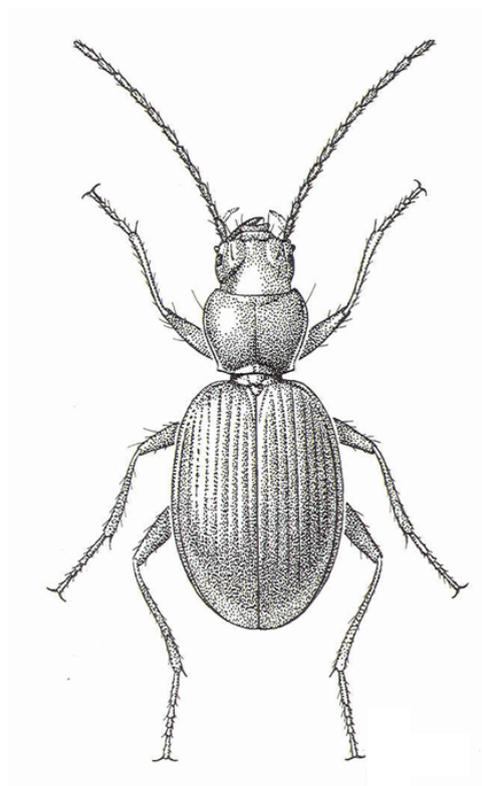


Trabajo de Fin de Grado (TFG)

Obtención de una colección de referencia de barcodes genéticos de carábidos de Canarias

Obtaining a reference collection of genetic barcodes of Canarian carabids



MARTA PERDOMO MARTIN

Tutorizado por el Dr. Heriberto López Hernández y la Dra. Nuria Macías
Hernández

Grado en Biología

Universidad de La Laguna, Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Animal y Edafología y Geología

Convocatoria Septiembre 2022

Índice

Resumen	2
Abstract	2
Introducción	3
Código de barras de ADN (Barcoding)	3
Familia Carabidae	5
Objetivos	6
Material y métodos	6
Selección de muestras y fotografías	6
Laboratorio de genética	11
Extracción de ADN	11
Amplificación del material genético	11
Secuenciación	12
Edición y alineamiento de secuencias	13
Resultados y Discusión	13
Extracción y PCR	13
Secuenciación	14
Comparación con la base de datos BOLD	15
Subfamilia Broscinae	19
Subfamilia Callistinae	20
Subfamilia Carabinae	20
Subfamilia Harpalinae	21
Subfamilia Lebiinae	22
Subfamilia Licininae	23
Subfamilia Masoreinae	24
Subfamilia Nebriinae	24
Subfamilia Pterostichinae	24
Subfamilia Trechinae	26
Subfamilia Zuphiinae	27
Conclusiones	28
Conclusions	28
Bibliografía	29

Resumen

Las técnicas taxonómicas tradicionales de identificación de especies requieren el empleo de mucho tiempo, y cuando las muestras incluyen diferentes grupos taxonómicos también requiere la participación de especialistas en cada uno de ellos. Para el interés en conocer la biodiversidad presente en el planeta frente a la creciente tasa de extinción de especies, estas técnicas son lentas y caras. En las últimas décadas, el código de barras o DNA *Barcode* se ha presentado como un nuevo recurso para la identificación molecular de especies, cada vez más barato, accesible y rápido. Sin embargo, esta herramienta requiere la existencia de repositorios de secuencias de ADN de referencia extraídas de ejemplares previamente identificados correctamente. Este problema es cada vez menor por la existencia de iniciativas mundiales que están proveyendo a la comunidad científica de repositorios de *barcode* genéticos. El proyecto *Canary Barcode* del Grupo de Ecología de Evolución en Islas del IPNA-CSIC quiere contribuir a esta iniciativa obteniendo secuencias *barcode* de la fauna invertebrada de Canarias. Dentro de este proyecto, este TFG tiene como fin obtener una colección de *barcodes* genéticos de varias especies de la familia Carabidae, una familia de coleópteros que en Canarias destaca por su diversidad y endemismo.

Abstract

Traditional taxonomic techniques for species identification are time-consuming, and when samples include different taxonomic groups they also require the participation of specialists in each of them. In the interest of knowing the biodiversity present on the planet in the face of increasing species extinction rates, these techniques are slow and expensive. In recent decades, DNA Barcoding has emerged as a new resource for molecular identification of species, which is becoming cheaper, more accessible and faster. However, this tool requires the existence of repositories of reference DNA sequences extracted from previously correctly identified specimens. This problem is becoming less and less of a problem due to the existence of worldwide initiatives that are providing the scientific community with exponentially growing repositories of genetic barcodes. The Canary Barcode project of the Island Evolution Ecology Group of the IPNA-CSIC wants to contribute to this initiative by obtaining barcode sequences of the invertebrate fauna of the Canary Islands. Within this project, this study aims to obtain a collection of genetic barcodes of several species of the family Carabidae, a family of Coleoptera that in the Canary Islands stands out for its diversity and endemism.

Introducción

La actividad humana en las últimas décadas ha provocado la aceleración del cambio climático, con consecuencias ya notorias y cada vez más agudizadas (Pörtner et al., 2022). Estos cambios afectan a procesos que suceden a gran escala, más evidentes al ojo humano, como el incremento de las temperaturas, el aumento de tormentas en zonas meridionales y la subida del nivel de los mares, entre otras muchas (Arias et al., 2021). Estas variaciones en la meteorología y en las características generales del planeta, a su vez provocan a menor escala alteraciones en los factores abióticos de los diferentes hábitats y microhábitats, que pueden ser irreparables si persisten a lo largo del tiempo (Allan et al., 2021). Una de las consecuencias inmediatas de estas alteraciones en el clima y en el medio ambiente son las tasas nunca antes registradas de extinciones de animales y vegetales, causantes de importantes pérdidas en la biodiversidad (Barnosky et al., 2011; Johnson et al., 2017). En la actualidad, hay aproximadamente 2 millones de especies descritas en el planeta (Bánki et al., 2021; May, 1988), pero se estima que solo en la biota terrestre el número de especies eucariotas oscila entre los 10 y 100 millones (Waugh, 2007). Esto deja entrever que las técnicas taxonómicas tradicionales no son lo suficientemente rápidas y potentes como para acercar el conocimiento actual que se tiene de la biodiversidad terrestre a tales estimaciones, lo que conlleva a que muchas especies estén aún por identificar (Hebert et al., 2003; Zamani et al., 2022). El aumento de las tasas de extinción y la destrucción de los ecosistemas debido a la antropización hacen que los taxónomos vayan a contrarreloj para identificar el mayor número de especies posible mediante las técnicas tradicionales, antes de que hayamos siquiera sabido de su existencia. Esta situación genera cada vez más preocupación entre la comunidad científica. Sin embargo, la técnica de secuenciación del código de barras de ADN o *Barcoding* es una alternativa a la identificación morfológica tradicional de las especies, que progresivamente está cobrando importancia como herramienta taxonómica debido a que es muy rápida, sencilla, reproducible y cada vez más accesible (Hebert et al., 2003; Muster et al., 2021; Waugh, 2007).

Código de barras de ADN (Barcoding)

La citocromo oxidasa C es una proteína transmembrana situada en la mitocondria, conformada por varias subunidades de origen nuclear y tres de origen mitocondrial (subunidades I, II y III). La subunidad I (COI) cumple la función catalítica de la enzima,

estando encajada en la membrana de la cresta mitocondrial. Esta se encuentra muy conservada en las especies que emplean la fosforilación oxidativa para su metabolismo (Waugh, 2007). En el extremo 5' del gen que codifica para esta proteína se encuentra una región de 648 pares de bases (pb), que constituye una secuencia corta de nucleótidos ideal como potencial marcador de ADN para la identificación de especies animales (Astrin et al., 2016; Hebert et al., 2003). Esta región del COI tiene una tasa de mutación adecuada, lo suficientemente lenta para minimizar la variación intraespecífica, pero lo suficientemente rápida para resaltar la variación interespecífica (Waugh, 2007). Además, esta región tiene un bajo número de inserciones y deleciones, lo que facilita el alineamiento de las secuencias de ADN (Waugh, 2007). Todas estas características han propiciado que el uso de esta región del COI se haya generalizado y aceptado en el mundo científico como el DNA *barcode* en Metazoos (Herbert et al., 2003; Herbert & Gregory, 2005; ver *International Barcode of Life Project*, iBOL; <http://www.ibol.org/>). Las diferencias genéticas entre secuencias de esta región de especies distintas es la forma de cuantificar el grado de semejanza o similitud entre ellas. Usando una serie de valores umbrales para uno u otro caso se puede establecer si los ejemplares analizados son de la misma especie o pertenecen a taxones distintos (por ejemplo, ver Hebert et al., 2003; Pentinsaari et al., 2014). El DNA *Barcode* o el código de barras de ADN se presenta como un recurso en la identificación de especies (Astrin et al., 2016; Muster et al., 2021), pudiendo convertirse en una herramienta estándar que complemente las técnicas taxonómicas tradicionales basadas en caracteres morfológicos (Schindel & Miller, 2005). Se ha examinado su eficacia en diferentes taxones, de los cuales se han obtenido resultados prometedores para la identificación de especies en arañas (Barrett & Hebert, 2005; Blagoev et al., 2016; Paquin & Hedin, 2004; Prendini, 2005; Waugh, 2007), pseudoescorpiones (Muster et al., 2021), coleópteros (Greenstone et al., 2005; Pentinsaari et al., 2014), etc. También se ha empleado en muestras extintas (Lambert et al., 2005), en especímenes inmaduros (Paquin & Hedin, 2004; Prendini, 2005), o en especies en diferentes etapas de su ciclo vital (Hebert et al., 2004), permitiendo incluir cualquier individuo en análisis ecológicos independientemente de su estadio vital (huevos, larvas, adultos o restos de ejemplares muertos)(Astrin et al., 2016). Además, con bastante frecuencia el ADN *Barcode* ha permitido identificar especies crípticas (Hebert et al., 2004; Muster et al., 2021; Ramirez et al., 2017; Reier et al., 2020; Witt et al., 2006), aunque en algunos casos como en los metazoos basales no se obtuvieron los resultados esperados (Emerson et al., 2000; Huang et al., 2008).

La organización internacional Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL), trabaja en la creación de código de barras de ADN como norma mundial en el ámbito de la taxonomía (Schindel & Miller, 2005; BOLD, 2022). Fundada en mayo de 2004, se encarga del funcionamiento de la web *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (Ratnasingham, et al., 2007), una herramienta que permite cargar secuencias de la región COI y contrastarlas con las ya existentes, buscando el mayor porcentaje de similitud. La organización coopera de forma estrecha con otras organizaciones como el *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF) y la *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) entre muchas otras. BOLD cuenta con 10.452.110 secuencias barcode en la actualidad (acceso junio 2022), una cantidad que sigue creciendo exponencialmente, siendo la biblioteca de referencia del código de barras de ADN.

Familia Carabidae

Uno de los grupos de insectos más interesantes es sin duda el de los coleópteros ya que es el más diverso en el planeta, representando el 25% de todas las especies descritas de animales y plantas, llegando a conocerse 350.000 de ellas (McHugh & Liebherr, 2009). Esta cifra aumenta cada año en las diferentes zonas del planeta, convirtiendo a los coleópteros en uno de los grupos de artrópodos que más aporta a la biodiversidad terrestre. Parte de su éxito evolutivo se debe a la diversidad de formas morfológicas que presentan (ver figs. 3 y 6), lo que le confiere una gran capacidad de supervivencia en una gran variedad de hábitats (McHugh & Liebherr, 2009).

Dentro de ellos, los carábidos (Carabidae) es la familia más diversa, con más de 40.000 especies (GBIF, 2022). Caracterizados por una alta capacidad de dispersión, ocupan una gran variedad de nichos, dotando a la familia de una gran amplitud ecológica y de plasticidad genética. Aunque la mayoría de especies tienden a ser saprófagos y prefieren los ambientes húmedos, se pueden encontrar carábidos riparios, submarinos, edafobios, fisurícolas, etc., cada uno de ellos a su vez con diversas estrategias tróficas (Machado, 1995). Toda esta variedad de adaptaciones a diferentes hábitats y formas de alimentación ha provocado una gran diversidad morfológica, con situaciones frecuentes de convergencias adaptativas que pueden dar lugar a errores de identificación taxonómica a nivel de especie (Maddison & Maruyama, 2019).

En Canarias se ha registrado la presencia de 226 especies de carábidos (Biota, 2022), 12 de las cuales se sabe con certeza que son introducidas. Sin embargo, lo que realmente destaca es

que el 70% de las especies de carábidos presentes en Canarias son endemismos, lo que da una idea de la importancia de este grupo para la biodiversidad canaria (Machado, 1995). Muchos de estos endemismos tienen una alta presencia en los bosques de laurisilva de las islas occidentales, debido a la alta humedad característica de este tipo de bosque y su altitud (Machado, 1995), pero no dejan de tener una presencia importante en ambientes más secos. Entre los proyectos de investigación del Grupo de Ecología y Evolución en Islas del IPNA-CSIC se encuentra *Canary Barcode*, una iniciativa para la elaboración de una base de datos de secuencias *barcode* de las especies de invertebrados terrestres presentes en Canarias. Es un reto científico en el que no puede faltar una buena representación de la familia Carabidae. En las últimas tres décadas, el Catedrático en Zoología de la Universidad de La Laguna, Pedro Oromí, ha creado una colección de ejemplares de invertebrados identificados, conservados en etanol y guardados en congelador. Esta colección alberga una buena representación de los carábidos de Canarias, y la obtención del ADN *barcode* de los mismos supondría una buena aportación para el principal objetivo del proyecto *Canary Barcode*.

Objetivos

El trabajo que se presenta tiene como objetivo general:

- Obtener una colección de *barcodes* genéticos de varias especies de la familia Carabidae presentes en Canarias.

A partir de esa colección de *barcodes* se procederá a:

- Identificar especies emparentadas, especies introducidas, especies crípticas, etc.
- Si fuera el caso, determinar errores de identificación, trabajando para ello con las bases de datos de secuencias *barcode* de ADN depositadas en BOLD.

Material y métodos

Selección de muestras y fotografías

Las muestras fueron tomadas de la colección de invertebrados conservada en etanol y en congelador a -20°C que el Catedrático en Zoología Pedro Oromí tiene en la UDI de Zoología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna. De los 335 viales de la colección con material de la familia Carabidae, se escogieron aquellos con ejemplares que ofrecieran la

mejor representación de especies de carábidos en la región de Canarias para su análisis en el método del *Barcode*.

Como criterios de selección se eligieron preferentemente los viales con muestras identificadas a nivel de especie, aunque también se eligieron algunas de ellas identificadas sólo a nivel de género para comprobar el poder de resolución de los *barcodes*. El segundo criterio seguido fue el de seleccionar los viales con la fecha de captura más reciente, para evitar problemas en el laboratorio debido al posible deterioro del material genético de las muestras debido a su antigüedad. El tercer criterio de selección se basó en la localidad de colecta de los ejemplares, de modo que se eligieron aquellos viales siguiendo las siguientes premisas:

- Si la especie solo se había recolectado en una isla determinada, se seleccionó una muestra de esta isla.
- Si de una especie habían viales de varias islas, se tomó una muestra de cada una de ellas para comprobar la posible existencia de un *barcode* específico según la isla (estructura genética entre las poblaciones de esas islas).
- Si una especie hubiera sido recolectada en regiones geográficas bien diferenciadas de una misma isla (por ejemplo, Teno y Anaga; Betancuria y Jandía, etc.). Se seleccionó una muestra de cada una de estas regiones para examinar la existencia de un *barcode* específico según la geografía (estructura genética entre las poblaciones de una isla).

A la hora de seleccionar las muestras también se tuvo en cuenta el tipo de muestreo empleado para su captura. Los ejemplares que fueron recolectados con trampas de caída (*pitfall*) con líquido Turquin (Turquin , 1973) fueron descartados debido a que este líquido contiene ácido acético, un producto que daña el ADN. Los ejemplares recolectados con trampas MSS (Medio Subterráneo Superficial) solo fueron seleccionados si se sabía que estas trampas estuvieron instaladas un periodo de tiempo corto, ya que en tiempos prolongados el líquido conservante no actúa bien y se degrada el ADN.

Después de seleccionar los viales, de estos se extrajeron un total de 128 ejemplares (Tabla 1). Se elaboró una base de datos en Excel con todos los datos taxonómicos y de colecta de estos ejemplares, así como los resultados de los siguientes pasos de extracción, amplificación y secuenciación del ADN realizados en el laboratorio.

Antes de su procesamiento en el laboratorio, de cada ejemplar se tomó una fotografía de la parte dorsal y ventral del cuerpo para vincular imágenes del individuo con su *barcode* de ADN para futuras comprobaciones taxonómicas de rutina sin necesidad de usar el ejemplar. Las fotos se obtuvieron con una cámara Canon Powershots A640 acoplada a un microscopio

estereoscópico Zeiss Stemi 2000c usando el método de *stacks* de fotos (tomando diferentes fotos enfocando en diferentes planos para luego combinarlas en una única imagen), y posterior apilamiento de estas con el software CombineZM.

Tabla 1. Relación de ejemplares seleccionados para el estudio y su procedencia geográfica. AL: Alegranza; FV: Fuerteventura; GC: Gran Canaria; HI: El Hierro; LG: La Gomera; LP: La Palma; LZ: Lanzarote; MC: Montaña Clara; TF: Tenerife.

Subfamilia	Tribu	Género	Especie	Nº indiv.	Isla
Broscinae	Broscini	<i>Broscus</i>	<i>crassimargo</i>	1	LG
			<i>rutilans</i>	1	TF
Callistinae	Chlaenini	<i>Chlaenius</i>	<i>spoliatus</i>	1	TF
Carabinae	Carabini	<i>Carabus</i>	<i>abbreviatus</i>	3	TF
			<i>faustus</i>	1	TF
			<i>faustus cabrerai</i>	1	TF
			sp.	3	TF
	Calosomatini	<i>Calosoma</i>	<i>olivieri</i>	2	TF, LG
Harpalinae	Harpilini	<i>Harpalus</i>	<i>distinguendus</i>	1	TF
			<i>schaumi</i>	1	LP
			sp.	1	HI
			<i>tenebrosus</i>	1	LP
		<i>Nesacinus</i>	<i>fortunatus</i>	1	GC
			<i>micans</i>	1	LG
			<i>sanctae crucis</i>	1	TF
			<i>solitarius</i>	3	FV, LZ
			sp.	2	FV
Lebiinae	Cymindini	<i>Cymindis</i>	<i>amicta</i>	1	GC
			cf. <i>discophora</i>	1	TF
			<i>discophora</i>	3	FV, LG, LZ
			<i>marginella</i>	3	AL, LZ, MC
			<i>simillima</i>	2	LG
			<i>suturalis</i>	1	LZ

Subfamilia	Tribu	Género	Especie	Nº indiv.	Isla
			<i>velata</i>	4	LG
			<i>zargoides</i>	6	TF
	Dromiini	<i>Philorrhizus</i>	<i>mateui</i>	1	GC
		<i>Paradromius</i>	<i>insularis</i>	1	TF
		<i>Metadromius</i>	<i>pervenustus</i>	1	TF
Licininae		<i>Licinus</i>	<i>punctatulus granulatus</i>	1	GC
			sp.	1	FV
Masoreinae	Masoreini	<i>Masoreus</i>	<i>orientalis nobilis</i>	2	FV
			<i>affinis arenicola</i>	1	LZ
			<i>alticola</i>	1	TF
			sp.	1	MC
Nebriinae		<i>Leistus</i>	<i>nubivagus</i>	1	TF
Pterostichinae	Agonini	<i>Olisthopus</i>	<i>glabratus</i>	1	TF
			<i>glabratus tamaranus</i>	1	GC
			<i>palmensis</i>	2	LP
			sp.	3	LG, LZ, MC
	Poecilini	<i>Paranchus</i>	<i>nichollsii</i>	1	LG
			<i>Eutrichopus</i>	<i>canariensis</i>	1
		<i>Orthomus</i>	<i>gonzalezi</i>	2	TF
			<i>berytensis</i>	3	FV, LG, TF
			<i>discors</i>	2	FV, MC
			sp.	1	GC
			<i>Wolltinerfia</i>	<i>martini</i>	2
		<i>tenerifae</i>	2	TF	
	Sphodrini	<i>Amaroschema</i>	<i>gaudini</i>	1	TF
		<i>Calathus</i>	<i>abaxoides</i>	3	TF
			<i>amplius</i>	1	TF
<i>angularis</i>			1	GC	
<i>angustulus</i>			2	TF	

Subfamilia	Tribu	Género	Especie	Nº indiv.	Isla
			<i>appendiculatus</i>	1	GC
			<i>ascendens</i>	1	TF
			<i>carinatus</i>	1	TF
			<i>cf. freyi</i>	1	TF
			<i>depressus</i>	2	TF
			<i>gonzalezi</i>	2	FV
			<i>pilosipennis</i>	1	LG
			<i>rectus</i>	1	TF
			<i>spretus</i>	1	HI
		<i>Laemostenus</i>	<i>complanatus</i>	2	HI, TF
			sp.	1	GC
		<i>Licinopsis</i>	<i>gaudini</i>	2	LP
			<i>obliterata franzi</i>	1	HI
			<i>picescens</i>	4	HI
			sp.	2	HI
	Synuchini	<i>Gomerina</i>	<i>nitidicollis</i>	1	GC
		<i>Pseudoplatyderus</i>	<i>amblyops</i>	3	LG
Trechinae	Trechodini	<i>Canarobius</i>	sp.	1	TF
		<i>Thalassophilus</i>	sp.	2	LP
			<i>subterraneus</i>	1	LP
		<i>Spelaeovulcania</i>	<i>canariensis</i>	1	TF
	Trechini	<i>Trechus</i>	<i>minioculatus</i>	2	HI
	Bembidini	<i>Bembidion</i>	<i>fortunatum</i>	1	TF
			<i>iricolor</i>	1	TF
			<i>schmidti subcallosum</i>	1	LG
		<i>Lymnastis</i>	sp.	2	LG, TF
	Zuphiinae	Dicrodontini	<i>Dicrodontus</i>	<i>brunneus</i>	1
sp.				1	TF
Zuphini		<i>Parazuphium</i>	<i>feloii</i>	1	LP

Subfamilia	Tribu	Género	Especie	Nº indiv.	Isla
			TOTAL	128	

Laboratorio de genética

Extracción de ADN

Según el tamaño del ejemplar, para la extracción se seleccionó una cantidad de tejido que variaba entre el cuerpo completo, el protórax, o una o varias patas. Primero se realizó la digestión de las muestras poniendo el tejido de cada ejemplar en un tubo tipo *Eppendorf* con Buffer TLL y proteinasa K, en estufa a 63°C durante toda la noche. Este es un proceso fundamental para provocar la lisis de las membranas celulares, liberando el ADN en el buffer. Al día siguiente, siguiendo la asignación alfanumérica preestablecida en la base de datos de trabajo de laboratorio, el contenido líquido de cada ejemplar se traspasó a su respectivo hueco en una placa de medio faldón de 96 pocillos (8x12), evitando tomar los restos de tejidos. El resto de muestras (24) se extrajeron en otra placa con muestras de otros estudios. La placa se metió en un robot KingFisher para realizar una extracción con el kit de extracción magnética Mag-Bind HDQ Blood DNA & Tissue 96KIT de OMEGA, con un programa ya establecido.

Amplificación del material genético

Tras la obtención del ADN de las muestras, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un termociclador Applied Biosystems. En estas PCR se amplificó el gen mitocondrial COI usando los *primers* degenerados del par LCO1490 / HCO2198 (Folm_deg_F TAAACTTCNGGRTGNCCAAAAAATCA / Folm_deg_R TTTCACAAATCATAARGAYATYGG) según Yu et al., 2012. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20 µl en cada muestra, en el que 1 µl correspondía al extracto de ADN y los 19 restantes a la mezcla de reactivos indicada en la Tabla 2. Debido a la gran variedad de géneros y especies seleccionadas en el estudio, lo habitual es que algunas de ellas requieran unas condiciones determinadas de amplificación. Para lograr que las PCR funcionaran en todas las muestras en el menor número de intentos posible, se realizaron varias pruebas variando las condiciones de amplificación, en concreto el número de ciclos y la concentración de ADN usada. La realización de una electroforesis en los geles de agarosa permitieron comprobar qué condiciones eran las más ideales para conseguir una

amplificación óptima del gen de interés para un alto porcentaje de las muestras. Las condiciones de las amplificaciones finalmente fueron un primer paso de desnaturalización de 4 minutos a 95°, 42 ciclos de una desnaturalización de 45 segundos a 95°C, seguida de una hibridación de 45 segundos a 46°C y de una elongación de 90 segundos a 72°C, y finalmente un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C seguida de una pausa de la reacción a 10°C durante tiempo indeterminado hasta la retirada de los productos de PCR del termociclador. Para minimizar fallos en las PCR se cuantificó la cantidad de ADN presente en cada muestra por absorbancia con un Lector Infinite MNano+, y posteriormente se normalizó el contenido de ADN de las muestras para asegurar que todas tuvieran una concentración de ADN no superior a 5 ng/μl.

Tabla 2. Composición de la mezcla de reactivos usada en las PCR de este estudio.

Productos	μl en cada muestra
H2O	13.72
NH4 (10x)	2
MgCl2 (50mM)	1.2
dNTPs (2.5 mM c/u)	0.4
BSA	0.4
FoldF (10 μM)	0.6
FoldR (10 μM)	0.6
Taq	0.08
SUBTOTAL	19
Extracto de ADN	1

Secuenciación

Las muestras que dieron un resultado positivo en la amplificación se prepararon para su secuenciación. Para ello se tomó 5 μl del producto de PCR de cada una de estas muestras y se sometió a un procedimiento de purificación con 2 μl de la mezcla de enzimas EXO I y rAP PCR usando un protocolo de *cleanup* casero. Con este procedimiento se limpian las muestras de impurezas, para aumentar así la probabilidad de conseguir unas secuencias limpias y de alta calidad. A los 7 μl resultantes se les añadió 5 μl del *forward* del *primer* degenerado

empleado y el total de volumen obtenido en todas las muestras fué enviado en una placa al servicio de secuenciación de Macrogen (Madrid).

Edición y alineamiento de secuencias

Una vez recibidas las secuencias, estas fueron visualizadas, editadas y alineadas usando el software Geneious R7 (Kearse et al. 2012). En la edición de las secuencias de cada individuo básicamente se eliminaron las impurezas (delección de colas y primers, búsqueda y resolución de ambigüedades). Las secuencias pertenecientes a un mismo género se alinearon en bloque para poder identificar mejor la presencia de ambigüedades o dobles picos. Las muestras que dieron secuencias malas se volvieron a secuenciar con productos de PCR nuevos, y las que dieron secuencias cortas debido a que el extremo 5' estaba sucio, se volvieron a secuenciar usando el *reverse* del *primer* degenerado.

Una vez que todas las secuencias estuvieron editadas, éstas fueron comprobadas en la base de datos de referencia BOLD (Ratnasingham, et al., 2007), con el fin de compararlas con las secuencias ya existentes en esta base de datos para verificar: i) la identificación taxonómica asignada a nuestras muestras en base al porcentaje de similitud genética; ii) para comprobar si de nuestras especies ya había secuencias *barcode* en este repositorio; iii) para explorar si las especies seleccionadas en nuestro estudio tienen una categoría de origen en la Base de Datos de Biodiversidad de Canarias (BIOTA) que pudiera ser cuestionada.

Para resolver situaciones incoherentes en las relaciones interespecíficas de las especies de algunos géneros, sus secuencias fueron alineadas y se construyeron árboles filogenéticos de *Neighbor-Joining* en Geneious a partir de datos de distancia evolutiva.

Resultados y Discusión

Extracción y PCR

El éxito de los resultados de las extracciones de las muestras fueron corroborados mediante electroforesis en gel de agarosa después de la realización de la PCR (Fig. 1). La amplificación del material genético tuvo un éxito del 93,7%. Ciento veinte de las 128 analizadas mostraron una banda correspondiente al fragmento de COI amplificado, de ellas un 93,3% dieron como resultado una intensidad “fuerte”, significado de una buena amplificación. En dos de las muestras (8G, 8H) se puede observar una segunda banda que podría ser la amplificación de otra región del material genético o algún rastro de impurezas.

De los 128 ejemplares seleccionados para este estudio, solo 120 amplificaron finalmente de modo satisfactorio y se enviaron a secuenciar. El trabajo realizado en el laboratorio ha contribuido a la optimización del proceso de extracción, amplificación y secuenciación para futuros estudios con muestras de la familia Carabidae.

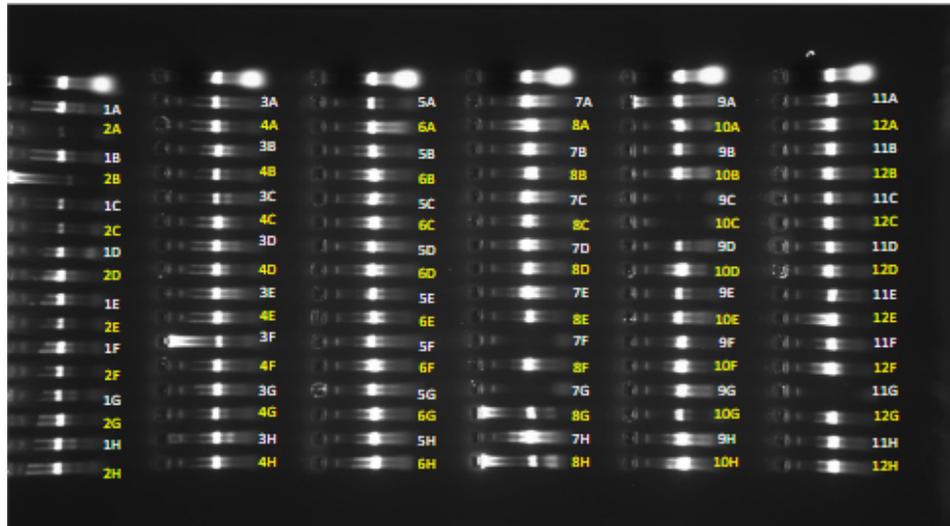


Fig. 1. Ejemplo de los gels de agarosa con productos de PCR obtenidos en este estudio.

Secuenciación

De las secuencias de COI, de los 120 ejemplares analizados se obtuvieron 118 secuencias óptimas. Teniendo en cuenta el valor HQ%, que nos indica el porcentaje de bases de alta calidad en el programa Geneious (*Geneious Prime User Manual, 2022*), del total de secuencias obtenidas, 102 de ellas presentaban una calidad mayor o igual de un 86,4%, suponiendo un éxito en las secuenciaciones de un 85%. En cuanto a la extensión en pares de bases (pb), se obtuvo que 110 de las muestras presentaban una longitud mayor a 600 pb, es decir, el 93,2% de las muestras. En cuanto a la presencia de ambigüedades, en 15 de las secuencias se encontraron ambigüedades, suponiendo un 12,7%. Sin embargo, al editarse y realizar el alineamiento con todas las secuencias (Fig. 2), estas se pudieron resolver dejando de ser un posible inconveniente.

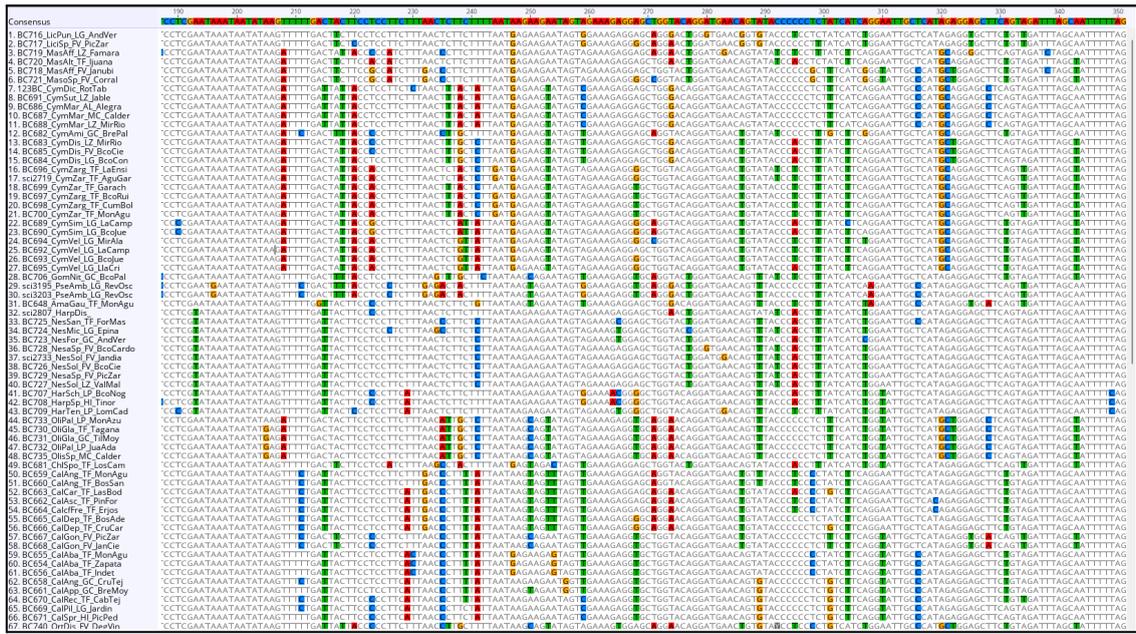


Fig. 2. Vista parcial del alineamiento de secuencias de carábidos de Canarias obtenidas en este estudio.

Comparación con la base de datos BOLD

Una vez obtenidas todas las secuencias editadas, se utilizó la herramienta de identificación taxonómica de BOLD, que compara cada una de nuestras secuencias con las almacenadas en este repositorio, ofreciéndonos un listado de las secuencias con el mayor porcentaje de similitud genética respecto a la nuestra. Esto nos permitió conocer la especie depositada en BOLD genéticamente más cercana, el porcentaje de similitud genética y el país de procedencia de las secuencias de BOLD semejantes a las nuestras (Tabla 3). Cinco de las 118 muestras de este estudio (4,2%) dieron una similitud del 100% con alguna secuencia depositada en BOLD, por lo que no aportarán ninguna novedad a este repositorio. De las 113 muestras restantes, 83 (70,3% del total de muestras) son secuencias inéditas para el repositorio de BOLD, ya que: i) no coinciden con especies de BOLD con la misma identificación taxonómica, y ii) tienen un porcentaje de similitud genética con muestras de BOLD inferior al 98%, un valor que se ha usado en otros estudios como umbral con el mismo fin (Kennedy et al., 2022). Las 30 muestras restantes (25,4% del total de muestras) dieron secuencias nuevas para BOLD, pero no de especies nuevas para este repositorio, ya que tienen una coincidencia igual o superior al 98% con alguna secuencia ya depositada en esta web, y además, tienen la misma asignación taxonómica de estas secuencias de BOLD (salvo en el caso de *Paranchus nichollsii*). Por tanto, el número de secuencias nuevas de carábidos obtenidas por el proyecto *Canary Barcode* es de 83. A pesar de que en Canarias se han realizado varios trabajos genéticos con la familia Carabidae (Emerson et al. 1999, 2000; Moya et al.,

2004; Contreras-Díaz et al., 2006), en ninguno de ellos se ha empleado la región barcode del gen COI, por lo que era de esperar que el porcentaje de *barcode* inéditos obtenidos en este estudio iba a ser muy alto.

Tabla 3. Resultados de las búsquedas realizadas con las especies incluidas en este estudio que dieron secuencias buenas, indicando la especie depositada en BOLD genéticamente más cercana, el porcentaje de similitud genética y el país de procedencia de la secuencia de BOLD.

Especie	Resultados de las búsquedas en BOLD			Barcode nuevo para Canarias
	Especie más cercana	% similitud	Procedencia del barcode de Bold	
<i>Broscus crassimargo</i>	<i>B. asiaticus</i>	93,6	Irán	si
<i>Broscus rutilans</i>	<i>B. asiaticus</i>	94,5	Irán	si
<i>Chlaenius spoliatus</i>	<i>Chlaenius spoliatus</i>	99,7-97	No publicado, Austria	no
<i>Carabus abbreviatus</i>	<i>Carabus abbreviatus</i>	98 - 100	Canarias (Tenerife)	no
<i>Carabus faustus</i>	<i>Carabus abbreviatus</i>	99,5	Canarias (Tenerife)	no
<i>Carabus faustus cabrerai</i>	<i>Carabus abbreviatus</i>	99,8	No publicado	no
<i>Carabus</i> sp.	<i>Carabus abbreviatus</i>	99 - 100	Canarias (Tenerife)	no
<i>Calosoma olivieri</i>	<i>Calosoma olivieri</i>	98,7- 100	Marruecos	no
<i>Harpalus distinguendus</i>	<i>Harpalus distinguendus</i>	99-100	Alemania, Finlandia, Francia	no
<i>Harpalus schauimi</i>	<i>Harpalus schauimi</i>	99	Canarias (Tenerife)	no
<i>Harpalus</i> sp.	<i>Harpalus schauimi</i>	99	Canarias (Tenerife)	no
<i>Harpalus tenebrosus</i>	<i>Harpalus tenebrosus</i>	98-100	Malta, Eslovenia, Pakistán y Alemania	no
<i>Nesacिनopus fortunatus</i>	<i>Acinopus picipes</i>	98,1	No publicado	si
<i>Nesacिनopus micans</i>	<i>Acinopus picipes</i>	97,9	No publicado	si
<i>Nesacिनopus sanctaerucis</i>	<i>Acinopus picipes</i>	97,4	No publicado	si
<i>Nesacिनopus solitarius</i>	<i>Nesacिनopus solitarius</i>	99,8	Canarias (Fuerteventura)	no
<i>Nesacिनopus</i> sp.	<i>Nesacिनopus solitarius</i>	99,8	Canarias (Fuerteventura)	no
<i>Cymindis amicta</i>	<i>Cymindis unicolor</i>	93,4	Canadá	si

Especie	Resultados de las búsquedas en BOLD			Barcode nuevo para Canarias
	Especie más cercana	% similitud	Procedencia del barcode de Bold	
<i>Cymindis cf. discophora</i>	<i>Cymindis planipennis</i>	93,8	EEUU	si
<i>Cymindis discophora</i>	<i>Cymindis arizonensis</i>	95 - 96	EEUU	si
<i>Cymindis marginella</i>	<i>Cymindis planipennis</i>	94 - 95	EEUU	si
<i>Cymindis simillima</i>	<i>Cymindis simillima</i>	99 - 100	Canarias (La Gomera)	no
<i>Cymindis suturalis</i>	<i>Cymindis planipennis</i>	94,2	EEUU	si
<i>Cymindis velata</i>	<i>Cymindis velata</i>	98 - 99	Canarias (La Gomera)	no
<i>Cymindis zargoides</i>	<i>Cymindis planipennis</i>	95 - 96	EEUU	si
<i>Philorhizus mateui</i>	<i>Philorhizus notatus</i>	92,2	Alemania	si
<i>Paradromius insularis</i>	<i>Paradromius linearis</i>	>99	Alemania, Polonia, Finlandia	no
<i>Metadromius pervenustus</i>	<i>Tetragonoderus fasciatus</i>	92	EEUU	si
<i>Licinus punctatulus granulatus</i>	<i>Licinus punctulatus</i>	99,2	Italia	no
<i>Licinus</i> sp.	<i>Dixus clypeatus / Licinus silphoides</i>	97,8	No publicado	si
<i>Masoreus orientalis nobilis</i>	<i>Masoreus wetterhallii</i>	92,5	Alemania	si
<i>Masoreus affinis arenicola</i>	<i>Masoreus wetterhallii</i>	95,9	Alemania	si
<i>Masoreus alticola</i>	<i>Masoreus wetterhallii</i>	94,7	Alemania	si
<i>Masoreus</i> sp.	<i>Masoreus wetterhallii</i>	92,7	Alemania	si
<i>Leistus nubivagus</i>	<i>Leistus nubivagus</i>	99,8	Canarias (Tenerife)	no
<i>Olisthopus glabratus</i>	<i>Olisthopus rotundatus</i>	93	Alemania	si
<i>Olisthopus tamaranus</i>	<i>Olisthopus rotundatus</i>	93	Alemania	si
<i>Olisthopus palmensis</i>	<i>Olisthopus rotundatus</i>	92 - 93	Alemania	si
<i>Olisthopus</i> sp.	<i>Olisthopus rotundatus</i>	93,2	Alemania	si
<i>Paranchus nichollsii</i>	<i>Paranchus albipes</i>	98,1	Alemania	no
<i>Orthomus berytensis</i>	<i>Orthomus barbarus expansus</i>	96 - 97	No publicado	si
<i>Orthomus discors</i>	<i>Orthomus barbarus expansus</i>	94 - 95	No publicado	si

Especie	Resultados de las búsquedas en BOLD			Barcode nuevo para Canarias
	Especie más cercana	% similitud	Procedencia del barcode de Bold	
<i>Orthomus</i> sp.	<i>Orthomus barbarus expansus</i>	96,3	No publicado	si
<i>Wolltinerfia martini</i>	<i>Platynus/Pterostichus strenuus</i>	91,7/ 89,7	Costa Rica/Alemania	si
<i>Wolltinerfia tenerifae</i>	<i>Platynus</i>	90,4	Costa Rica	si
<i>Amaroschema gaudini</i>	<i>Harpalus paratus</i>	91,6	EEUU	si
<i>Calathus abaxoides</i>	<i>Calathus cinctus / Calathus ambiguus</i>	94 - 95	Alemania, Austria, Alemania	si
<i>Calathus angularis</i>	<i>Calathus erratus / Calathus ambiguus</i>	94,3	No publicado / Alemania	si
<i>Calathus angustulus</i>	<i>Calathus advena</i>	93,7	Canadá	si
<i>Calathus appendiculatus</i>	<i>Calathus erratus / Calathus ambiguus</i>	94,1	No publicado / Alemania	si
<i>Calathus ascendens</i>	<i>Calathus ambiguus</i>	93	Austria	si
<i>Calathus carinatus</i>	<i>Calathus ambiguus</i>	93,2	Austria	si
<i>Calathus cf.freyi</i>	<i>Calathus ambiguus</i>	92,8	Austria	si
<i>Calathus depressus</i>	<i>Calathus ambiguus</i>	93 - 94	Austria	si
<i>Calathus gonzalezi</i>	<i>Calathus mollis</i>	95 - 96	Alemania	si
<i>Calathus pilosipennis</i>	<i>Calathus erratus</i>	94,7	No publicado	si
<i>Calathus rectus</i>	<i>Calathus erratus</i>	95,5	No publicado	si
<i>Calathus spretus</i>	<i>Calathus erratus</i>	95,2	No publicado	si
<i>Laemostenus complanatus</i>	<i>Laemostenus complanatus</i>	99 - 100	EEUU, Portugal	no
<i>Laemostenus</i> sp.	<i>Laemostenus complanatus</i>	100	EEUU	no
<i>Licinopsis gaudini</i>	<i>Laemostenus cazorlensis</i>	92 - 93	España	si
<i>Licinopsis obliterateda franzi</i>	<i>Calathus ingratus</i>	91,2	Canadá	si
<i>Licinopsis picescens</i>	<i>Laemostenus cazorlensis</i>	92 - 93	España	si
<i>Licinopsis</i> sp.	<i>Laemostenus cazorlensis</i>	92 - 93	España	si

Especie	Resultados de las búsquedas en BOLD			Barcode nuevo para Canarias
	Especie más cercana	% similitud	Procedencia del barcode de Bold	
<i>Gomerina nitidicollis</i>	<i>Leleis rutila</i>	91,9	Costa Rica	si
<i>Pseudoplatyderus amblyops</i>	<i>Bradycellus / Chlaenius impunctifrons / Nemotarsus rhombifer</i>	90 - 92	No publicado / EEUU, Costa Rica	si
<i>Canarobius</i> sp.	<i>Pelophila borealis</i>	88,9	Rusia	si
<i>Thalassophilus</i> sp.	<i>Thalassophilus pieperi</i>	92 - 94	No publicado	si
<i>Thalassophilus subterraneus</i>	<i>Thalassophilus pieperi</i>	94,5	No publicado	si
<i>Spelaeovulcania canariensis</i>	<i>Pterostichus femoralis</i>	90	No publicado	si
<i>Trechus minioculatus</i>	<i>Trechus obtusus</i>	93,7	EEUU	si
<i>Bembidion fortunatum</i>	<i>Bembidion glaciale</i>	93,5	Austria	si
<i>Bembidion iricolor</i>	<i>Ocys harpaloides</i>	99,5	Francia, España (Barcelona)	no
<i>Bembidion schmidti subcallosum</i>	<i>Bembidion glaciale</i>	94,8	Austria	si
<i>Lymnastis</i> sp.	<i>Bembidion georgeballi / Tachyta</i>	89 / 88,9	Ecuador / Canadá	si
<i>Parazuphium feloi</i>	<i>Harpalus vagans</i>	86,9	EEUU	si

A continuación se detallan los resultados obtenidos en las búsquedas realizadas en BOLD, en función de las subfamilias a las que pertenecen nuestras muestras.

Subfamilia Broscinae

Las dos especies del género ***Broscus*** analizadas en esta subfamilia, *B. crassimargo* y *B. rutilans*, (Fig. 3A) dieron como resultado en el blast de BOLD la especie *B. asiaticus*, con una similitud del 93,7% y 94,5%, respectivamente. Son valores de similitud bajos, por lo que consideramos que no hay coincidencia de nuestras secuencias de *Broscus* con ninguna de las depositadas en BOLD. En este caso, las secuencias *barcode* que hemos obtenido para estas dos especies serán aportaciones inéditas para BOLD en el momento en que se suban a este repositorio.

Subfamilia Callistinae

El representante del género *Chlaenius* analizado en nuestro estudio de esta subfamilia, *Ch. spoliatus*, tuvo un porcentaje de similitud del 99,7 y 97% con secuencias de *Ch. spoliatus*, una de procedencia aún no publicada y otra de Austria, respectivamente. Podemos concluir que nuestro ejemplar corresponde a esta especie con toda seguridad, y que la asignación taxonómica que le habíamos dado es correcta.

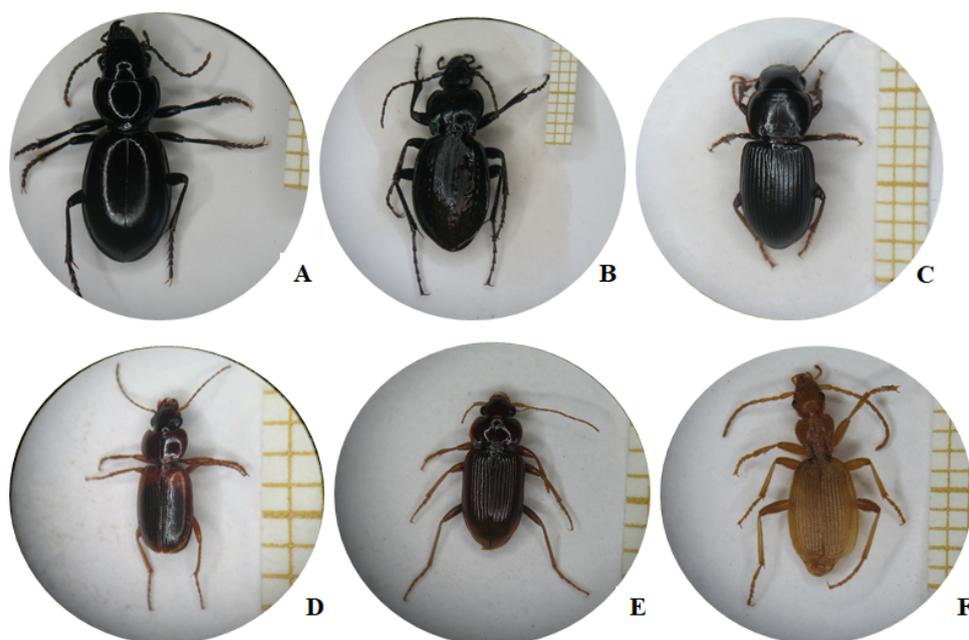


Fig. 3. Fotografías de varios ejemplares de carábidos incluidos en este estudio. A. *Brosicus rutilans* (Subf. Broscinae) B. *Carabus* sp. (Subf. Carabinae) C. *Nesacynopus* sp. (Subf. Harpalinae) D. *Masoreus* sp. (Subf. Masoreinae) E. *Leistus nubivagus* (Subf. Nebriinae) F. *Dicrodontus* sp. (Subf. Zuphiinae).

Subfamilia Carabinae

En el género *Carabus*, a pesar de que en nuestro estudio teníamos ejemplares de Tenerife determinados tanto como *C. abbreviatus*, *C. faustus cabrerai* y *Carabus* sp. (Fig. 3B), todos ellos coincidieron con una misma especie, *C. abbreviatus*, con un porcentaje de similitud mayor del 98%. Machado (1992) en su monografía de los carábidos canarios ya indica que existen ejemplares con morfologías intermedias entre *C. abbreviatus* y *C. faustus cabrerai*. Esto podría estar indicando que es un género de reciente radiación en el que las especies aún no han alcanzado un aislamiento precigótico efectivo, por lo que la hibridación entre especies se puede dar, haciendo que las distancias genéticas entre ellas sean bajas, tal como hemos encontrado en este estudio, y que los caracteres morfológicos sean ambiguos. Para esclarecer

el patrón encontrado y demostrar si hay hibridación entre poblaciones de estas dos especies será necesario hacer un estudio genético empleando más genes mitocondriales y nucleares, y más poblaciones.

En el género *Calosoma*, los dos ejemplares de *C. oliveri* de nuestro estudio coinciden en un 98,7% y 100% respectivamente con secuencias de ejemplares de Marruecos de esta misma especie, por lo que podemos concluir que la determinación de nuestro ejemplar y nuestro *barcode* son correctas. Este género de distribución paleártica (Jeannel, 1941) presenta cuatro especies aladas en el Mediterráneo occidental, incluida *C. oliveri*, por lo que cabría esperar que su clasificación como nativa probable en BIOTA se deba a que se considere que su capacidad de vuelo es suficiente como para colonizar las islas desde zonas continentales cercanas, como es el caso de Marruecos.

Subfamilia Harpalinae

Del género *Harpalus*, las especies *H. schaumii* (Fig. 6A) y *Harpalus* sp. coincidieron en más del 99% con secuencias de *H. schaumii*, por lo que podemos asumir que nuestras determinaciones son correctas, y que nuestro ejemplar determinado solo a nivel de género es *H. schaumii*. Este caso ilustra perfectamente la utilidad de las secuencias barcode para identificar taxones que no han sido determinados a nivel de especie con herramientas taxonómicas tradicionales, tal y como se ha demostrado en otros estudios (ver por ejemplo, Emerson et al., 2017; Uscanga et al., 2021). Nuestro ejemplar de *H. tenebrosus* coincide entre el 98 y el 100% con ejemplares de esta misma especie procedentes de Malta, Eslovenia, Pakistán y Alemania. Este patrón de distribución tan amplio y con una divergencia genética tan baja entre poblaciones es un indicativo de especies panmícticas, especies que tienen una gran capacidad de dispersión y de establecimiento natural o facilitado por el hombre en cualquier lugar nuevo, por lo que probablemente sea una especie introducida en Canarias, y no nativa probable tal como figura en BIOTA. Este caso ilustra otra de las utilidades de las secuencias barcode y los repositorios de secuencias genéticas, y es que pueden ayudar a esclarecer las categorías de origen de las especies presentes en un lugar determinado (Janion-Scheepers et al., 2018; Kennedy et al., 2022).

En cuanto al género *Nesacinopus*, los ejemplares de las especies endémicas *N. fortunatus*, *N. micans* y *N. sanctaerucis* dieron como resultado que son muy próximas a *Acinopus picipes*, con porcentajes de 98,1%, 97,9% y 97,4% respectivamente. Machado (1992) indica que los *Nesacinopus* canarios tienen una genitalia parecida a las de *Acinopus*, pero en ningún momento pone en duda la validez de las especies canarias. A falta de poder comprobar las

relaciones filogenéticas y morfológicas entre estos dos géneros, consideramos que las secuencias *barcode* obtenidas en este estudio son válidas y que serán inéditas cuando se incorporen en BOLD. Por último, nuestros ejemplares identificados como *N. solitarius* y *Nesacinopus* sp. (Fig. 3C) coincidieron en un 99,8% con secuencias ya publicadas de *N. solitarius* procedentes de Fuerteventura. De nuevo, mostramos un ejemplo de la utilidad de las secuencias *barcode* para identificaciones taxonómicas, de modo que nuestro ejemplar identificado como *Nesacinopus* sp., resulta ser *N. solitarius* con toda seguridad.

Subfamilia Lebiinae

El género *Philorhizus* está representado en nuestro estudio por un ejemplar de la especie *Ph. mateui*. Este tuvo un porcentaje de similitud del 92,2% con una secuencia de *Ph. notatus* procedente de Alemania. El género *Metadromius* también estuvo representado en nuestro estudio con un solo ejemplar de la especie *M. pervenustus*, que coincidió en un 92% con la especie *Tetragonoderus fasciatus* procedente de EEUU. En ambos géneros podemos concluir que las secuencias *barcode* obtenidas en este estudio serán aportaciones inéditas para el repositorio de BOLD.

En el caso del género *Paradromius*, la única especie analizada, *P. insularis*, dió un porcentaje de similitud con *P. linearis* superior al 99,2% con una gran cantidad de secuencias procedentes de Alemania, Polonia y Finlandia. En este caso parece que la determinación taxonómica del material que hemos usado en el estudio no es correcta y que nuestro ejemplar realmente es *P. linearis* y no *P. insularis*. El grupo de *P. linearis* se caracteriza por ser euritópico y poseer en las islas una amplia variedad de formas endémicas (Machado, 1992), pero este caso particular que hemos analizado parece ser un claro ejemplo de especie con una amplia distribución continental introducida en Canarias, coincidiendo con lo establecido en BIOTA. Sería interesante revisar la identificación morfológica de nuestro ejemplar para su correcta asignación a nivel de especie.

Nuestros ejemplares del género *Cymindis* ofrecieron resultados variados. La especie *C. amicta* obtuvo un porcentaje de similitud del 93,4% con un ejemplar de *C. unicolor* de Canadá. Los tres ejemplares de *C. discophora* hicieron un match del 95% con ejemplares de EEUU de la especie *C. arizonensis*, mientras que los tres ejemplares de *C. marginella* (Fig. 6B) se asemejaron en un 94% con *C. planipennis* de EEUU. También coincidieron con la especie *C. planipennis* de EEUU, el ejemplar de *C. suturalis* (Fig. 6C) con un 94,2% de similaridad, y los cinco ejemplares de *C. zargoides* con un porcentaje del 95,5%. Todos estos

ejemplares con coincidencias tan bajas constituirán, por tanto, aportaciones inéditas para BOLD. En el caso de los ejemplares de *C. simillina* y *C. velata*, éstos dieron porcentajes de similitud superiores al 98% con secuencias de ambas especies ya presentes en BOLD, todas de La Gomera.

En la figura 4 se muestra el árbol filogenético de *Neighbor-Joining* realizado con el alineamiento de secuencias de *Cymindis* obtenido en este estudio, en el que descubrimos un caso de identificación taxonómica errónea, que posteriormente pudo ser confirmado analizando el ejemplar bajo la lupa. Como se ve en la figura 4, el ejemplar 123BC identificado como *C. discophora* (rodeado en azul) no se encuentra en el mismo clado del resto de individuos de esta especie (rodeados en rojo), sino que se une a un ejemplar de *C. suturalis* con un porcentaje de similitud muy alto (99,8%). El ejemplar 123BC se trata, por tanto, de un ejemplar de *C. suturalis* erróneamente identificado como *C. discophora*.

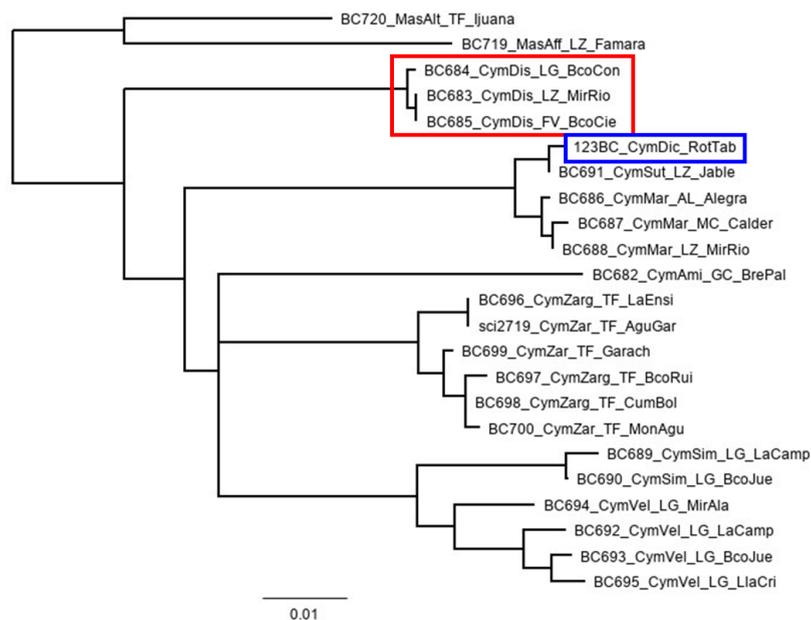


Fig. 4. Árbol filogenético *Neighbor-Joining* de los ejemplares de *Cymindis* usados en este estudio.

Subfamilia Licininae

Para esta subfamilia se seleccionaron dos especies del género *Licinus*. Por un lado, un ejemplar de *L. punctatulus granulatus* de Gran Canaria que coincidió en un 99,2% con la secuencia de un ejemplar de Italia de esta misma especie. Esto indica que la asignación taxonómica que le habíamos dado a nuestro ejemplar es correcta, y que lo más probable es que esta especie está introducida en Canarias, tal como se indica en BIOTA. El otro ejemplar usado en nuestro estudio, *Licinus* sp. de Fuerteventura, tuvo una coincidencia inferior al 98%

con otras especies de *Licinus* y *Dixus*, por lo que podría tratarse de la especie endémica de Lanzarote y Fuerteventura *Licinus manriquianus*. De confirmarse esta identidad taxonómica, constituirá otro registro inédito para el repositorio de BOLD.

Subfamilia Masoreinae

El género *Masoreus* estuvo representado en este estudio por ejemplares de *M. affinis arenicola*, *M. alticola* y *M. orientalis nobilis*. Todas las secuencias obtenidas coincidieron con un porcentaje inferior al 98% con ejemplares de Alemania de la especie *M. wetherhallii*, la única especie de *Masoreus* presente en BOLD. Por tanto, las secuencias de *Masoreus* obtenidas en este estudio, además de inéditas, aumentarán sustancialmente la información recogida en BOLD sobre este género.

Subfamilia Nebriinae

La única especie de esta subfamilia en nuestro estudio, *Leistus nubivagus* (Fig. 3E), dió como resultado un match del 99,8% con la secuencia de un ejemplar de la misma especie procedente de Tenerife. Por tanto, nuestro *barcode* no supone una aportación inédita en BOLD, pero es otro ejemplo más de cómo corroborar las asignaciones taxonómicas tradicionales con esta herramienta genética.

Subfamilia Pterostichinae

Las diferentes especies del género *Olisthopus* (Fig. 6D) coincidieron con una similitud inferior al 98% con una misma especie procedente de Alemania, *O. rotundatus*. *Paranchus nichollsii*, la única especie representante de este género en nuestro estudio, tuvo un porcentaje de similitud del 98,1% con *P. albipes* procedente de Alemania. La especie del género *Amaroschema* coincidió con *Harpalus parathus* de EEUU en un 91,6%. El género *Gomerina*, con *G. nitidicollis*, consiguió un match del 91% con un ejemplar de *Lelis rutila* de Costa Rica. Todas estas secuencias de nuestro estudio que han dado un valor de similitud tan bajo con las presentes en BOLD, serán por tanto aportaciones inéditas al repositorio.

Los géneros *Licinopcis*, *Wolltinerfia* y *Pseudoplatyderus* son endémicos de Canarias y están constituidos por especies adaptadas a vivir en el medio subterráneo. Son especies que se han originado en el medio subterráneo y no tienen especies hermanas claras en el medio epigeo (Machado, 1992; Oromí et al., 2021), por lo que no es probable encontrar secuencias coincidentes de procedencia continental. Hasta ahora nunca se ha hecho un estudio genético con la región *barcode* que incluya a estos géneros, de modo que las coincidencias que hemos

obtenido para estos ejemplares tienen un porcentaje de similaridad muy bajo. Todas las secuencias *barcode* derivadas de estos géneros son aportaciones inéditas para el repositorio de BOLD. Además, los ejemplares de estos carábidos subterráneos identificados previamente solo a nivel de género, con este estudio pudieron ser identificados a nivel de especie usando los *barcode* obtenidos con los ejemplares determinados a nivel de especie.

El género *Calathus* es el que cuenta con el mayor número de especies diferentes en nuestro estudio. Se trata de un género con una importante radiación en Canarias, con todas sus especies endémicas (Machado, 1992). No se encontró ninguna coincidencia superior al 96% de similaridad, por lo que todas nuestras secuencias serán inéditas en los repositorios de *barcode*. Estudios genéticos previos sugieren que Canarias fué colonizada al menos tres veces por este género, de modo que varias especies como *C. gonzalezi* y *C. simplicicollis* de las islas orientales, o *C. angustulus*, *C. depressus*, *C. fryi*, *C. ascendens*, *C. carinatus* y *C. auctus* de Tenerife tienen relaciones filogenéticas más cercanas con especies continentales que con el resto de especies canarias (Emerson et al., 2000). Usando el *barcode* y sólo una representación de las especies usadas en Emerson et al. (2000), hemos obtenido el mismo patrón filogenético, con dos clados claros: uno (rodeado con un rectángulo azul en la figura 5) constituido por *C. gonzalezi* de Fuerteventura y una mezcla de especies del resto de islas, y otro (rodeado con un rectángulo rojo en la figura 5) formado sólo por especies de Tenerife, en lo que parece una radiación local del género, tal como indica Emerson et al. (2000) en su trabajo. Varios de los match que hicieron los ejemplares de *Calathus* usados en este estudio, aunque fueron con valores bajos de similaridad, concuerdan con las relaciones filogenéticas encontradas previamente entre especies canarias y continentales (ver Tabla 3 y árboles de Emerson et al., 2000).

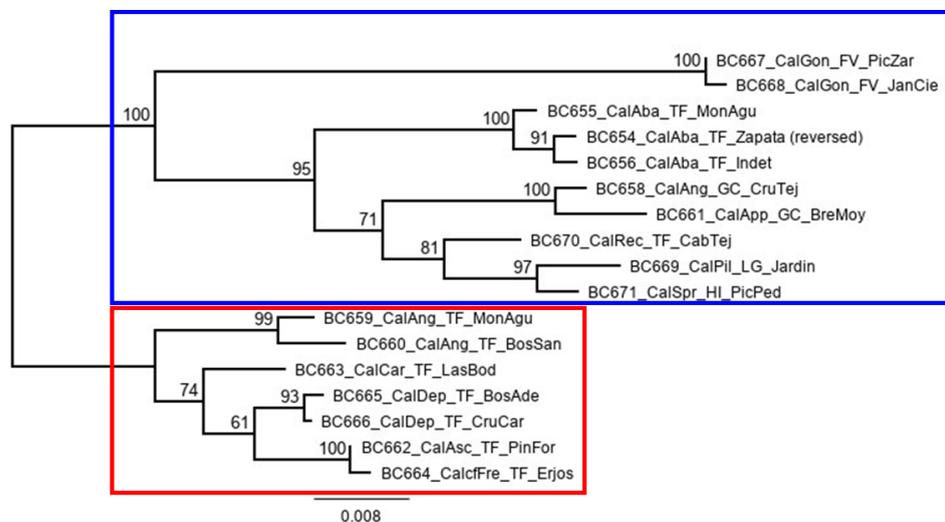


Fig. 5. Árbol filogenético *Neighbor-Joining* de los ejemplares de *Calathus* usados en este estudio.

Del género *Orthomus*, encontramos que todas las secuencias coinciden con una sola especie, *O. barbarus expansus*, pero ninguna de ellas con un porcentaje mayor del 98%. Nuestro ejemplar determinado como *Orthomus* sp. coincide en más de un 99% con nuestros ejemplares de *O. berytensis* (Fig. 6E), por lo que los propios *barcode* generados en este estudio ya sirven para identificar las especies que hemos incluido identificadas solo a nivel de género.

En el género *Laemostenus*, los dos ejemplares identificados por *L. complanatus* dieron esta misma especie entre un 99% y 100%, demostrando que la asignación que establecimos para nuestros ejemplares fue correcta. El ejemplar *Laemostenus* sp. (Fig. 6F) coincidió en un 100% de similitud con la especie anterior, *L. complanatus*, confirmando así la identidad taxonómica de nuestro ejemplar.

Subfamilia Trechinae

En Canarias esta subfamilia tiene una buena representación tanto de géneros como de especies endémicas adaptadas al medio subterráneo. Es el caso de los ejemplares usados de *Canarobius*, *Spelaeovulcania* y los de las especies de *Thalassophilus*, *Trechus* y *Lymnastis*. En todos ellos el resultado de las búsquedas en BOLD ha sido el mismo que con *Licinopcis*, *Wolltinerfia* y *Pseudoplatyderus* de la subfamilia Pterostichinae. Los matches encontrados son con especies no emparentadas y con porcentajes de similaridad muy bajos. Las especies subterráneas de Canarias tienen distribuciones geográficas muy reducidas, en general restringidas a una sola isla o región de la misma, de modo que sus secuencias *barcode* difícilmente van a estar en los repositorios de secuencias generales a menos que su procedencia sea de estudios específicos realizados con ellas. Todas las secuencias *barcode* de especies subterráneas que se obtengan de este estudio son de gran interés para el Grupo de Ecología de Evolución en Islas del IPNA-CSIC, ya que varios de sus integrantes tienen líneas de investigación centradas en invertebrados con este tipo de vida.

En cuanto al género *Bembidion*, las especies *B. fortunatum* y *B. schmidti subcallosum* coincidieron en el match con la misma especie *B. glaciale* procedentes de Austria, pero con porcentajes de similaridad por debajo del 98%. En cambio, el ejemplar identificado en nuestro estudio como *B. iricolor* concuerda en un 99,5% con ejemplares de *Ocys harpaloides* procedentes de Francia y Barcelona. La presencia de *O. harpaloides* en Tenerife ya había sido detectada recientemente en los estudios genéticos que realiza el Grupo de Ecología de

Evolución en Islas, usando el mismo procedimiento, es decir, comparando secuencias *barcode* obtenidas en el laboratorio con las presentes en BOLD. Se trata sin duda de una introducción reciente de una especie con gran parecido con *B. iricolor*, que seguro ha pasado desapercibida hasta ahora. Por tanto, nuestro ejemplar de *B. iricolor* pertenece en realidad a *O. harpaloides*, suponiendo una nueva cita para las islas no registrada aún en la base de datos BIOTA.

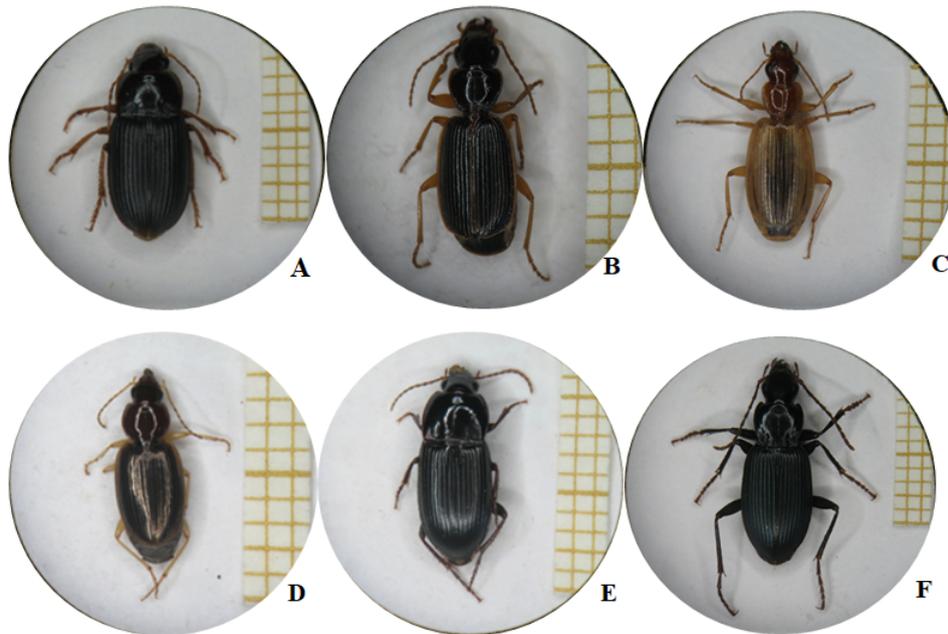


Fig. 6. Fotografías de varios ejemplares de carábidos incluidos en este estudio. A. *Harpalus schaumi* (Subf. Harpalinae) B. *Cymindis marginella* (Subf. Lebiinae) C. *Cymindis suturalis* (Subf. Lebiinae) D. *Olisthopus palmensis* (Subf. Pterostichinae) E. *Orthomus berytensis* (Subf. Pterostichinae) F. *Laemostenus* sp. (Subf. Pterostichinae).

Subfamilia Zuphiinae

La última de las subfamilias analizadas en este estudio solo cuenta con un género en el material seleccionado, ***Parazuphium***, que en Canarias tiene dos especies, una de vida subterránea y otra epigea. En nuestro estudio hemos usado un ejemplar de *Parazuphium feloi*, que es una de las especies canarias con las transformaciones morfológicas más acentuadas que se conocen para desarrollar su vida en ambientes subterráneos (Machado, 1998; Oromí, 2021). Como en las otras especies subterráneas, en BOLD no se encontró ninguna coincidencia bien soportada, de modo que el *barcode* de esta especie también será una incorporación inédita en este repositorio.

Conclusiones

Tras la realización de este estudio podemos concluir que:

1. El alto porcentaje de éxito del protocolo ejecutado en este estudio para la obtención de códigos de barras de ADN ha permitido aportar un número significativo de *barcodes* genéticos de diferentes especies de la familia Carabidae al proyecto *Canary Barcode*. Esto no solo permite generar una colección local de *barcodes* de carábidos de Canarias, sino que también incrementará la información de los repositorios globales (BOLD, GenBank), con 83 secuencias inéditas, cumpliéndose así el objetivo principal planteado en este TFG.
2. Se ha optimizado el protocolo de trabajo en el laboratorio, específico para la familia Carabidae, lo que facilitará el proceso de obtención de *barcodes* genéticos para este grupo de coleópteros en futuros estudios.
3. Las secuencias *barcode* y los repositorios de secuencias genéticas han supuesto una ayuda para esclarecer la categoría de origen de las especies presentes en un lugar determinado y sugerir algunas correcciones respecto a lo indicado en BIOTA, tal como hemos demostrado en 5 ocasiones en este estudio.
4. El *barcode* también ayudó a identificar taxonómicamente los ejemplares a nivel de especie en 4 ocasiones.

Se muestra así el potencial de esta técnica genética como herramienta adicional para la identificación taxonómica de los ejemplares obtenidos en estudios diversos.

Conclusions

After carrying out this study we can conclude that:

1. The high success rate of the protocol executed in this study for obtaining DNA barcodes has made it possible to contribute a significant number of genetic barcodes of different species of the family Carabidae to the Canary Barcode project. This not only makes it possible to generate a local collection of Canarian carabid barcodes, but will also increase the information from global repositories (BOLD, GenBank), with 83 unpublished sequences, thus fulfilling the main objective of the project.
2. The working protocol in the laboratory has been optimised specifically for the family Carabidae will facilitate the process of obtaining genetic barcodes for this group of Coleoptera in future studies.

3. The barcode sequences and genetic sequence repositories have been helpful in clarifying the category of origin of the species present at a given site and suggesting some corrections to what is indicated in BIOTA, as we have demonstrated on 5 occasions in this study.
4. The barcode also helped to taxonomically identify specimens to species level on 4 occasions.

This shows the potential of this genetic technique as an additional tool for taxonomic identification of specimens obtained in different studies.

Bibliografía

- Allan, Richard P, Christophe Cassou, Deliang Chen, Annalisa Cherchi, L Connors, Francisco J Doblaz-Reyes, Hervé Douville, et al. «Summary for Policymakers», 2021, 32.
- Arias, Paola A, Nicolas Bellouin, Richard G Jones, Vaishali Naik, Gian-Kasper Plattner, Joeri Rogelj, Jana Sillmann, et al. «Technical Summary», 2021, 112.
- Astrin, Jonas J., Hubert Höfer, Jörg Spelda, Joachim Holstein, Steffen Bayer, Lars Hendrich, Bernhard A. Huber, et al. «Towards a DNA Barcode Reference Database for Spiders and Harvestmen of Germany». Editado por Matja Kuntner. *PLOS ONE* 11, n.º 9 (28 de septiembre de 2016): e0162624.
- Bánki, O., Roskov, Y., Vandepitte, L., DeWalt, R. E., Remsen, D., Schalk, P., Orrell, T., Keping, M., Miller, J., Aalbu, R., Adlard, R., Adriaenssens, E., Aedo, C., Aescht, E., Akkari, N., Alonso-Zarazaga, M. A., Alvarez, B., Alvarez, F., Anderson, G., et al. (2021). *Catalogue of Life Checklist* (Version 2021-09-21). Catalogue of Life. <https://doi.org/10.48580/d4sv>
- Barnosky, Anthony D., Nicholas Matzke, Susumu Tomiya, Guinevere O. U. Wogan, Brian Swartz, Tiago B. Quental, Charles Marshall, et al. «Has the Earth's Sixth Mass Extinction Already Arrived?» *Nature* 471, n.º 7336 (3 de marzo de 2011): 51-57.
- Barrett, Rowan D.H, y Paul D.N Hebert. «Identifying Spiders through DNA Barcodes». *Canadian Journal of Zoology* 83, n.º 3 (1 de marzo de 2005): 481-91.
- Biota, 2022. <https://www.biodiversidadcanarias.es/biota/>
- Blagoev, Gergin A., Jeremy R. deWaard, Sujeevan Ratnasingham, Stephanie L. deWaard, Liuqiong Lu, James Robertson, Angela C. Telfer, y Paul D. N. Hebert. «Untangling Taxonomy: A DNA Barcode Reference Library for C Anadian Spiders». *Molecular Ecology Resources* 16, n.º 1 (enero de 2016): 325-41.
- BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Consultada el 12 de junio de 2022.
- Contreras-Díaz HG, Moya O, Oromí P, Juan C (2006) Evolution and diversification of the forest and hypogean ground-beetle genus *Trechus* in the Canary Islands, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 42, 687-699.
- Emerson B. C., Oromí P, Hewitt GM (1999) MtDNA phylogeography and recent intransland diversification among Canary Island *Calathus* beetles. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13, 149-158
- Emerson, B. C., Oromí, P., & Hewitt, G. M. (2000). Interpreting colonization of the *Calathus* (Coleoptera: Carabidae) on the Canary Islands and Madeira through the application of the parametric bootstrap. *Evolution*, 54(6), 2081-2090
- Emerson, B. C., Oromí P., y Godfrey M Hewitt. «Tracking Colonization and Diversification of Insect Lineages on Islands: Mitochondrial DNA Phylogeography of *Tarphius Canariensis* (Coleoptera: Colydiidae) on the Canary Islands». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267, n.º 1458 (7 de noviembre de 2000): 2199-2205.
- Emerson, B. C., Casquet, J., López, H., Cardoso, P., Borges, P. A., Mollaret, N., ... & Thébaud, C. (2017). A combined field survey and molecular identification protocol for comparing forest arthropod biodiversity across spatial scales. *Molecular Ecology Resources*, 17(4), 694-707.
- GBIF, 2022. <https://www.gbif.org/species/3792>. Consultada el 13 de julio de 2022.
- «Geneious Prime User Manual», 2022, 322.
- Greenstone, M. H., D. L. Rowley, U. Heimbach, J. G. Lundgren, R. S. Pfannenstiel, y S. A. Rehner. «Barcoding Generalist Predators by Polymerase Chain Reaction: Carabids and Spiders». *Molecular Ecology* 14, n.º 10 (septiembre de 2005): 3247-66.

- Hebert, Paul D. N., Alina Cywinska, Shelley L. Ball, y Jeremy R. deWaard. «Biological Identifications through DNA Barcodes». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, n.º 1512 (7 de febrero de 2003): 313-21.
- Hebert, Paul D. N., Erin H. Penton, John M. Burns, Daniel H. Janzen, y Winnie Hallwachs. «Ten Species in One: DNA Barcoding Reveals Cryptic Species in the Neotropical Skipper Butterfly *Astraptes Fulgerator*». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, n.º 41 (12 de octubre de 2004): 14812-17.
- Hebert, P. D., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.
- Huang, Danwei, Rudolf Meier, Peter A. Todd, y Loke Ming Chou. «Slow Mitochondrial COI Sequence Evolution at the Base of the Metazoan Tree and Its Implications for DNA Barcoding». *Journal of Molecular Evolution* 66, n.º 2 (febrero de 2008): 167-74..
- International Barcode of Life. «The International Barcode of Life Consortium». Accedido el 3 de agosto de 2022. <https://ibol.org/>.
- Janion-Scheepers, C., Phillips, L., Sgrò, C. M., Duffy, G. A., Hallas, R., & Chown, S. L. (2018). Basal resistance enhances warming tolerance of alien over indigenous species across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(1), 145-150.
- Jeannel, R. (1941-42): Faune de France, Coléoptères Carabiques. Parts 1-2. 1173 pp. 1941 Première Partie, 39: 1-571; 1942 Deuxième Partie, 40: 573-1173; 1949 Supplément, 51: 1-51.
- Johnson, Christopher N., Andrew Balmford, Barry W. Brook, Jessie C. Buettel, Mauro Galetti, Lei Guangchun, y Janet M. Wilmschurst. «Biodiversity Losses and Conservation Responses in the Anthropocene». *Science* 356, n.º 6335 (21 de abril de 2017): 270-75.
- KEARSE M., MOIR R., WILSON A., STONES-HAVAS S., CHEUNG M., STURROCK S., BUXTON S., COOPER A., MARKOWITZ S., DURAN C., THIERER T., ASHTON B., MENTJES P. & DRUMMOND A. 2012: Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Kennedy, S., Calaor, J., Zurápití, Y., Hans, J., Yoshimura, M., Choo, J., Andersen, J. C., Callaghan, J., Roderick, G. K., Krehenwinkel, H., Rogers, H., Gillespie, R. G., & Economo, E. P. (2022). Richness and resilience in the Pacific: DNA metabarcoding enables parallelized evaluation of biogeographic patterns. *Molecular Ecology*, 00, 1–14. <https://doi.org/10.1111/mec.16575>
- Lambert, D. M., A. Baker, L. Huynen, O. Haddrath, P. D. N. Hebert, y C. D. Millar. «Is a Large-Scale DNA-Based Inventory of Ancient Life Possible?» *Journal of Heredity* 96, n.º 3 (1 de mayo de 2005): 279-84.
- Machado, Antonio. *Monografía de los carábidos de las Islas Canarias: Insecta, coleoptera*. LaLaguna: Instituto de Estudios Canarios, 1992.
- Machado, Antonio. «INTERPRETACIÓN ECOLÓGICA Y BIOGEOGRÁFICA DE LA DIVERSIDAD DE CARABIDAE EN LAS ISLAS CANARIAS (INSECTA: COLEOPTERA)», 1995, 25.
- Machado, A. (1998). Un nuevo Parazophium Jeannel anoftalmo de La Palma, islas Canarias (Coleoptera, Carabidae). *Vieraea*, 26 (1997), 163-167.
- Maddison, David R., y Munetoshi Maruyama. «Phylogenetic Relationships and Convergent Evolution of Ocean-Shore Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae: Trechinae: *Bembidion* and Relatives): Evolution of Ocean-Shore Ground Beetles». *Systematic Entomology* 44, n.º 1 (enero de 2019): 39-60.
- May, Robert M. «How Many Species Are There on Earth?» *Science* 241, n.º 4872 (16 de septiembre de 1988): 1441-49.
- McHugh, Joseph V., y James K. Liebherr. «Coleoptera». En *Encyclopedia of Insects*, 183-201. Elsevier, 2009.
- Moya O, Contreras-Díaz HG, Oromí P, Juan C. 2004. Genetic structure, phylogeography and demography of two ground-beetle species endemic to the Tenerife laurel forest (Canary Islands). *Molecular Ecology* 13: 3153- 3167.
- Muster, Christoph, Jörg Spelda, Björn Rulik, Jana Thormann, Laura von der Mark, y Jonas J. Astrin. «The Dark Side of Pseudoscorpion Diversity: The German Barcode of Life Campaign Reveals High Levels of Undocumented Diversity in European False Scorpions». *Ecology and Evolution* 11, n.º 20 (octubre de 2021): 13815-29.
- Oromí, P., Arechavaleta, M., De la Cruz, S., García R., Izquierdo, I., López, H., Macías-Hernández, N., Martín, J.L., Martín, S., Martínez, A., Medina, A.L., Naranjo, M., Pérez, A.J y Zurita, N. (2021) Diversidad faunística en el medio subterráneo volcánico, con especial énfasis en las Islas Canarias. *Boletín de la Sociedad Española de Espeleología y Ciencias del Karst: SEDECK*, (16), 25-50.
- Paquin, P., y M. Hedin. «The Power and Perils of ‘Molecular Taxonomy’: A Case Study of Eyeless and Endangered Cicurina (Araneae: Dictynidae) from Texas Caves: CICURINA CONSERVATION PHYLOGENETICS». *Molecular Ecology* 13, n.º 10 (27 de agosto de 2004): 3239-55.

- Pentinsaari, Mikko, Paul D. N. Hebert, y Marko Mutanen. «Barcoding Beetles: A Regional Survey of 1872 Species Reveals High Identification Success and Unusually Deep Interspecific Divergences». Editado por Diego Fontaneto. *PLoS ONE* 9, n.º 9 (25 de septiembre de 2014): e108651.
- Pörtner, Hans-Otto, Debra Cynthia Roberts, Melinda M. B. Tignor, Elvira S. Poloczanska, Katja Mintenbeck, Andrés Alegria, Marlies Craig, et al., eds. *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.*, 2022.
- Prendini, Lorenzo. «Comment on “Identifying Spiders through DNA Barcodes”». *Canadian Journal of Zoology* 83, n.º 3 (1 de marzo de 2005): 498-504..
- Ramirez, Jorge L., Jose L. Birindelli, Daniel C. Carvalho, Paulo R. A. M. Affonso, Paulo C. Venere, Hernán Ortega, Mauricio Carrillo-Avila, José A. Rodríguez-Pulido, y Pedro M. Galetti. «Revealing Hidden Diversity of the Underestimated Neotropical Ichthyofauna: DNA Barcoding in the Recently Described Genus Megaleporinus (Characiformes: Anostomidae)». *Frontiers in Genetics* 8 (12 de octubre de 2017): 149.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.
- Reier, Susanne, Helmut Sattmann, Thomas Schwaha, Hans-Peter Fuehrer, y Elisabeth Haring. «Unravelling the Hidden Biodiversity – the Establishment of DNA Barcodes of Fish-Parasitizing Acanthocephala Koehltreuter, 1771 in View of Taxonomic Misidentifications, Intraspecific Variability and Possible Cryptic Species». *Parasitology* 147, n.º 13 (noviembre de 2020): 1499-1508.
- Schindel, David E., y Scott E. Miller. «DNA Barcoding a Useful Tool for Taxonomists». *Nature* 435, n.º 7038 (mayo de 2005): 17-17.
- Turquin, M. J., 1973. Une biocoenose cavernicole originale pour le Bugey: le Puits de Rappe. C. R. 96 Congr. aut. Sc. sav., Toulouse 1971, 3: 235-256.
- Uscanga, A., López, H., Piñero, D., Emerson, B. C., & Mastretta-Yanes, A. (2021). Evaluating species origins within tropical sky-islands arthropod communities. *Journal of Biogeography*, 48(9), 2199-2210.
- Waugh, John. «DNA Barcoding in Animal Species: Progress, Potential and Pitfalls». *BioEssays* 29, n.º 2 (febrero de 2007): 188-97.
- Witt, Jonathan D. S., Doug L. Threlhoff, y Paul D. N. Hebert. «DNA Barcoding Reveals Extraordinary Cryptic Diversity in an Amphipod Genus: Implications for Desert Spring Conservation: DNA BARCODING OF AMPHIPODS». *Molecular Ecology* 15, n.º 10 (24 de julio de 2006): 3073-82.
- Yu, D., Ji, Y., Emerson, B., Wang, X., Ye, C., Yang, C., & Ding, Z. (2012). Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4), 613–623. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x>
- Zamani, Alireza, Zdenek Faltýnek Fric, Hugo F. Gante, Tapani Hopkins, Alexander B. Orfinger, Mark D. Scherz, Alena Sucháčková Bartoňová, y Davide Dal Pos. «DNA Barcodes on Their Own Are Not Enough to Describe a Species». *Systematic Entomology* 47, n.º 3 (2022): 385-89.