



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Código de barras de ADN. Una alternativa para documentar la diversidad biológica

DNA barcoding: an alternative to document biological diversity

Aymée Robainas-Barcia y Erik García-Machado

Centro de Investigaciones Marinas,
Universidad de La Habana.

.....
* Autor para correspondencia:
egarcia@cim.uh.cu

INTRODUCCIÓN

La vida en nuestro planeta, a lo largo de su existencia, ha manifestado fluctuaciones a gran escala. Estas se han debido, probablemente, a cambios drásticos de las condiciones ambientales y al desequilibrio de los ecosistemas. A estos factores se unen, además, los efectos de la actividad del hombre, que contribuyen de manera importante a la pérdida de la diversidad biológica del planeta. Uno de los paliativos de esta crisis sería alcanzar un conocimiento absoluto de las especies que habitan los diferentes ecosistemas, con el fin de comprender los procesos que en ellos ocurren.

Si bien la inmensa mayoría de las especies que existieron en nuestro planeta han desaparecido, la diversidad actual no ha podido documentarse en su totalidad (Bellwood *et al.*, 2004). El número de especies que existen actualmente es impreciso, aunque el valor más probable fue estimado en alrededor de los 10 millones (Wilson, 2003); sin embargo, hasta la fecha solo se han descrito formalmente algo más de 1,5 millones de especies (Baillie *et al.*, 2004). Por este motivo, a pesar de los esfuerzos que se realizan, una gran parte de las especies que existen no podrán ser descritas.

Una de las causas fundamentales de este hecho es la escasez de taxónomos (Hopkins y Freckleton, 2002; Hebert *et al.*, 2003a) y de infraestructura para desarrollar esta ciencia (Wilson, 2003). No obstante, en los últimos tiempos los catálogos de especies se han multiplicado extraordinariamente a nivel mundial —por ejemplo, The IUCN Red List; el Censo de Vida marina (www.coml.org), la fundación All Species (www.all-species.org)—. En Cuba se hacen grandes esfuerzos al respecto. Actualmente, se encuentran en elaboración y actualización varias bases de datos sobre la diversidad biológica marina y terrestre (Claro, 2006; Silva-Taboada *et al.*, 2007).

Simultáneamente a la crisis manifestada por la taxonomía tradicional, la biología molecular y, en particular, el desarrollo de técnicas de obtención de datos cada vez más eficaces y baratas han mostrado

Recibido: 2008-07-10

Aceptado: 2008-09-05

avances espectaculares. La invención de la técnica de PCR (Mullis y Faloona, 1987) y la introducción de las polimerasas termoestables (Saiki *et al.*, 1988) abrieron definitivamente el acceso a los caracteres moleculares. Durante los últimos quince años, los taxónomos, genetistas y evolucionistas se han beneficiado de estos avances para el estudio de los caracteres moleculares, y han contribuido de forma significativa al desarrollo de las bases de datos moleculares, con secuencias nucleotídicas de miles de especies –por ejemplo, GeneBank y EmBL.

Considerando estos antecedentes, Hebert *et al.* (2003a) propusieron la creación de un sistema estandarizado para la identificación de especies, al cual nombraron «DNA barcoding», de manera análoga al código de barras empleado para identificar los productos comerciales. Este sistema se basa en la utilización de secuencias cortas de ADN como fuente de datos.

Durante los años transcurridos desde su primera aplicación, las opiniones acerca de su utilidad han sido múltiples, incluso divergentes. Este artículo tiene como objetivo analizar los avances en esta nueva y activa área de trabajo, así como profundizar en la necesidad y factibilidad de incorporar el código de barras de ADN al estudio de la diversidad biológica en Cuba. Para esto, se valoran algunos aspectos conceptuales, ampliamente debatidos en la actualidad. Sin embargo, dado el carácter informativo del presente trabajo, no se profundiza en los métodos de análisis, ni en las disquisiciones relacionadas con el DNA barcoding y la problemática sobre la definición de especie.

El código de barras de ADN

La base conceptual del código de barras de ADN radica en utilizar secuencias de fragmentos de genes conservados para identificar especies, sobre la base de un conocimiento taxonómico bien sustentado (Hebert *et al.*, 2003a). Su aplicación sea poya en que la variación dentro de las especies es poca con respecto a la variación existente entre estas. Razón por la cual la determinación de la diversidad intraespecífica puede sustentarse en un tamaño de muestra pequeño, siempre y cuando la muestra comprenda un grupo representativo de las subpoblaciones. Para ello deben tenerse en cuenta, de manera primordial, las variaciones geográficas y fenotípicas (Moritz y Cicero, 2004; Dasmahapatra y Mallet, 2006).

Para implementar el código de barras de ADN es

imprescindible contar con una base de datos homogénea que recopile toda la información existente acerca de las especies. Debe incluir su descripción morfológica y ecológica, así como las secuencias nucleotídicas de los mismos genes para todas. Esta base de datos tiene que ser de uso libre para toda la comunidad científica, así como para personas no expertas (Rubinoff, 2006).

En la figura 1 se esquematiza la metodología del código de barras de ADN. El material biológico, como en muchos estudios moleculares, no se restringe a individuos adultos, sino que cualquier ejemplar, independientemente de su etapa de desarrollo orgánico, puede ser analizado. La obtención de las secuencias y del perfil de barcoding es un proceso de trabajo común en los estudios de taxonomía molecular. Una vez que se ha generado la información, se procede a interpretar y determinar la identidad de la especie; para ello, las secuencias obtenidas se comparan con las disponibles en las bases de datos ya existentes –por ejemplo, Gene-Bank–. De manera general, este procedimiento es muy sencillo. Consiste en alinear las secuencias, calcular las distancias moleculares –por ejemplo, k2P (Kimura, 1980) – entre los taxones, y estimar los porcentajes de divergencia, que establezcan los límites, entre las especies analizadas. Las divergencias nucleotídicas entre las secuencias varían en dependencia del género que se esté analizando.

Por ejemplo, para estomatópodos, lepidópteros y aves se ha estimado un máximo de divergencia, dentro de un mismo clado, de un 3 %; y un mínimo de un 6 % de divergencia entre clados (Hebert *et al.*, 2003b, 2004a, b; Barber y Boyce, 2006). Indiscutiblemente, solo un fundamento taxonómico sólido permite determinar dichos límites, sin ambigüedad, en una primera etapa de trabajo.

El análisis de las secuencias pertenecientes a muestras que no han sido identificadas a priori, comienza con una búsqueda en las bases de datos. Para ello se emplean algoritmos informáticos como el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990), que permiten estimar niveles de similitud, tanto local como global, a partir del alineamiento de las secuencias. Sin embargo, los resultados del BLAST solo constituyen hipótesis de relaciones, establecidas sobre la base de la similitud entre las secuencias. Por esta razón, la muestra problema no puede ser identificada hasta estimar los niveles de divergencia de su secuencia con respecto a las de los taxones más cercanos,

utilizando, por ejemplo, distancias moleculares (Hebert *et al.*, 2003a, b).

Alternativamente se ha propuesto el análisis directo de caracteres –análisis de agregación poblacional (PAA) (Davis y Nixon, 1992)– y, recientemente, el uso de pruebas de discriminación estadística, basadas en la teoría de la coalescencia (Rosenberg, 2007; Tavares y Baker, 2008).

Si la muestra se ubica dentro de un grupo monofilético, del cual forma parte una de las secuencias de referencia, se considera que ha sido asignada eficientemente a esa especie. En el caso contrario, es necesario proceder con la identificación taxonómica tradicional –variante reconocida como taxonomía reversa (Markmann y Tautz, 2005).

Ni la tecnología ni el fundamento del código de barras de ADN son novedosos, si se tienen en cuenta los avances mostrados por la taxonomía molecular durante las últimas décadas (Moritz y Cicero, 2004; Rubinoff, 2006). Sus aportes radican, principalmente, en la estandarización de los marcadores utilizados, aspecto preconizado con anterioridad por Caterino *et al.* (2000), así como en la optimización de la obtención de datos, como resultado del proceso de estandariza-

ción. No obstante, la utilización de secuencias cortas de ADN para reconocer especies constituye el punto neurálgico de discusión entre los especialistas.

El genoma mitocondrial posee una serie de características que hacen de sus genes los candidatos más factibles para analizar las diferencias entre especies cercanas. El número de copias de este genoma, en una célula somática, es mayor que el del ADN nuclear (Birky *et al.*, 1982); ello facilita la obtención de material genético a partir de pequeños fragmentos de muestras, incluso degradadas. Por otra parte, exhibe una tasa de evolución mayor que la del genoma nuclear y se hereda de forma uniparental, lo cual reduce el tamaño efectivo de la población y determina que las diferencias entre linajes evolutivos independientes puedan detectarse antes que en el genoma nuclear. Esto último permite que, aun con secuencias relativamente pequeñas, se puedan delimitar las especies (Hebert *et al.*, 2003b). Por último, los genes mitocondriales carecen de secuencias intragénicas no codificadas (intrones) y no sufren recombinación, características estas que facilitan la amplificación de las regiones de interés (Saccone *et al.*, 1999).

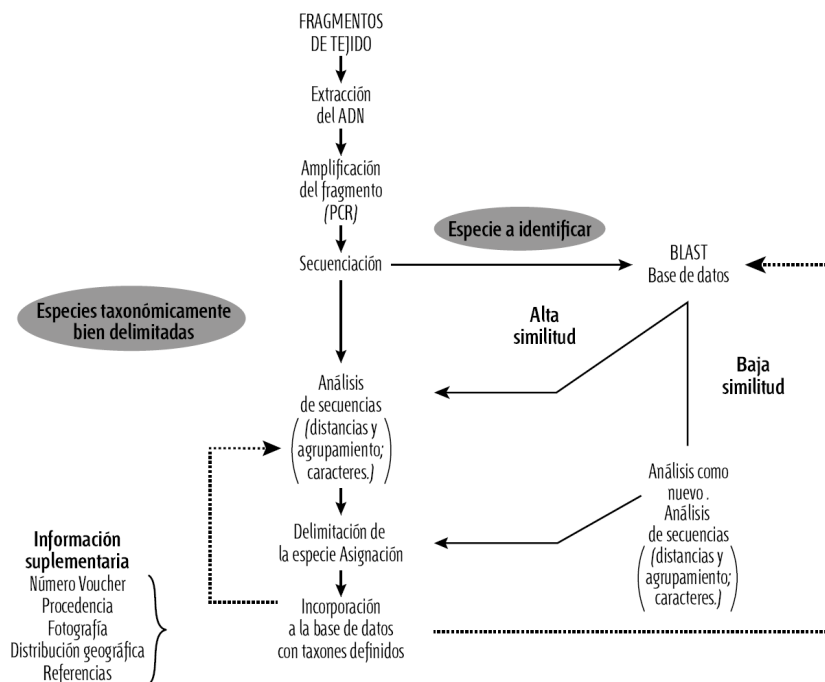


Figura 1. Esquema del sistema propuesto para el código de barras de ADN.

Figure 1. Diagram of the proposed system for DNA barcoding.

El gen mitocondrial que codifica para la proteína citocromo oxidasa I (Col) fue el primero en ser evaluado como marcador o código de barras y su uso se ha difundido rápidamente (Hebert *et al.*, 2003a, b; 2004a, b; Blaxter *et al.*, 2005; Barber y Boyce, 2006; Pfenninger *et al.*, 2007; Hubert *et al.*, 2008; Tavares y Baker, 2008). El éxito de este gen radica en el empleo de oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias altamente conservadas, con los que se pueden obtener amplificaciones de su región 5' (ca. 650pb) en prácticamente todos los phyla de animales; y en que muestra un mayor rango de información filogenética que otros genes mitocondriales —el balance de las posiciones nucleotídicas, conservadas y variables, permite distinguir entidades taxonómicas con diferentes niveles de divergencia evolutiva (Hebert *et al.*, 2003a; Barber y Boyce, 2006; Hubert *et al.*, 2008)—. Otros dominios de este mismo gen también han sido valorados para el análisis de algunos grupos taxonómicos con el objetivo de encontrar mayor variabilidad, tal sucede para Anthozoa y Porifera (Erpenbeck *et al.*, 2006).

Alternativamente, para afrontar los problemas derivados del análisis de ciertos grupos de animales y plantas, se han utilizado otros genes, entre los que se encuentran: las subunidades pequeña y grande del ARN ribosomal nuclear (nSSU y 18S) (Blaxter *et al.*, 2005; Markmann y Tautz, 2005; Caterino y Tishechkin, 2006) como datos complementarios a la información recopilada del Col; algunos intrones (ITS) (Blaxter *et al.*, 2003; Chase *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2005), principalmente en especies de plantas para las cuales aún no se ha podido estandarizar el uso de un fragmento de gen en particular; y otros genes mitocondriales como la subunidad 16S del ARN ribosomal (Vences *et al.*, 2005; Steinke *et al.*, 2005) que, a pesar de las dificultades para el alineamiento de sus secuencias, debido a la presencia de inserciones y deleciones (indels), han sido considerados tan o más útiles que el Col.

Aportes del código de barras de ADN

Hasta el presente, el código de barras de ADN ha permitido asignar acertadamente individuos a diferentes táxones como aves, moluscos, peces marinos y dulceacuícolas, insectos, crustáceos y primates (Hebert *et al.*, 2003a, b; Hebert *et al.*, 2004a, b; Lee y Foighil, 2004; Ward *et al.*, 2005; Barber y Boyce, 2006; Hajibabaei *et al.*, 2006b, c; Hubert *et al.*, 2008), a la especie correspondiente. De igual manera ha sido

empleado con éxito para catalogar especies extintas o procedentes de colecciones (Hajibabaei *et al.*, 2006a), para realizar estudios forenses (Nelson *et al.*, 2007), para detectar la presencia de especies reguladas por el mercado, en alimentos en conserva o procesados (Smith *et al.*, 2008; Yancy *et al.*, 2008) y para el control de especies invasoras (Chown *et al.*, 2008).

La generación de datos moleculares con esta metodología ha permitido develar especies crípticas en diferentes grupos taxonómicos. Tal es el caso de la mariposa *Astrartes fulgerater* que, considerada anteriormente como una sola especie, comprende un complejo de especies diferenciadas solamente por la apariencia de sus larvas, alimentos y hábitat (Brower, 2006); las moscas de la familia Tachinidae, formadas por grupos de especies crípticas hospedero-específicas (Smith *et al.*, 2006); el género *Halys* (heteroptera) cuyas especies presentan diferencias en ciertos caracteres morfológicos, que permanecen prácticamente invariables dentro del género (Memon *et al.*, 2006); y la especie de briozoo *Celleporella hyalina* que comprende varias líneas genéticas aisladas reproductivamente, a pesar de ser similares morfológicamente (Gómez *et al.*, 2007), entre otros ejemplos.

Los aportes del código de barras de ADN se han extendido al análisis del contenido estomacal y de las excretas (Pons, 2006), lo cual permite evaluar las características de la dieta de las especies durante sus diferentes ciclos de vida. Igualmente, ha sido utilizado para identificar especies cuyos estadios larvales son difíciles de reconocer con métodos tradicionales: mariposas (Janzen *et al.*, 2005), anfibios (Vences *et al.*, 2005) y crustáceos (Blaxter *et al.*, 2003), así como en insectos con conductas sociales complejas, donde las diferentes castas distan morfológicamente (Smith *et al.*, 2006).

Por otra parte, al proveer un sistema factible para la evaluación rápida de la biodiversidad y la identificación de productos y especies importadas o exportadas de manera ilegal (DeSalley Amato, 2004), reporta gran utilidad para el desarrollo de la biología de la conservación. Uno de los desafíos que enfrenta esta rama de la biología consiste en establecer las unidades para la conservación. En este sentido, la información que puede brindar el código de barras de ADN, con respecto a las especies existentes, la cantidad de ejemplares y su distribución geográfica, es fundamental para desarrollar estudios que permitan esclarecer la estructura y diversidad genética, así como los patro-

nes de migración y conectividad de las poblaciones que habitan diferentes zonas geográficas. Teniendo en cuenta el cúmulo de datos que se generan a partir de la aplicación del código de barras de ADN, los análisis no se restringirían al estudio de una o pocas especies, sino que permitirían analizar de forma global la evolución de las regiones que se quieren conservar. Estos aspectos son relevantes para desarrollar planes de manejo y conservación estratégicos, establecer áreas protegidas y dictar medidas para la explotación racional de las especies que tienen importancia desde el punto de vista comercial. A su vez, esta información permitiría evaluar la efectividad de las áreas protegidas y monitorear los efectos de los esfuerzos de conservación.

Limitaciones del código de barras de ADN

La posible utilidad y prioridad que se ha dado al código de barras de ADN por parte de varias instituciones ha generado un debate crítico, liderado fundamentalmente por taxónomos, similar al acontecido como resultado de la incorporación de los caracteres moleculares a la taxonomía y la aplicación de métodos estadísticos a la reconstrucción filogenética (Hillis *et al.*, 1994; Brower *et al.*, 1996; Felsenstein, 2004).

A pesar de las ventajas que muestra el ADN mitocondrial (ADNmt) como marcador molecular, su uso no está exento de dificultades (Ballard y Whitlock, 2004). En primer lugar, la ausencia de recombinación, excepto en hongos y plantas, propicia que cualquier afectación sobre una parte de la molécula influya sobre el resto del mitogenoma (Avice, 2004; Moritz y Cicero, 2004). Por otra parte, existen numerosos ejemplos de hibridación introgresiva —transferencia de genes de una especie a otra— (Ferris *et al.*, 1983; Avice y Saunders, 1984; Ballard, 2000; Verardi *et al.*, 2006), aspecto difícil de discriminar si no se realiza un análisis amplio de caracteres diagnósticos. Tampoco se puede descartar la transferencia horizontal de genes entre especies alejadas filogenéticamente (Graur y Li, 2000). Estos elementos pudieran interferir indudablemente con la asignación correcta de las especies.

Como hemos mencionado con anterioridad —contrariamente a la práctica taxonómica actual que requiere la integración de la información proveniente de diferentes caracteres (morfológicos, ecológicos, y de múltiples loci independientes) (Brower *et al.*, 1996; Avice, 2004)—, Hebert *et al.* (2003a) proponen utilizar un fragmento de un gen mitocondrial como fuente de información para identificar especies. Por esta razón

la utilidad del código de barras de ADN, para la descripción de especies nuevas, ha sido cuestionada considerablemente (Tautz *et al.*, 2003; Blaxter, 2004; Vences *et al.*, 2005; DeSalle, 2006; Cognato, 2006; Rubinoff, 2006). Lógicamente, uno de los argumentos esgrimidos es que el número de genes y la longitud de las secuencias empleadas son insuficientes para definir los límites entre especies. Sin embargo, se han realizado estudios que demuestran, convincentemente, la eficacia del método para catalogar especies identificadas previamente mediante criterios taxonómicos tradicionales (Roca *et al.*, 2001; Hebert *et al.*, 2004b; Blaxter *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006; Proudlove y Wood, 2006; Witt *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2007).

Algunos autores consideran que la mayoría de los estudios realizados para asignar individuos a especies conocidas han subestimado la variación intraespecífica, al analizar pocos individuos y no considerar el rango de distribución de la especie. Además, han sobreestimado la variación interespecífica, al no incluir especies cercanas en el análisis (Dasmahapatra y Mallet, 2006; Hickerson *et al.*, 2006). Estos criterios ponen de manifiesto que la aplicación exitosa del código de barras de ADN requiere un muestreo exhaustivo que abarque íntegramente el rango de distribución geográfica de las especies, y que se tengan en cuenta el tamaño de la muestra y la representatividad taxonómica dentro del género que se esté analizando; de forma tal que quede registrada toda la variación existente dentro de la especie, y se asegure que los taxones potencialmente hermanos puedan ser evaluados y discriminados.

La metodología empleada para interpretar el código de barras de ADN, una vez que ha sido generado, también se ha cuestionado. La mayoría de los artículos publicados emplean métodos de estimación de distancias para delimitar las especies (Hebert *et al.*, 2003a, b; 2004a, b; Blaxter *et al.*, 2005; Barber y Boyce, 2006; Pfenninger *et al.*, 2007; Hubert *et al.*, 2008; Tavares y Baker, 2008). Sin embargo, el establecimiento de valores de distancia evolutiva ($k2P$) entre taxones que puedan ser utilizados de manera estándar se dificulta, porque no se tienen en cuenta las posibles variaciones en el tiempo de ancestría común entre especies hermanas, y las diferencias existentes entre las tasas de evolución de los linajes (DeSalle *et al.*, 2005; Meyer y Paulay, 2005). Si el análisis se realiza solamente sobre la base de árboles reconstruidos a

partir de distancias (Rosenberg, 2007), ambos aspectos contribuyen con la identificación errónea de grupos recíprocamente monofiléticos, aun con altos valores de robustez.

Algunos autores plantean que para interpretar el código de barras es preferible emplear el análisis directo de caracteres (DeSalle *et al.*, 2005). Según ellos, el análisis de caracteres tiene la ventaja de que, cuando no hay caracteres diagnósticos, las entidades analizadas se consideran parte de un solo linaje evolutivo; mientras que los métodos de distancia carecen de criterios objetivos para delinear los táxones —por ejemplo, debido al amplio rango de superposición entre las distancias inter- e intraespecíficas, no existe un valor límite de similitud para determinar el estatus de la especie—. Por otra parte, el análisis de caracteres es compatible con los métodos clásicos que integran la información ecológica y morfológica. No obstante, su factibilidad es discutible si se tiene en cuenta que el número de caracteres a analizar es pequeño. Indiscutiblemente, para el desarrollo futuro del código de barras de ADN es ineludible utilizar métodos estadísticos que permitan valorarla incertidumbre concerniente a las inferencias realizadas (Tavares y Baker, 2008). Dicha incertidumbre se debe al carácter estocástico de las genealogías intraespecíficas y a las posibilidades de encontrar polimorfismo ancestral, como resultado del reordenamiento alélico inconcluso en especies que han divergido recientemente.

Algunos autores han enfatizado que los datos utilizados en el código de barras de ADN son insuficientes para realizar inferencias filogenéticas (Willy Rubinoff, 2004; Will *et al.*, 2005; Brower, 2006), y que deben ser suplementados con secuencias de genes nucleares. Efectivamente, tienen razón, pero han malinterpretado el verdadero objetivo del sistema propuesto, probablemente por el uso de árboles (Neighbor Joining) en los trabajos publicados. El código de barras de ADN no pretende establecer relaciones genealógicas lejanas, sino delimitar especies, y se auxilia de árboles solo para ilustrarlos grupos obtenidos. El uso de genes nucleares puede contribuir, con una valiosa información, en aquellos casos donde el ADNmt no sea resolutivo (Dasmahapatra y Mallet, 2006).

Independientemente de las limitantes señaladas, se ha demostrado que el código de barras de ADN es un sistema apropiado para la identificación de especies y para revelar especies crípticas (Roca *et al.*, 2001; Herbert *et al.*, 2004b; Lee y Foighil, 2004; Blaxter *et al.*,

2005; Ward *et al.*, 2005; Barber y Boyce, 2006; Gómez *et al.*, 2007; Hajibabaei *et al.*, 2006b, c; Proudlove y Wood, 2006; Smith *et al.*, 2006; Witt *et al.*, 2006; Hubert *et al.*, 2008). La iniciativa ha ido ganando aceptación gradualmente en la comunidad científica, lo cual se evidencia en el número creciente de publicaciones anuales y el número de especies incluidas en las bases de datos —hasta el 5 de mayo del 2008: 38 572 especies, según www.barcodinglife.org.

¿Código de barras de ADN en Cuba?

Uno de los mayores retos de la taxonomía consiste en cuantificar la diversidad biológica del trópico. Las Antillas figuran entre los cinco *hotspots* de biodiversidad más importantes del planeta, y uno de estos se encuentra en el archipiélago cubano. Cuba posee la mayor diversidad marina del Caribe insular, tanto desde el punto de vista ecológico, como a nivel de especies, y el doble de las especies de plantas exclusivas necesarias, para figurar como *hotspot* (Fontenla, 2007).

A este escenario contribuyen el origen paleogeográfico, así como la complejidad geomorfológica de nuestro archipiélago (Iturralde-Vinent, 2006). Estos han favorecido el desarrollo de diferentes ecosistemas que han influido, de manera determinante, sobre los patrones de distribución y dispersión de las especies a lo largo de su evolución. Al respecto existen numerosos ejemplos, entre los que se pueden citar los estudios de especiación en hormigas del género *Macromischa* (Fontenla, 2004), en lagartos del género *Anolis* (Glor *et al.*, 2004), la familia *Capromyidae* (Woods *et al.*, 2001) y las leguminosas (Lavin *et al.*, 2001).

La gran diversidad de especies marinas y terrestres que habitan el archipiélago cubano, junto al alto grado de endemismo que caracteriza la biota insular, hacen que nuestra isla sea objeto de gran interés para el desarrollo de la taxonomía molecular y la implementación del código de barras. Durante varios años se han dedicado esfuerzos a la documentación de la diversidad de la flora y fauna a todo lo largo de la isla; ejemplos de esto lo constituyen el Estudio nacional sobre la diversidad biológica en la República de Cuba (Vales-García *et al.*, 1998) y la Estrategia nacional para la diversidad biológica y plan de acción en la República de Cuba (Vilamajó *et al.*, 2002). No obstante, los recursos, tanto humanos como materiales y el tiempo necesarios para realizar este inventario en un lapso

relativamente corto, son limitados.

Aunque los resultados son alentadores, queda un largo camino por recorrer. Particularmente, en el ambiente marino se han registrado alrededor de 9 000 especies, de las cuales el 30 % se encuentra sin inventariar (Espinosa y Ortea, 2007). Inclusive, los especialistas suponen que el desconocimiento de la flora y fauna marina sea aún mayor, si se consideran grupos poco conocidos, como es el caso de hongos, bacterias, protozoos y nemátodos. Esta situación también se observa en numerosos grupos que constituyen la meiofauna (Claro, 2006). Otro grupo, extremadamente diverso y ampliamente distribuido en nuestro país, es el de los insectos. Dentro de este se han descrito un poco más de 8 200 especies; sin embargo, se estima que el número real puede ser tres veces superior (De Armas, 2007).

El conocimiento recopilado a partir de los trabajos de sistemática y taxonomía desplegados en nuestro país constituye un magnífico punto de partida para el desarrollo de una base de datos molecular que contribuya con el desempeño de investigaciones, encaminadas a profundizar en el conocimiento de nuestra naturaleza, como son los estudios genético-poblacionales, biogeográficos, filogeográficos y evolutivos. Los resultados que se logren contribuirán a interpretar el pasado y el presente de la diversidad biológica en Cuba, así como prever cuáles son las especies y ecosistemas que requieren de mayor atención para la conservación. Solamente resta coordinar esfuerzos, entre especialistas e instituciones, para alcanzar este objetivo común.

LITERATURA CITADA

- Altschul, S.F. *et al.* (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403 - 410.
- Avise, J.C. (2004): *Molecular markers, natural history, and evolution*, Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Avise, J.C. y N.C. Saunders (1984): Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers», *Genetics*. 108: 237-255.
- Baillie, J. E. M.; C. Hilton-Taylor y S.N. Stuart (Eds.) (2004): *2004 IUCN red list of threatened species*. A *global species assessment*, IUCN, Gland, Suiza y Cambridge (Reino Unido).
- Ballard, J. W. O. (2000): When one is not enough: introgression of mitochondrial DNA in *Drosophila*, *Molecular Biology and Evolution* 17(7): 1126–1130.
- Ballard, J. W. O. y M. Whitlock (2004): The incomplete natural history of mitochondria, *Molecular Ecology*. 13: 729–744.
- Barber, P.; S.L. Boyce (2006): Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae, *Proceedings of the Royal Society of London*. 273: 2053-2061.
- Bellwood, D.R.; T.P. Hughes; C. Folke y m. Nystrom (2004): Confronting the coral reef crisis, *Nature*. 429: 827-833.
- Birky, C.W.; A.R. Acton; R. Dietrich y m. Caven(1982): mitochondrial transmission genetics: replication, recombination and segregation of mitochondrial DNA and its heritage in crosses, *Mitochondrial Genes*. pp. 333-348.
- Blaxter, M. L. (2004): The promise of a molecular taxonomy, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 359: 669-679.
- Blaxter, M. L.; B. Elsworth y J. Daub (2003): DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades, *Biology Letters*. 271: 189-192.
- Blaxter, M. L.; B. Elsworth y J. Daub *et al.* (2005): Defining operational taxonomic units using DNA barcode data, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 360: 1935-1943.
- Brower, A.V.Z. (2006): Problems with DNA barcodes for species delimitation: “ten species” of *Astraptus fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperiiidae), *Systematics and Biodiversity*. 4: 127-132.
- Brower, A.V.Z.; R. De Salle y A. Vogler (1996): Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective, *Annual Review of Ecology and Systematics*. 27: 423-450.
- Caterino, M. S. y A. K. Tishechkin (2006): DNA identification and morphological description of the first confirmed larvae of Heteriinae (Coleoptera: Histeridae). *Systematic Entomology*. 31(3): 405-418.

- Caterino, M. S.; S. Cho y F.A.H. Sperling (2000): The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel, *Annual Review of Entomology*. 45: 1-54.
- Chase, M. W. *et al.* (2005): Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 360: 1889-1895.
- Chown, S. L.; B. J. Sinclair y B. Jansen van Vuuren (2008): DNA barcoding and the documentation of alien species establishment on sub-Antarctic Marion Island, *Polar Biology*. 31: 651-655.
- Claro, R. (ed.) (2006): *La biodiversidad marina de Cuba* (CD-Rom), Instituto de Oceanología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Ciudad de La Habana.
- Cognato, A. I. (2006): Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries, *Journal of Economic Entomology*. 99 (4): 1037-1045.
- Dasmahapatra, K.K. y J. Mallet (2006): DNA barcodes: recent successes and future prospects, *Heredity*. 97: 254-255.
- Davis, J. L. y K. C. Nixon (1992): Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species, *Systematic Biology*. 41(4): 421-435.
- De Armas, L.F. (2007): El mundo subterráneo. En: H. González (ed.), *Biodiversidad de Cuba*, Ediciones Polymita S.A., Guatemala. pp. 178-207.
- De Salle, R. (2006): Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff, *Conservation Biology*. 20(5): 1545-1547.
- De Salle, R. y G. Amato (2004): The expansion of conservation genetics, *Nature Reviews Genetics*. 5: 702-712.
- De Salle, R., G. Amato ; M.G. Egan y M. Siddall (2005): The unholy trinity: taxonomy, species delimitation, and DNA barcoding, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 360: 1905-916.
- Erpenbeck, D.; J.N.A. Hooper y G. Wörheide (2006): Co1 phylogenies in diploblasts and the "barcoding of life" - are we sequencing a suboptimal partition?, *Molecular Ecology Notes*. 6(2): 550-553.
- Espinosa J. y J. Ortea (2007): Biota marina. En: H. González (ed.), *Biodiversidad de Cuba*, Ediciones Polymita S.A., Ciudad de Guatemala. pp. 73-140.
- Felsenstein, J. (2004): *Inferring phylogenies*, Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Ferris, S.D. *et al.* (1983): Flow of mitochondrial DNA across a species boundary, *PNAS*. 80: 2290-2294.
- Fontenla, J. L. (2004): Evolución espacial en *Macromischa* (Hymenoptera, Formicidae), *Boletín de la S.E.A.* 34: 125-130.
- Fontenla, J. L. (2007): Islas, biodiversidad y cultura. En: H. González (ed.): *Biodiversidad de Cuba*, Ediciones Polymita S.A., Guatemala. pp. 18-35.
- Glor, R. E. *et al.* (2004): Partial island submergence and speciation in an adaptive radiation: a multi-locus analysis of the Cuban green anoles, *Proceedings of the Royal Society of London*. 271: 2257-2265.
- Gómez, A. *et al.* (2007): Mating trials validate the use of DNA barcoding to reveal cryptic speciation of a marine Bryozoan taxon, *Proceedings of the Royal Society of London*. 274: 199-207.
- Graur, D. y W.h. Li (2000): *Fundamentals of molecular evolution*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Hajibabaei, M.; G.A.C. Singer y D.A. Hickey (2006c): Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences, *Genome*. 49(7): 851-854.
- Hajibabaei, M.; G.A.C. Singer y D.A. Hickey *et al.* (2006a): A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*. 6(4): 959-964.
- Hajibabaei, M.; G.A.C. Singer y D.A. Hickey *et al.* (2006b): DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera, *PNAS*. 103(4): 971-968.

- Hebert, P. D. N.; S. Ratnasingham y J. R. de Waard. (2003b): Barcoding animal life: cytochrome coxide subunit 1 divergences among closely related species, *Proceedings of the Royal Society of London*. 270: 1-4.
- Hebert, P. D. N.; A. Cywinska, S.L. Ball y J.R. de Waard. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings of the Royal Society of London*. 270: 313-322.
- Hebert, P. D. N.; M. Stoekle, T. Zemplak y C. M. Francis (2004a): Identification of birds through DNA barcodes, *PLoS Biology*. 2: 1657-1668.
- Hebert, P. D. N.; et al. (2004b): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerater*, *PNAS*. 101(41): 12-17.
- Hickerson, M.J.; C.P. Meyer y C. Moritz (2006): DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space, *Systematic Biology*. 55: 729-739.
- Hillis, D. M., J. P. Huelsenbeck y C. W. Cunningham (1994): Application and accuracy of molecular phylogenies, *Science*. 264: 671-677.
- Hopkins, G.W. y R.P. Freckleton (2002): Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation, *Animal Conservation*. 5: 245-249.
- Hubert, N. et al. (2008): Identifying canadian freshwater fishes through DNA barcodes. Disponible en <<http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0002490>>.
- Iturralde-Vinent, M. (2006): Meso-Cenozoic Caribbean paleogeography: implications for the historical biogeography of the region, *International Geology Review*. 48: 791-827.
- Janzen, D.H. et al. (2005): Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 360: 1835-1845.
- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Biology*. 16: 111-120.
- Kress, W.J. et al. (2005): Use of DNA barcodes to identify flowering plants, *PNAS*. 102(23): 8369-8374.
- Lavin, M. et al. (2001): Identifying tertiary radiations of fabaceae in the greater Antilles: alternatives to cladistic vicariance analysis, *International Journal of Plant Science*. 162(6): 53-76.
- Lee, T. y D.o. Foighil (2004): Hidden floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene trees reveal four cryptic species within the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex, *Molecular Ecology*. 13(11): 27-42.
- Markmann, M. y D. Tautz (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*. 360: 1917-1924.
- Meyer, C.P. y G. Paulay (2005): DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling, *PLoS Biology*. 3(12): 2229-2238.
- Memon, N.; R. Meier; A. Manan y k.F.-y. Su (2006): on the use of DNA sequences for determining the species limits of a polymorphic new species in the stink bug genus *Halys* (Heteroptera: Pentatomidae) from Pakistan, *Systematic Entomology*. 31(4): 703-710.
- Moritz, C. y C. Cicero (2004): DNA barcoding: promise & pitfalls, *PLoS Biology*. 2(10), p. 354.
- Mullis, k. y F. Faloona (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology*. 155: 335-350.
- Nelson, L.A.; J.F. Wallman y M. Dowton (2007): Using Col barcodes to identify forensically and medically important blowflies, *Medical and Veterinary Entomology*. 21(1): 44-52.
- Pfenninger, M. et al. (2007): Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species, *Molecular Ecology*. 16: 1957-1968.

- Pons, J. (2006): DNA-based identification of preys from non-destructive, total DNA extractions of predators using arthropod universal primers, *Molecular Ecology Notes*. 6: 623-626.
- Proudlove, G. y P.J. Wood (2006): The blind leading the blind: cryptic subterranean species and DNA taxonomy, *Trends in Ecology and Evolution*. 18(6): 272-273.
- Roca, A. L.; N. Georgiadis; J. Pecon-Slattey y S. J. O'Brien (2001): Genetic evidence for two species of elephant in Africa, *Science*. 293: 1473 - 1477.
- Rosenberg, N.A. (2007): Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly, *Evolution*. 61(2): 317-323.
- Rubinoff, D. (2006): Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation, *Conservation Biology*. 20(4): 1026-1033.
- Saccone, C. *et al.* (1999): Evolutionary genomics in the metazoa: the mitochondrial DNA as a model system, *Gene*. 238: 195-210.
- Saiki, R. K. *et al.* (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, *Science*. 39: 487-491.
- Silva-Taboada, G.; W. Suárez y S. Díaz (2007): *Compendio de los mamíferos terrestres autóctonos vivos y extinguidos de Cuba*, Boloña, Friesens (Canadá).
- Smith, P.J.; S. M. McVeagh y D. Steinke (2008): DNA barcoding for the identification of smoked fish products, *Journal of Fish Biology*. 72(2): 464-471.
- Smith, M. A. *et al.* (2006): DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae), *PNAS*. 103(10): 3657-3662.
- Steinke, D.; m. Vences; W. Salzburger y A. meyer (2005): Taxl: a software tool for DNA barcoding using distance methods, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 360: 1975-1980.
- Tautz, D. *et al.* (2003): A plea for DNA taxonomy, *Trends in Ecology and Evolution*. 18: 70-74.
- Tavares, E.S. y A.J. Baker (2008): Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds, *BMC Evolutionary Biology*. 8, p. 81.
- Vales-García, M. A.; M. A. Álvarez; L. Montes y A. Ávila (eds.) (1998): *Estudio nacional sobre la diversidad biológica en la República de Cuba. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente*, Centro Nacional de Biodiversidad, Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA, Ciudad de La Habana.
- Vences, M. *et al.* (2005): Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians, *Frontiers in Zoology*. 2: 1-12.
- Verardi, A.; V. Lucchini y E. Randi (2006): Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis, *Molecular Ecology*. 15: 2845-2855.
- Vilamajó, A.D.; M.A. Vales-García; R.P. Capote-López y D. Salabarría-Fernández (2002): *Estrategia Nacional para la Diversidad Biológica y Plan de Acción en la República de Cuba*, PNUMA, CENBIO, IES, AMA, CITMA, Ciudad de La Habana.
- Ward, R.D. *et al.* (2005): DNA barcoding Australia's fish species, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 360: 1847-1857.
- Will, k.W. y D. Rubinoff (2004): myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification, *Cladistics*. 20: 47-55.
- Will, K. W.; B.D. Mishler y Q. D. Wheeler (2005): The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy, *Systematic Biology*. 54(5): 844-851.
- Wilson, E. O. (2003): The encyclopedia of life, *Trends in Ecology and Evolution*. 18: 77-80.
- Witt, J.; D.S. Threlloff; L. Doug y P.D.N. hebert(2006): DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation, *Molecular Ecology*. 15: 3073-3082.

Woods, C.A.; R. Borroto y C.W. Kilpatrick (2001): Insular patterns and radiation of West Indian rodents. En: C.A. Woods y F.E. Sergile (eds.) *Biogeography of the West Indies: New Patterns and Perspectives*, CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 333-351.

Yancy, H. F. *et al.* (2008): Potential use of DNA barcodes in regulatory science: applications of the regulatory fish encyclopedia, *Journal of Food Protection*. 71(1): 210-217.

