

**USO DEL GEN CITOCROMO OXIDASA I (COI) Y CÓDIGO DE BARRAS EN  
ESTUDIOS DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES**

**LEDY ANGÉLICA DAZA CRIADO**

**1049620140**

**SANDRA PATRICIA MONTENEGRO GOMEZ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO  
AMBIENTE  
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA  
FUSAGASUGÁ, 2018**

## **RESUMEN**

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y la Lista Roja de Especies Amenazadas, permite poner en alerta el estado de la biodiversidad mundial; Haciendo necesario la implementación de técnicas de estudios taxonómicos en algunos grupos biológicos, debido a la dificultad que representa la identificación morfológica de algunos organismos en los que no se presentan suficientes caracteres diagnósticos. Existen nuevas técnicas moleculares que facilitan esta labor. Sin embargo, en Colombia aún no son muy conocidas y/o aplicadas. Actualmente el proyecto Barcode of life busca establecer una biblioteca de referencia para la vida basada en el estudio del gen Citocromo Oxidasa I (COI) como método de identificación de especies animales de manera rápida, económica y con la gran ventaja de que solo requiere de una pequeña muestra del espécimen, por lo que no es necesario sacrificar el individuo. El objetivo de este estudio es realizar un compendio de los estudios realizados usando el gen COI para la identificación de especies animales ya que, al ser una técnica con gran acogida entre la comunidad científica, para la UNAD realizar este tipo de investigaciones daría un mayor reconocimiento de calidad académica motivando al desarrollo de investigaciones de este tipo.

## **ABSTRACT**

The International Union for Conservation of Nature and Red List of Endangered Species, allows to alert the state of the world's biodiversity; this makes necessary the implementation of taxonomic study techniques in some biological groups, due to the difficulty represented by the morphological identification of some organisms in which there are not enough diagnostic characters. However, there are new molecular techniques that facilitate this work, but in Colombia they are still not well known and/or applied. Currently the project Barcode of life seeks establish a reference library for life based on the study of the Cytochrome Oxidase I (COI) gene as a method of identification of animal species quickly, economically and with the great advantage that only requires a small sample of the specimen, so it is not necessary to sacrifice the individual. The objective of this study is to make a compendium of the studies carried out using the COI gene for the identification of animal species since, as it is a technique with great reception among the scientific community, for the UNAD to carry out this type of research would give greater recognition of academic quality motivating the development of research of this type.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>II. MARCO CONCEPTUAL Y TEÓRICO</b> .....	8
1. Generalidades del DNA Mitocondrial (mtDNA).....	9
2. Código de barras de la vida.....	13
3. Uso del Código de barras de la vida para la documentación de la biodiversidad en Colombia .....	16
4. Retos en el uso del código de barras para la vida .....	18
5. Uso del gen citocromo oxidasa I (COI) en la realización de códigos de barras .....	19
6. Estado normativo para el acceso a resultados de diversidad genética basados en técnica de código de barras en Colombia .....	22
7. Perspectivas del Código de barras de la vida y documentación de la biodiversidad de fauna en Colombia.....	23
<b>III. CONCLUSIONES</b> .....	26
<b>IV. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	28



## I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico en diferentes campos de investigación, ha permitido el mejoramiento y la solución a muchas de las problemáticas que sufren las poblaciones a causa del uso y explotación desmedida de los recursos naturales del planeta. Sin embargo, de acuerdo a los reportes otorgados por entidades encargadas de estudiar la biodiversidad mundial, esta ha sufrido una acelerada pérdida a causa de diferentes factores tanto antrópicos como ambientales. El conocimiento de la biodiversidad es un factor de alta importancia ya que permite comprender su funcionamiento e integrarla en el uso y el desarrollo sostenible de la humanidad. Además, la rápida disminución de especies en el mundo, pone en riesgo las principales fuentes hídricas, alimenticias y medicinales. Por esta razón son muchos los investigadores que se han dedicado a realizar esta tarea; que, si bien no es nada fácil, cada día se pone a prueba la ciencia de manera que facilite este trabajo. Actualmente, el desarrollo de la biología molecular ha permitido contribuir con este objetivo y desde hace varias décadas se viene ejecutando un proyecto de código de barras de la vida (*Barcode of Life*), como una iniciativa mundial que busca inventariar la biodiversidad del planeta. Esta es una herramienta que facilita y acelera el trabajo realizado por la taxonomía convencional basada en caracteres morfológicos, ocupa una posición intermedia entre los estudios convencionales de filogenia molecular y genética de poblaciones. Esta técnica sugiere que un fragmento estándar de 648 pb de la región del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI), sirve como un código de barras para la identificación de especies animales. Aunque se ha presentado escepticismo entre la comunidad científica, poco a poco científicos de todo el planeta se han ido uniendo a esta iniciativa demostrando que el gen COI del mtDNA puede utilizarse con éxito para la identificación de especies animales de la mayoría de los grupos existentes. Actualmente la base de datos Bold system cuenta con 436.044 especies animales descritas con código de barras usando este parámetro, de los cuales 1.723 registros son de especies en Colombia. Por esta razón el presente estudio tiene como objetivo realizar un compendio del uso del gen citocromo oxidasa I (COI) y código de barras (*Barcode of live*) en estudios de genética y biología molecular para la identificación de especies animales de manera que se dé a conocer

esta iniciativa en los centros de investigación dentro del país y se motive a inventariar la biodiversidad colombiana, que como se conoce posee entre el 14% y el 15% de la biodiversidad mundial y se cree que aún faltan muchas especies por determinar. Por lo que esta sería una herramienta que facilitaría este proceso teniendo la ventaja de que no discrimina la taxonomía convencional, sino que por el contrario es un complemento para aclarar especies crípticas o determinar individuos cuando no se tiene el espécimen completo, sino que solo que conserva un fragmento del mismo.

## II. MARCO CONCEPTUAL Y TEÓRICO

Actualmente los avances tecnológicos en los diferentes campos de investigación, permiten el mejoramiento y dan solución a muchas de las problemáticas que sufre la sociedad a causa del uso y explotación desmedida de los recursos naturales del planeta. De acuerdo a los reportes de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y la Lista Roja de Especies Amenazadas, (quienes permiten conocer y alertar acerca del estado de la biodiversidad mundial). Se evidencia una acelerada pérdida de biodiversidad debido al inadecuado uso de la tierra, la deforestación, el cambio climático, las especies invasoras y los patógenos emergentes, entre otras causas (Hoffmann *et al.*, 2010), sus aplicaciones a nivel nacional permiten a los investigadores tomar decisiones que se consideren las mejores opciones para la conservación de las especies, enfocar las medidas de gestión de recursos naturales para acelerar el inventario de la diversidad biológica, comprender su funcionamiento e integrar el uso en el desarrollo sostenible de la sociedad humana (SCBD, 2011). Además, indica que la rápida disminución de especies en el mundo, pone en riesgo las principales fuentes hídricas, alimenticias y medicinales; que de las 63.837 especies evaluadas 19.817 están en amenaza de extinción, incluyendo el 41% de los anfibios, 33% de los corales formadores de arrecifes, 25% de los mamíferos, 13% de las aves y 30% de las coníferas.

La falta de información sobre el número -exacto- de especies en el mundo se debe en parte a la falta de exploración en ciertas áreas del planeta, a la escasez de estudios taxonómicos en algunos grupos biológicos, y a la dificultad que representa la identificación morfológica de algunos organismos, debido a problemas intrínsecos en ciertos grupos con plasticidad fenotípica, diferencias ontogénicas y dimorfismo sexual, entre otros. Además, existen algunos casos como fragmentos de tejidos en descomposición, sangre, plumas, piel, carne o diferentes estadios larvales donde no se presentan suficientes caracteres diagnósticos para una acertada identificación y puede requerir de mucho tiempo ya que existen pocos taxónomos especializados para cada grupo de organismos (Paz *et al.*, 2011).

A nivel mundial los estudios genéticos que permiten identificar especies son escasos, es



notoria la falta de metodologías moleculares estandarizadas y de grupos interesados en realizar este tipo de investigaciones, ya que el mayor auge en la historia lo ha tenido la taxonomía tradicional. Sin embargo, actualmente el proyecto Barcode of life busca construir un código de barras del ADN para establecer una biblioteca de referencia para la vida multicelular (Hebert *et al.*, 2003a), basada en el conocimiento y los estudios acerca de la región control del ADNmt del gen Citocromo c Oxidasa I (COI). Presentándose como un método taxonómico estandarizado, empleando secuencias cortas de ADN, siendo una herramienta de investigación rápida, económica y muy aceptada entre las utilizadas, ya que solo requiere de pequeñas muestras del espécimen, por lo que ya no es necesario sacrificar el individuo para su identificación (la mejor razón de aceptación entre los investigadores), se muestra como una excelente herramienta para la identificación de especies crípticas, refleja variación intraespecífica de un gran número de especies en el mundo y complementa la taxonomía tradicional basada en caracteres morfológicos. Por estas razones se hace necesario la divulgación de esta investigación, ya que, pese a los buenos resultados de la técnica, aún es desconocida para muchos de los investigadores enfocados en la identificación y recuperación de especies animales en Colombia. Conociendo que el DNA mitocondrial es una molécula con replicación semi-conservativa y con genes únicos, permite contar con una metodología estandarizada que no requiere mayor esfuerzo investigativo para determinar su secuencia. La mitocondria al cumplir funciones de obtención de energía y respiración celular, permite la conservación del DNA con la misma calidad que lo hace el núcleo, con la diferencia que en animales esta información es heredada únicamente vía materna.

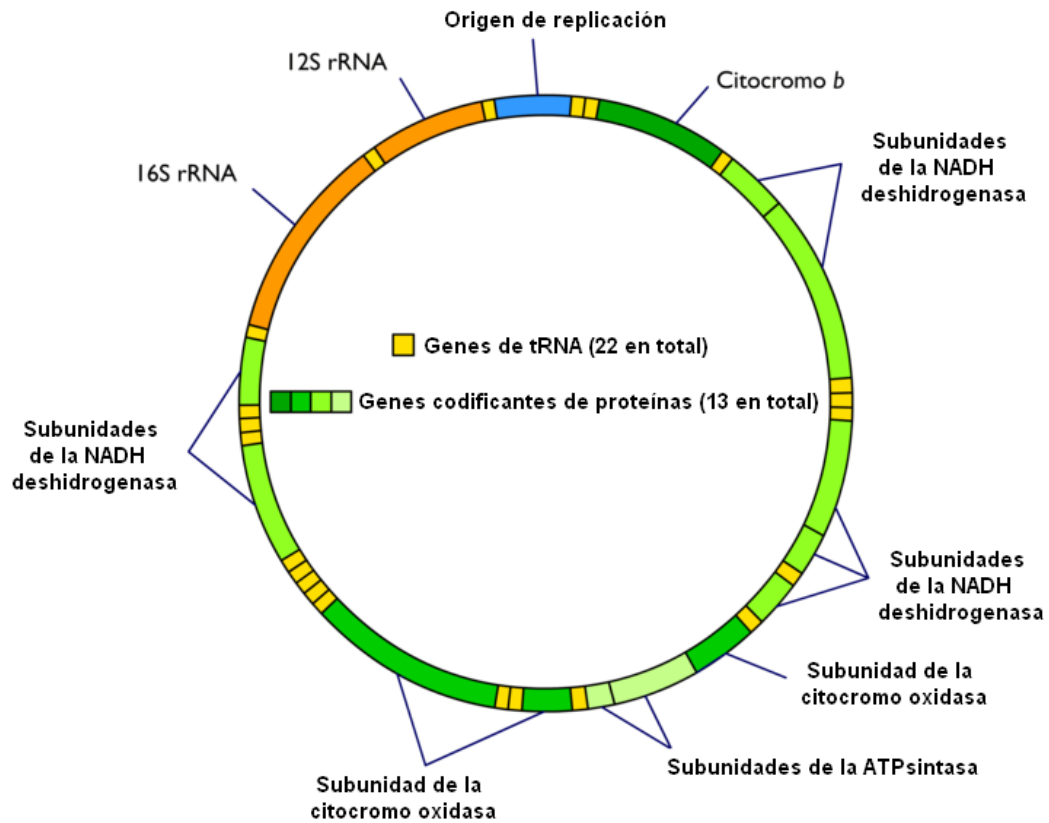
### **1. Generalidades del DNA Mitocondrial (mtDNA)**

La mitocondria es un organelo celular que participa en la transformación de energía de oxidación en ATP, una molécula indispensable para la vida (Aquadro *et al.*, 1983). Esto se logra gracias a la gran cantidad de moléculas que se encuentran dentro de la mitocondria, uno de los cuales es el DNA (Lodish *et al.*, 2000). El mtDNA es una molécula circular de aproximadamente 16.000 nucleótidos que presenta replicación semi-conservativa, ausencia de proteínas cromosomales (histonas) y ninguna repetición de genes (Aquadro *et al.*, 1983).

En mamíferos, es heredada a partir de un solo parental, en la mayoría de los casos a partir de la madre (FitzSimmons *et al.*, 1997). Cada una de las células eucariotas contiene varias moléculas de mtDNA que contienen de 100 a 1000 copias por célula, entre individuos presentan un alto número de polimorfismos de nucleótidos o variaciones en sus secuencias. El mtDNA está localizado en la matriz inferior de la mitocondria, su replicación se da sin el proceso de interfase, y las células hijas reciben aproximadamente el mismo número de copias. Sin embargo, no existe un mecanismo que reparta exactamente el mismo número de mitocondrias a cada hija, por esta razón algunas células hijas contienen mayor cantidad de mtDNA (FitzSimmons *et al.*, 1997; Hebert *et al.*, 2003a). Aparentemente el mtDNA presenta un nivel muy bajo de recombinación (Lodish *et al.*, 2000). En la mayoría de las variantes se involucran sustituciones, o cambios pequeños; pero el orden de los genes es estable a lo largo de tiempos evolutivos pequeños (Stryer, 1995).

El tamaño y la cantidad de proteínas que se codifican en el mtDNA varían en un nivel muy alto, al comparar diferentes individuos. En mamíferos no tiene intrones y no presenta las regiones largas no codificantes que se encuentran en el DNA nuclear. Esta molécula circular presenta dos cadenas, la cadena H o pesada, la cual codifica 13 genes para mRNA, que a su vez producen 13 proteínas, 22 genes de tRNA y 2 genes para 2 rRNAs mitocondriales (Figura. 1). La cadena L o ligera, presenta una menor cantidad de C+G, codifica un gen para mRNA el cual produce 1 proteína y 8 tRNAs (Lodish *et al.*, 2000).

Estas características permiten que el mtDNA sea utilizado como marcador filogenético macro-evolutivo (Avice, 2000). Por otro lado, las secuencias del mtDNA proporcionan una nueva técnica la cual permite obtener información independiente para aclarar o corroborar las filogenias que se han obtenido utilizando otras metodologías. El análisis del mtDNA es una herramienta que en los últimos años ha sido muy utilizada para estudios relacionados con la ecología evolutiva, la genética de poblaciones y la sistemática ya que juega un papel muy importante en el metabolismo celular (Hillis *et al.*, 1995). Se cree que algunas enfermedades genéticas relacionadas con el metabolismo se encuentran relacionadas con este genoma. Todas estas razones han llevado a una gran cantidad de autores a utilizarla en estudios comparativos entre diferentes individuos (Lansman *et al.*, 1987 y Brown, 1985).



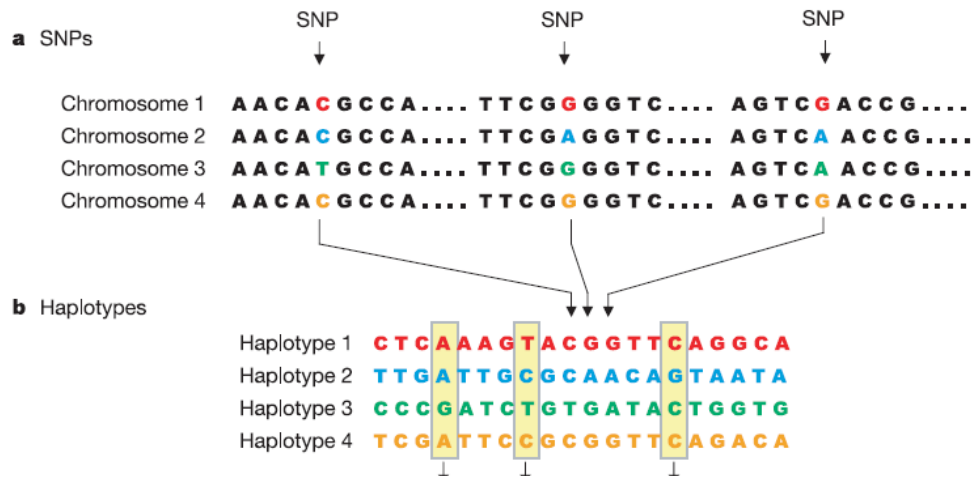
**Figura 1.** Molécula del mtDNA. Presenta 13 genes para mRNA codificantes para proteínas (Color verde), 22 genes de tRNA (color amarillo) y 2 genes para 2 rRNAs mitocondriales (color anaranjado). Adaptación al castellano del esquema en blanco del genoma mitocondrial disponible en Commons. Creación propia de uso libre.

Con el mejoramiento de las técnicas de secuenciación de ADN y la gran cantidad de secuencias obtenidas en las dos últimas décadas en gran variedad de organismos, el orden de los genes y las características del genoma mitocondrial ha sido estudiado y analizado en profundidad. En numerosos estudios filogenéticos se han usado secuencias de genes mitocondriales para establecer los niveles de relaciones filogenéticas (Kumazawa and Nishida, 1993). Por ejemplo, la región control o DLoop del genoma mitocondrial se utiliza

con frecuencia en estudios poblacionales debido a la alta variabilidad en su secuencia de nucleótidos, mientras que la codificación de los genes de proteínas, como el citocromo b (Cyt b) generalmente se utilizan para el análisis filogenético de los taxones superiores.

La primera secuencia completa de estudios de todo el mtDNA de los animales mostró que la mayoría de los genomas mitocondriales de invertebrados están formados por casi el mismo número de genes, como en los vertebrados. No obstante, varios reajustes se han encontrado en nematodos (Okimoto *et al.*, 1991, 1992), artrópodos (Boore *et al.*, 1995), bivalvos (Hoffmann *et al.*, 1992), moluscos (Yamazaki *et al.*, 1997), equinodermos (Cantatore *et al.*, 1987; Jacob *et al.*, 1988; Cantatore *et al.*, 1989; De Giorgi *et al.*, 1991), y *Drosophila yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985). Esta variación en el orden de genes dentro de los invertebrados ha permitido utilizar el genoma mitocondrial con enfoque filogenético (Camacho *et al.*, 2008).

El tipo más común de variación genética (SNP- Polimorfismo de un solo nucleótido) (Figura.2), es una diferencia respecto a una base presente en un sitio particular de la secuencia de ADN. Por ejemplo, algunas poblaciones pueden tener citosina (C) en un sitio, mientras otras tienen timina (T) en el mismo sitio. Cada alelo nuevo (SNP) va a estar asociado con otros alelos que estaban presentes en la secuencia de ADN a partir de la cual surgieron. La combinación de alelos observados en un solo cromosoma, o parte de un cromosoma se conoce como haplotipo (International HapMap Consortium, 2003). Este conjunto de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en una sola cromátide se encuentran estadísticamente asociados. Se piensa que estas asociaciones y la identificación de algunos alelos de un haplotipo, permiten identificar el resto de sitios polimórficos en su región.



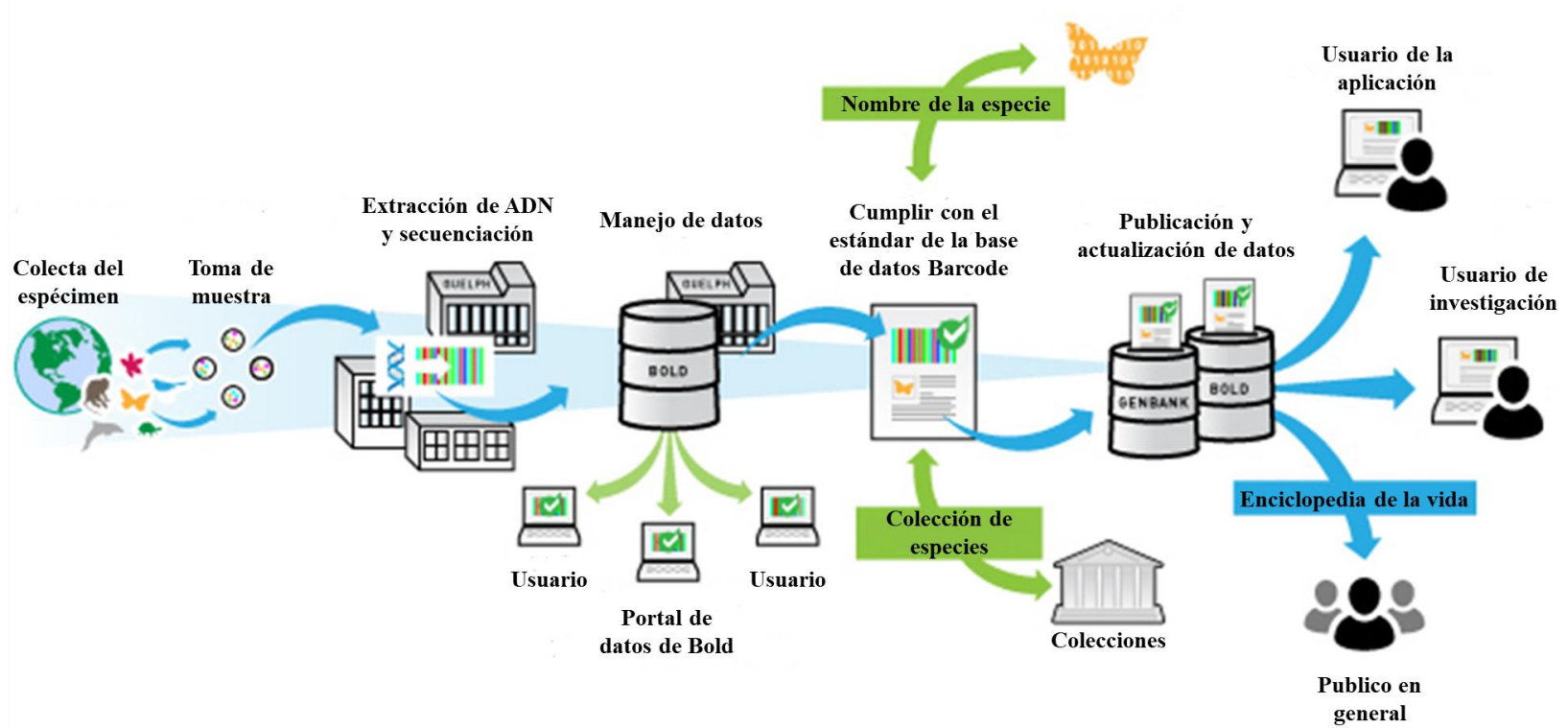
**Figura 2.** SNPs. a) Mutaciones de una sola base en el ADN b) Haplotipos. Conjunto de polimorfismos generado por los SNPs. (Tomado y modificado de International HapMapConsortium, 2003).

## 2. Código de barras de la vida

Con el desarrollo tecnológico y la acogida de técnicas de secuenciación, el ADN se ha convertido en una nueva fuente de información para aclarar relaciones evolutivas. Las huellas de un análisis comparativo de secuencias nucleotídicas actualmente son comunes en todas las áreas de las ciencias biológicas (Tibayrenc, 2005). Permitiendo evaluar relaciones biológicas utilizando secuencias de mtDNA. El proyecto código de barras de la vida (*Barcode of Life*), fue propuesto por Paul Hebert, investigador de la Universidad de Guelph, en Ontario, Canadá en 2003. Es la mayor iniciativa mundial genómica jamás realizada para inventariar la biodiversidad del Planeta (Herbert *et al.*, 2004). Se presenta como una herramienta de identificación taxonómica de especímenes para declarar especies crípticas, busca una cobertura completa de las especies y ocupa una posición intermedia entre los análisis de filogenia molecular y genética de poblaciones que se venían realizando anteriormente (Hajibabaei *et al.*, 2007). Esta técnica consiste en extraer y secuenciar el DNA

de la muestra de interés, luego de conocidas las secuencias de DNA, se realiza un alineamiento que permita comparar las secuencias de interés con las ya disponibles en la biblioteca virtual del proyecto Barcode (Figura. 3). Las secuencias de códigos de barras de especímenes que no coincidan con ninguna especie presente en la base de datos de referencia pueden indicar que la base de datos está incompleta o que posiblemente se trata de una nueva especie. Los códigos de barras pueden revelar divergencia genética muy alta dentro de una misma especie putativa sugiriendo la existencia de especies crípticas.

Este proyecto propone que un fragmento estándar de 648 pb de la región del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI), sirve como un código de barras para la identificación de especies animales (Herbert *et al.*, 2003a). Después de haber demostrado que el gen COI del mtDNA puede utilizarse con éxito para la identificación de especies de aves de América del Norte (Herbert *et al.*, 2004), y muchos otros vertebrados (Vilaça *et al.*, 2006; Clare *et al.*, 2007; Hajibabaei *et al.*, 2007b; Chaves *et al.*, 2008) la investigación se ha incrementado para inventariar la diversidad de las especies, utilizando esta etiqueta molecular.



<https://www.wildlifehero.com/home/services/barcode-of-life.html>

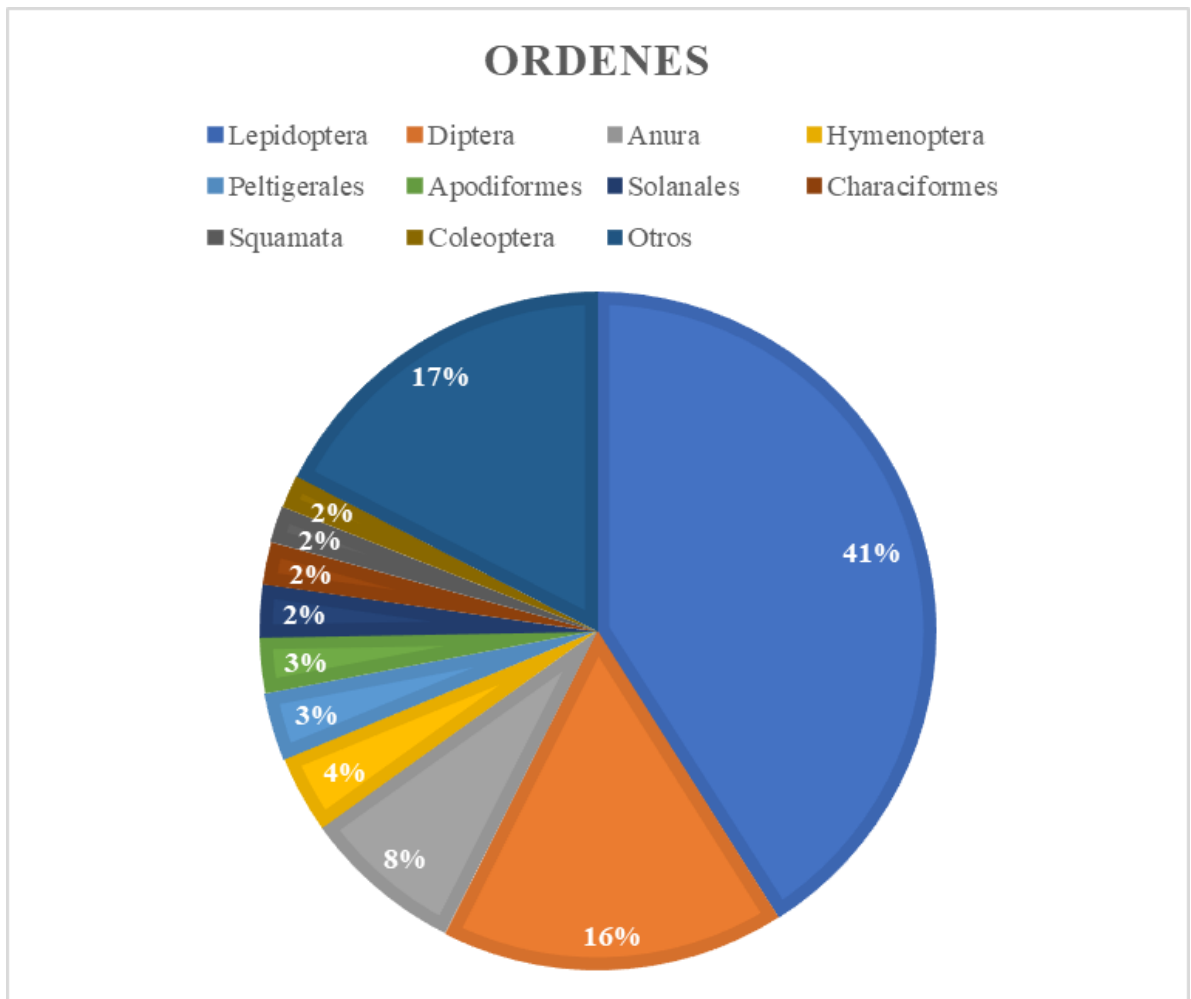
**Figura 3.** Metodología de campo, laboratorio y análisis bioinformático del uso del código de barras para la vida (Barcode of life). Tomado y modificado de Wildlife Hero.

Científicos de la biodiversidad, especialistas en genómica y tecnólogos de más de 50 países están trabajando en conjunto para construir el código de barras de la vida de todas las especies del planeta y establecer una biblioteca de referencia que será la base para un sistema de identificación basado en el mtDNA de la vida multicelular (Paz *et al.*, 2011). La base de datos del proyecto Código de Barras de la Vida (BOLD Systems) es un banco de trabajo internacional en línea que ayuda a la recopilación, gestión, análisis y uso de códigos de barras de ADN, basado en la comparación de la secuencia que codifica para la subunidad 1 del gen mitocondrial COI (Herbert *et al.*, 2003c). Actualmente, está ganando adeptos como una forma rápida de estudiar la biodiversidad del planeta al permitir identificar taxonómicamente ejemplares dudosos y describir especies crípticas (aquellas con idéntica morfología y secuencias de COI diferentes) (Herbert *et al.*, 2003a). El tamaño del fragmento de este gen se ha seleccionado para generar una secuencia fiable y fácil de leer además que permite la identificación de muestras de ADN degradado, que son secuencias difíciles de obtener (Hajibabaei *et al.*, 2006). Este impulso ha sido también objeto del Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL, <http://barcoding.si.edu>), una alianza internacional de organizaciones de investigación que apoyan el desarrollo de códigos de barras de ADN como un estándar internacional para la identificación de las especies. (Copyright BOLD, 2014-2018).

### **3. Uso del Código de barras de la vida para la documentación de la biodiversidad en Colombia**

El proyecto *Barcode of life* se ha convertido en uno de los programas internacionales más importantes para la identificación molecular de gran cantidad de especies (Herbert *et al.*, 2004; Herbert & Gregory, 2005; Smith *et al.*, 2005). A febrero de 2018 esta base de datos cuenta con 436345 registros disponibles al público, de los cuales Colombia representa el 1,58% de los datos reportados con 6916 registros que pertenecen a 1766 especies y 89 instituciones de investigación. Siendo Lepidóptera con 41%, Díptera con 16,4% y Anura con 7,7% los géneros con mayor número de registros del país (Figura. 4).





**Figura. 4.** Secuencias a nivel de orden reportadas en Colombia para *Bold System* a febrero de 2018. Tomado de *Bold System- Record List*.

Estos y cada uno de los registros aportados para inventariar la biodiversidad son de gran importancia ya que permiten conocer variabilidad al interior del país, donde se encuentra, cuál es su estado de conservación y cuáles son las posibilidades de uso sostenible. En la lucha por obtener estos registros, ya se conoce que Colombia, cuenta con 1834 especies de aves, representando el 51,8% el de la riqueza del país, siendo el grupo con mayor riqueza, le siguen los anfibios con 700 especies, 19,7%, los reptiles 512 especies, 14,5% y los mamíferos que presentan el valor más bajo con 492 especies, es decir 14% de la riqueza nacional (Rangel, 2015). Sin embargo, Colombia se destaca como el segundo país más biodiverso a nivel mundial y se cree que aún faltan muchas especies por descubrir. Es por esta razón que

estrategias como el código de barras para la vida facilitarían el proceso y se lograría realizar planes de manejo para especies que se encuentren en algún grado de amenaza y poder estabilizar las especies, su hábitat y los ecosistemas en general.

#### **4. Retos en el uso del código de barras para la vida**

Pese a los grandes avances y la acogida que ha tenido este proyecto por parte de un grupo de científicos, el uso de la biología molecular y los avances tecnológicos ha sido estigmatizado por otra parte de la comunidad científica por dos razones principales, una de ellas es el alto costo en los procesos de laboratorio para la adquisición de equipos y reactivos que permiten analizar las muestras y por otra parte la propuesta de utilizar códigos de barras de ADN como método de identificación generó polémica desde sus inicios debido a la confusión que existe entre esta herramienta de identificación molecular y la taxonomía molecular conocida como taxonomía por ADN (Tautz *et al.*, 2003; Blaxter, 2004). En la taxonomía por ADN, la determinación de especies ya no dependería de características morfológicas sino únicamente de las secuencias de ADN. Estas técnicas, tanto códigos de barra de ADN como taxonomía por ADN, proponen coleccionar secuencias de ADN que evidencien la variación intraespecífica de la biodiversidad mundial. Sin embargo de acuerdo a los estudios realizados por algunos científicos en diferentes grupos taxonómicos (Hebert *et al.*, 2003b; Moritz y Cicero, 2004; Meyer y Paulay, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2007b; Luo *et al.*, 2011, entre otros) es evidente que la generación de códigos de barras de ADN no descarta el uso de la taxonomía basada en caracteres morfológicos diagnósticos, sino que por el contrario la presenta como una herramienta complementaria basada en técnicas de biología molecular para la correcta identificación de especies, acentuando su uso, si además se trata de especies en alto riesgo de amenaza, tráfico ilegal, falta del espécimen completo o deterioro ecológico de las mismas (Padial y De la Riva, 2007). Se ha estimado que el costo de describir todas las especies animales superará los 270 000 millones de dólares y requerirá siglos (Carbayo y Marque, 2011) esta situación rebela que existen muchas especies aún por descubrir y ser identificadas y que se requiere con urgencia nuevas técnicas, enfoques y perspectivas que permitan realizar esta tarea en menos tiempo y a un bajo costo. Especialistas en biodiversidad constantemente intentan abordar las dificultades taxonómicas desde un contexto local o regional mediante la

asignación de especímenes a unidades taxonómicas operativas (OTU) utilizando las diferencias morfológicas percibidas como indicadores de los límites de las especies. Sin embargo, es muy difícil codificar las OTU basadas en la morfología en un formato que permita su comparación entre los estudios. El acogimiento de secuencias de ADN como base para la clasificación OTU no sería una restricción; debido a que su naturaleza digital ayuda a la aplicación de protocolos estandarizados para la designación OTU, la comparación de resultados entre estudios y la preservación de datos (Ratnasingham y Hebert, 2013). Las técnicas de identificación por ADN y código de barras para la vida usando el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) como secuencia base para la identificación de especies animales, permiten lograr resultados en corto tiempo, garantizan la identificación de especies y complementan la información ya obtenida por las OTU, lo que facilita la documentación de la biodiversidad en el planeta.

## **5. Uso del gen citocromo oxidasa I (COI) en la realización de códigos de barras**

El gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) es la subunidad principal del complejo citocromo C oxidasa (complejo proteico transmembrana o complejo respiratorio IV) (Figura. 5), se encuentra en bacterias y en la mitocondria de eucariotas, es la última enzima en la cadena de transporte de electrones respiratorios y a menudo se usa como un código de barras de ADN para identificar especies animales debido a que tiene una alta tasa de sustitución, presentando variación de la secuencia entre especies del mismo género (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Luo *et al.*, 2011).

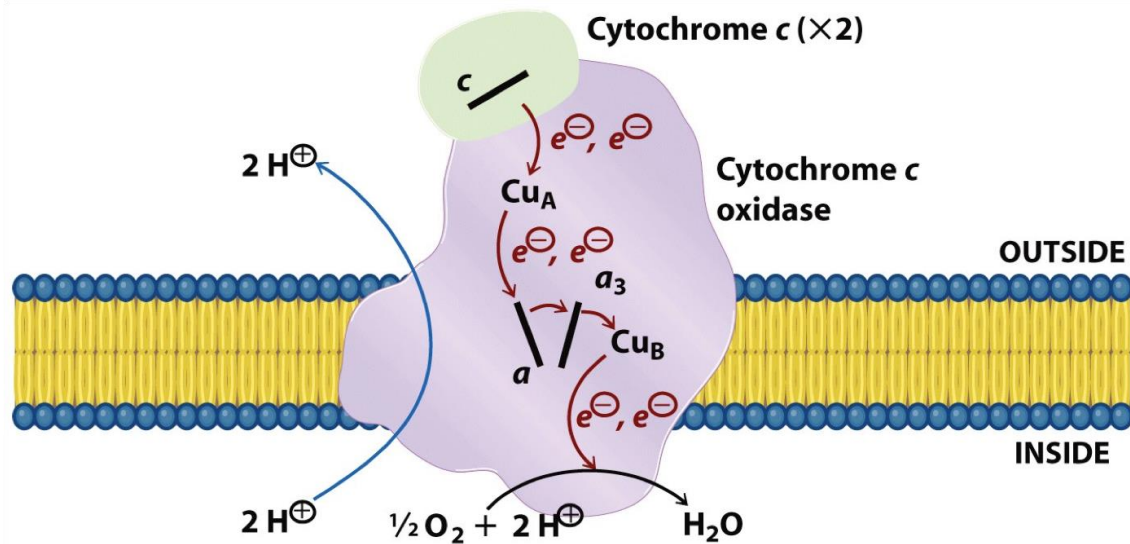


Figure 14-13 Principles of Biochemistry, 4/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

**Figura 5.** Complejo proteico transmembrana: Estructura del citocromo c (color verde), portador de electrones desde el complejo III al complejo IV y el complejo IV conocido como citocromo c oxidasa (color purpura).

En la última década, estudios realizados en grupos animales como aves, peces, mamíferos, lepidópteros, hemípteros y otros insectos han demostrado que el fragmento COI presenta una variación interespecífica lo suficientemente amplia para permitir una buena correspondencia entre la identificación molecular y la identificación basada en caracteres morfológicos de las especies (Hebert *et al.*, 2003c; Hebert *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005; Borisenko *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011). No obstante, Moritz y Cicero, 2004; Meyer y Paulay, 2005, sugieren que el solapamiento a nivel intraespecífico e interespecífico aumenta cuando se analizan muestras de un mayor grupo de organismos emparentados haciendo que el código de barras de ADN no sea tan eficaz para todos los grupos taxonómicos. En otras especies pertenecientes a la clase de los anfibios, cuando varios individuos de la misma especie proceden de regiones geográficas apartadas, la variación intraespecífica puede superar la variación interespecífica si se habla de especies del mismo género, esto hace que la delimitación de especies con solo la secuencia de COI sea más difícil de realizar (Vences *et al.*, 2005). Sin embargo, en estudios realizados por Kerr *et al.*, 2009; Lukhtanov *et al.*, 2009, con lepidópteros y aves se ha confirmado que al integrar individuos y taxones de diferentes regiones geográficas se pueden

identificar normalmente las especies usando el gen COI. Otros estudios por su parte han revelado que aunque el código de barras basado en la secuencia del gen COI es apropiado para la identificación de especies en la mayoría de grupos de animales, existen algunas dificultades al usarlo en algunos grupos de esponjas y cnidarios, debido a que este presenta una evolución muy lenta y como consecuencia la distancia genética entre especies cercanas es demasiado pequeña para permitir la identificación confiable a nivel de especie (Hebert *et al.*, 2003d; Rougerie *et al.*, 2014). Por lo tanto, se ha sugerido que en esponjas se realice secuenciación de un fragmento más largo del gen COI y se incluya el gen nuclear, *Internal Transcribed Spacer* (ITS). En cnidarios el gen COI ha sido poco estudiado y su técnica avanza muy lento, la recomendación en este grupo es usar el gen mitocondrial 16S como marcador complementario para código de barras, ya que proporciona un nivel de resolución que diferencia entre especies. Además, muestra un alcance suficientemente amplio para distinguir géneros, familias e incluso una superfamilia (Plumularoidea), y para inferir las relaciones entre muchos de estos grupos taxonómicos en diferentes niveles jerárquicos (Moura *et al.*, 2008).

Estudios utilizando código de barras de DNA son de gran importancia para la identificación de mamíferos en zonas neotropicales donde por la gran extensión del territorio y pese al esfuerzo de los investigadores por documentar la biodiversidad de este grupo, falta conocimiento detallado de este. Además, permite la aplicación en estudios ecológicos de carnívoros, facilitando determinar las especies de las cuales se alimentan (Figueiró, 2010). En reptiles, esta metodología permitió proponer los primeros códigos de barras para 31 de las 128 especies de las familias Liolaemidae y Phyllodactylidae de reptiles descritas para Chile (Barría, *et al.*, 2012). En Colombia, estos estudios han permitido identificar individuos de las 7 especies de tortugas marinas descritas actualmente; estos estudios han permitido realizar un control de tráfico ilegal de especies, cuando solo se tienen muestras de carne, huevos o caparazón. La secuenciación de un fragmento de 611pb del gen COI permitió identificar y determinar los haplotipos de 17 tortugas carey anidantes en playas del caribe colombiano (Daza y Hernández, 2014).

## **6. Estado normativo para el acceso a resultados de diversidad genética basados en técnica de código de barras en Colombia**

Los códigos de barras de ADN proporcionan un método estandarizado de identificación de especies a través del uso de secuencias cortas de la región citocromo oxidasa I del genoma mitocondrial, haciendo un trabajo importante en los sectores económico, de salud, agropecuario y ambiental, ya que condiciona las medidas de gestión asociadas a epidemias, plagas e invasiones biológicas.

En Colombia los estudios de biodiversidad genética son de gran importancia, tanto para la comunidad científica, como para los entes gubernamentales, por lo que están constituidos y especificados en el artículo 58 de la constitución política de Colombia, Ley 99 de 1993, Ley del medio ambiente en el artículo 5. numeral 20, donde establece que le corresponde al Ministerio del Medio Ambiente coordinar, promover y orientar las acciones de investigación sobre el medio ambiente y los recursos naturales renovables, establecer el Sistema de Información Ambiental y organizar el inventario de biodiversidad y de los recursos genéticos nacionales. Además, el decreto 309 del 2000, por el cual se reglamenta la investigación científica sobre diversidad biológica, en el que el capítulo IV establece las aclaraciones y manejo que se debe dar a los recursos genéticos y la ley 1286 de 2009, la cual promueve el fortalecimiento de una cultura basada en la generación, la apropiación, la divulgación del conocimiento, la investigación científica, el desarrollo tecnológico, la innovación y el aprendizaje permanente, otorgando incentivos a las instituciones que demuestren la veracidad de sus resultados.

En el marco de la política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos (PNGIBSE) proyectada al año 2035, se acepta que el conocimiento de la biodiversidad nacional a nivel genético es limitado y no se cuenta con cifras representativas al respecto de su estado actual. Debido a que el acceso a recursos genéticos se concede a través del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible para investigación o para bioprospección y su número no es alentador, entre 2011 y 2017, se firmaron 179 contratos de acceso a recursos genéticos, todos con fines de investigación, pero solo 1 utilizando ADNmt (MAVDT 2018). Es evidente que el conocimiento sobre el patrimonio genético y

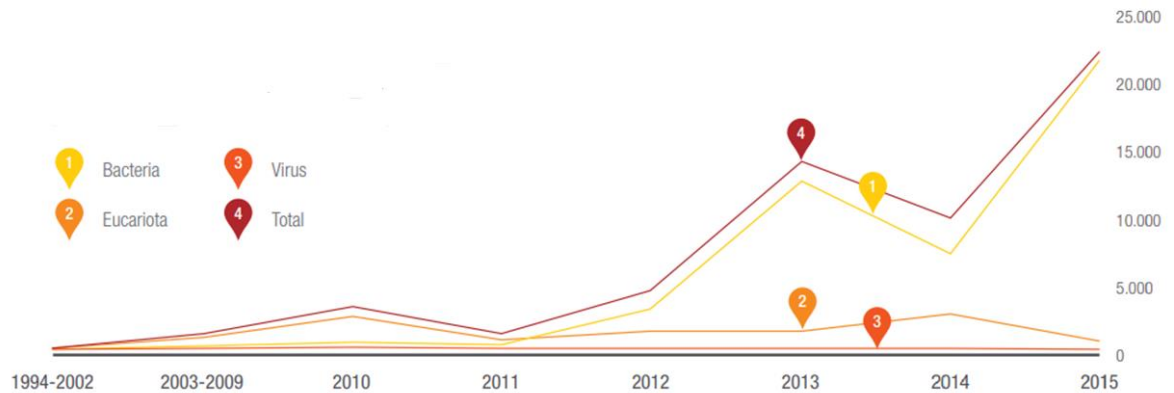
molecular de la Nación, como potencial para estrategias de uso, preservación y restauración de biodiversidad, aún es limitado, debido generalmente a las barreras normativas y culturales para el acceso al material genético. (MADS, 2013). Esto explica, el ¿por qué?, la técnica de código de barras se ha trabajado en Colombia por más de una década y aun no se evidencia un numero de resultados. Se puede inferir que muchos de estos resultados han quedado en el anonimato o publicados en revistas locales, debido a la extensión en tiempo y documentación que lleva tramitar un contrato para el uso de recursos genéticos.

### **7. Perspectivas del Código de barras de la vida y documentación de la biodiversidad de fauna en Colombia**

El uso de secuencias de ADN ha sido propuesto como base fundamental en la clasificación biológica y como herramienta analítica para el reconocimiento e identificación de especies en grupos particularmente complejos. En Colombia, analizar la biodiversidad resulta un proceso confuso, pero de gran interés para los investigadores, debido a que es el segundo país más biodiverso del mundo. De acuerdo con el reporte otorgado por Colciencias en 2016, Colombia cuenta con 54.871 especies registradas, de las cuales 66 especies de aves, 1.500 plantas, 367 anfibios endémicos, 115 reptiles, 34 mamíferos y 1543 orquídeas son endémicas en el país. Además, se registran cerca de 7.432 especies de vertebrados: 479 mamíferos, 1889 aves, 571 reptiles, 803 anfibios, 2.000 peces marinos, 1533 peces dulceacuícolas y 197 aves migratorias, 30.436 especies de plantas, 32 biomas terrestres y 314 tipos de ecosistemas, los de páramo representan aproximadamente el 1,7% del territorio colombiano que aportan agua al 70% de la población. (Colciencias, 2016)

Por lo anterior, la ciencia trabaja para contribuir al cuidado y preservación de las especies, proponiendo alternativas de cambio para el bienestar de todos los seres vivos. Una mirada detallada sobre la biodiversidad puede revelar la información genética de los organismos. La variabilidad de moléculas de ADN en las poblaciones de una especie está relacionada con el potencial de adaptación que la misma tiene frente a cambios en su ambiente. La información molecular permite calcular el flujo genético entre poblaciones, su aislamiento o conectividad, su vulnerabilidad a la extinción, medir la diversidad filogenética, la historia evolutiva del

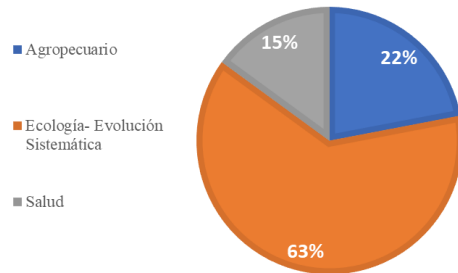
conjunto de especies que hacen parte de la comunidad, identificar especies crípticas y determinar especies a partir de muestras de piel, carne o cualquier tejido obtenido de la incautación del tráfico ilegal de especies, entre otros. Por esta razón, los análisis de ADN deben ser considerados en la priorización de áreas para la conservación, ya que refleja el potencial de respuesta al cambio de las comunidades en un área determinada (Humboldt,2015). En Colombia, la información genética ha sido poco estudiada. Sin embargo, el número de secuencias genéticas publicadas para diversos grupos biológicos, particularmente para bacterias, ha aumentado significativamente en los últimos cuatro años (Figura. 6). Una revisión de los estudios asociados con las secuencias de bacterias indica que la mayor parte de esta información se ha generado en los sectores agropecuario y de salud (Figura. 7). En contraste, existen muchos menos datos de secuencias publicadas en temas tan relevantes como la bioprospección, la bioremediación y las ciencias básicas. Así mismo, la cantidad de información genética disponible para plantas y animales principalmente asociada con estudios de ecología, evolución y sistemática es muy escasa (Cháves y Santamaria, 2006).



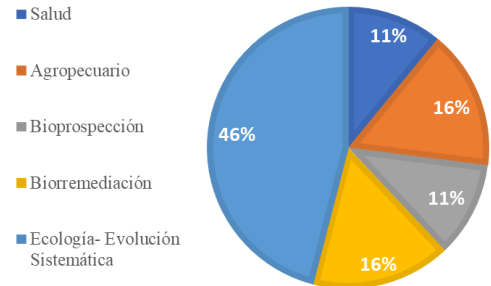
**Figura 6.** Número de secuencias de ADN, generada por año, por dominio de organismos con origen en Colombia publicadas en la base de datos Genbank (Base de datos de secuencias genéticas de ADN del *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*). Tomado de *Instituto Humboldt*



**PORCENTAJE DE ESTUDIOS ASOCIADOS A LAS SECUENCIAS DE EUCARIOTAS PUBLICADAS EN EL GENBANK POR SECTOR DE APLICACIÓN**



**PORCENTAJE DE SECUENCIAS DE ADN DE BACTERIAS PUBLICADAS EN GENBANK CATEGORIZADAS POR SECTOR DE APLICACIÓN**



**Figura 7.** Porcentaje de secuencias de ADN de eucariotas y bacterias publicadas en GenBank categorizadas por sector de aplicación. Tomado de *Instituto Humboldt*

### III. CONCLUSIONES

La identificación de especies animales es un tema de gran importancia dentro de la sociedad, ya que permite establecer un concepto de la biodiversidad mundial y a partir de este brindar estrategias tanto de uso sostenible como de protección a las mismas, de acuerdo a su estado de conservación. Los avances que ha tenido la ciencia y el desarrollo de técnicas de biología molecular, como la iniciativa de código de barras para la vida, en el marco de su propuesta estándar de usar 648pb del gen mitocondrial citocromo oxidada I COI para la identificación de especies animales, ha dado resultado en más de 75 países del mundo con cerca de 436.044 especies identificadas hasta el momento. Sin embargo, es una técnica que pese a que se está trabajando hace más de tres décadas, aun no es muy conocida y aceptada dentro de la comunidad científica, algunas de las razones es que se piensa que se omite los caracteres taxonómicos convencionales, por otra parte el elevado costo en elementos y equipos de laboratorio con los que se realiza el procedimiento y otra, aún más importante ya que es la razón de este estudio es la falta de información dentro de los investigadores, ya que muchos acostumbran a usar las técnicas de antaño para sus estudios.

En el presente estudio se logró copilar información en la que se establece la veracidad y efectividad de la técnica código de barras para la vida usando el gen COI, donde su máximo exponente, el doctor Hebert, un científico de la universidad de Guelph, en Ontario, Canadá, junto con sus colaboradores, no ha parado de realizar identificación de especies animales usando esta técnica y demostrando que es confiable y que se puede llegar a obtener un código de barras de nucleótidos para todas las especies animales del planeta. Hebert y otros investigadores describen en sus publicaciones que esta técnica ha funcionado en muchas especies de diferentes grupos como mamíferos, aves, peces, reptiles, anfibios y en general la mayoría de los grupos invertebrados.

De manera puntual se hace la invitación a la comunidad científica, particularmente en Colombia a que se use esta técnica ya que es de fácil acceso, no necesita sacrificar el individuo para su identificación y se realiza en corto tiempo, teniendo en cuenta que Colombia es el segundo país más biodiverso de América y que la labor de identificación de

especies es ardua y no se cuenta con especialistas para cada uno de los grupos animales. El proyecto de código de barras es una técnica que se encuentra estandarizada para la mayoría de los grupos, por lo que no requiere de una larga práctica de laboratorio para obtener resultados.

#### IV. BIBLIOGRAFÍA

- Aquadro, C. F., & Greenberg, B. D. (1983). Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103(2), 287-312.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species* Harvard Univ Pr.
- Barría D, C., Sallaberry-Pincheira, N., Gonzalez-Acuña, D., Leitchle, J., Riquelme, P., Garín, C., ... & JA, V. 2012. Cold Code Chile: Datos preliminares acerca de código de barras genético de reptiles chilenos.
- Blaxter M.L.(2004). The Promise of a DNA Taxonomy. *Philos Trans. Proceedings of the Royal Society of London .Series B: Biological Sciences*, 359(1444):669-679.
- Boore, J. L., Collins, T. M., Stanton, D., Daehler, L. L., & Brown, W. M. (1995). Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial-DNA rearrangements.
- Borisenko Av, Lim Bk, Ivanovanv, Hanner Rh, Hebert PDN. (2008). DNA Barcoding in Surveys of Small Mammal Communities: A Field Study in Suriname. *Molecular Ecology Resourch*. 8(3):471-479.
- Camacho\_Mosquera, L., Amorocho, D., Mejía-Ladino, L. M., Palacio-Mejía, J. D., & Rondón-González, F. (2008). Caracterización genética de la colonia reproductiva de la tortuga marina golfina- *Lepidochelys olivacea*-en el Parque Nacional Natural Gorgona (Pacífico Colombiano) a partir de secuencias de ADN mitocondrial.
- Cantatore, P., Roberti, M., Rainaldi, G., Gadaleta, M. N., & Saccone, C. (1989). The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(19), 10965-10975.

- Carbayo F, Marque AC (2011) El costo de describir todo el reino animal. *Tendencias en Ecología y Evolución* 26:154-155.
- Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1985). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22(3), 252-271.
- Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL and Hebert PD (2007) DNA barcoding of Neotropical bats: Species identification and discovery within Guyana. *Mol Ecol Notes* 7:184-190.
- Chaves, A., Clozato, C., Lacerda, D., Sari, E., & Santos, F. (2008). Molecular taxonomy of Brazilian tyrant-flycatchers (Passeriformes: Tyrannidae). *Molecular Ecology Resources*, 8(6), 1169-1177.
- Cháves, M. E. Y M. Santamaría. (eds.). 2006. Informe sobre el avance en el conocimiento y la información de la biodiversidad 1998 – 2004. Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. DC. Colombia.
- Colciencias. 2016. Colombia el segundo país mas biodiverso del mundo. [http://www.colciencias.gov.co/sala\\_de\\_prensa/colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo](http://www.colciencias.gov.co/sala_de_prensa/colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo)
- Copyright BOLD. (2014-2018). Barcode of life data system. Canadá. <http://www.boldsystems.org/>
- Daza-Criado, L., & Hernández-Fernández, J. (2014). Molecular identification and first report of mitochondrial COI gene haplotypes in the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* (Testudines: Cheloniidae) in the Colombian Caribbean nesting colonies. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 7123-7132.

- De Giorgi, C., Martiradonna, A., Pesole, G., & Saccone, C. (1997). Lineage-specific evolution of echinoderm mitochondrial ATP synthase subunit 8. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29(3), 233-239.
- Figueiró, H. V. (2010). Código de barra de DNA de mamíferos Neotropicais, e sua aplicação em estudos ecológicos de carnívoros.
- FitzSimmons, N. N., Limpus, C. J., Norman, J. A., Goldizen, A. R., Miller, J. D., & Moritz, C. (1997). Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8912.
- Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D. H., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., & Hebert, P. D. N. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 959-964.
- Hajibabaei, M., Singer, G., Clare, E., & Hebert, P. (2007). Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology*, 5(1), 24.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. (2007b). DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167-172.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003a). Barcode of Life: Identifying Species with DNA Barcoding Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hebert P., Ratnasingham S, De Waard J. (2003b) Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (S96S99).

- Hebert, P., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003c). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hebert P., Ratnasingham S, De Waard Jr. (2003d) Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(S1 1), S96-S99.
- Hebert P., Stoeckle My, Zemplak Ts, Francis C. M.(2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2(10):e312.
- Hebert, P., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852-859.
- Hillis, Z. M., Richardson, J. I., & Richardson, T. H. (1995). Buck island reef national monument hawksbill sea turtle research program, 1991. *NOAA Technical Memorandum NMFS SEFSC*, (361), 47.
- Hofmann, E., Powell, E., Klinck, J., & Wilson, E. (1992). Modeling oyster populations: III. critical feeding periods, growth and reproduction.
- Humbold. 2015. Biodiversidad, estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia. Pdf. 1-18
- Jacobs, H. T., Elliott, D. J., Math, V. B., & Farquharson, A. (1988). Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology*, 202(2), 185.
- Kerr Kcr, Stoeckle My, Dove Cj, Weigt La, Francis Cm, Hebert Pdn. (2007). Comprehensive DNA Barcode Coverage of North American Birds. *Molecular Ecology Notes*. 7(4):535-543

- Lansman, J., T. Hallam, & T. Rink. (1987). Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial walls as mechanotransducers?. *Nature* 325:811-813.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Integrating cells into tissues.
- Lukhtanov Va, Sourakov A, Zakharov Ev, Hebert Pdn. (2009). DNA Barcoding Central Asian Butterflies: Increasing Geographical Dimension does not Significantly Reduce the Success of Species Identification. *Molecular Ecology Resour.* 9(5):1302-1310.
- Luo A, Zhang A, Ho S, Xu W, Zhang Y, Shi W. (2011). Potential Efficacy of Mitochondrial Genes for Animal DNA Barcoding: A Case Study Using Eutherian Mammals. *BMC Genomics.* 12(1):84.
- May Rm, Harvey Ph. (2009). Species Uncertainties. *Science.*323(5915):687-687.
- Meyer C. Paulayg. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *Proceedings of the Royal Society of London.Series B: Biological Sciences,*3(12):e422.
- Ministerio De Ambiente y Desarrollo Sostenible. 2013. Política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos (PNGIBSE). ISBN: 978-958-8343-71-6
- Moritz C, Cicero C. (2004). DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *Proceedings of the Royal Society of London.Series B: Biological Sciences,* 2(10):e354.
- Moura Cj, Harris Dj, Cunha Mr, Rogers Ad. (2008). DNA Barcoding Reveals Cryptic Diversity in Marine Hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from Coastal and Deep-sea Environments. *Zool Scr.* 37(1):93-108.
- MAVDT. 2018. Listado de contratos de acceso a recursos genéticos firmados a 2018 por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales. Bogotá.



- Okimoto, R., Chamberlin, H. M., Macfarlane, J. L., & Wolstenholme, D. R. (1991). Repeated sequence sets in mitochondrial DNA molecules of root knot nematodes (Meloidogyne): Nucleotide sequences, genome location and potential for host-race identification. *Nucleic Acids Research*, 19(7), 1619-1626.
- Padial Jm, De La Riva I.(2007). Integrative Taxonomists Should Use and Produce DNA Barcodes. *Biological systems*.(1586):67-68.
- Park DS, Footitt R, Maw E, Hebert PDN (2011). Barcoding bugs: DNA-based identification of the true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Proceedings of the Royal Society of London.Series B: Biological Sciences*, 6: e18749.
- Paz, A., González, M., Crawford, J. A. (2011) Código de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana* 16(3), 161-176.
- Rangel C.J. 2015. La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 39(151):176-200
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. (2013). A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System
- Rougerie R, Kitching IJ, Haxaire J, Miller SE, Hausmann A, Hebert PDN (2014). Australian Sphingidae – DNA Barcodes Challenge Current Species Boundaries and Distributions. *Proceedings of the Royal Society of London.Series ONE* 9(7): e101108.
- Smith, M. A., Fisher, B. L., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: The ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1825-1834.
- Stryer, L. (1995). *Bioquímica*, Cuarta Ed.; S.A. Barcelona. Editorial Reverte. 2.

- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas Rh, Vogler Ap. (2003). A Plea for DNA Taxonomy. *Trends Ecology Evolution*. 18(2):70-74.
- Tibayrenc, M. (2005). Bridging the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. *Trends in Microbiology*, 13(12), 575-580.
- Vences M, Thomas M, Van Der Meijden A, Chiari Y, Vieites Dr. (2005). Comparative Performance of the 16S rRNA Gene in DNA Barcoding of Amphibians. *Front Zool*.2(1):5.
- Vilaça ST, Lacerda DR, Sari HER and Santos FR (2006) DNA-based identification to Thamnophilidae (Passeriformes) species: The first barcodes of Neotropical birds. *Rev Bras Ornitol* 14:7-13
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- Yamazaki, S., Ali, F., & Hirata, H. (1997). Low water pollution rearing by means of polyculture of larvae of kuruma prawn *Penaeus japonicus* with a sea lettuce *Ulva pertusa*. *Fisheries Science: FS*, 63(6), 1046-1047.