

FORO

Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología

LANTERI, Analía A.

División Entomología, Museo de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina; e-mail: alanteri@fcnym.unlp.edu.ar

DNA barcoding and its possible applications to the field of Entomology

■ **ABSTRACT.** This article deals with some of the most controversial issues of the DNA barcode initiative, focusing on its potential applications to Entomology. The barcoding proposes using information within the same gene region (Cytocrome c Oxidase I= COI mitochondrial gene), in all living species and under standard conditions of sequencing. At present, it does not attempt to replace alpha taxonomy or phylogeny, but to accelerate the task of identification, particularly, in the fields of Biomedicine (identification of pathogens, parasites and vectors), Pest Control (interception of all ontogenetic stages of alien invasive insects) and studies on Biodiversity Conservation. For an accurate delimitation of biological species, it is necessary to undertake exhaustive sampling of COI sequences along their geographical range, as well as to sequence nuclear genes, and to accomplish detailed morphological and biological information. The «Evolutionary Significant Units» based on «DNA barcoding» might correspond to morphospecies, cryptic species, subspecies or lineages with different host preferences. The integration of «DNA barcode», field work, collections of museums and scientific research are essential for this tool to make a fruitful impact on the field of Systematic Entomology.

KEY WORDS. DNA. Barcoding life. Entomology. Systematics.

■ **RESUMEN.** En este artículo se abordan algunos aspectos de la controversia sobre la iniciativa «Código de barras del ADN», y se hace hincapié en sus potenciales aplicaciones en Entomología. Esta iniciativa propone emplear información dentro de una misma región génica (gen mitocondrial de la Citocromo c Oxidasa I = COI), en todas las especies vivientes y con condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas. En la actualidad, no pretende sustituir la taxonomía alfa y la filogenia sino agilizar las tareas de identificación, especialmente en el campo de la Biomedicina (identificación de patógenos, parásitos y vectores), el control de plagas (intercepción de especies invasoras, cualquiera sea su estado de desarrollo ontogenético) y los estudios sobre conservación de la biodiversidad. Para arribar a una correcta delimitación de las especies biológicas es preciso contar con las secuencias de COI de numerosos individuos a lo largo de todo su rango geográfico y además, secuencias de genes nucleares e información morfológica y biológica detallada. Las «Unidades Evolutivas Significativas», identificadas sobre la base del «código de barras», podrían corresponder tanto a morfoespecies como a especies crípticas y a subspecies o linajes con diferentes preferencias de huéspedes. La integración del «código de barras del ADN», el trabajo de campo, las colecciones de museos y la investigación científica resultan imprescindibles para que esta herramienta redunde en avances significativos en el campo de la Sistemática Entomológica.

PALABRAS CLAVE. ADN. Código de barras. Entomología. Sistemática.

Recibido: 2-IV-2007; aceptado: 17-V-2007

INTRODUCCIÓN

La primera conferencia internacional sobre «Barcoding life» tuvo lugar en el «Natural History Museum» de Londres en el año 2005 y contó con la participación de 200 científicos de 50 países aproximadamente (Marshall, 2005). El objetivo fue proponer un sistema basado en secuencias del ADN para identificar organismos vivos y así, brindar soporte a los programas de investigación sobre biodiversidad. Se discutió acerca de los marcadores moleculares más útiles en taxonomía y las dificultades para asignar nombres científicos a las entidades biológicas definidas mediante este tipo de evidencias.

Un grupo de científicos de la «University of Guelph», Canadá, propuso usar una secuencia de unos 500 nucleótidos del gen mitocondrial de la Citocromo c Oxidasa I (COI), como «identificador universal» para especies animales (Hebert *et al.*, 2003 a, b) en analogía con los «códigos de barras» de uso comercial. Para poner en marcha la iniciativa era necesario disponer de un sistema que relacionara cada «barcode» o «secuencia de ADN diagnóstica» con especímenes de referencia o «vouchers», asignados a nombres de la clasificación linneana, depositados en instituciones científicas. Este sistema significó un avance notable con respecto a los estándares taxonómicos empleados por «GenBank» dado que una gran parte de los 40 millones de secuencias acumuladas en dicha base desde 1982 (el 90% en los últimos cinco años), no cuenta con «vouchers» de los ejemplares estudiados (Smith, 2005).

En el año 2004 se creó la secretaría del «Barcode of Life» en el «National Museum of Natural History», Washington DC, USA, y el «Consortium for the Barcode of Life» (CBOL) al cual se unieron numerosos museos de historia natural, herbarios y organizaciones científicas de diferentes países (www.barcodinglife.si.edu). Entre los megaproyectos internacionales, que proponen emplear el código de barras del ADN para identificar especies de grandes grupos taxonómicos, cabe citar el *FISH-BOL* (www.fishbol.org) cuyo objetivo es obtener el «DNA barcoding» de todas las especies

de peces; el *ABBI* (www.barcodingbirds.org) referido a aves y el «All Lep Barcode of life» (www.lepbarcoding.org) cuya finalidad es obtener el código de barras de las 180.000 especies conocidas de Lepidoptera. En lo que respecta a la identificación de especies invasoras y plagas, cabe citar el *INBIPS* o «International Network for Barcoding Invasive and Pest species» (www.barcoding.si.edu/INBIPS.htm).

Los defensores de la iniciativa «Código de barras del ADN» sostienen que ésta facilitará la tarea de identificación de especies y contribuirá a revitalizar las colecciones biológicas, así como a acelerar el inventario de la biodiversidad (Gregory, 2005; Hebert & Gregory, 2005; Schindel & Miller, 2005). Sus opositores, en cambio, señalan que terminará por destruir la sistemática tradicional (Ebach & Holdrege, 2005) y que su eficiencia para identificar y delimitar especies es muy relativa (Lipscomb *et al.*, 2003; Wheeler, 2004). También se discute si la prioridad en la asignación de recursos económicos para investigación en Sistemática Biológica deberían tenerla los programas para el entrenamiento de taxónomos y el desarrollo de una infraestructura electrónica, en el contexto de revisiones y monografías taxonómicas (e.g. PEET= «Partnerships for Enhancing Expertise in Taxonomy»; www.nhm.ku.edu/peet), o la iniciativa «DNA Barcode» (Smith, 2005; Cameron *et al.*, 2006).

En este artículo se abordarán algunos de los aspectos más controvertidos de la iniciativa «Código de barras del ADN» enfatizando sus potenciales usos en el área de la Sistemática Entomológica.

DISCUSIONES SOBRE EL «CÓDIGO DE BARRAS DEL ADN»

Algunas de las discusiones principales sobre el «DNA barcoding» giran en torno a las siguientes preguntas: ¿Es posible identificar todas las especies vivientes empleando sólo una corta secuencia de ADN? ¿Cuál es la importancia del código de barras en la delimitación y reconocimiento de nuevas especies? ¿Qué metodologías de análisis de secuencias emplean los usuarios del

«barcode»? ¿Qué impacto tiene la iniciativa del «Código de Barras del ADN» sobre el desarrollo de la Sistemática actual?

Identificación de especímenes

La idea de emplear secuencias de ADN particulares para la identificación rápida de especímenes no es fundamentalmente nueva (Moritz & Cicero, 2004). Antes de la implementación del «código de barras del ADN», diferentes genes o fragmentos de genes y varias técnicas moleculares han sido utilizadas para identificar especies, por ejemplo: PCR específicas para especies invasoras (IAS= «Invasive Alien Species»), PCR-RFLP («Restriction Fragment Length Polymorphism») o secuencias de ADN características de especies plaga (Liu, 2004; Brown *et al.*, 2002; Brunner *et al.*, 2002). Lo innovador de la iniciativa «DNA barcoding» es que ha propuesto usar información dentro de una misma región génica, en todos los taxones y con condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas, y ha destacado la necesidad de relacionar esta información con ejemplares «vouchers» depositados en museos.

La pretensión de universalidad del «DNA barcoding» es controvertida, pues en ciertos grupos taxonómicos como las plantas superiores, COI es altamente invariante y por lo tanto no permite identificar especies (Moritz & Cicero, 2004). Para ello, se deben emplear genes de plástidos (e.g. *rbcl*, *ndhF*) o de ADN ribosomal nuclear (e.g. ITS) (Chase *et al.*, 2005). Asimismo, en varios grupos de animales, hongos y algas, COI es insuficiente para distinguir especies y es preciso secuenciar genes nucleares (Markmann & Tautz, 2005; Saunders, 2005), o resulta imposible emplear COI, pues dichos organismos carecen de mitocondrias (e.g. los microsporidios).

El «DNA barcoding» tiene gran aceptación entre los especialistas en virus, bacterias, protistas y hongos, organismos cuya determinación sobre la base de morfología resulta particularmente dificultosa (Holmes, 2004). En estos casos, constituye una herramienta que facilita la identificación de especies conocidas en el campo de

la Biomedicina, tales como patógenos, parásitos y vectores. También ha resultado de utilidad para la identificación de nemátodos intersticiales de suelo y sedimentos (De Ley *et al.*, 2005) y en ciertas investigaciones en el campo de la Ecología y la Biología de la conservación, como por ejemplo los inventarios rápidos de biodiversidad para estudios de impacto ambiental, la detección del tráfico de especies en vías de extinción o la identificación de especies plagas y sus parasitoides (Colwell & Coddington, 1994; Myers *et al.*, 2000).

Otro de los aspectos positivos de la iniciativa «barcode» es que posibilita la asociación de los distintos estados de desarrollo ontogenético de la misma especie. En insectos holometábolos el hallazgo de huevos, larvas y pupas disociados de los ejemplares adultos difícilmente permite una adecuada identificación, por lo que el «DNA barcoding» constituye una herramienta de gran utilidad para interceptar especies invasoras, que pueden transformarse en plagas en diferentes países (Armstrong & Ball, 2005).

En síntesis, el código de barras del ADN resulta de gran utilidad para la identificación de especies pertenecientes a taxones difícilmente diagnosticables sobre la base de morfología y también para grupos de organismos, como por ejemplo las aves, cuyos problemas taxonómicos fundamentales han sido resueltos convenientemente por los especialistas (Kerr *et al.*, 2007).

Delimitación de especies

La delimitación de las especies requiere de un adecuado muestreo, capaz de poner en evidencia la variación local y las conclusiones con respecto a la separación entre poblaciones y grupos de poblaciones (Davis & Nixon, 1992). Si el muestreo es insuficiente, tanto los análisis basados en los datos morfológicos como aquéllos que emplean datos moleculares, suelen conducir a resultados erróneos.

En estudios destinados a poner a prueba la eficiencia del código de barras para la delimitación de especies, se deben analizar al menos 10 individuos por muestra poblacional,

para evaluar convenientemente la variación de haplotipos a nivel intraespecífico. La mayoría de las investigaciones realizadas hasta el presente, no incluyen muestreos exhaustivos que permitan analizar la variación de cada especie a lo largo de todo su rango geográfico, por lo que en ciertos casos resulta aún prematuro realizar una valoración sobre la utilidad del código de barras para la correcta identificación de dichos taxones (Lipscomb *et al.*, 2003; Wheeler, 2004; Hickerson *et al.*, 2006).

La delimitación de especies es un problema sistemático complejo, que no se reduce a la identificación de grupos de individuos con secuencias de ADN similares, sino que presupone la evaluación de numerosos atributos (moleculares, morfológicos y biológicos) y la aplicación de un determinado concepto de especie (morfológico, biológico, filogenético, evolutivo, cladístico, etc.) (Lanteri, 1995; Lanteri *et al.*, 2006). Dado que los límites entre dichas entidades biológicas son generalmente difusos y difíciles de establecer, no sería correcto adoptar decisiones definitivas sobre la evidencia aportada por un sólo gen (Green, 1996; Will *et al.*, 2005). Por ello la iniciativa «DNA barcode» no persigue actualmente el objetivo de delimitar especies, sino que está orientada principalmente a la identificación de organismos y grupos de organismos.

En cuanto a los niveles de divergencia molecular entre linajes definidos en base a secuencias de COI, resultan de gran utilidad para formular hipótesis y orientar futuras investigaciones en el campo de la sistemática. Por ejemplo, si la divergencia a nivel molecular no está acompañada por una diferenciación morfológica suficiente, pero se asocia con distintas preferencias de huéspedes u otros atributos biológicos, es posible que los linajes reconocidos correspondan a especies crípticas dentro de una misma morfoespecie, o a complejos de especies próximas con características biológicas distintivas (Hebert *et al.*, 2004a). En investigaciones subsecuentes deberían ponerse a prueba las hipótesis previamente formuladas (Baker *et al.*, 2003; McGovern & Hellberg, 2003).

En el caso de complejos de varias especies afines o de especies ampliamente distribuidas y con gran variación intra e interpoblacional, es conveniente emplear marcadores nucleares además del COI, que permitan investigar eventos de introgresión, hibridación y especiación incompleta. Los marcadores mitocondriales son insuficientes para este tipo de estudios, pues evidencian sólo la mitad de la historia evolutiva de la especie ya que se heredan uniparentalmente por vía materna (Lanteri & Confalonieri, 2003).

En lo que respecta a la relación entre niveles de divergencia genética y su significación taxonómica, los defensores del «DNA barcode» han propuesto valores estimativos del 1- 2% de divergencia en el ADNmt para la variación intraespecífica y valores mayores para separar especies. Asimismo, según las distancias que aplica el modelo de Kimura dos parámetros (K2P), los promedios de divergencia para géneros serían del 9.93%, para familias del 15.46%, para órdenes del 22.18% y para clases del 23.27%. Estos porcentajes, calculados sobre la base de COI, no pueden generalizarse a todos los grupos taxonómicos pues no cabría esperar que fueran constantes. Por ejemplo, en anfibios se encontraron divergencias intraespecíficas muy elevadas (del 7-14%) tanto a nivel intra como interpoblacional, debidas probablemente a una marcada estructuración filogeográfica de las especies, con haplotipos característicos de las distintas subpoblaciones (Vences *et al.*, 2005). Algo similar ocurre en la especie de gorgojo *Aramigus tessellatus* y en el picudo del algodónero, *Anthonomus grandis*, en Sudamérica (Normark & Lanteri, 1998; Scataglini *et al.*, 2006).

En síntesis, pese a que el «barcode» permite identificar especies con bastante precisión en ciertos grupos taxonómicos, por ejemplo peces (Ward *et al.*, 2005), aves (Hebert *et al.*, 2004b; Kerr *et al.*, 2007) y lepidópteros (Hajibabaei *et al.*, 2006), la tarea científica de delimitar especies requiere de un «barcode multilocus» con genes nucleares, además de información morfológica y biológica detallada (Monaghan *et al.*, 2005).

Métodos de análisis de secuencias

Las secuencias de «DNA barcode» pueden analizarse mediante métodos de distancia, estableciendo valores máximos de variación intraespecífica (Lambert *et al.*, 2005) o buscando combinaciones únicas de autapomorfías (DeSalle *et al.*, 2005). Hasta el presente, la mayoría de las aproximaciones al «DNA barcoding» usan métodos de distancia para hacer inferencias sobre la asignación de individuos a determinadas especies. Una de las ventajas de estos métodos es que insumen menos tiempo que aquéllos basados en parsimonia. Se puede realizar un simple BLAST (Altschul *et al.*, 1990, 1997) que permite identificar el vecino más próximo a la secuencia problema, calcular divergencias entre la secuencia problema y las conocidas (Steinke *et al.*, 2005), y/o construir árboles de distancia como el «Neighbor Joining»(NJ) (Saitou & Nei, 1987).

La mayoría de los especialistas concuerda en que COI es un excelente marcador para identificar «Molecular Operacional Taxonomic Units» (MOTU), término que alude a grupos de individuos con secuencias similares (Floyd *et al.*, 2002; Blaxter, 2004; Blaxter *et al.*, 2005). La identificación de MOTU puede ser útil, tanto en estudios taxonómicos como en estudios ecológicos o de especiación. El problema es resolver qué status taxonómico tiene cada MOTU o cada «singleton» (=individuo que se desvía de los clusters principales). Estos últimos podrían representar o bien especies raras aún no descriptas o simples variantes individuales.

Por lo general, los soportes de «bootstrap» de los árboles de NJ son elevados (más del 80%) para especies que también se diferencian claramente sobre la base de caracteres morfológicos. Por el contrario, en el caso de complejos específicos con elevada variación intra e interoblacional los resultados son dudosos y para adoptar decisiones taxonómicas bien fundadas, deben emplearse genes nucleares además de COI (Meier *et al.*, 2006). Estudios taxonómicos realizados sobre estos complejos han conducido en algunos casos al reconocimiento de especies crípticas (Baker *et al.*, 2003; McGovern & Hellberg,

2003; Hebert *et al.*, 2004a) o subespecies con distintas preferencias de huéspedes y rangos geográficos, cuya potencialidad de alcanzar el status de plagas o de controlar organismos invasores podría ser diferente (Drew & Hancock, 1994; Smith *et al.*, 2006).

La identificación de MOTU por métodos de distancia a nivel infraespecífico no invalida que subsecuentemente se pueda testear la monofilia de estos grupos por métodos filogenéticos. A veces, las especies animales son no monofiléticas a nivel de su estructura mitocondrial, porque aún no han alcanzado el estado de monofilia recíproca como consecuencia del «*lineage sorting*» incompleto, o porque hubo introgresión (Funk & Omland, 2003; Lanteri & Confalonieri, 2003). Para el análisis cladístico de haplotipos mitocondriales se suelen emplear algoritmos de parsimonia implementados en programas de computación habituales en reconstrucción filogenética como el PAUP, NONA o TNT (Swofford, 2002; Goloboff, 1996; Goloboff *et al.*, 2003). Asimismo, Templeton (2001) ha propuesto un análisis de parsimonia estadística en el que los largos de las ramas del árbol, se toman en cuenta para evaluar la diferenciación entre especies. Según dicho autor la variación puede ser homoplástica (ramas largas) o no homoplástica (ramas cortas). Mediante un test de máxima verosimilitud es posible estimar la posibilidad de que una secuencia dada, pueda asignarse a determinada especie. El test opera sobre un árbol de genes (árbol de coalescencia) obtenido por métodos filogenéticos (Matz & Nielsen, 2005).

Aporte del código de barras del ADN al desarrollo de la sistemática

La «Taxonomía integrada» (Dayrat, 2005) implica el uso de distintas fuentes de caracteres (incluido el ADN) para descubrir, delimitar y realizar identificaciones de las especies y de los taxones naturales en todos los niveles. El debate actual no es ADN versus morfología, sino descripciones basadas en un solo carácter o sistema de caracteres versus un sistema de múltiples caracteres (Will *et al.*, 2005).

El «DNA barcoding» permite identificar grupos o «unidades evolutivas significativas» (Moritz, 1994), pero sólo en el contexto de una «Taxonomía integrada» se podrá establecer qué status taxonómico revisten dichas unidades: ¿morfoespecies complejas, especies crípticas, subespecies, linajes partenogenéticos, variantes poblaciones? Por eso, una consecuencia de la iniciativa «barcode» podría ser la mayor demanda de taxónomos, ya que si los ecólogos, etólogos y especialistas en conservación emplean MOTU carentes de nombre, se generará una confusión tan grande como cuando se realizan investigaciones sobre la base de morfoespecies no identificadas.

El «Taxonomic impediment» (Taylor, 1983) no podrá ser superado al margen de las revisiones y monografías taxonómicas que aún restan por realizarse en cada grupo. Si los 1.7 millones de especies descritas hasta el presente por medio de métodos taxonómicos tradicionales, representan menos del 15 % de las especies de la diversidad global, es mucho lo que todavía resta hacer a los taxónomos (Smith, 2005; Crisci, 2006). Una secuencia de ADN es un simple dato y sólo en un contexto teórico y metodológico sólido se puede dar un significado correcto a los resultados de los análisis de datos (Wheeler, 2004). A través de la «Taxonomía integrada» los taxónomos podrán proporcionar al resto de la comunidad científica los medios que le permitan identificar a las especies y taxones superiores, ya sea mediante secuencias de COI, de otros genes y/o de caracteres morfológicos (Will *et al.*, 2005).

ALGUNOS EJEMPLOS DE APLICACIÓN DEL CÓDIGO DE BARRAS DEL ADN EN INSECTOS

1. Identificación de especies invasoras (polillas y moscas de la fruta)

La estabilidad de los ecosistemas se ve afectada frecuentemente por la acción de especies introducidas debido al creciente comercio internacional, las cuales luego se transforman en invasoras, causando serios daños económicos. Un aspecto crítico en

bioseguridad relacionada con «Invasive Alien Species» (IAS) es la intercepción y rápida identificación de dichas especies. Esta tarea se ve dificultada por la escasez de especialistas en los distintos grupos taxonómicos y de herramientas para una determinación rápida (claves dicotómicas, buenas ilustraciones, bibliografía sobre aspectos biológicos de las especies, bases de datos taxonómicas completas y actualizadas), hecho que se agrava cuando sólo se cuenta con ejemplares inmaduros (huevos, larvas, pupas) o fragmentos de ellos. Debido a estas dificultades, en el caso de algunas plagas de gran importancia económica a nivel internacional, se aplica la tecnología de diagnóstico molecular como complemento de las claves morfotaxonómicas: e.g moscas de la fruta (Tephritidae) (Armstrong *et al.*, 1997), polillas de las familias Lymantriidae («tussock moths») y Tortricidae («leafroller moth») que se comportan como plagas forestales (Armstrong *et al.*, 2003; Dugdale *et al.*, 2002) y trips (Thripidae) (Toda & Komazaki, 2002).

Armstrong & Ball (2005) realizaron un estudio para evaluar la utilidad del «DNA barcoding» en bioseguridad relativa a dos plagas potenciales para Nueva Zelanda («tussock moth» y moscas de la fruta). En Nueva Zelanda son siete las especies de polillas consideradas como potenciales plagas forestales a ingresar desde el hemisferio norte. La utilidad del «barcoding» se refiere a la posibilidad de identificar dichas especies aún cuando se hayan interceptado sólo masas de huevos. En lo que respecta a las moscas de la fruta (cerca de 4.000 especies de las cuales 250 son consideradas plagas de interés económico) Nueva Zelanda es uno de los pocos países que se hallan libres, de allí el interés en emplear dicha herramienta como mecanismo de identificación.

En el estudio realizado por Armstrong & Ball (2005) las secuencias se obtuvieron del «Barcode of Life Database» y del «Gen Bank», se alinearon 650 pb homólogas usando el programa Sequencer (Gene Codes Corp) y se construyeron árboles de distancia de «Neighbor Joining» (NJ) basados en el modelo K2P (Kimura 1980), mediante el programa MEGA v2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Los grupos

recuperados en el análisis se compararon con los obtenidos previamente por PCR-RFLP y ADNr nuclear, registrándose un 90-96% de coincidencia entre ambos métodos. Los resultados se consideraron muy positivos, ya que las potenciales polillas invasoras se pudieron identificar a nivel de familia, género y especie, y las moscas de la fruta a nivel de complejos de especies.

2. Estudios de biodiversidad con fines de conservación (hormigas de Madagascar)

El objetivo del trabajo de Smith *et al.* (2005) fue comparar si la estima de la diversidad basada en «DNA barcode MOTU» es significativamente diferente que aquella basada en Taxonomía morfológica tradicional. El modelo fue puesto a prueba en un grupo taxonómico considerado como bioindicador clave: las hormigas, y en un área particularmente amenazada: Madagascar, ya que su fauna de artrópodos terrestres está en severo riesgo de extinción debido al deterioro de sus habitats y a la invasión de especies exóticas. La fauna de Madagascar incluye alrededor de 1.000 especies de hormigas de las cuales el 96% son endémicas (Fisher, 1999).

Smith *et al.* (2005) estudiaron cuatro sitios de muestreo diferentes. Los especímenes fueron identificados a nivel de género, inmediatamente después de su colección por parataxónomos, y preservados en alcohol al 95%. La diversidad y los cambios registrados en morfoespecies y MOTU fueron comparados dentro y entre sitios, usando el índice de similitud de Jaccard (Magurran, 2004), calculado mediante el programa Estimates v7.5 (Colwell, 2004).

El estudio de Smith *et al.* (2005) demostró que no existen diferencias significativas en la estimación de riqueza (número de especies o MOTU) basada en evidencia morfológica y en métodos moleculares (grupos de secuencias de «DNA barcode» con valores umbrales del 2% y 3% de divergencia). Algunas discrepancias ocurren en ciertas áreas geográficas que muestran una diferenciación ecológica y de elevación muy marcadas (Fisher, 1999). En ellas el «barcode» ha servido para identificar linajes regionales que deberán estudiarse con

mayor profundidad, para establecer su status específico o estructura filogeográfica.

Smith *et al.* (2005) concluyeron que el «DNA barcoding» contribuye a acelerar las identificaciones con fines de conservación en grupos hiperdiversos y no reemplaza ni compete con la Taxonomía, sino que es un importante complemento de ella.

3. Inventario de mariposas de Costa Rica

En 1978 D.H. Jansen y W. Hallwachs comenzaron el inventario de mariposas y sus parasitoides asociados (dípteros e himenópteros de las familias Tachinidae y Braconidae respectivamente) en el «Área de Conservación de Guanacaste» (ACG), en el noroeste de Costa Rica. Esta reserva incluye unas 115.000 ha de selvas húmedas, de neblina y áridas, desde el nivel del mar hasta los 2.000 m de altura (Jansen & Hallwachs, 2005). Hasta el presente se han inventariado 3.200 especies de mariposas (www.acguanacaste.ac.cr) las cuales se identificaron, fotografiaron y criaron para realizar observaciones biológicas.

Cada espécimen «voucher» inventariado se halla automáticamente disponible para obtener su ADN a partir de la extracción de una de sus patas. Una vez registrada la secuencia de COI se construye un árbol de «Neighbor Joining» (NJ), indicando los valores de «bootstrap» de los grupos de individuos. Según los estudios de Jansen *et al.* (2005), de 1.000 morfoespecies sólo el 3% no puede distinguirse sobre la base de «barcodes». En general, especies bien definidas por su morfología forman distintos grupos en el NJ con divergencias mayores al 1%.

Astrartes fuligator (Hesperiidae) es un taxón muy variable, dentro del cual se reconocieron diez grupos, algunos considerados luego como especies diferentes ya que las divergencias moleculares halladas se relacionaron con distintas preferencias de hábitat o de alimentación de las larvas (Hebert *et al.*, 2004a). El «barcode» también resultó útil para comprobar que la gran diferenciación morfológica observada en *Saliana severus* (Herperiidae) se debe a dimorfismo sexual y no a la presencia de dos especies distintas (Jansen *et al.*, 2005).

CONSIDERACIONES FINALES

Resulta conveniente hacer una distinción entre el desarrollo de la iniciativa www.barcoding.si.edu y los usos de la información generada a partir de ella, en los proyectos de investigación y/o en programas aplicados al control de plagas, especies invasoras o conservación de la biodiversidad. Para optimizar los resultados del «barcode» en Sistemática y otras disciplinas afines como Genética y Ecología de poblaciones, Biogeografía, Filogenia, Biología evolutiva, etc., es esencial la interacción de quienes están desarrollando la iniciativa con especialistas en distintos grupos taxonómicos. Sólo así se podrá aprovechar toda la potencialidad de esta herramienta tecnológica compleja, que hasta el presente ha aportado a la comunidad científica el conocimiento de las secuencias del gen COI de 28.020 especies de organismos.

Actualmente, muchos taxónomos están trabajando en la organización de bases de datos que reúnen toda la información disponible sobre cada especie biológica (ilustración del hábito y caracteres diagnósticos, descripción morfológica, sinonimia, distribución geográfica, datos biológicos, etc.), por ejemplo la «Orthoptera Species File Online» (Eades *et al.*, 2007). Estas bases, cada vez más completas y accesibles para cualquier biólogo, podrán asociarse en un futuro con las «secuencias barcode» de cada especie. En algunos grupos de parásitos y patógenos, como los microsporidios, la caracterización molecular es ya un requisito indispensable para la descripción de nuevos taxones. Asimismo, la tecnología moderna se encamina hacia la producción de dispositivos que permitirán obtener secuencias de ADN de los organismos coleccionados en el campo, de manera casi automática.

También se está trabajando en la obtención rápida y económica del «barcode» de los especímenes «viejos» depositados en museos, instituciones que deberán prever los recursos necesarios (espacios, fondos y personal) para alojar los «vouchers» de la iniciativa «barcode». Haber contribuido a detectar y corregir ciertos errores de las secuencias registradas en «GenBank» y proponer que

cada individuo identificado por «barcode» cuente con su «voucher» en un museo, esté o no identificado a nivel de especie, es uno de los grandes avances que produjo esta iniciativa.

La propuesta del «Barcode» no pretende, ni podría sustituir la taxonomía alfa y la filogenia (Schindel & Miller, 2005). Su enfoque actual está principalmente orientado a facilitar la identificación de especies, de manera que los taxónomos puedan dedicarse a resolver cuestiones científicas que les son propias como la delimitación y descripción de especies y taxones superiores y el análisis de las relaciones filogenéticas entre ellos.

La integración de «barcode», trabajo de campo, colecciones de museos e investigación científica resulta imprescindible para que el «Código de barras del ADN» contribuya al progreso de la Sistemática Entomológica de un modo significativo.

AGRADECIMIENTOS

A María Marta Cigliano y María Guadalupe del Río por la lectura crítica del manuscrito, a Pablo Tubaro por acercarme al debate sobre «DNA barcoding», a los árbitros del artículo por sus valiosos comentarios y sugerencias y a Gustavo Flores por invitarme a participar en este volumen de homenaje al apreciado y reconocido Dr. Axel Bachmann.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS & D. J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
2. ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER & D. J. LIPMAN. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
3. ARMSTRONG, K. F. & S. L. BALL. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1813-1823.
4. ARMSTRONG, K. F., C. M. CAMERON & E. R. FRAMPTON. 1997. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid molecular diagnostic technique for quarantine application. *Bull. Entomol. Res.* 87: 111-118.
5. ARMSTRONG, K. F., P. MCHUGH, W. CHINN, E. R. FRAMPTON & P. J. WALSH. 2003. Tussock moth species arriving on imported used vehicles determined by DNA analysis. *N. Z. Pl. Prot.* 56: 16-20.

6. BAKER, A. M., C. BARTLETT, S. E. BUNN, K. GOUDKAMP, F. SHELDON & J. M. HUGHES. 2003. Cryptic species and morphological plasticity in long-lived bivalves (Unionoida: Hyriidae) from inland Australia. *Mol. Ecol.* 12: 2707-2717.
7. BLAXTER, M. L. 2004. The promise of the DNA taxonomy. *Phil. Trans. R. Soc. B* 359: 669-680.
8. BLAXTER, M., J. MANN, T. CHAPMAN, F. THOMAS, C. WHITTON, R. FLOYD & E. ABEBE. 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1935-1943.
9. BROWN, S., W. MCLAUGHLIN, I. T. JEREZ & J. K. BROWN. 2002. Identification and distribution of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) haplotypes in Jamaica. *Trop. Agric.* 79: 140-149.
10. BRUNNER, P. C., C. FLEMING & J. E. FREY. 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agric. For. Entomol.* 4: 127-136.
11. CAMERON, S., D. RUBINOFF & K. HILL. 2006. Who will actually use DNA barcoding and what will it cost? *Syst. Biol.* 55(5): 844-847.
12. CHASE, M. W., N. SALAMIN, M. WILKINSON, J. M. DUNWELL, R. P. KESANAKURTHI, N. HAIDAR & V. SAVOLAINEN. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1889-1895.
13. COLWELL, R. K. 2004. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples available at <http://vicaroy.eeb.uconn.edu/estimates>. Persistent URL <http://purl.oclc.org/estimates>.
14. COLWELL, R. K. & J. A. CODDINGTON. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Phil. Trans. R. Soc. B* 345: 101-118.
15. CRISCI, J. V. 2006. One dimensional Systematics: Perils in a time of steady progress. *Syst. Bot.* 31(1): 217-221.
16. DAVIS, J. I. & K. C. NIXON. 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Syst. Biol.* 41: 421-435.
17. DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* 85: 401-415.
18. DE LEY, P. et al., 2005. An integrated approach to face and informative morphological vouchering of nematodos for applications in molecular barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1945-1958.
19. DESALLE, R., M. G. E. EGAN & M. SIDDALL. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1905-1916.
20. DREW, R. A. & A. L. HANCOCK. 1994. The *Bactocera dorsalis* complex of fruit flies in Asia. *Bull. Entomol. Res. Suppl. Series*, Wallingford, UK, CAB International Sppl. 2: 1-68.
21. DUGDALE, J. S., D. GLEESON, L. H. CLUNIE & P. HOLDER. 2002. A diagnostic guide to Tortricidae encountered in field surveys and quarantine inspections in New Zealand. ISBN 0-478-07953-2, MAF NPPRL.
22. EBACH, M. C. & C. HOLDREGE. 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature* 434: 697.
23. EADES, D. C., D. OTTE & P. NASKRESCKI. 2007. Orthoptera Species File Online (www.osf2.orthoptera.org).
24. FISHER, B. L. 1999. Improving inventory efficiency: a case study of leaf litter ant diversity in Madagascar. *Ecol. Appl.* 9: 714-731.
25. FLOYD, R., E. ABEBE, A. PAPERÀ & M. BLAXTER. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.* 11: 839-850.
26. FUNK, D. J. & K. E. OMLAND. 2003. Species level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 34: 397-423.
27. GREEN, D. M. 1996. The bounds of species: hybridization in the *Bufo americanus* groups of North American toads. *Israel J. Zool.* 42: 95-109.
28. GREGORY, T. R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434: 1067.
29. GOLOBOFF, P. 1996. Pee-Wee, NONA, SPA and Phast programs and documentation. Willi Hennig Society Web site. <http://www.vims.edu/~mes/hennig/hennig.html>.
30. GOLOBOFF, P., K. NIXON & J. FARRIS. 2003. *TNT, Tree analysis using New Technology*. Published by the authors, Tucumán, Argentina.
31. HAJIBABAEI, M., D. H. JANSEN, J. M. BURNS, W. HALLWACHS & P. D. N. HEBERT. 2006. DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 968-971.
32. HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA, S. L. BALL & J. R. DE WAARD. 2003a. Biological identification through DNA bar codes. *Proc. R. Soc. B* 270: 313-321.
33. HEBERT, P. D. N., S. RATNASINGHAM & J. R. deWAARD. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. B* 270 (Suppl. 1): S96-S99.
34. HEBERT, P. D. N., E. H. PENTON, J. M. BURNS, D. H. JANZEN & W. HALLWACHS. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 14812-14817.
35. HEBERT, P. D. N., M.Y. STOECKLE, T. S. ZEMLAK & C. M. FRANCIS. 2004b. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol.* 2(10): 1657-1663.
36. HEBERT, P. D. N. & T. R. GREGORY. 2005. The promise of DNA barcoding for Taxonomy. *Syst. Biol.* 54(5): 853-859.
37. HICKERSON, M. J., C. P. MEYER & C. MORITZ. 2006. DNA Barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Syst. Biol.* 55(5): 729-739.
38. HOLMES, B. 2004. Barcode me. *New Sci.* 182: 32-35.

39. JANSEN, D. H. & W. HALLWACHS. 2005. Philosophy, navigation and use of a dynamic database ('ACG Caterpillars SRNP') for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids, of the «Area de Conservación Guanacaste» (ACG), northwestern Costa Rica (<http://janzen.sas.upenn.edu>).
40. JANSEN, D. H., M. HAJIBABAEI, J. M. BURNS, W. HALLWACHS, E. REMIGIO & P. D. N. HEBERT. 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1835-1845.
41. KERR, K. C. R., M. Y. STOECKLE, C. J. DOVE, L. A. WEIGHT, C. M. FRANCIS & P. D. N. HEBERT. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol. Ecol. Notes* doi:10.1111/j.1471.8286.2006.01670.x
42. KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Ecol.* 16: 111-120.
43. KUMAR, S. K., I. TAMURA, B. JAKOBSEN & M. NEI. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
44. LAMBERT, D. M., A. BAKER, L. HUYNEN, O. HADDRATH, P. D. HEBERT & C. D. MILLAR. 2005. Is a large-scale DNA inventory of ancient life possible? *J. Hered.* 96: 279-284.
45. LANTERI, A. A. 1995. La sistemática filogenética y los conceptos de especie. *Mendeliana* 11(1): 37-43.
46. LANTERI, A. A. & V. A. CONFALONIERI. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Pp. 185-193. *En: Llorente Bousquets, J. & J.J. Morrone (eds.). Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía.* Facultad de Ciencias, UNAM, México.
47. LANTERI, A. A., M. M. CIGLIANO & M. S. FERNÁNDEZ. 2006 (3ª ed.). Especie, variación infraespecífica y decisiones taxonómicas. Capítulo 5: 69-92. *En: Lanteri, A. A. y M. M. Cigliano (eds.). Sistemática Biológica: fundamentos teóricos y ejercitaciones.* Edulp, UNLP, La Plata, Argentina.
48. LIPSCOMB, D., N. PLATNICK & Q. WHEELER. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18: 65-66.
49. LIU, Y. C. 2004. Molecular identification of a plant quarantine pest (*Frankliniella occidentalis*) by one-tube nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Pl. Prot. Bull. Taipei* 46: 27-46.
50. MAGURRAN, A. E. 2004. *Measuring biological diversity.* Oxford, UK, Blackwell.
51. MARKMANN, M. & D. TAUTZ, 2005. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1917-1924.
52. MARSHALL, E. 2005. Will DNA barcodes breathe life into classification? *Science* 307: 1037.
53. MATZ, M. V. & R. NIELSEN. 2005. A likelihood ratio test for species membership based on DNA sequence data. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1969-1974.
54. MCGOVERN, T. M. & M. E. HELLBERG. 2003. Cryptic species, cryptic endosymbionts, and geographical variation in chemical defenses in the bryozoan *Bugula neritina*. *Mol. Ecol.* 12: 1207-1215.
55. MEIER, R., K. SHIYANG, G. VAIDYA & P. K. L. NG. 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.* 55(5): 715-728.
56. MONAGHAN, M. T., M. BALKE, T. R. GREGORY & A. P. VOGLER. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1925-1933.
57. MORITZ, C. 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9: 373-375.
58. MORITZ, C. & C. CICERO. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2: 1529-1531.
59. MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, C. G. MITTERMEIER, G. A. B. DA FONSECA, & J. KENT. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
60. NORMARK, B. B. & A. A. LANTERI. 1998. Incongruence between morphological and mitochondrial DNA characters suggests hybrid origins of parthenogenetic weevil lineages (genus *Aramigus*). *Syst. Biol.* 47(3): 475-494.
61. SAITOU, N. & M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
62. SAUNDERS, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1879-1888.
63. SCATAGLINI, M. A., A. A. LANTERI & V. A. CONFALONIERI. 2006. Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. *Genética* 126: 353-368.
64. SCHINDEL, D. E. & S. E. MILLER. 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435: 17.
65. SMITH, V. S. 2005. DNA Barcoding: perspectives from a «Partnerships for enhancing expertise in Taxonomy» (PEET) Debate. *Syst. Biol.* 54(5): 841-844.
66. SMITH, M. A., B. L. FISHER & P. D. N. HEBERT. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1825-1834.
67. SMITH, M. A., N. E. WOODLEY, D. H. JANSEN, W. HALLWACHS, P. D. N. HEBERT. 2006. DNA barcode reveals cryptic host specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 3657-3662.

68. STEINKE, D., M. VENCES, W. SALZBURGER & A. MEYER. 2005. Tax1-a software for DNA barcoding using distance methods. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1975-1980.
69. SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) v. 4beta10. Sunderland, MA: Sinauer.
70. TAYLOR, D. P. 1983. Descriptive taxonomy: Past, present and future. *En: Highley, E. & R. W. Taylor (eds). Australian systematics entomology: A bicentenary perspective.* CSIRO, Canberra, Australia, pp. 93-134.
71. TEMPLETON, A. R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Mol. Ecol.* 10: 779-791.
72. TODA, S. & S. KOMAZAKI. 2002. Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region. *Bull. Entomol. Res.* 92: 359-363.
73. VENCES, M., M. THOMAS, R. M. BONETT & D. R. VIEITES. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1859-1868.
74. WARD, R. D., T. S. ZEMLAK, B. H. INNES, P. R. LAST & P. D. N. HEBERT. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1847-1857.
75. WHEELER, Q. D. P. 2004. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Phil. Trans. R. Soc. B* 359: 571-583.
76. WILL, K. W., B. D. MISHLER & Q. D. WHEELER. 2005. The perils of DNA Barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* 54(5): 844-851.