

CÓDIGOS DE BARRAS GENÉTICOS EN UNA ESPECIE DE *Paramacrobotus* (TARDIGRADA: PARACHELA) EN SANTA MARTA, COLOMBIA

GENETIC BARCODING IN A *Paramacrobotus* SPECIES (TARDIGRADA: PARACHELA) IN SANTA MARTA, COLOMBIA

Martín Caicedo^{ID}, Moisés Arquez^{ID}, Lyda R. Castro^{ID} y Sigmer Quiroga^{ID}

RESUMEN

Debido a la gran cantidad de especies y a las dificultades en su identificación morfológica, muchos estudios taxonómicos actuales de tardígrados se basan en el uso de técnicas genéticas y moleculares. En Colombia son necesarios estudios enfocados en esta disciplina que permitan complementar la información morfológica; por consiguiente se analizaron siete secuencias del gen COI en el género de tardígrado *Paramacrobotus* de la cuenca baja del río Manzanares, en Santa Marta, y se compararon con las secuencias del mismo género presentes en la base de datos de GenBank a través de un análisis de divergencia específica y análisis de vecino más cercano (NJ). Las secuencias obtenidas en el estudio mostraron una clara diferenciación de las secuencias de GenBank y una baja distancia intraespecífica, obteniéndose el código de barras genético correspondiente a una sola especie. Las diferencias de los resultados con el análisis morfológico reflejan la eficacia de técnicas moleculares como los códigos de barras y evidencian la importancia de la integración de técnicas moleculares a los estudios taxonómicos de los tardígrados.

PALABRAS CLAVE: grupo *richtersi*; umbral de divergencia; citocromo oxidasa I (COI); taxonomía integradora

ABSTRACT

Because of the great number of species and troubles with their morphological identification, many current taxonomic studies in tardigrades are based on the use of genetic and molecular techniques. In Colombia, studies focused in this discipline are needed to be able to complement the morphological information; consequently, seven COI gene sequences were analyzed in the genus of tardigrade *Paramacrobotus* at the lower basin of the Manzanares River, in Santa Marta, and were compared with the sequences of the same genus present in the GenBank database through an analysis of specific divergence and neighbor-joining (NJ). The sequences obtained in the study showed a clear differentiation of the GenBank sequences, while at the same time showed a low intraspecific distance, obtaining a DNA barcoding for a single species. The differences obtained in comparison with the morphological analyses reflect the effectiveness of molecular techniques such as barcoding, emphasizing the importance of integration of molecular techniques to taxonomic studies on tardigrades.

KEY WORDS: *richtersi* group; divergence threshold; cytochrome oxidase I (COI); integrative taxonomy

Dirección de los autores:

Grupo de Investigación MIKU, Universidad del Magdalena, Carrera 32 No. 22-08, Santa Marta D.T.C.H., Colombia; e-mail: mcamaranto@gmail.com, **ORCID:** 0000-0001-7802-9573 (M.C.) (S.Q.). Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Simón Bolívar, Sede 2, Carrera 59 No. 59-92, Barranquilla D.E.I.P., Colombia, teléfono: 3444333 Ext. 266; e-mail: marquez2@unisimonbolivar.edu.co, **ORCID:** 0000-0003-1460-0288 (M.A.). Grupo de Investigación en Evolución, Sistemática y Ecología Molecular (GIESEMOL), Universidad del Magdalena, Carrera 32 No. 22-08, Santa Marta D.T.C.H., Colombia; e-mail: lydaraquelcastro@hotmail.com, **ORCID:** 0000-0003-3384-3832 (L.R.C.). Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena, Carrera 32 No. 22-08, Santa Marta D.T.C.H., Colombia, teléfono: 4217940 Ext. 3211; e-mail: sigmerquiroga@unimagdalena.edu.co, **ORCID:** 0000-0002-3321-1360 (S.Q.) (L.R.C.).

INTRODUCCIÓN

Los tardígrados, conocidos como ositos de agua, son un phylum de organismos microscópicos asociados a microhábitats húmedos, principalmente en la película de agua de musgos y líquenes, aunque también existen especies terrestres, dulceacuícolas y marinas (Bertolani et al., 2004). Actualmente son muy investigados, debido a sus propiedades de criptobiosis, que les permiten sobrevivir a diversas condiciones ambientales extremas (Jönsson, 2007; Schill et al., 2009). Aunque existen más de 1100 especies de tardígrados (Degma et al., 2014), con frecuencia la identificación es difícil, debido a que los caracteres morfológicos no son fáciles de observar y muchos géneros poseen especies con poca variación morfológica (Marley et al., 2011).

En la actualidad, se realizan estudios genéticos y moleculares para la identificación taxonómica basados en métodos como códigos de barras genéticos, unidades taxonómicas operacionales moleculares (MOTU) y secuencias de ARN ribosómico, los cuales han arrojado resultados certeros (Schill y Steinbrück, 2007; Beltrán-Pardo y Bernal-Villegas, 2009). En la última década, los estudios moleculares con tardígrados se han incrementado notablemente, logrando avances en el establecimiento de metodologías y protocolos de trabajo (Schill, 2007; Schill y Steinbrück, 2007; Cesari et al., 2009), así como en la discriminación de nuevos géneros y especies a partir de taxones con características uniformes (Guidetti et al., 2009; Schill et al., 2010).

En Colombia, se han registrado 43 especies (Meyer, 2013; Caicedo, et al., 2014; Lisi et al., 2014). El conocimiento sobre el phylum en el país es incipiente y se requieren avances en la identificación de varias especies aparentemente cosmopolitas. La implementación de técnicas moleculares es una herramienta útil en este tipo de investigaciones, por lo que en el presente trabajo se secuenció y analizó el gen COI en especímenes de tardígrados del género *Paramacrobotus*, con el fin de comprobar su eficacia como “código de barra genético” para diferenciar entre especies de este género.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se tomaron muestras de musgo en la cuenca baja del río Manzanares (sector de Bonda, Santa Marta, Colombia)

entre 46 y 80 m.s.n.m. (11° 13' 40,2" N - 11° 14' 02,7" N y 074° 06' 40,8" W - 074° 06' 42,7" W). Las muestras fueron guardadas en bolsas de papel para su secado y almacenamiento. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron rehidratadas durante 24 horas previas a la revisión, y posteriormente filtradas a través de dos tamices, uno de 1200 µm y otro de 55 µm. Se realizaron dos observaciones en estereoscopio por muestra, entre las 24 y 48 horas posteriores a la rehidratación. Siete especímenes del género *Paramacrobotus* fueron aislados para la extracción de ADN y cada uno fue montado previamente en un portaobjetos para su identificación en el microscopio. La información morfológica de los especímenes se encuentra descrita en Caicedo et al. (2014). Cada espécimen fue depositado individualmente en un tubo de 0,5 mL, con 10 µL de agua ultrapura, y almacenado en un congelador a -80 °C.

Extracción, amplificación y secuenciación

Para la extracción, se utilizó el protocolo del kit de purificación de ADN MasterPure™ (Epicentre Biotechnologies). El procedimiento fue realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, variando solamente los siguientes parámetros:

La incubación a 65 °C se realizó durante dos horas, agitando las muestras cada hora. Posterior a la incubación, a cada muestra se le agregó 1 µL de RNasa A (5 µg / µL) y fueron incubadas a 35 °C durante 30 min. El ADN obtenido al final del procedimiento fue resuspendido en 15 µL de buffer TE.

Se amplificó mediante PCR un fragmento de 640 pb del gen citocromo oxidasa I (COI), utilizando los *primers* LCO-1490 (Folmer et al., 1994) y HCOoutrev (Schwendinger y Giribet, 2005). Para la amplificación de cada muestra, se diluyeron 2 µL de ADN en 17,5 µL de agua ultrapura y se añadieron 2,7 µL de buffer (10 x), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,2 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada *primer* (10 pmol / µL) y 0,1 µL de Taq Polimerasa ABM (5 U / µL). El protocolo de amplificación mediante PCR utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, 35 ciclos de amplificación (95 °C por 15 seg, 40 °C por 1 min y 72 °C por 1 min 30 seg), elongación final a 72 °C por 5 min y descenso térmico rápido a 4 °C. Los productos de PCR fueron verificados con electroforesis en gel agarosa al 2 % y posteriormente purificados con el kit PCR Cleanup Gel Extraction de MACHEREY-NAGEL. El producto resultante fue secuenciado en las dos direcciones por tecnología Sanger.

Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, se utilizó el programa ProSeq (Filatov, 2009) para la observación y depuración de los cromatogramas. Las secuencias fueron verificadas a través de la herramienta BLAST del NCBI (Altschul et al., 1990) y posteriormente fueron alineadas con el algoritmo ClustalW, disponible en MEGA V.5 (Tamura et al., 2011). Durante el alineamiento

se realizaron correcciones en los marcos de lectura para evitar la presencia de codones de parada que pudieran generar errores en los análisis. Las secuencias obtenidas fueron registradas en GenBank, utilizando la aplicación Sequin, siguiendo las instrucciones del portal web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/QuickGuide/sequin.html> (NCBI, 2016). Tras su aprobación, se les asignaron los códigos correspondientes (KF788251-KF788257) (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias obtenidas en el estudio y secuencias de *Paramacrobilotus* y grupo externo descargadas de GenBank.

Especie	Origen	Abreviatura	Código GenBank
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> sp. 1 T1	Colombia	Tar 01 COL	KF788251
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> sp. 1 T2	Colombia	Tar 02 COL	KF788252
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> sp. 1 T3	Colombia	Tar 03 COL	KF788253
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> sp. 1 T4	Colombia	Tar 04 COL	KF788254
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> sp. 1 T5	Colombia	Tar 05 COL	KF788255
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> sp. 1 T6	Colombia	Tar 06 COL	KF788256
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> sp. 1 T7	Colombia	Tar 07 COL	KF788257
<i>Paramacrobilotus richtersi</i> 1	Italia	Tar 08 ITA	AY598779.1
<i>Paramacrobilotus richtersi</i> 2	Italia	Tar 09 ITA	AY598778.1
<i>Paramacrobilotus richtersi</i> 3	Alemania	Tar 10 ALE	EU244605.1
<i>Paramacrobilotus</i> sp. grupo “ <i>richtersi</i> ” 1	Estados Unidos	Tar 11 USA	EU244597.1
<i>Paramacrobilotus</i> sp. grupo “ <i>richtersi</i> ” 2	Kenia	Tar 12 KEN	EU244598.1
<i>Paramacrobilotus</i> sp. grupo “ <i>richtersi</i> ” 3	Kenia	Tar 13 KEN	EU244599.1
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> 1	España	Tar 14 SPA	FJ435809.1
<i>Paramacrobilotus</i> grupo <i>richtersi</i> 2	España	Tar 15 SPA	FJ435808.1
<i>Paramacrobilotus tonollii</i> (Ramazzotti, 1956)	No disponible	Tar 16	EU244609.1
<i>Echiniscus testudo</i> (Doyère, 1840)	Alemania	Ech testudo	EF620376.1

Para calcular las distancias intraespecíficas e interespecíficas de las secuencias se realizó un análisis de divergencia mediante el programa MEGA V.5 (Tamura et al., 2011), utilizando el modelo de distancia de Kimura 2-parámetros, con un *bootstrap* de 1000 réplicas, registrándose los valores promedio de distancias y los errores estándar (SE). Para diferenciar entre especies con base en los valores de distancia, se tuvo en cuenta un umbral de divergencia del 3 % en el gen COI, propuesto para tardígrados por Cesari et al. (2009). Con dichos valores de distancia, se realizó un análisis de vecino más cercano para obtener la representación gráfica de los

patrones de divergencia. En este análisis, se emplearon secuencias de otros ejemplares del mismo género obtenidas de GenBank, para realizar una comparación de las distancias interespecíficas. El heterotardígrado *Echiniscus testudo* (Doyère, 1840) se escogió como grupo externo (Tabla 1).

Finalmente, se ilustró la heterogeneidad de sitios específicos dentro del gen COI, mediante una representación de la variación en las secuencias obtenidas a través del programa en línea Fingerprint (Lou y Golding, 2007).

RESULTADOS

En el análisis morfológico inicial, los especímenes recolectados se dividieron en tres posibles especies, teniendo en cuenta diferentes caracteres morfológicos y morfométricos (proporción entre la longitud tubo bucal y el cuerpo, forma de las manchas oculares y proporción de las garras). Después de la corrección de los marcos de lectura y alineamiento, cada una de las secuencias obtenidas tuvo un total de 722 pb, representando una misma especie de tardígrado, *Paramacrobotus* grupo *richtersi* sp. 1, registrada previamente en la región (Caicedo et al., 2014). La composición promedio de nucleótidos fue de T = 36 %, A = 27,5 %, C = 19,5 % y G = 17 %.

El análisis de vecino más cercano muestra cuatro grupos que presentan nodos respaldados por valores de *bootstrap* de 100 % (Figura 1). El primer grupo está representado por las secuencias de *P.* grupo *richtersi* sp. 1, sustentando el hecho de que los especímenes pertenecen a la misma especie. El segundo grupo está conformado por dos secuencias, *P. richtersi* 3 y *P. tonollii*. El tercer grupo está compuesto por cinco secuencias: las secuencias 1 y 2 de *P. richtersi* (Italia), la secuencia 1 de *P.* sp. grupo “*richtersi*” (Estados Unidos) y las secuencias de *P.* grupo *richtersi* (España). Este grupo se etiquetó como secuencias de la región Holártica debido a las ecozonas boreales a las que corresponden. Finalmente, el cuarto grupo congrega a los especímenes de *P.* sp. grupo “*richtersi*” 2 y 3 (Kenia).

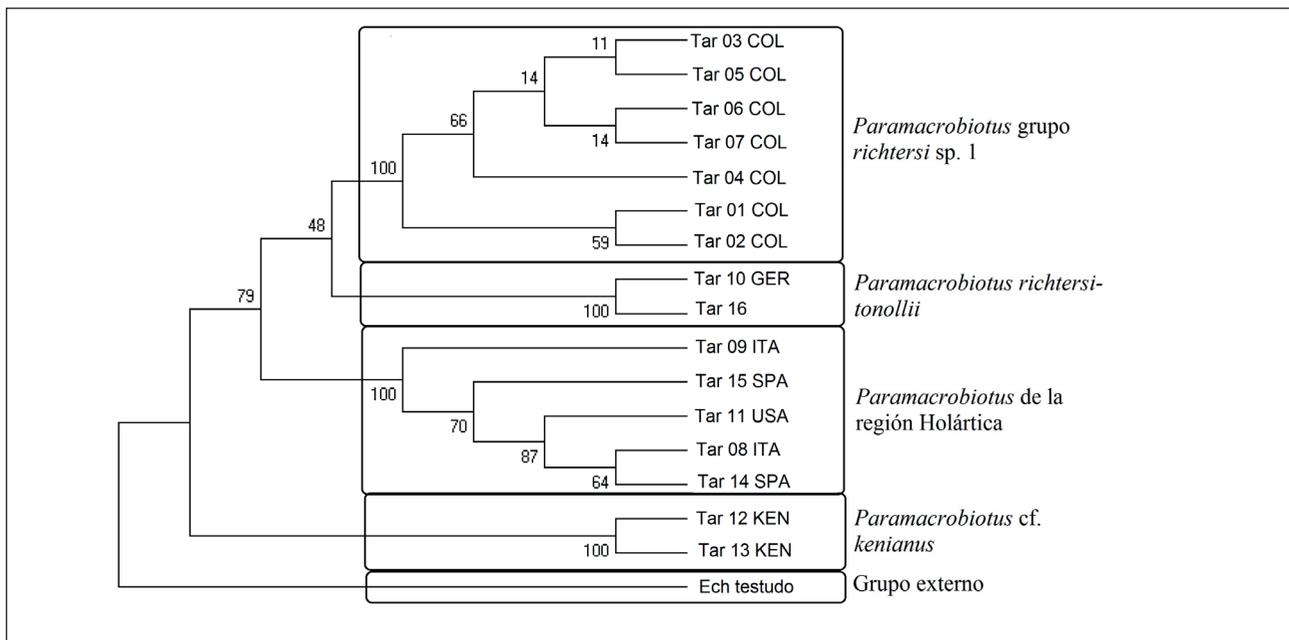


Figura 1. Árbol de vecino más cercano construido bajo el modelo de distancia Kimura 2-parámetros, a partir de secuencias de COI de *Paramacrobotus* (Tardigrada: Macrobiotidae), con una secuencia de heterotardigrado como grupo externo.

El análisis de distancias de las secuencias obtenidas mostró distancias intraespecíficas muy bajas, entre 0 % (Tar 01 COL-Tar 02 COL) y 0,33 % (Tar 01 COL-Tar 03 COL a Tar 07 COL). El promedio de las distancias entre las secuencias fue de 0,14 %. Comparando dichos valores con el umbral de divergencia del gen COI en tardígrados (Cesari et al., 2009), puede afirmarse que las siete secuencias pertenecen, en efecto, a una misma especie. Las variaciones de las distancias interespecíficas presentaron un margen amplio, desde 4,24 % (Tar 13 KEN-Tar 12 KEN) hasta 56,94 % (Ech testudo-Tar 16) (Tabla 2). El promedio de estas distancias

fue de 26,78 %. Entre los macrobiótidos, la mayor distancia fue de 36,09 % (Tar 12 KEN-Tar 08 ITA).

El código de barras obtenido mediante Fingerprint, ilustra de forma gráfica la composición de nucleótidos de la especie analizada que evidencia un alto porcentaje de timina y adenina en las secuencias, además de uniformidad de las secuencias entre los siete especímenes. El valor de la longitud de las barras en las secuencias fue de 0,00046, cifra que refleja la similitud de las secuencias a un nivel intraespecífico (Figura 2).

Tabla 2. Matriz de divergencia interespecífica. El análisis fue realizado usando el modelo de distancia Kimura 2-parámetros (K2P). Los números de la parte inferior (negro) representan los valores absolutos de distancia de las intersecciones. Los números de la parte superior (azul) representan los errores estándar (SE) para cada intersección.

	Tar 01 COL	Tar 02 COL	Tar 03 COL	Tar 04 COL	Tar 05 COL	Tar 06 COL	Tar 07 COL	Tar 08 ITA	Tar 09 ITA	Tar 10 GER	Tar 11 USA	Tar 12 KEN	Tar 13 KEN	Tar 14 SPA	Tar 15 SPA	Tar 16	Ech testudo
Tar 01 COL	0	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,0345	0,0309	0,0308	0,0316	0,032	0,0339	0,0319	0,0312	0,0324	0,0541
Tar 02 COL	0	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,0345	0,0309	0,0308	0,0316	0,032	0,0339	0,0319	0,0312	0,0324	0,0541
Tar 03 COL	0,0033	0,0033	0	0	0	0	0	0,035	0,0312	0,031	0,0319	0,0329	0,034	0,0322	0,0315	0,0326	0,055
Tar 04 COL	0,0033	0,0033	0	0	0	0	0	0,035	0,0312	0,031	0,0319	0,0329	0,034	0,0322	0,0315	0,0326	0,055
Tar 05 COL	0,0033	0,0033	0	0	0	0	0	0,035	0,0312	0,031	0,0319	0,0329	0,034	0,0322	0,0315	0,0326	0,055
Tar 06 COL	0,0033	0,0033	0	0	0	0	0	0,035	0,0312	0,031	0,0319	0,0329	0,034	0,0322	0,0315	0,0326	0,055
Tar 07 COL	0,0033	0,0033	0	0	0	0	0	0,035	0,0312	0,031	0,0319	0,0329	0,034	0,0322	0,0315	0,0326	0,055
Tar 08 ITA	0,3469	0,3469	0,3469	0,3469	0,3469	0,3469	0,3469	0,0059	0,0059	0,0333	0,0057	0,0358	0,0363	0,0061	0,0059	0,0349	0,054
Tar 09 ITA	0,3068	0,3068	0,3068	0,3068	0,3068	0,3068	0,3068	0,0219	0,0297	0,0297	0,0022	0,0321	0,0326	0,0028	0,0021	0,0312	0,0508
Tar 10 GER	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,3278	0,2891	0,0304	0,0304	0,0282	0,0296	0,0306	0,0305	0,0049	0,0528
Tar 11 USA	0,3141	0,3141	0,3141	0,3141	0,3141	0,3141	0,3141	0,0219	0,0033	0,2961	0,0324	0,0329	0,0329	0,0027	0,0022	0,032	0,0508
Tar 12 KEN	0,3185	0,3185	0,3257	0,3257	0,3257	0,3257	0,3257	0,3609	0,3224	0,2807	0,3262	0,0081	0,0325	0,0316	0,0304	0,032	0,049
Tar 13 KEN	0,3326	0,3326	0,3326	0,3326	0,3326	0,3326	0,3326	0,3604	0,3219	0,3008	0,3256	0,0424	0,0331	0,032	0,032	0,032	0,0517
Tar 14 SPA	0,3172	0,3172	0,3172	0,3172	0,3172	0,3172	0,3172	0,0236	0,0049	0,2966	0,0049	0,3267	0,3262	0,0027	0,0027	0,0321	0,0516
Tar 15 SPA	0,3104	0,3104	0,3104	0,3104	0,3104	0,3104	0,3104	0,0219	0,0033	0,2961	0,0033	0,3188	0,3182	0,0049	0,032	0,032	0,0517
Tar 16	0,3104	0,3104	0,3104	0,3104	0,3104	0,3104	0,3104	0,3452	0,3052	0,0168	0,3125	0,307	0,3283	0,313	0,3125	0,032	0,0548
Ech testudo	0,5517	0,5517	0,5569	0,5569	0,5569	0,5569	0,5569	0,551	0,5176	0,5443	0,5176	0,459	0,5073	0,5234	0,5227	0,5694	

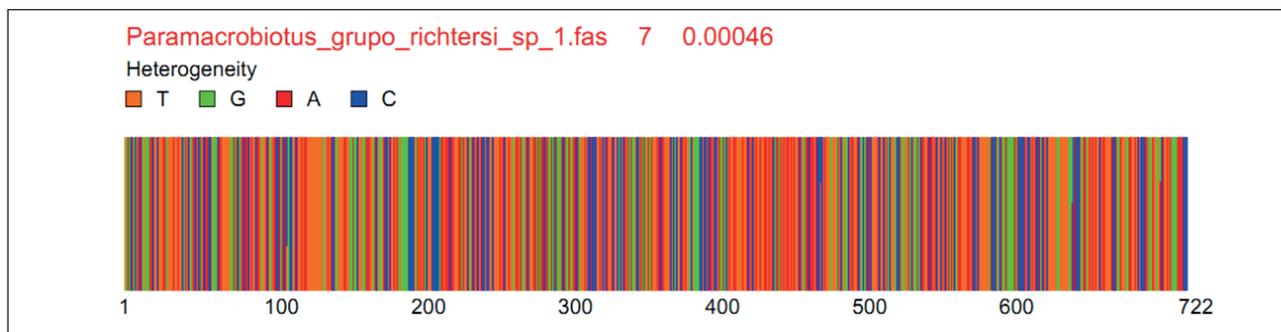


Figura 2. Código de barras de *Paramacrobotus* grupo *richtersi* sp. 1, generado a través de la herramienta Fingerprint.

DISCUSIÓN

A partir de un estudio morfológico y molecular del eutardígrado *Macrobotus macrocalix* Bertolani y Rebecchi (1993), se propuso un umbral de divergencia del 3 % para distinguir entre las especies de tardígrados, un valor semejante al de otros grupos de invertebrados (Cesari et al., 2009). Las secuencias generadas en el presente estudio mostraron valores de divergencia muy bajos (0 - 0,42 %), ajustándose dentro del intervalo de distancias intraespecíficas. Dichos resultados fueron similares a los valores obtenidos en otras investigaciones con códigos de barras generados a partir del COI en tardígrados (Cesari et al., 2009, 2013; Bertolani et al., 2011).

Inicialmente, las secuencias fueron subdivididas en tres posibles especies diferentes, teniendo en cuenta algunas características morfológicas y morfométricas; sin embargo, durante el proceso de montaje en placas, los tardígrados pueden sufrir ocasionalmente alteraciones debido al proceso de fijación, por lo cual se debe tener cuidado al seleccionar rasgos morfológicos para identificación (O. Lisi, *com. pers.*). Los resultados observados en el presente estudio confirman la utilidad e importancia de complementar la identificación morfológica con análisis moleculares.

El análisis de las secuencias obtenidas mostró resultados contrastantes con las secuencias descargadas de GenBank. Cada una de las secuencias del segundo grupo (*P. tonollii* y *P. richtersi* 3) pertenece a un subgrupo de especies de *Paramacrobotus* con claras diferencias morfológicas como los placoides faríngeos y la morfología de los huevos (Pilato y Binda, 2010). Sin embargo, los análisis moleculares mostraron que corresponden a la misma especie. Tales resultados indican que pudo ocurrir un error en la identificación morfológica de los especímenes utilizados en la

secuenciación. Es necesario realizar una revisión rigurosa en la identificación de dichos especímenes y complementar con otros análisis filogenéticos, a fin de obtener conclusiones sólidas.

Cinco secuencias de tres países (España, Estados Unidos e Italia) presentaron valores de divergencia por debajo del umbral propuesto (Cesari et al., 2009), sugiriendo que pertenecen a una misma especie. Si se confirma que se trata de *P. richtersi*, y se realizan otros estudios de taxonomía integradora en otras regiones, es posible que pueda redefinirse la distribución de esta especie como holártica, lo cual resolvería definitivamente su estatus actualmente dudoso como especie cosmopolita (Michalczyk et al., 2012). En contraste, si bien las secuencias de Kenia posiblemente están relacionadas con *Paramacrobotus kenianus* (Schill et al., 2010), los diferentes valores de divergencia indican que puede tratarse de dos especies diferentes. No obstante, dado que *P. kenianus* es una especie descrita casi exclusivamente a partir de datos moleculares del espaciador interno terminal 2 (ITS2), se requieren estudios taxonómicos que utilicen varios marcadores y caracteres morfológicos importantes.

El gen COI es una fuente de información muy útil para la diferenciación entre especies muy cercanas de tardígrados, o grupos de especies con escasas diferencias morfológicas (Cesari et al., 2009; Bertolani et al., 2011). Con el fin de generar relaciones filogenéticas robustas, es necesario integrar su información con otros genes (18S, 28S e ITS2) (DeSalle et al., 2005) y con la información morfológica (Guidetti et al., 2009; Bertolani et al., 2011; Guil y Giribet, 2012). Se recomienda un estudio de taxonomía integradora, usando tanto técnicas de caracterización morfológica como análisis moleculares, que permita tener unas bases claras para la diferenciación correcta de las especies

seleccionadas, particularmente en géneros con especies crípticas o grupos de especies, aplicando técnicas como preparación de vouchers de especímenes hologenóforos (Bertolani et al., 2011) y cultivo de especies (Kagoshima et al., 2013).

CONCLUSIONES

El estudio mostró que un código de barras genético basado en genes como el COI es una buena herramienta para una correcta identificación de especies de tardígrados, especialmente ante la presencia de dificultades en la identificación morfológica. Los futuros estudios taxonómicos de tardígrados deben combinar el uso de caracteres morfológicos y técnicas moleculares, considerando diversos genes, a fin de obtener un respaldo robusto para los resultados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean extender sus agradecimientos a los grupos de investigación MIKU y GIESEMOL, de la Universidad del Magdalena, por su ayuda, apoyo y recomendaciones durante las fases de muestreo y análisis de especímenes y datos moleculares. Igualmente, agradecimientos a los doctores Oscar Lisi (Universidad de Catania-Sicilia) y Noemí Guil (Museo Nacional de Ciencias Naturales-España) por sus sugerencias y recomendaciones durante la realización del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Beltrán-Pardo, E. y Bernal-Villegas, J. 2009. Acercamiento a los estudios actuales sobre el filo Tardigrada y su importancia en la medicina. *Universidad de Medicina de Bogotá* 50: 380–403.
- Bertolani, R. y Rebecchi, L. 1993. A revision of the *Macrobotus hufelandi* group (Tardigrada, Macrobiotidae), with some observations on the taxonomic characters of eutardigrades. *Zoologica Scripta* 22(2): 127–152.
- Bertolani, R., Guidetti, R., Jönsson, K.I., Altiero, T., Boschini, D. y Rebecchi L. 2004. Experiences with dormancy in tardigrades. *Journal of Limnology* 63: 16–25.
- Bertolani, R., Rebecchi, L., Giovannini, I. y Cesari, M. 2011. DNA barcoding and integrative taxonomy of *Macrobotus hufelandi* C.A.S. Schultze 1834, the first tardigrade species to be described, and some related species. *Zootaxa* 2997: 19–36.
- Caicedo, M., Londoño, R. y Quiroga, S. 2014. Catálogo taxonómico de los ositos de agua (Tardigrada) de la cuenca baja de los ríos Manzanares y Gaira, Santa Marta, Colombia. *Boletín Científico Museo de Historia Natural Universidad de Caldas* 18(1): 197–209.
- Cesari, M., Bertolani, R., Rebecchi, L. y Guidetti, R. 2009. DNA barcoding in Tardigrada: the first case study on *Macrobotus macrocalix* Bertolani y Rebecchi 1993 (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Molecular Ecology Resources* 9: 699–706.
- Cesari, M., Bertolani, R., Rebecchi, L., Giovannini, I. y Guidetti, R. 2013. A DNA barcoding approach in the study of tardigrades. *Journal of Limnology* 72(1): 182–198.
- Degma, P., Bertolani, R. y Guidetti, R. 2014. *Actual checklist of Tardigrada species (2009-2014, Ver. 27: 31-10-2014)*. URL: <http://www.tardigrada.modena.unimo.it/miscellanea/Actual%20checklist%20of%20Tardigrada.pdf>. Consultado: 4 de diciembre de 2014.
- DeSalle, R., Egan, M.G. y Siddall, M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 360: 1905–1916.
- Doyère, L.M.F. 1840. Memoire sur les Tardigrades. I. *Annales des Sciences Naturelles, Paris* 2(14): 269–362.
- Filatov, D.A. 2009. Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics* 25: 3189–3190.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- Guidetti, R., Schill, R.O., Bertolani, R. y Dandekar, T., Wolf, M. 2009. New molecular data for tardigrade phylogeny, with the erection of *Paramacrobotus* gen. nov. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47: 315–321.
- Guil, N. y Giribet, G. 2012. A comprehensive molecular phylogeny of tardigrades adding genes and taxa to a poorly resolved phylum-level phylogeny. *Cladistics* 28: 21–49.

- Jönsson, K.I. 2007. Tardigrades as a Potential Model Organism in Space Research. *Astrobiology* 7(5): 757-767.
- Kagoshima, H., Imura, S. y Suzuki, A.C. 2013. Molecular and morphological analysis of an Antarctic tardigrade, *Acutuncus antarcticus*. *Journal of Limnology* 72(1): 15-23.
- Lisi, O., Londoño, R. y Quiroga, S. 2014. Tardigrada from a sub-Andean forest in the Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia) with the description of *Itaquascon pilato* sp. nov. *Zootaxa* 3841(4): 551-562.
- Lou, M. y Golding, G.B. 2007. FINGERPRINT: visual depiction of variation in multiple sequence alignments. *Molecular Ecology Resources* 7(6): 908-914.
- Marley, N.J., McInnes, S. y Sands, C.J. 2011. Phylum Tardigrada: A re-evaluation of the Parachela. *Zootaxa* 2819: 51-64.
- Meyer, H. 2013. Terrestrial and freshwater Tardigrada of the Americas. *Zootaxa* 3747(1): 001-071.
- Michalczyk, Ł., Welnicz, W., Frohme, M. y Kaczmarek, Ł. 2012. Redescriptions of three *Milnesium* Doyère, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. *Zootaxa* 3154: 1-20.
- NCBI Resource Coordinators. 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 44(D1): D7-D19.
- Pilato, G. y Binda, M.G. 2010. Definition of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification. *Zootaxa* 2404: 1-54.
- Schill, R.O. 2007. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR amplification of mitochondrial genes of tardigrades. *Journal of Limnology* 66(1): 164-170.
- Schill, R.O. y Steinbrück, G. 2007. Identification and differentiation of Heterotardigrada and Eutardigrada species by riboprinting. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45(3): 184-190.
- Schill, R.O., Mali, B., Dandekar, T., Schnölzer, M., Reuter, D. y Frohme, M. 2009. Molecular mechanisms of tolerance in tardigrades: New perspectives for preservation and stabilization of biological material. *Biotechnology Advances* 27: 348-352.
- Schill, R.O., Förster, F., Dandekar, T. y Wolf, M. 2010. Using compensatory base change analysis of internal transcribed spacer 2 secondary structures to identify three new species in *Paramacrobotus* (Tardigrada). *Organisms Diversity and Evolution* 10(4): 287-296.
- Schwendinger, P.J. y Giribet, G. 2005. The systematics of the south-east Asian genus *Fangensis* Rambla (Opiliones: Cyphophthalmi: Stylocellidae). *Invertebrates Systematics* 19: 297-323.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Fecha de recepción: 18/02/2016

Fecha de aceptación: 05/06/2017

Publicado en línea: 22/06/2017

Para citar este artículo: Caicedo, M., Arquez, M., Castro, L.R. y Quiroga, S. 2017. Códigos de Barras Genéticos en una especie de *Paramacrobotus* (Tardigrada: Parachela) en Santa Marta, Colombia. *Revista Intropica* Vol. 12(1): 15 -22.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21676/23897864.2125>