

Revisión taxonómica de los subgéneros *Hyalodaphnia* y *Daphnia* (género *Daphnia*), mediante el uso de marcadores moleculares y Código de Barras (COI)

Taxonomic Revision of the Subgenus *Daphnia* and *Hyalodaphnia* (*Daphnia* genus) using Molecular Markers and Barcodes (COI)

C. K. Huertas Rodríguez^{a,*}
L. Arrieta Violet^a

Resumen

Esta revisión analizó algunos estudios realizados con COI-Barcode, ND5, 12S RNAr y 16S RNAr, con el fin de esclarecer la confusión existente en la clasificación de los subgéneros *Hyalodaphnia* y *Daphnia* (género *Daphnia*). Los resultados indican que el uso del gen COI permitió identificar, a partir de una especie de *D. tenebrosa* clasificada anteriormente, tres especies provisionalmente diferentes; igualmente, tres especies de *D. pulex* parecen formar linajes monofiléticos en Churchill, Manitoba-Canadá. Para el mismo gen en el complejo *D. pulex* se obtuvieron siete especies provisionalmente diferentes en la población argentina. En el complejo *D. pulex*, en Norte América (Canadá y Estados Unidos) y Europa, usando el gen ND5, se obtuvieron nueve especies provisionalmente diferentes, tres de las cuales estaban erróneamente clasificadas como *D. obtusa*. Para el complejo *D. galeata*, del subgénero *Hyalodaphnia*, mediante el análisis del gen COI y 12S ADNr, se asignaron cuatro especies provisionalmente nuevas; así mismo, en el complejo *D. longiremis* se ubicó *D. cristata*. El estudio del complejo *D. laevis* en Norte América, analizando la variación de aloenzimas y los genes 12S y 16S ADNr, permitió discriminar cinco especies provisionalmente diferentes. Sin embargo, se recomienda realizar más estudios para confirmar la clasificación confusa del género *Daphnia*.

Palabras clave: Código de barras de ADN, COI, *Daphnia*, Marcadores moleculares, Taxonomía, subgénero *Daphnia*, Subgénero *Hyalodaphnia*.

Abstract

The objective of this review is to analyze some studies that clarify the taxonomic confusion about subgenera *Hyalodaphnia* and *Daphnia* of the genus *Daphnia*, through the studies with molecular markers and barcodes. The results were the following ones: the use of the gen COI allow to identify from specie of *D. tenebrosa* classified before, three provisionally different species, equally three species of *D. pulex* seems to form monophyletic lineages in Churchill, Manitoba, Canada. For the same gene in the complex *D. pulex*, it was obtained seven provisionally different species in the Argentina population. In the complex *D. pulex* in

^aGrupo de Investigación en Genética y Biología Molecular, GEBIMOL, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Uptc.

*Autor de correspondencia: cindy.huertas@uptc.edu.co

North America (Canada and United States) and Europe, using the ND5 gene nine provisionally different species were obtained, three of which were erroneously classified such as *D. obtuse*. For complex *D. galeata*, from the subgenus *Hyalodaphnia* through the analysis of the gene COI y 12S DNAr, were provisionally assigned four new species, also in the complex *D. longiremis* stood *D. cristata*. The study of the complex *D. laevis* in North America analyzing the variation of the allozymes and 12S and 16S DNAr genes, it allowed to discriminate five provisionally different species. However is recommended to realize more studies for confirming the confuse classification of the genus *Daphnia*.

Key words: DNA Barcoding, COI, *Daphnia*, Molecular Markers, Taxonomy, Subgenus *Daphnia*, Subgenus *Hyalodaphnia*.

1. Introducción

Dada la alta diversidad presente en el reino animal, se observó una creciente necesidad de buscar asistencia tecnológica para la descripción original y el reconocimiento de especies [1, 2]. Investigaciones recientes han sugerido la posibilidad de crear identificación que dependa del análisis de diversidad de secuencias pequeñas de ADN [3]; a partir de esto, se ha propuesto un sistema basado en secuencias del ADN como marcadores moleculares en taxonomía [4] y, últimamente, el Código de Barras de ADN, para identificar organismos vivos y brindar soporte a los programas de investigación sobre biodiversidad [5].

El Código de Barras del ADN (DNA Barcoding) es un análisis que se basa en la comparación de distancias genéticas, utilizando secuencias cortas de ADN, en regiones de genes estandarizados para identificación y descubrimiento de especies [6, 7]. El propósito de implementar esta técnica es complementar, mas no suplantar, las actuales prácticas taxonómicas (en caracteres morfológicos, ultraestructurales, cariotípicos, etc.); por lo tanto, esta técnica consiste en identificar un espécimen desconocido en términos de clasificación conocida [8]. Las secuencias de ADN proporcionan caracteres diagnósticos que complementan la taxonomía tradicional, pero no la reemplazan; los estudios de códigos de barras pueden ayudar a detectar especies que se pasan por alto con rasgos morfológicos sutiles [9].

Los dos principales objetivos del código de barra de ADN se basan en identificar los especímenes y mejorar el descubrimiento de nuevas especies, facilitando la identificación, en particular, en los organismos crípticos microscópicos [5]. El Código de Barras de ADN fue concebido inicialmente como un sistema estándar para identificar especies [5, 10]. La

dificultad principal de los códigos de barras de ADN consistió en encontrar el gen ideal que discrimina cualquier especie en el reino animal. Hebert y col. [5, 11, 12] propusieron que un sistema de Código de Barras del ADN para la vida animal podría basarse en la diversidad de secuencias del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad I (COI).

La razón principal para la selección de COI como el gen de Código de Barras estándar fue el patrón típico de variación observado para numerosas especies, con divergencia marcada y falta de solapamiento entre distancias genéticas intraespecíficas e interespecíficas [5], característica considerada de suma importancia para la exactitud y fiabilidad de los resultados obtenidos en cuanto a separación e identificación de especies [8]. COI, en comparación con otros genes, parece tener una señal filogenética útil en una gama más amplia de niveles taxonómicos; la evolución de COI es suficientemente rápida para permitir la discriminación de especies estrechamente relacionadas, así como variación intraespecífica asociada con la estructura geográfica (subespecies) [8]. La región propuesta está situada en el extremo 5' del gen mitocondrial citocromo C oxidasa I (COI), con una longitud de 648 pb [5, 8, 13, 14].

Las numerosas ventajas del genoma mitocondrial, como su condición haploide, falta de intrones, herencia matrilineal, exposición limitada a la recombinación, altas tasas de evolución y la presencia de regiones conservadas y variables, facilitan la tipificación molecular de individuos, y su uso para la diferenciación de estos a diferentes escalas taxonómicas [15, 16]. Sin embargo, las excepciones a la capacidad de resolución de COI se presentan en las esponjas y Cnidarios, ya que la tasa de evolución del genoma mitocondrial no es igual para todas las especies vivas [8]. Las esponjas y Cnidarios tienen una tasa evolutiva 10 a 20 veces más lenta que otros

metazoos [9, 17, 18], lo cual causa la falta de variación de la secuencia COI, impidiendo la distinción de estos organismos por debajo del nivel de familia [19]. Se ha determinado en estudios de diversidad de secuencias de COI entre los taxones congéneres en los **phyla** animales mayores, que aproximadamente el 98 % de las especies presentan más del 2 % de divergencia de secuencias; sin embargo, en los Cnidarios se observa divergencia mucho menor que la presentada en otros animales [5], determinando así que las divergencias de la secuencias en COI regularmente permiten la discriminación de especies muy afines en todo el reino animal, excepto en Cnidaria [8], lo que sugiere que la identificación a nivel de especies puede obtenerse a través de análisis COI [5].

Para el caso particular del género *Daphnia*, que se subdivide en tres subgéneros (*Ctenodaphnia*, *Hyalodaphnia* y *Daphnia*), la clasificación del subgénero *Ctenodaphnia* se considera bien resuelta, pero las fronteras de las especies de los subgéneros *Hyalodaphnia* y *Daphnia* aún son problemáticas, siendo este último el más confuso [20]. El género *Daphnia* es muy diverso genéticamente y presenta una serie de especies crípticas y complejos múltiples de especies difíciles de discriminar desde el punto de vista morfológico; esta gran diversidad es producto de la plasticidad fenotípica, la reproducción interespecífica (hibridación), la poliploidía y la reproducción partenogénica de las especies; razón por la cual, en los últimos años, se ha tenido que recurrir al estudio de marcadores moleculares, como las isoenzimas y los genes mitocondriales específicos, y, recientemente, el uso del Código de Barras, para delimitar las especies crípticas, los complejos de especies y descubrir nuevas especies.

El objetivo de esta revisión fue analizar estudios realizados con COI-Barcode, ND5, 12S RNAr y 16S RNAr, que permitan esclarecer la confusión en la clasificación de los subgéneros *Hyalodaphnia* y *Daphnia* del género *Daphnia*, en la identificación de especies y separación de ellas en los complejos presentes en estos subgéneros, y el aporte realizado por la metodología código de barras.

2. Metodología

La literatura utilizada para la revisión sobre marcadores moleculares y Código de Barras de ADN

en el género *Daphnia*, en español o inglés, se obtuvo de varias fuentes documentales, como Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>) y Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), entre otras, mediante los descriptores: *Código de Barras de ADN* y *Daphnia*; la búsqueda se limitó al periodo 1980-2011. Los artículos fueron seleccionados de aquellos que informasen sobre los siguientes aspectos: a) tipos de estudios (experimental, de población, de revisión, etc.), b) cualquier año y cualquier población de *Daphnia*, c) uso de marcadores moleculares y d) uso de Código de Barras en el género *Daphnia*. De los registros encontrados se seleccionaron publicaciones obtenidas tras la combinación de las diferentes palabras clave, teniendo en cuenta la relevancia de los estudios y sus contribuciones.

3. Resultados y discusión

Actualmente existe un sistema de datos de Código de Barras de la vida (BOLD SYSTEM)-www.barcodinglife.org-, plataforma que proporciona una bioinformática integrada para todo el proceso de análisis de Código de Barras de ADN, la cual es un repositorio para los registros de especímenes y secuencias que forman la unidad básica de datos de todos los estudios de Código de Barras, así como un banco de trabajo que ayuda en la gestión, el control de calidad y el análisis de los datos de Código de Barras, y un vehículo para la colaboración entre las comunidades de investigación dispersas geográficamente [13]. Los datos para el género *Daphnia* indican que hay un registro de 1483 especímenes, de los cuales, 96 presentan Código de Barras [13].

Daphnia es un género de crustáceos planctónicos descrito por O. F. Müller; se ubica dentro de la familia *Daphniidae*, infraorden Anomopoda, suborden Cladocera, orden Diplostraca, subclase Phyllopoda, clase Branchiopoda, subphylum Crustacea y phylum Artropoda. Estos organismos son considerados uno de los grupos acuáticos cuyo componente de especies muestra amplia distribución geográfica y diversificación regional limitada [21]; sin embargo, análisis recientes utilizando los marcadores moleculares y Código de Barras han revelado que muchos de los taxones de cladóceros reconocidos por la taxonomía tradicional son en realidad una amalgama de especies genéticamente divergentes [21, 22].

Esta revisión arrojó los siguientes resultados concernientes al uso de marcadores moleculares y Cód

igo de Barras, tendientes a dilucidar la confusión taxonómica en el género *Daphnia* (tabla 1).

Tabla 1. Resultados del uso de marcadores moleculares y Código de Barras reportados por diferentes autores.

Autor	Año	País	Localidad	Secuencias Usadas	Especie Estudiada	Hallazgos
Weider y Hebert [23]	1987	Canadá	Churchill, Manitoba	Estanques salinos cerca de la bahía de Hudson.	Aloenzimas de cuatro Loci, Pgm (fosfoglucomutasa), Pgi (fosfoglucomutasa), Got (glutamato oxaloacetato transaminasa), Ao (aldehído oxidasa)	<i>D. pulex</i> Análisis de aloenzimas de cuatro loci para indicar "ecotipos" multiclonales de <i>D. pulex</i> , adaptados a diferentes rangos de conductividad/salinidad en estanques cercas a la Bahía de Hudson.
Colbourne y col. [24]	1998	Norte América y Europa	Distrito Franklin Canadá, Siberia oriental, Alemania, Groenlandia, Islandia, Iowa USA, Manitoba Canadá, Noruega, territorios Noroccidentales Canadá, Ontario Canadá, Oregón USA, Suiza, Washington USA, Siberia Occidental, Svalbard Noruega.	Genes Mitocondriales ND4y ND5.	<i>D. pulex</i>	Revelaron que el complejo <i>D. pulex</i> está dividido en nueve linajes distintos: <i>D. pulicaria</i> , polar, <i>D. pulicaria</i> , occidental, <i>D. pulicaria</i> , oriental, <i>D. melanica</i> , <i>D. middendorffiana</i> , <i>D. pulex</i> , panártica, <i>D. pulicaria</i> , europea, <i>D. tenebrosa</i> , <i>D. pulex</i> , europea.
Taylor y col. [25].	1998	Estados Unidos y México.	33 localidades: Estados Unidos (Estanques de granjas, presas, reservorios; de Arizona, California, Nebraska, Connecticut, Georgia, Massachusetts, Michigan, Carolina del Norte, Nueva York, Oklahoma, Oregón y Texas). México (Lagos, presas y reservorios de Tamaulipas e Hidalgo).	Genes mitocondriales (12S y 16S ARN).	<i>D. laevis</i>	A partir de un estudio del complejo <i>D. laevis</i> se encontró la existencia de cinco especies crípticas y grupos ampliamente alopátricos (<i>D. dubia</i> , <i>D. laevis laevis</i> , <i>D. laevis gessneri</i> , <i>D. magniceps magniceps</i> , <i>D. magniceps pacifica</i>).
Weider y col. [26]	1999	Canadá	Churchill, Manitoba	Usando polimorfismo en los sitios de restricción en los genes ND4 y ND5.	<i>D. pulex</i>	Confirmaron los resultados de Colburne y col.[24], encontrando que cuatro de los linajes adicionales dentro del complejo <i>D. pulex</i> , solo son encontrados en Churchill, incluyendo <i>D. pulex</i> , panártica, <i>D. pulicaria</i> , occidental, <i>D. pulicaria</i> , polar y <i>D. middendorffiana</i> .
Schwenk y col. [27]	2000	Islandia, Portugal, Norte África	Finlandia, Grecia, América.	Norte de Europa (Islandia a Finlandia), sur de Europa (Portugal a Grecia), África y Norte América.	Gen mitocondrial COI, la subunidad ribosomal 12S, y secuencias de ADN nuclear del primero y segundo espaciador transcrito interno.	Subgénero <i>Hyalodaphnia</i> Hallaron que el subgénero <i>Hyalodaphnia</i> del género <i>Daphnia</i> , constituye un grupo monofilético que se compone de cuatro complejos de especies (<i>D. curvirostris</i> , <i>D. longiremis</i> , <i>D. laevis</i> , <i>D. galeata</i>)
Adamowicz, y col. [20]	2004	Argentina	Estanques, Cunetas laterales, lagos de playa, lagos alpinos, ríos, reservorios y lagos salinos en Buenos Aires, Provincias de Córdoba y La Pampa.	Gen mitocondrial COI.	Género <i>Daphnia</i> .	Mostraron la presencia de siete grupos: <i>D. obtusa</i> 1, 2 y 3; <i>D. ambigua</i> , <i>D. parvula</i> , <i>D. peruviana</i> y <i>D. pulicaria</i> .
Jeffery y col. [28]	2011	Canadá	Churchill, Manitoba.	Gen mitocondrial COI	<i>D. pulex</i>	Reportaron las cinco especies de <i>Daphnia</i> previamente conocidas en Churchill, Manitoba Canadá: <i>D. magna</i> y cuatro especies dentro del complejo <i>D. pulex</i> : <i>D. cf. pulex</i> , <i>D. pulicaria</i> , <i>D. cf. middendorffiana</i> y <i>D. tenebrosa</i> .
Jeffery y col. [28]	2011	Canadá	Churchill, Manitoba.	Gen mitocondrial COI	<i>D. pulex</i>	Reportaron información que <i>D. tenebrosa</i> estuvo representada por tres grupos intraespecíficos separados por una divergencia promedio de 2,5–3,1 (rango total de divergencia de 0–3,4 %, para los tres grupos).

3.1. Subgénero *Daphnia*

Jeffery y col. [28] realizaron un estudio con las secuencias del gen mitocondrial COI en varias poblaciones de las especies del subgénero *Daphnia*, localizadas en Churchill (Canadá). Los autores obtuvieron un árbol de Neighbour Joining, utilizando el modelo de distancia K2P de Kimura, y Bootstrap como soporte de ramas (1000 réplicas). El fenograma mostraba que las poblaciones de *D. tenebrosa* forman un grupo (Bootstrap 99%) con tres ramas y con valores de divergencia genética entre 2.5-3.1 %, los cuales pueden corresponder a subespecies; sin embargo, los autores recomiendan realizar más estudios, utilizando otros marcadores moleculares tendientes a determinar la condición de especies de estas tres ramas. Estos resultados son corroborados por el trabajo

de Adamowicz y col. [20], el cual encontró valores de divergencia genética de 4,3 % en la población 1 de *D. obtusa* en Argentina. También, los estudios con aloenzimas del mismo estudio concuerda con los resultados de la secuencia de COI. En este estudio de Jeffery y col. [28], *D. cf. Middendorffiana*, *D. pulicaria* y *D. pulex* forman un grupo (Bootstrap 99%), con una divergencia genética de 2 %, lo que no las separa en especies diferentes.

Según Adamowicz y col. [29, 30], cuando la clasificación de un grupo de especies de braquiópodos es confusa, diferencias genéticas mayores del 5 % son evidencias para considerarlas especies diferentes, siempre y cuando existan otras evidencias ecológicas o marcadores moleculares que complementen los datos de ADNm.

Adamowicz y col. [20], usando variaciones en la secuencia del gen COI en poblaciones de las especies del subgénero *Daphnia* localizadas en Argentina, generaron un árbol de Neighbour Joining, utilizando el modelo de distancias de Kimura, y Bootstrap como soporte de las ramas de 1000 réplicas. El fenograma obtenido mostraba que los organismos estudiados (*D. obtusa*, *D. peruviana*, *D. parvula*, *D. pulicaria* poliploide y *D. ambigua*) se agrupan en siete grupos, a saber: tres grupos diferentes de *D. obtusa* (1, 2 y 3), *D. peruviana*, *D. parvula*, *D. pulicaria* (poliploide) y *D. ambigua*, soportadas fuertemente por divergencias genéticas que oscilaron entre 16,2% y 28,3%, y bootstrap de 100. Los grupos 1, 2 y 3 de *D.*

obtusa muestran gran diversidad; el grupo uno y el grupo dos están ubicados como especies semejantes (16,2 de divergencia genética), y el grupo tres está separado genéticamente más de 20,8% (tabla 1 y 2). La clasificación de los organismos de las poblaciones de *D. obtusa* y *D. pulex*, así como de otras especies del complejo, es dudosa; si se mira la literatura antigua, las evidencias genéticas permitieron el reconocimiento de siete especies dentro de este complejo. La especie *D. obtusa*, que anteriormente se consideraba una sola, en realidad son tres especies distintas, puesto que, además de las diferencias en la diversidad genética, no se encontró evidencias de hibridación interespecífica, al no existir ningún loci heterocigoto [20].

Tabla 2. Estimación de la Divergencia genética y las distancias genéticas en el gen COI entre las especies del subgénero *Daphnia*. Columna DG= Distancias genéticas. Adaptado de Adamowicz 2004 [20].

Grupos	<i>Daphnia</i> (Morfoespecies)	Civergencia genética							DG
		ambigua	obtusa 1	obtusa 2	obtusa 3	parvula	peruviana	pulicaria	
1	ambigua								0,9
2	obtusa 1	21,6	-						4,3
3	obtusa 2	21,2	16,2	-					1,3
4	obtusa 3	22,7	21,1	20,6	-				2,3
5	Parvula	26,0	22,9	22,1	22,8	-			-
6	peruviana	26,2	24,1	28,3	27,3	27,3	-		-
7	pulicaria	25,3	23,8	20,3	22,2	25,3	27,5	-	0,3

Tabla 3. Adaptación del fenograma de Colbourne y col. [24] con base en la variación del gen mitocondrial ND5 en el complejo *D. pulex*.

Grupos principales	Divergencia genética	Grupos	Morfoespecies	Divergencia genética	Región
A	15,3%	1	<i>D. pulicaria polar</i>	1, 4 a 1,6%	Diferentes regiones de Norte América
		2	<i>D. pulicaria occidental</i>		
		3	<i>D. pulicaria oriental</i>		
		4	<i>D. melanica</i> .		
		5	<i>D. middendorffiana</i>		
		6	<i>D. pulex panartica</i>		
B		7	<i>D. pulicaria europea</i>	2,3%	Europa
		8	<i>D. pulicaria tenebrosa</i>		
C	> 15,5%	9	<i>D. pulex europea</i>	> 2,3%	Europa Central

Colbourne y col. [24] realizaron un estudio con las secuencias del gen ND5 en varias poblaciones del complejo *D. pulex*, subgénero *Daphnia*, en Norte América y Europa. Los autores obtuvieron un árbol de Neighbour Joining, utilizando el modelo de distancia K2P de Kimura, y Bootstrap como soporte de ramas (1000 réplicas [tablas 1 y 3]). El fenograma mostraba que las poblaciones del complejo *D. pulex* se reúnen en tres grupos principales A, B y C; la distancia genética entre los grupos A y B es de 15,3% y la

divergencia del C es mayor. El grupo A divergió en 6 especies hace 1,4 a 1,6 millones de años [24]: *D. pulicaria polar*, *D. pulicaria occidental*, *D. melanica*, *D. middendorffiana* y *D. pulex panártica*; el grupo B divergió en dos especies hace 2,3 millones de años [23]: *D. pulicaria europea* y *D. pulicaria tenebrosa*, y el grupo C divergió en *D. pulex europea*. Las poblaciones de *D. pulex* de Norte América y Europa están separadas por una divergencia genética del 17%, igualmente ocurre en las poblaciones de *D. pulicaria de* Norte América y Europa, con una

distancia de 15 %, mientras que la divergencia genética dentro de las poblaciones de Norte América es menor a 3,5 %, mostrando las poblaciones europeas más similaridad a *D. tenebrosa* (tabla 2, grupo 8). Estos resultados están en concordancia con los estudios de aloenzimas que revelan la divergencia genética entre las poblaciones de *D. pulex* y *D. pulicaria* de Norte América y Europa Central [31]. Esta reevaluación taxonómica permite explicar la formación de híbridos entre *D. pulex* y *D. pulicaria* en Norte América, mas no en Europa; lo que indica que los linajes norteamericanos están estrechamente relacionados (pertenecen al mismo grupo A), mientras que los linajes europeos son más divergentes, y por eso se agrupan en grupos diferentes (grupos B y C).

Los estudios de Hebert y col. [32] afirman que muchas poblaciones de *D. pulicaria* en Norte América contienen genomas ADN_m, producto de introgresión con *D. pulex*; de la misma manera, los estudios de Colbourne y col. [24] arrojan resultados en la secuencia del gen mitocondrial ND5, los cuales señalan pocas divergencias entre las poblaciones norteamericanas de *D. pulex* (ártica) y las poblaciones de *D. arenata* (restringida a estanques occidentales de las Cascadas Montañosas en Oregón). Esta similitud puede reflejar la ocurrencia de introgresión; sin embargo, las dos especies evidencian marcadas divergencias tanto en las aloenzimas como en los haplotipos de ADN_m [33], razón suficiente para considerarlas especies diferentes.

El uso de sitios de restricción dentro de los genes ND4-ND5 permite la discriminación entre grupos, por lo que el empleo de estos marcadores moleculares facilita la asignación del estatus taxonómico de un linaje específico, lo que hace posible realizar estudios filogeográficos detallados en el complejo *D. pulex*.

El hecho de que los individuos de *D. pulex* de Norte América y los organismos de *D. pulex* de Europa compartan características morfológicas muy estrechas, que llevan a la confusión taxonómica en los organismos de este complejo, probablemente refleja la existencia de evolución convergente, debido a que el ambiente ártico de los dos continentes es similar y la plasticidad fenotípica exhibida por los miembros del complejo es alta [28].

Sin embargo, delimitar las fronteras taxonómicas entre los miembros del complejo *D. pulex* sigue sien-

do un desafío para la taxonomía moderna, toda vez que fenómenos como la hibridación, la introgresión, la asexualidad y la poliploidia son frecuentes entre sus miembros. Colbourne y col. [24] afirman que estas discontinuidades genéticas están dividiendo a los integrantes del complejo *D. pulex* en linajes con integridad morfológica y biogeográfica.

El estudio del complejo *D. laevis* en Norte América, en el que se miró la variación en Aloenzimas y las secuencias de dos genes de ADN_m (12S y 16S ADN_r), realizado por Taylor y col. [25], muestra claramente la existencia de cinco grupos ampliamente alopátricos, morfológicamente crípticos (*D. dubia*, *D. laevis laevis*, *D. laevis gessneri*, *D. magniceps magniceps* y *D. magniceps pacifica*) (tabla 1).

3.2. Subgénero *Hyalodaphnia*

Mediante los análisis de máxima parsimonia, evolución mínima y máxima de las secuencias de 12S y COI (por separados), y la combinación del conjunto de datos (COI+12S), las quince especies de *Hyalodaphnia* resultaron en una topología que incluye no solo a las cuatro especies reportadas como representantes del complejo *D. galeata*, distribuidas en Norte América (*D. dentifera*, *D. mendotae*, *D. thorata* y *D. umbra*), sino otras cuatro especies endémicas de Europa (*D. cucullata*, *D. galeata*, *D. longispina* y *D. rosea*), confirmaron también que *D. curvirostris* es miembro de este subgénero; además, que el subgénero *Hyalodaphnia* constituye un grupo monofilético que se compone de cuatro complejos de especies: Complejo *D. laevis*, representado por tres especies (*D. dubia*, *D. magniceps* y *D. laevis*); complejo *D. curvirostris* (una especie); complejo *D. galeata* (ocho especies), y complejo *D. longiremis*, por dos especies (*D. longiremis* y *D. cristata* (especie endémica de Europa) [27].

Estos resultados indican que nueve especies de *Hyalodaphnia* ocurren en América del Norte [34, 35], y siete, en Europa; así mismo, que la fauna europea carece de complejos de especies endémicas. Se amplía el rango de distribución de *D. umbra*, tanto en Europa como en América del Norte, confirmando que el subgénero *Hyalodaphnia* constituye un grupo monofilético que se compone de cuatro complejos de especies.

El análisis de hibridación de las especies del género *Daphnia* mostró que la divergencia en el ADN_m

es relativamente alta (9%), en comparación con la hibridación de otros artrópodos (3%). La prevalencia de los híbridos está ligada, en parte, al mantenimiento de la compatibilidad reproductiva, a pesar de la divergencia genética marcada. En *Hyalodaphnia*, todos los casos de hibridación involucran especies pertenecientes al complejo *D. galeata*. En América del Norte, *D. mendotae* se ha originado claramente al parecer como resultado de la invasión de *D. galeata* (en el Pleistoceno), como producto de la hibridación con *D. dentifera*; aunque su genoma mitocondrial refleja este origen, su genoma nuclear fue reconfigurado rápidamente como resultado de la introgresión de *D. dentifera*. La importancia de este proceso está señalado por la notable diferencia en la posición filogenética de *D. mendotae*, cuando se examina para marcadores de ADN mitocondrial y nuclear [27].

3.3. Plasticidad fenotípica y la clasificación taxonómica del género *Daphnia*

Las investigaciones han mostrado que los marcadores moleculares y el Código de Barras de ADN en el género *Daphnia* son una herramienta valiosa, ya que además de permitir dilucidar la clasificación de este género, también ayudan en estudios ecológicos de interacciones entre especies. Petrusek y col. [36] señalan que el análisis filogenético de los datos moleculares obtenidos en un estudio de Código de Barras de ADN, en combinación con los datos morfológicos y ecológicos, revelaron una notable interacción predador-presa. En este estudio se caracterizaron individuos de varias poblaciones del complejo *Daphnia atkinsoni*, mediante el análisis de secuencias de dos genes mitocondriales COI y la subunidad mitocondrial 12S ADNr, encontrando que la corona de espinas, característica considerada un rasgo específico de la especie, es fenotípicamente plástica y es inducida por señales químicas liberadas por *Cancriformis triops*, el camarón renacuajo (Notostraca).

Así mismo, Schwenk y col. [27], en el análisis conjunto de ADN mitocondrial y marcadores nucleares, plantean la necesidad de identificar diferencias morfológicas constantes que permitan la discriminación de las especies, debido a que la característica de la corona tradicionalmente utilizada por la taxonomía tradicional presenta un alto grado de variación

entre los miembros del conjunto *D. longispina* y *D. rosea* del conjunto *D. hialina* y *D. galeata*.

La confusión taxonómica en la clasificación morfológica de los subgéneros de *Daphnia* se empieza a dilucidar con el uso de marcadores moleculares como isoenzimas, genes mitocondriales (ND4, ND5, 12S ADNr, 16S ADNr), espaciadores transcritos internos y COI, permitiendo de esta manera realizar estudios más completos, en términos ecológicos, filogenéticos y de historia de vida de los organismos.

4. Conclusiones

La literatura revisada mostró gran diversidad genética del género *Daphnia* y abundantes confusiones en la clasificación morfológica tradicional; por lo que es prioridad describir detalladamente las especies del género *Daphnia* mediante el uso de diferentes marcadores moleculares, tales como aloenzimas, genes mitocondriales (12S ADNr, 16S ADNr, ND4 y ND5) y espaciadores transcritos internos, entre otros, y, principalmente, con Código de Barras. Estos estudios deben incluir el análisis en conjunto de los datos ultraestructurales, bioquímicos, cariotípicos y ecológicos, entre otros, que respondan a la alta plasticidad fenotípica de los organismos y a las características emergentes producto de la hibridación (reproducción interespecífica) de la poliploidía, de la reproducción partenogenética y de la introgresión de genes en las poblaciones.

El esclarecimiento de las fronteras de las especies en forma estricta ayudará a descubrir nuevas especies, a hallar especies crípticas, a entender la biodiversidad del género y a determinar si las especies provisionales de estos estudios son realmente diferentes o filogrupos biogeográficos en estudios ecológicos, asociación de los taxones a la comunidad y en estudios de la historia filogenética de las especies.

4.1. Subgénero *Daphnia*

Con estudios de variación de la secuencia del gen mitocondrial COI, en la región de Churchill (Manitoba, Canadá) [28]: Las tres especies de *D. tenebrosa*, clasificadas anteriormente como una especie, son en realidad tres especies provisionalmente diferentes, separadas por divergencias genéticas del orden de 2,5 a 3,1 millones de años, y las tres especies

del complejo *D. pulex* (*D. cf. middendorffiana*, *D. publicaria* y *D. cf. pulex*) parecen formar linajes monofiléticos mitocondriales, con una divergencia del 2%. De igual manera, el estudio de Adamowicz y col. [20], en Argentina, usando el mismo gen, permitió encontrar que las cinco especies estudiadas (*D. obtusa*, *D. peruviana*, *D. parvula*, *D. pulicaria* poliploide y *D. ambigua*) se agrupan en tres grupos principales, y estos, a su vez, se subdividen en siete grupos, tres de los cuales pertenecen a *D. obtusa*, por lo que esta especie estudiada, realmente, son tres especies provisionalmente diferentes.

Los estudios en la variación nucleotídica del gen ND5 en localidades de Norte América (Canadá y Estados Unidos) y Europa, dentro del complejo *D. pulex*, permitió agrupar los organismos estudiados en tres grupos principales (A, B y C), subdivididos en grupos diferentes: *D. pulicaria* polar, *D. pulicaria* occidental, *D. pulicaria* oriental, *D. melanica*, *D. middendorffiana*, *D. pulex* panártica, *D. pulicaria* europea, *D. tenebrosa* y *D. pulex* europea. Lo que destaca que los organismos que habían sido incluidos erróneamente en la misma especie son especies provisionalmente diferentes.

Las poblaciones de *D. pulex* de Norte América y Europa están separadas por una divergencia genética en la secuencia del gen ND5 de 17%; igualmente ocurre en las poblaciones de *D. pulicaria* de Norte América y Europa, con una distancia de 15%; mientras que la divergencia genética dentro de las poblaciones de Norte América es menor a 3,5%, las poblaciones europeas muestran más similaridad a *D. tenebrosa*; los estudios con aloenzimas confirman estos resultados. Esta reevaluación taxonómica de los organismos del complejo *D. pulex* permite explicar la formación de híbridos entre *D. pulex* y *D. pulicaria* en Norte América, mas no en Europa, puesto que la compatibilidad reproductiva de los linajes norteamericanos persiste, al estar más emparentados, en contraposición con los linajes europeos, que perdieron la compatibilidad reproductiva.

El fenómeno de introgresión es frecuente entre especies de *D. pulex* y *D. publicaria*, *D. pulex* y *D. arenata*.

La presencia de características morfológicas muy similares entre los organismos de la población de *D. pulex* de Norte América y *D. pulex* de Europa, a pesar de la divergencia genética entre ellas, puede

ser explicada gracias a la divergencia evolutiva, debido a que ocupan hábitats similares y la plasticidad fenotípica de la especie se ve reflejada.

La variación de aloenzimas y las secuencias de dos genes del ADNm (12S ADNr y 16S ADNr) permitieron determinar que el complejo *D. laevis* se compone de cinco especies provisionalmente diferentes: *Daphnia dubia*, *D. laevis laevis*, *D. laevis gessneri*, *D. magniceps magniceps* y *D. magniceps pacifica*.

4.2. Subgénero *Hyalodaphnia*

Muchas de las diferencias ecológicas, biogeográficas y genéticas que existen en la actualidad entre grupos del subgénero *Hyalodaphnia* sugieren la importancia particular de investigaciones detalladas sobre la estructura genética en estos grupos.

Los análisis con los genes mitocondriales 12S ADNr y COI en poblaciones europeas y norteamericanas mostraron que el complejo *D. galeata* está compuesto por cuatro especies endémicas europeas (*D. cucullata*, *D. galeata*, *D. longispina* y *D. rosea*), y permitieron asignar a *D. cristata* al complejo *D. longiremis*, que se reportaba como representado por una sola especie.

Agradecimientos

A la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y a su Dirección de Investigaciones (DIN), por el apoyo brindado para el desarrollo de este artículo, y por el otorgamiento de la beca como joven investigadora a la primera autora.

A Andrea del Pilar Huertas, por la colaboración brindada en el proceso de traducción, y a la docente Sofía Albesiano, por el apoyo en el proceso para culminar este artículo.

Referencias

- [1] H. C. Godfray, "Challenges for taxonomy", *Nature*, vol. 417, no. 6884, pp. 17-9, 2002.
- [2] M. Blaxter and R. Floyd, "Molecular systematics: Counting angels with DNA", *Nature*, vol. 421, no. 6919, pp. 122-124, 2003.
- [3] D. Tautz, P. Arctander, A. Minelli, R. H. Thomas, and A. P. Vogler, "A plea for DNA taxo-

- nomy”, *Trends Ecol. Evol.*, vol. 18, no. 2, pp. 70-74, 2003.
- [4] M. Blaxter and R. Floyd, “Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality”, *Trends Ecol. Evol.*, vol. 18, no. 6, pp. 268-269, 2003.
- [5] P. Hebert, S. Ratnasingham, and J. de Waard, “Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species”, *Proc. Biol. Sci. / R. Soc.*, vol. 270, no. 1, pp. S96-9, 2003.
- [6] P. Romero, and R. Ramírez, “Divergencia intraespecífica y código de barras de ADN en *Systrophia helicycloides* (Gastropoda, Scolodontidae)”, *Rev. Peru. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 201-208, 2011.
- [7] P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. de Waard, “Biological identifications through DNA barcodes”, *Proc. Biol. Sci.*, vol. 270, no. 1512, pp. 313-321, 2003.
- [8] A. Bucklin, D. Steinke, and L. Blanco-Bercial, “DNA Barcoding of Marine Metazoa”, *Ann. Rev. Mar. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 471-508, 2011.
- [9] L. Frézal, and R. Leblois, “Four years DNA barcoding: current advances and prospects”, *Infect. Genet. Evol.*, vol. 8, no. 5, pp. 727-736, 2008.
- [10] S. Miller, “DNA barcoding and the renaissance of taxonomy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 12, pp. 4775-4776, 2007.
- [11] P. D. N. Hebert, M. Y. Stoeckle, T. S. Zemplak, and C. M. Francis, “Identification of Birds through DNA Barcodes”, *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 10, p. e312, 2004.
- [12] P. Hebert, E. Penton, J. Burns, D. Janzen, and W. Hallwachs, “Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 41, pp. 14812-1417, 2004.
- [13] S. Ratnasingham, and P. Hebert, “Bold: The Barcode of Life Data System”, *Mol. Ecol. Notes*, vol. 7, no. 3, pp. 355-364, 2007.
- [14] V. Savolainen, R. S. Cowan, A. P. Vogler, G. K. Roderick, and R. Lane, “Towards writing the encyclopaedia of life?: an introduction to DNA barcoding”, *Society*, vol. 360, no. September, pp. 1805-1811, 2005.
- [15] F. A. H. Sperling, and R. G. Harrison, “Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of swallowtail butterflies: Evolution”, *Evolution (N. Y.)*, vol. 48, pp. 408-422, 1994.
- [16] S. K. Behura, “Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues”, *Mol. Ecol.*, vol. 15, no. 11, pp. 3087-3113, 2006.
- [17] T. L. Shearer, M. J. H. Van Oppen, S. L. Romano, and G. Wörheide, “Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria)”, *Mol. Ecol.*, vol. 11, no. 12, pp. 2475-2487, 2002.
- [18] D. Huang, R. Meier, P. A. Todd, and L. M. Chou, “Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding”, *J. Mol. Evol.*, vol. 66, no. 2, pp. 167-174, 2008.
- [19] D. Erpenbeck, J. N. A. Hooper, and G. Wörheide, “COI phylogenies in diploblasts and the ‘Barcoding of Life’ - are we sequencing a suboptimal partition?”, *Mol. Ecol. Notes*, vol. 6, no. 2, pp. 550-553, 2006.
- [20] S. J. Adamowicz, P. D. N. Hebert, and M. C. Marinone, “Species diversity and endemism in the *Daphnia* of Argentina: a genetic investigation”, *Zool. J. Linn. Soc.*, vol. 140, no. 2, pp. 171-205, 2004.
- [21] P. D. N. Hebert, and C. C. Wilson, “Provincialism in Plankton - endemism and allopatric speciation in Australian *Daphnia*”, *Evolution (N. Y.)*, vol. 48, no. Iss 4, pp. 1333-1349, 1994.
- [22] D. Frey, “The taxonomy and biogeography of the Cladocera”, *Hydrobiologia*, vol. 145, no. 1, pp. 5-17, 1987.
- [23] L. Weider, and P. D. N. Hebert, “Ecological and physiological differentiation among low-arctic clones of *Daphnia pulex*” *Ecology*, vol. 68, pp. 188-198, 1987.
- [24] J. K. Colbourne, T. J. Crease, L. J. Weider, and P. D. N. Hebert, “Phylogenetics and evolution of a circumarctic species complex (Cladocera: *Daphnia pulex*)”, *Biol. J. Linn. Soc.*, vol. 65, no. 3, pp. 347-365, 1998.

- [25] D. J. Taylor, T. L. Finston, and P. D. N. Hebert, "Biogeography of a widespread freshwater crustacean: Pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex", *Evolution (N. Y.)*, vol. 52, no. 6, pp. 1648-1670, 1998.
- [26] L. J. Weider, A. Hobaek, J. K. Colbourne, T. J. Crease, and P. D. N. Hebert, "Holarctic phylogeography of an asexual species complex I. Mitochondrial DNA variation in arctic *Daphnia*", *Evolution (N. Y.)*, vol. 53, no. 3, pp. 777-792, 1999.
- [27] K. Schwenk, D. Posada, and P. D. Hebert, "Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species", *Proc. Biol. Sci.*, vol. 267, no. 1455, pp. 1833-1842, 2000.
- [28] N. W. Jeffery, M. Elías-Gutiérrez, and S. J. Adamowicz, "Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada", *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. 9, 2011.
- [29] S. J. Adamowicz, and A. Purvis, "How many branchiopod crustacean species are there? Quantifying the components of underestimation", *Glob. Ecol. Biogeogr.*, vol. 14, no. 5, pp. 455-468, 2005.
- [30] S. J. Adamowicz, A. Petrusek, J. K. Colbourne, P. D. N. Hebert, and J. D. S. Witt, "The scale of divergence: a phylogenetic appraisal of intercontinental allopatric speciation in a passively dispersed freshwater zooplankton genus", *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 50, no. 3, pp. 423-436, 2009.
- [31] M. Cerni, and P. D. N. Hebert, "Intercontinental allozyme differentiation among four holarctic *Daphnia* species", *Limnol. Oceanogr.*, vol. 44, no. 6, pp. 1381-1387, 1999.
- [32] P. D. N. Hebert, S. S. Schwartz, and J. Hrbacek, "Patterns of genotypic diversity in Czechoslovakian *Daphnia*", *Heredity (Edinb)*, vol. 62, no. 2, pp. 207-216, 1989.
- [33] T. J. Crease, S.-K. Lee, S.-L. Yu, K. Spitze, N. Lehman, and M. Lynch, "Allozyme and mtDNA variation in populations of the *Daphnia pulex* complex from both sides of the Rocky Mountains", *Heredity (Edinb)*, vol. 79, no. 3, pp. 242-251, 1997.
- [34] J. K. Colbourne and P. D. N. Hebert, "The Systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): A Molecular Phylogenetic Approach", *Philos. Trans. Biol. Sci.*, vol. 351, no. 1337, pp. 349-360, 1996.
- [35] D. J. Taylor, P. D. Hebert, and J. K. Colbourne, "Phylogenetics and evolution of the *Daphnia longispina* group (Crustacea) based on 12S rDNA sequence and allozyme variation", *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 5, no. 3, pp. 495-510, 1996.
- [36] A. Petrusek, R. Tollrian, K. Schwenk, A. Haas, and C. Laforsch, "A 'crown of thorns' is an inducible defense that protects *Daphnia* against an ancient predator", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 7, pp. 2248-2252, 2009.