de especies amenazadas de la IUCN, lo que indica malas prácticas de pesca que deben revisarse rigurosamente. Con estos resultados los autores prueban que el *barcoding* puede ser una herramienta sumamente útil para regular la pesca a nivel nacional.

En otro trabajo de identificación muy relevante, Leyva y colaboradores (2016) analizaron mediante *barcoding* los huevos encontrados en una zona de desove de peces pelágicos en la península de Yucatán, pudieron identificar hasta 42 taxones, de estos 33 especies, encontraron un nuevo registro (*Ariomma melanum*), además de obtener datos de las zonas de desove de todas las especies, se tomaron datos morfológicos y fotografías de las zonas de anidación lo que contribuye al manejo y cuidado de estas especies en la zona. Como es evidente, para este trabajo fue imprescindible el uso del *barcoding* ya que es virtualmente imposible distinguir tantas especies con solo huevos.

Igualmente relevante es el trabajo realizado por Dahruddin y colaboradores (2021) quienes trabajaron en la reserva Sundaland, un punto de alta diversidad en las islas de Java, Sumatra, Borneo y la península de Malasia. Debido a que en esta zona hay más de 900 especies de ictiofauna, este trabajo de identificación estaba centrado en *Barbonymus sp*, donde se identificaron 6 MOTUs difiriendo de anteriores trabajos debido a que solo se utilizaron individuos juveniles y a introgresión es presentadas entre las especies *B. gonionotus* and *B. schwanefeldii*, pudiendo encontrar dos diferentes MOTUs de *Barbonymus* distintas.

Capítulo IV. Inconvenientes encontrados durante el uso de herramientas moleculares.

Aunque el uso de herramientas moleculares parece ser la solución a problemas biológicos, como establecer los límites genéticos entre las especies, identificar nuevas especies o identificar rápida e inequívocamente la especie a la que corresponde una muestra, frecuentemente la decisión resulta muy difícil y se basa en la experiencia del investigador aún con los grandes avances en las técnicas y la capacidad de secuenciación de genes y genomas (Zachos, 2016).

Algunos estudios han comprobado que realizar análisis con un solo tipo de datos, puede conducir a resultados erróneos, Dávalos & Russell (2014) usaron simulación para demostrar que si bien el uso del genoma mitocondrial es muy adecuado (debido a que las distancias genéticas intraespecíficas no se superponen con las interespecíficas), no es aplicable a todos los grupos de organismos. Especialmente en algunos, como mamíferos, aves y en general aquellos en los que las hembras son altamente filopátricas y los machos tienden a dispersarse demasiado, se genera un sesgo que es importante considerar. Esto se debe a que los grupos formados podrían no representar linajes evolutivos reales, debido al carácter monofilético del mtDNA, que se agudiza cuando el tamaño de la población ancestral es pequeño y es especialmente notable en especies tropicales.

En otro trabajo realizado con aves, Koblick y colaboradores en el 2020 recopilaron casos en los que el análisis de solo datos genéticos mitocondriales conduce a errores debido a que la divergencia de los haplotipos no siempre correlaciona con la antigüedad de los grupos y puede ser una consecuencia del efecto de recombinación entre partes del genoma nuclear y el genoma mitocondrial. En este trabajo los autores señalan la necesidad de llevar a cabo una correlación de los resultados de los estudios de genética molecular con ideas elementales sobre la apariencia morfológica, su especificidad ambiental, y también tener en cuenta la

información sobre la naturaleza de las relaciones reproductivas y espaciales entre ellos.

En otro artículo Jiménez-Contreras y colaboradores en el 2012 realizaron un análisis morfológico, morfométrico y molecular (CO1 e ITS) para rotíferos del género *Limnias*, y encontraron diferencias significativas en los grupos formados entre los marcadores moleculares, mientras que para ITS se formaron dos grupos, para COI se agruparon en tres, tal como los datos morfológicos y morfométricos lo sugerían, finalmente cuando fueron evaluados juntos CO1 mostraba ser consistentes, a diferencia de ITS1.

Maroniche y colaboradores en el 2016, realizaron un estudio en el que querían identificar *Rizhospiridillium* spp, mediante marcadores de rRNA 16s, muy utilizados en la filogenia de estas bacterias, sin embargo el estudio reveló que el marcador esta contenido en numerosos operones con tasas elevadas de variabilidad intergenética en el genoma de especies cercanas, lo que dificultó la identificación y obligó a recurrir al uso de rpoD (factores sigma de la polimerasa), para poder elaborar los arboles filogenéticos de estas especies.

Finalmente, estos resultados sugieren que aunque las herramientas moleculares han permitido avanzar y estemos cerca de discernir los límites entre las especies, los datos moleculares no deben ser la única fuente de información y que se requieren fuentes adicionales que reflejen el comportamiento de las especies y que produzcan un resultado más robusto y confiable.

Capítulo V. Las nuevas propuestas

Algunos trabajos han realizado nuevas consideraciones, Yeates y colaboradores en el 2011 afirman que para que los trabajos puedan llamarse verdaderamente integrativos deben cumplir con ciertos criterios, por ejemplo, el protocolo debe ser aplicable en la mayoría de taxones sin importar su tipo de reproducción, debe incorporar datos genéticos, morfométricos, ecológicos y etológicos, así como que los datos sean considerados como estados de carácter y que puedan ser incorporados a una matriz para ofrecer una cierta confianza estadística. Así se

podrá mejorar la eficacia de las herramientas moleculares en la detección de especies nuevas, en la discriminación de las existentes o en la revisión de la diversidad biológica.

Schlik-Steiner y sus colaboradores en el 2010 se refirieron a estas aproximaciones con el nombre de taxonomía integrativa, ellas presentan las características antes mencionadas, permiten resolver problemas de límites de especies y reducen el tiempo invertido en métodos de identificación tradicionales. Entre los principales logros con la taxonomía integrativa ha sido alcanzar acuerdos entre las disciplinas biológicas involucradas con esta tarea (taxonomía, genética, morfología, etc) el cual fue uno de los objetivos del uso de la biología molecular y además que el protocolo propuesto es flexible y permite robustecer la confiabilidad en las conclusiones. Lo mismos autores en el 2014, insisten en la necesidad de involucrar varias disciplinas para aumentar el grado de confiabilidad y proponen pasos para resolver controversias.

Andujar y sus colaboradores en el 2014, abordaron desde la taxonomía integrativa el caso de los organismos del subgénero de escarabajos *Mesocarabus* spp. En este grupo la taxonomía es complicada principalmente porque los caracteres no divergen sincrónicamente y existen procesos que mezclan estados de caracteres en linajes que descienden de un ancestro común. En este caso la taxonomía integrativa con los estados de carácter y los análisis filogenéticos se logró construir una hipótesis sobre la historia evolutiva.

Más recientemente, Koblick y colaboradores (2019), apuntan la necesidad de la construcción de nuevas categorías genuinamente interrelacionadas con los conceptos de especie, subespecie y semiespecie para el grupo de aves y con posible aplicación en otros grupos taxonómicos. Los autores afirman que, la principal característica de una especie como entidad evolutiva debe ser su estabilidad en el tiempo aun cuando su aislamiento reproductivo se rompa periódicamente. Las razas intraespecíficas en regiones geográficas muestran variaciones sostenibles de diferentes grados, pero no tienen aislamiento reproductivo; se reproducen al contacto y forman zonas de intergradación,

denominándose como subespecies. Las descripciones de nuevas subespecies son viables hasta los límites que reflejan la estructura geográfica natural de la especie en toda su extensión. Para los morfos jóvenes que han alcanzado el nivel de insularidad de especie, en el curso de la evolución, parece apropiado restaurar una categoría de semiespecie. Las semiespecies muestran diferencias morfológicas significativas y particularidades ecológicas distinguidas, por regla general, pero están conectadas a morfos estrechamente relacionados por flujos de genes en las zonas de contacto. Estos nuevos terminos ayudarían a que las especies estuvieran mejor representadas y por lo tanto su uso ayudaría a la conservación y manejo de la biodiversidad.

Recientemente en el 2022, Stengel y sus colaboradores realizaron un análisis utilizando la taxonomía integrativa en conjunto con la teoría eco-evolutiva, es decir aquella que propone que las dinámicas evolutivas y los procesos ecológicos moldean la genética, el fenotipo, etc, para el estudio del grupo de hongos. En este grupo es particularmente difícil delimitar especies para entender sus interacciones con el ambiente y su evolución debido a sus ciclos de vida complejos, la variación en su morfología, la presencia de especies crípticas, la poliploidía y la presencia de transposones. Los autores, proponen que en este caso, la integración es fundamental y el uso de datos de secuenciación multilocus, en conjunto con datos de proteómica y transcriptómica, se puede resolver los errores taxonómicos. Los autores afirman que uniendo los postulados de esta teoría con la taxonomía integrativa, se puede discernir la influencia de las relaciones ecoevolutivas en la configuración de la variabilidad espacio-temporal entre especies, y si bien la propuesta la construyen para hongos, sugieren que podría beneficiar el estudio de otros grupos con problemas similares como arqueas y bacterias.

Discusión y conclusiones

Un concepto que ha ido perdiendo vigencia con el desarrollo de la biología molecular es el de especies “cosmopolitas”. Este término ha sido usado ampliamente en especies marinas y es asignado comúnmente a aquellas especies que cuentan con un amplio rango de distribución (principalmente en los océanos Atlántico y Pacífico),

esto debido a que durante mucho tiempo, se utilizó la información obtenida en el siglo XIX donde las descripciones e ilustraciones de las especies eran breves y solo se tenía acceso a los datos morfológicos en el mejor de los casos. Un ejemplo concreto de un taxón en el que el uso de este concepto ha sido poco adecuado es el de los poliquetos marinos; se han realizado estudios que muestran que muchas especies consideradas “cosmopolitas” constituyen más bien complejos de especies crípticas, y que las especies cosmopolitas son casos extremadamente raros (Fontaneto *et al*, 2008; Kolbasova *et al* 2020; García-Morales *et al*, 2021; Hutchings & Kupriyanova, 2018). Por lo anterior, las especies conocidas y descritas actualmente en términos de diversidad están infrarrepresentadas, y se proponen algunas consideraciones para hacer una revisión de material antiguo de especies consideradas cosmopolitas. Es decir trabajar con material depositado en colecciones y museos, especialmente material topotípico, es decir cercano a la localidad del tipo o en caso de que el material se haya perdido sea propuesto un neotipo (Zachos, 2016; Hutchings & Kupriyanova, 2018).

Desde hace años, la caracterización genética se ha usado para categorizar taxonómicamente, identificar, ampliar nuestro conocimiento sobre las especies de organismos y en última instancia su protección y conservación (Bickford *et al*, 2007; Deiner *et al* 2017; Kennedy *et al*, 2020; De Luca *et al*, 2021 ;Binkiené *et al*, 2021).

Desde el inicio del uso de estas herramientas se evidenció que los indicadores de diversidad de especies, están errados y son poco representativos, ya que solo se basaron en criterios morfológicos, morfométricos y solo los más exhaustivos, incluían criterios ecológicos. Adicionalmente en algunos de estos trabajos la descripción de las especies era muy ambigua o poco detallada. Así las herramientas de biología molecular han cambiado la forma en que muchas especies fueron categorizadas. Con ayuda de la información genética mitocondrial fue posible vislumbrar una delimitación completa, objetiva y aplicable a la gran mayoría de grupos.

Con estas herramientas, muchos trabajos (Wilson, 1995; Kolbasova *et al*, 2020; Mills *et al*, 2015; Srivastava & Manjunath, 2020) han ampliado el conocimiento de especies resolviendo problemas como el de los complejos de especies crípticas o cosmopolitas donde muchas especies indistinguibles morfológicamente fueron separadas. Sin embargo esta no ha sido una solución definitiva ya que la información utilizada en la mayoría de los casos proviene de una sola fuente (mtDNA) (Will & Rubinoff, 2004; Will *et al*, 2005).

Por lo anterior se considera que para próximos estudios utilicen una visión integrativa que considere además de la información genética mitocondrial, con información nuclear, complementando con datos morfológicos, ecológicos, etológicos y morfométricos, que sean analizados estadísticamente para ofrecer un reflejo más real del número de especies, es decir, evitando tanto la sobre y subrepresentación dado que de la estimación real, abundancia y su distribución depende que se tomen las medidas necesarias y adecuadas para su protección y conservación.

Referencias bibliográficas.

Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Serranía-Soto, C. R., & Piedra-Ibarra, E. (2012). Local adaptation in populations of a *Brachionus* group plicatilis cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshwater Biology*, 57(4), 728–740.

Andújar, C., Arribas, P., Ruiz, C., Serrano, J., & Gómez-Zurita, J. (2014). Integration of conflict into integrative taxonomy: fitting hybridization in species delimitation of *Mesocarabus* (Coleoptera: Carabidae). *Molecular Ecology*, 23(17), 4344–4361.

Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–155.

Binkienė, R., Chagas, C. R. F., Bernotienė, R., & Valkiūnas, G. (2021). Molecular and morphological characterization of three new species of avian Onchocercidae (Nematoda) with emphasis on circulating microfilariae. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1–19.

Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M. de Bruyn, M. (2014, June 1). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 29, pp. 358–367.

Bromhan L. Penny D. (2003) The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics* 5: 216-224

Cañedo-Apolaya, R. M., Ortiz-Alvarez, C., Alfaro-Cordova, E., Alfaro-Shigueto, J., Velez-Zuazo, X., Mangel, J. C., Ramirez, J. L. (2021). Species Delimitation of Southeast Pacific Angel Sharks (*Squatina* spp.) Reveals Hidden Diversity through DNA Barcoding. *Diversity*, 13(5), 177.

Cervantes-Martínez, A.; Gutiérrez-Aguirre, M.A.; Suárez-Morales, E.; Jaime, S. Phenetic and Genetic Variability of Continental and Island Populations of the Freshwater Copepod *Mastigodiatomus ha* Cervantes, 2020 (Copepoda): A Case of Dispersal? *Diversity* 2021, 13, 279.

Cerritos López R. (2007) La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos.

Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, MA

Cronquist, A. (1978). Once again, what is a species? In 'BioSystematics in Agriculture'. (Ed. L. V. Knutson.) pp. 3–20. (Alleheld Osmun: Montclair, NJ.

Da Cruz Lopes da Rosa, J., Dias, C. de O., Suárez-Morales, E., Weber, L. I., & Fischer, L. G. (2021). Record of Caromiobenella (Copepoda, Monstrilloida) in Brazil and Discovery of the Male of *C. brasiliensis*: Morphological and Molecular Evidence. *Diversity*, 13(6), 241.

Dávalos L. M. & Russell A. L. (2014). Sex-biased dispersal produces high error rates in mitochondrial distance-based and tree-based species delimitation. *J Mammal* 95:781–79.

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

Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895.

De Luca, D., Piredda, R., Sarno, D., & Kooistra, W. H. C. F. (2021). *Resolving cryptic species complexes in marine protists: phylogenetic haplotype networks meet global DNA metabarcoding datasets. The ISME Journal*

De Queiroz K. 2007 Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879–886.

Dobzhansky T (1935) A critique of the species concept in biology. *Philos Sci* 2:344–355

Domínguez-Domínguez, O., & Vázquez-Domínguez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal biodiversity and conservation*, 32(1), 59-70.

Elías-Gutiérrez, M.; Hubert, N.; Collins, R.A.; Andrade-Sossa, C. (2021) Aquatic Organisms Research with DNA Barcodes. *Diversity* , 13, 306.

Fajarningsih, Nurrahmi. (2016). Internal Transcribed Spacer (ITS) as DNA barcoding to Identify Fungal Species: a Review. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 11. 37.

Fontaneto, D. Boschetti, C, Ricci, C. 2008. Cryptic diversification in ancient asexuals: evidence from the bdelloid rotifer *Philodina flaviceps*. *Journal of evolutionary Biology*. 21 (2): 580-587.

Fujisawa T., Barraclough T.G. (2013) Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed Yule coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Syst. Biol.*, 62, 707–724.

García-Morales A E, Elías-Gutiérrez M. (2013). DNA barcoding of freshwater rotifera in Mexico: evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecological Resources* 13(6):1097-107.

García-Morales, A.E.; Domínguez-Domínguez, O.; Elías-Gutiérrez, M. (2021). Uncovering Hidden Diversity: Three New Species of the *Keratella* Genus (Rotifera, Monogononta, Brachionidae) of High Altitude Water Systems from Central Mexico. *Diversity*, 13, 676.

Gibson, J. F., Shokralla, S., Curry, C., Baird, D. J., Monk, W. A., King, I., & Hajibabaei, M. (2015). Large-scale biomonitoring of remote and threatened ecosystems via high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 10, e0138432.

Hebert Paul, Alina Cywinska, Shelley L. Ball, & Jeremy R. deWaard. (2003). Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proceedings: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.

Heckenhauer, J., Barfuss, M. H. J., & Samuel, R. (2016). Universal Multiplexable matK Primers for DNA Barcoding of Angiosperms. *Applications in Plant Sciences*, 4(6), 1500137.

Hollingsworth, P. M., L. L. Forrest, J. L. Spouge, M. Hajibabaei, and S. Ratnasingham, M. van der Bank, M. W. Chase, *et al.* 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings the National of Academy of Sciences, USA* 106: 12794–12797.

Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE*, 6(5), e19254.

Hutchings, P., & Kupriyanova, E. (2018). *Cosmopolitan polychaetes – fact or fiction? Personal and historical perspectives. Invertebrate Systematics*, 32(1), 1.

Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S. M., Edwards, D. P., Tang, Y., Nakamura, A., Yu, D. W. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters*, 16(10), 1245–1257.

Kennedy, S.R., Prost, S., Overcast, I. Rominger A.J, Gillespie R.G & Krehenwinkel H. (2020). High-throughput sequencing for community analysis: the promise of DNA barcoding to uncover diversity, relatedness, abundances and interactions in spider communities. *Dev Genes Evol* 230, 185–201.

Koblik, E.A., Red'kin, Y.A., Volkov, S.V. & Mosalov A.A. (2020). The Concept of Bird Species: Theory and Practice. *Biol Bull Russ Acad Sci* 47, 707–723

Kolbasova, G., Kosobokova, K., & Neretina, T. (2020). Bathy- and mesopelagic annelida from the Arctic Ocean: Description of new, redescription of known and notes on some “cosmopolitan” species. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 103327.

- Leyva-Cruz, E., Vásquez-Yeomans, L., Carrillo, L., & Valdez-Moreno, M. (2016). Identifying pelagic fish eggs in the southeast Yucatan Peninsula using DNA barcodes. *Genome*, 59(12), 1117–1129.
- Lipscomb, Diana & Platnick, Norman & Wheeler, Quentin. (2003). The Intellectual Content of Taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*. 18. 65-66.
- Lobo-Arteaga, J.; Tuaty-Guerra, M.; Gaudêncio, M.J. Integrative Taxonomy Reveals That the Marine Brachyuran Crab *Pyromaia tuberculata* (Lockington, 1877) Reached Eastern Atlantic. *Diversity* 2021, 13, 225.
- Maroniche, G. A., García, J. E., Salcedo, F., & Creus, C. M. (2017). Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of rpo D as genetic markers. *Microbiological Research*, 195, 1–10.
- Mayr E (1942) Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York
- Mayr E (1957) Species concepts and definition. In: Mayr E (ed) The species problem. American
- Mayr E (1970) Populations, species, and evolution. An abridgment of Animal Species and Evolution. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Mills, S., Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciroso-Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Galindo, K. H., ... Walsh, E. J. (2016). Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, 796(1), 39–58.
- Mugasa, C. M., Villinger, J., Gitau, J., Ndungu, N., Ciosi, M., & Masiga, D. (2018). Morphological re-description and molecular identification of Tabanidae (Diptera) in East Africa. *ZooKeys*, 769, 117–144.
- Nijman, I.J., Otsen, M., Verkaar, E.L., de Ruijter, C. y Hanekamp, E. 2003. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity*, 90: 10–16
- Panprommin, D., Soontornprasit, K., & Pangeson, T. (2019). Comparison of three molecular methods for species identification of the family Cichlidae in Kwan Phayao, Thailand. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 30(1), 184–190.
- Pfenninger, M., Schwenk, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evol Biol* 7, 121 (2007).

Pompanon, F., Deagle, B. E., Symondson, w. o. c., Brown, d. s., Jarman, s. n., & Taberlet, p. (2011). Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 1931–1950.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364.

Sánchez-Velásquez, J. J., Reyes-Flores, L. E., Yzásiga-Barrera, C., & Zelada-Mázmela, E. (2021). The Introduction of the Asian Red Algae *Melanothamnus japonicus* (Harvey) Díaz-Tapia & Maggs in Peru as a Means to Adopt Management Strategies to Reduce Invasive Non-Indigenous Species. *Diversity*, 13(5), 176.

Sarmiento-Camacho, S., & Valdez-Moreno, M. (2018). DNA barcode identification of commercial fish sold in Mexican markets. *Genome*, 61(6), 457–466.

Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., & Crozier, R. H. (2010). Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 421–438.

Schlick-Steiner, B. C., Arthofer, W., & Steiner, F. M. (2014). Take up the challenge! Opportunities for evolution research from resolving conflict in integrative taxonomy. *Molecular Ecology*, 23(17), 4192–4194.

Srivastava, D., & Manjunath, K. (2020). DNA Barcoding of Endemic and Endangered Orchids of India: A Molecular Method of Species Identification. *Pharmacognosy magazine*, 16(70), S290–S299

Stagličić, N., Dragičević, B., Žužul, I., & Šegvić-Bubić, T. (2019). Anomalous Colouration of a Starry Weever, *Trachinus Radiatus* (Actinopterygii: Perciformes: Trachinidae), from the Adriatic Sea. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 49(1), 177–180.

Stengel A, Stanke KM, Quattrone AC & Herr JR. (2022). Improving Taxonomic Delimitation of Fungal Species in the Age of Genomics and Phenomics. *Front. Microbiol.* 13:847067.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789–1793

Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., & Vogler, A. P. (2002). DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature*, 418(6897), 479–479.

Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H. & Vogler, A. P. 2003 A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18, 70–74.

Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(3), 265–293.

Torretti, R. (2010). La proliferación de los conceptos de especie en la biología evolucionista (The proliferation of species concepts in evolutionary biology). *Theoria. Revista de Teoría, Historia y Fundamentos de la Ciencia*, 25(3), 325-377.

Valdez-Moreno, M.; Mendoza-Carranza, M.; Rendón-Hernández, E.; Alarcón-Chavira, E.; Elías-Gutiérrez, M. (2021) DNA Barcodes Applied to a Rapid Baseline Construction in Biodiversity Monitoring for the Conservation of Aquatic Ecosystems in the Sian Ka'an Reserve (Mexico) and Adjacent Areas. *Diversity*, 13, 292.

Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110– 117.

Vallejo, F.J (2019). Estructura genética y filogeografía de poblaciones de *Girardinichthys multiradiatus* (Meek, 1904), en dos cuencas hidrológicas del estado de México. Tesis para obtener el título de biólogo. FESI, Universidad Nacional Autónoma de México.

Wibowo, A., Hubert, N., Dahruddin, H., Steinke, D., Suhaimi, R. A., Samuel, Ning, N. (2021). Assessing Temporal Patterns and Species Composition of Glass Eel (*Anguilla spp.*) Cohorts in Sumatra and Java Using DNA Barcodes.

Wilkins JS (2006) Species, kinds, and evolution. *Rep Cent Natl Sci Educ* 26:36–45.

Will, K. W., & Rubinoff, D. (2004). *Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. Cladistics*, 20(1), 47–55.

Will, K. W., Mishler, B. D., & 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: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 20 Suppl 2, S117–S121.

Ye, S. H., Siddle, K. J., Park, D. J., & Sabeti, P. C. (2019). Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification. *Cell*, 178(4), 779–794.

Yeates, D. K., Seago, A., Nelson, L., Cameron, S. L., Joseph, L., & Trueman, J. W. H. (2010). Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology*, 36(2), 209–217.

Zachos, F. E. (2016). *Species concepts in biology: historical development, theoretical foundations and practical relevance*. Springer.

Zhang J, Kapli P., Pavlidis P. & Stamakis A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29, 2869–2876.

Zhang, Y.-N.; Xu, S.-L.; Huang, Q.; Liu, P.; Han, B.-P. (2021). Application of COI Primers 30F/885R in Rotifers to Regional Species Diversity in (Sub) Tropical China. *Diversity*, 13, 390.

Bibliografía

Darwin, C. (1963). *El origen de las especies por la selección natural* (Vol. 2). Ediciones Ibéricas y LCL.

Hey, J. (2006). On the failure of modern species concepts. *Trends in ecology & evolution*, 21(8), 447-450.

Pavlinov, I. (Ed.). (2013). *The species problem: Ongoing issues*. Intech Rijeka.