TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHETUMAL

Estandarización de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) para la identificación de quironómidos (Insecta: Chironomidae) en ambientes acuáticos epicontinentales de México

Tesis para obtener el grado de

Licenciatura en Biología

Presenta:

May Espinosa Sugeyly Cineret

Director: Dr. Sergio Cohuo Durán

Asesor externo: Dra. Laura Anahí Macario González

Revisores:

Dra. Carmen Amelia Villegas Sánchez

Dr. Pedro Mis Ávila

Chetumal, Quintana Roo

Mayo, 2025

Agradecimientos

A mis asesores, la Dra. Laura Macario y el Dr. Sergio Cohuo, quienes me instruyeron y guiaron en todo el proceso del desarrollo de la investigación; asimismo a la Dra. Carmen Villegas y el Dr. Pedro por sus observaciones y dedicación en la revisión de la tesis.

Al doctor Ramón que me brindó la oportunidad de trabajar junto a él en el tema desarrollado y compartió su conocimiento y experiencia conmigo.

Al M.C Plutarco Hernández por su dedicación y expertis en la identificación de Chironomidae.

Al Instituto Tecnológico de Chetumal por la enseñanza, el aprendizaje, valores y experiencia académica en el tiempo en que cursé la licenciatura en Biología.

Al Instituto Tecnológico de la Zona Maya por la oportunidad de desarrollar las actividades de laboratorio en sus instalaciones.

Al Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) unidad Chetumal por el apoyo en la extracción de ADN.

Dedicatoria

A Dios la mente maestra detrás de todo lo creado y a mi familia (Manases, Elizabeth, Zulemy y Jonatan).

Índice

1. Introducción 6

2. Antecedentes 9

3. Marco teórico 13

3.1. Taxonomía de Chironomidae 13

3.2. Principio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 13

3.3. Eficiencia de RFLP para identificar la diversidad de Chironomidae 14

4. Justificación 16

5. Objetivos 18

5.1. General 18

5.2. Específicos 18

5.3. Pregunta de investigación 18

6. Metodología 19

6.1. Área de estudio 19

6.1.1. Sitios de muestreo 20

6.2. Colecta de muestras 22

6.3. Extracción de ADN 23

6.4. Cuantificación de ADN 24

6.5. Reacción de PCR y visualización de productos de amplificación 24

6.6. Selección de la enzima de restricción 25

6.7. Digestión enzimática de los productos de amplificación 25

7. Resultados 26

7.1. Colecta de muestras e identificación morfológica 26

7.2. Extracción y cuantificación de ADN 27

7.3. PCR de gen COI y amplificación. 30

7.4. Análisis in sillico de enzimas de restricción 34

7.5. Digestión con la enzima 44

8. Discusión 52

9. CONCLUSIONES 56

10. FUENTES DE INFORMACIÓN 58

11. Anexos 68

1. Introducción

Uno los grandes problemas en México es la disponibilidad de agua en calidad y cantidad para asegurar el desarrollo social y el funcionamiento de los ecosistemas (Esparza, 2014). Actualmente, los ambientes acuáticos superficiales y subterráneos en el país son los más vulnerables a las actividades antropogénicas (Semarnat, 2015). Los ambientes acuáticos son, por lo tanto, constantemente monitoreados para detectar aporte de nutrientes, contaminantes como medicamentos, metales pesados y compuestos del sector productivo (Comisión Nacional del Agua, 2024). Los métodos de monitoreo de calidad de agua están basados en la medición de parámetros químicos y físicos, que requieren de métodos y equipos especializados, usualmente en condiciones controladas en laboratorios, lo que conlleva costos elevados (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible, 2015). Lo anterior hace que el monitoreo ambiental en cuerpos de agua sea altamente selectivo. En muchos sistemas acuáticos del país, se desconoce el estado actual de estos ecosistemas, así como los posibles efectos antropogénicos a corto y largo plazo.

La indicación biológica (bioindicación) relaciona la respuesta ecológica de especies con parámetros ambientales (González et al., 2014). Cambios en la estructura biológica en un sistema pueden indicar cambios físicos y químicos en el ambiente, incluso antes de ser detectados a nivel químico (Michailova et al., 2012; Chowdhury et al., 2023). La bioindicación es una estrategia usada ampliamente en países desarrollados para monitorear condiciones ambientales en cuerpos de agua, sin embargo, una de las limitantes para su aplicación en México, es el desconocimiento de las especies que habitan en los cuerpos de agua. Lo anterior debido a la alta diversidad biológica, atributos ecológicos especie- específicos y su relación con el ambiente (Serrano-Balderas et al., 2016) .

Una de las estrategias comúnmente utilizadas para desarrollar bioindicación en las regiones tropicales, es acelerar la identificación de especies a través de técnicas moleculares como el BARCODING: Código de barras de la vida. La mayoría de estas técnicas, sin embargo, requieren entre 20-50 días para obtener una identificación precisa de los organismos, y regularmente los costos son elevados cuando se realiza un monitoreo regional. La técnica de Fragmentos de Restricción Polimórfica (RFLP), consiste en utilizar un marcador molecular por medio del cual se pueden identificar los polimorfismos presentes en las especies a causa de mutaciones (Pérez & Picó, 2014). Se ha utilizado con éxito para identificar rápidamente, así como para resolver ambigüedades taxonómicas en Chironomidae (Carew et al., 2003). Además, requiere de pocos insumos, y se obtienen resultados en el rango de 2-5 horas (Carew et al., 2003). El costo para realizar secuenciación de ADN mandando los productos a un laboratorio son de 112 MXN por muestra (Eurofins Genomics, s. f.), mientras que, en nuestra investigación, empleando RFLP el costo fue de 63 MXN por muestra.

Esta técnica está basada en la colecta de organismos, extracción de ADN y generación de fragmentos de ADN, generalmente relacionados con el gen COI, para obtener patrones de bandeo que son específicos a nivel género o especie.

En México, son pocos los taxa que pueden tener presencia en lagos ubicados a través de gradientes ambientales con alta diversidad, abundancia y sensibilidad a los cambios ambientales. Dentro de estos está el taxa, Chironomidae, que son mosquitos no picadores, que en su estado larval se desarrollan en cuerpos de agua y que se reconocen como bioindicadores de contaminación, estado trófico y cambios químicos del agua (Pérez et al., 2013). El conocimiento actual de Chironomidae en México no es homogéneo, siendo el norte del país un área de escaso registro de especies, y alrededor de 41 géneros sin especies identificadas (Bello-González et. al., 2024). Por su parte, en

la zona sur, en la Península de Yucatán según Bello-González, hay por lo menos 36 especies registradas; en la península de Yucatán se han realizado más estudios para identificar Chironomidae, (Vinogradova & Wolfgang Riss, 2024) reportaron 48 géneros para Yucatán.

La región del ADNmt del gen Citocromo C Oxidasa I (COI), debido a su amplia variabilidad interespecífica, y a la disponibilidad de base de datos de secuencias, como el proyecto Código de Barras de la Vida (BOLD Systems), con las que se pueden comparar las secuencias, ha sido empleada exitosamente en la identificación de especies cripticas (Capaldi, 1990; Shoubridge, 2001; Paz et al., 2011).

En el presente estudio se identificaron taxonómicamente por medio de morfología clásica las especies de la familia Chironomidae en dos regiones de México: región hidrológica prioritaria Sierra la Laguna y oasis aledaños y la región sur de la Península de Yucatán; y se determinaron los patrones de Restricción Polimórfica (RFLP) para taxones seleccionados. Con el fin de realizar la identificación de especies bioindicadoras de manera rápida y económica para emplearse en estudios de calidad de agua.

2. Antecedentes

La Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO) en la obra "Aguas Continentales y Diversidad Biológica de México" (Arriaga y Alcocer, 2002), clasifica regiones hidrológicas prioritarias en el país y establece las directrices para su conservación y buen uso. Este documento indica que existe poca información sobre la mayoría de las regiones hidrológicas, su estado de conservación, el efecto de las actividades antropogénicas y las amenazas económicas a nivel regional en caso de alteraciones hidrológicas, estado trófico y de contaminación.

Para conocer el estado de los ambientes acuáticos se realizan monitoreos continuos, un método con gran éxito es el uso de especies bioindicadoras, las cuales reúnen características como es un tiempo corto de vida y de reproducción, sensibilidad a los cambios ambientales y dispersión (González et al., 2014). Las larvas de la familia Chironomidae han sido empleadas exitosamente, para esto se necesita identificarlas; en México, el método de identificación más usado es el que involucra caracteres morfológicos, lo que presenta problemas ya que está sujeto al juicio del taxónomo y se puede identificar erróneamente los géneros, ya que las larvas no tienen todos sus caracteres desarrollados (Karima, 2021).

En cuanto a las técnicas moleculares, Carew et al., 2003 identificaron Chironomidae en Melbourne, Australia utilizando la técnica PCR-RFLP con las secuencias del gen COI. El uso de comparación de perfiles basados en las enzimas de restricción SspI, HinfI, RsaI y Taq1 tuvieron más éxito que la identificación de todos los taxa determinados morfológicamente; asimismo se construyó una clave diagnóstica usando estas enzimas, y todas las especies fueron asignadas correctamente. La identificación de las especies de Chironomidae fue posible ya que las endonucleasas de restricción presentaron niveles bajos de variaciones intraespecíficas; por otra

parte, se encontraron variaciones significativas entre algunos géneros, entre los cuáles *Cladopelma* y *Procladius* presentan especies crípticas compartiendo unas pocas endonucleasas de restricción.

En el año 2018 se publicaron dos guías correspondientes a la identificación de larvas de Chironomidae; Prat et al., 2018 se enfocaron en las larvas de los ríos altoandinos de Ecuador y Perú, con el objetivo de identificar los morfotipos utilizando caracteres macroscópicos (con aumento de 100x) hasta subfamilia o géneros. De manera simultánea (Hamerlik et al., 2018) publicaron una clave descriptiva e ilustrada en el mismo año para identificar Chironomidae de arroyos ecuatorianos de gran altitud alimentados por glaciares y no alimentados por glaciares, se encontraron las subfamilias Chironominae, Diamesinae, Podonominae, Orthocladiinae y Tanypodinae (en total 23 especies).

En el estado de Baja California Sur se han identificado pocos taxa de Chironomidae, en 1974 Cheng & Hogue realizaron un estudio en la costa Sur de Baja California Sur; en la Isla San José y algunas lagunas (entre estas coincidimos en San José del Cabo y Todos Santos), utilizaron redes de barrido colocadas en arena en playas y lodo cercanas a raíces aéreas de manglares; los resultados fueron organismos del género *Smittia* encontrados en muestras de lodo; adicional a sus estudios identificaron a *Thalassomya bureni*, una especie marina que fue obtenida en la Bahía Balandra.

En México la identificación de larvas de Chironomidae se ha realizado principalmente con caracteres morfológicos (Navarrete-Salgado et al., 2004; Moreno et al., 2020; Prat & Castro-López, 2023).

México presenta una gran diversidad de organismos de la familia Chironomidae; como ejemplo en el Lago de Alchichica se encuentra *Chironomus alchichica*, la cuál es una especie endémica (Acosta et al., 2019) que fue descrita por (Acosta et al., 2017) utilizando análisis morfológicos, citológicos y moleculares; esta última mediante el código de barras del gen COI. El análisis

molecular pudo diferenciar las características morfológicas encontradas. En la identificación molecular *C. alchichica* se agrupa junto con su especie hermana *C. decorus* (Variación intraespecífica = 92%). Ambas especies son del grupo hermano de *C. bifurcatus* (93%), y esta línea evolutiva es del grupo hermano de *C. maturus.* Las distancias genéticas dentro de *C. alchichica* sp. n. (0,004) fueron inferiores a las distancias P entre otras especies del grupo *decorus* (incluidos *C. maturus* y *C. bifurcatus*), lo que demuestra que se trata de una especie diferente. El uso de técnicas moleculares es importante para correlacionar los resultados con la identificación morfológica, la estandarización de la técnica RFLP permitirá una identificación más rápida.

Estudios puntuales señalan la alta diversidad del grupo y la relevancia de estudiarlos como bioindicadores, Prat & Castro-López, 2023 realizaron un estudio en el río Pesquería en Monterrey, usando las claves de identificación de Prat et al. (2012), Rossaro et al., (2022) y Epler (2001); en total identificaron 35 taxa. Se encontró que la distribución está determinada por la contaminación química, lo que permitió identificar tres zonas: la zona superior, dominada por taxa tolerantes; la zona media, influenciada por el aporte de aguas residuales, donde también predominan taxa tolerantes a la contaminación; y la zona inferior, asociada a áreas agrícolas.

La Universidad Autónoma del Estado de Morelos en 2024 publicó una lista revisada de Chironomidae presentes en México, en el artículo de Bello-González et. al.; se basaron en Andersen et al. (2000) y en la información publicada en artículos científicos, libros y capítulos de libros de especies registradas posteriormente. De acuerdo con los resultados, en México existe un total de 110 especies de Chironomidae conocidas y 41 géneros sin especies identificadas; esto indica, sin embargo, que el conocimiento de la biodiversidad en el país no es homogéneo y existen regiones en donde se desconocen los grupos de Chironomidae. Los estados de la región central y

norte de México presentan poca o nula identificación, y aunque en el sureste del país existe literatura de especies, en algunas zonas, son totalmente desconocidos.

Entre las investigaciones referentes a la identificación de Chironomidae morfológicamente en la península de Yucatán se encuentra la guía ilustrada de Chironomidae subfósil de cuerpos de agua de Central América y la Península de Yucatán realizada por Hamerlík et al., 2022. El estudio se llevó a cabo en México (Península de Yucatán), Belice, Guatemala, El Salvador y Honduras. La identificación se llevó a cabo fijando las cápsulas cefálicas obtenidas para ser observadas en un microscopio compuesto de hasta 400 x aumentos empleando claves. En total se encontraron 101 morfotipos pertenecientes a 64 géneros de las subfamilias Chironominae, Orthocladiinae, Tanypodinae y Podonominae.

En cuanto a la identificación de Chironomidae de la Península de Yucatán con técnicas moleculares Valdez-Moreno et al., 2021 emplearon el código de barras para identificar zooplancton en la Reserva de la Biósfera de Sian Ka´an, empleando primers ZPlank para la PCR; se registraron un total de 44 BINs para Chironomidae, estos no han sido identificados taxonómicamente, pero se encuentran en la biblioteca de ECOSUR para estudios futuros.

3. Marco teórico

3.1. Taxonomía de Chironomidae

Chironomidae es una familia que pertenece al orden Díptera de la clase Insecta; las subfamilias que pertenecen a Chironomidae de acuerdo a Karima (2021) son: Telmatogetoninae, Podonominae, Tanypodinae, Buchonomyiinae, Diamesinae, Prodiamesinae, Orthocladiinae, Chironominae, Chilenomyiinae, Aphroteniinae y Usambaromyinae. Su alimentación está basada principalmente en presas pequeñas de animales, plantas y detritos (aunque se han reportado algunas especies carnívoras y parásitas) (Oliver, 1971). Son presa de diferentes organismos, entre ellos crustáceos, odonatos (como el caballito de diablo *Ischnura verticalis*), coleópteros hemípteros, peces (por ejemplo, *Culaea inconstants*, *Lepomis macrochirus* y *Cottus cognatus*), anélidos (como *Chaetogaster diaphanus*) megaloptera (*Sialis foliginosa*); asimismo, los adultos son presa de aves (por ejemplo *Hirundo rustica*, *Apus apus*, *Delichon urbica* y *Riparia riparia*) (Armitage et al., 1995 y Sotelo-Casas et al., 2014). Las larvas de Chironomidae tienen gran aporte nutricional en proteínas, aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y ácidos grasos (Shahidi & Vatandoost, 2021).

3.2. Principio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La composición nucleotídica del ADN ha sido ampliamente estudiada mediante técnicas moleculares. Una de sus aplicaciones es la diferenciación de especies a través del análisis de genes. En animales, el gen **COI** es ampliamente utilizado, ya que se ha reportado que mantiene una baja variabilidad genética en períodos evolutivos cortos, pero presenta una notable variabilidad interespecífica. (Daza, 2018).

La técnica molecular PCR permite generar copias de la región de interés del ADN mediante diferentes temperaturas en un termociclador, para llevarlo a cabo utiliza el molde de ADN; un par

de primers; Taq polimerasa; dNTPs (nucleótido de trifosfato de desoxirribosa): adenina, timina, guanina y uracilo; cofactores y H_2O (Tamay de Dios et al., 2013).

La reacción empieza con la desnaturalización, a una temperatura de 95°C, donde la doble cadena de ADN se separa; el siguiente paso es la hibridación a temperatura entre 50 - 60°C, los primers se unen a los extremos de las cadenas simples de ADN en un sitio específico y seguidamente la enzima Taq polimerasa también se une (esto ocurre en sentido 5´-3´); el tercer paso es la extensión, donde la Taq polimerasa une los dNTPs a los nucleótidos complementarios sintetizando de esta manera una nueva cadena de ADN (Mullis, 1990; Pinilla et al., 2008; Singh et al., 2012; Tamay de Dios et al., 2013). Estos tres pasos mencionados se repiten de 30 – 35 ciclos y, por último, la temperatura baja a 4°C, este paso se conoce como extensión (Singh et al., 2012).

3.3. Eficiencia de RFLP para identificar la diversidad de Chironomidae

RFLP es una técnica molecular conformada por las enzimas de restricción, los cebadores, el gel en agarosa y el procedimiento que requiere su ejecución (compuesto por la extracción de ADN, PCR, digestión con la enzima de restricción, electroforesis en gel de agarosa y visualización de los patrones con rayos UV) (Amiteye, 2021). Se basa en el conjunto de Polimorfismos de Nucleótido Simple que pueda presentar el locus a estudiar, esto se refiere a las variaciones que se presentan entre los fragmentos de ADN de los individuos (Amiteye, 2021). Dadas las diferencias de las especies el resultado es el corte en la doble cadena de ADN, con diferentes tamaños de los segmentos, por la especificidad de las enzimas de restricción en los sitios reconocidos (Mittal et al., 2013; Pérez & Picó, 2014).

Las enzimas de restricción son un complejo proteico que actúan como defensa en las bacterias contra los virus bacteriófagos; reconocen sitios específicos para unirse al ADN del hospedero y

seguidamente crear cortes (con extremos cohesivos o romos) (M. Green & Sambrook, 2021; Maurya, 2019).

Existen cuatro tipos principales de enzimas de restricción (I, II y II). Las enzimas de restricción de tipo I están compuestas por tres subunidades (endonucleasa, metiltransferasa y reconocimiento) poseen un sitio específico de reconocimiento pero la escisión es inespecífica; requieren de los cofactores ATP, Mg y S-adenosilmetionina; al término de la escisión la enzima de restricción se convierte en ATP; no se pueden detectar fragmentos en el gel de electroforesis (Green y Sambrook, 2021; Roberts y Murray, 1976). Las enzimas de restricción de tipo II cuentan con un sitio y escisión específico, son empleadas ampliamente en estudios moleculares, los sitios de corte son palíndromos, cuenta con dos subunidades: de corte y reconocimiento, los sitios activos varían dependiendo de la enzima (Green y Sambrook, 2021). Por último, las enzimas de restricción de tipo III cuentan con dos subunidades: endonucleasa y reconocimiento, no son específicas (con un corte de entre 25- 28 nucleótidos), la reacción es impulsada por la metilación de ADN (Green y Sambrook, 2021).

Para los fines que competen a este estudio se recurrió al uso de una enzima de restricción tipo II.

4. Justificación

Los cambios en la estructura biológica y los ensambles de Chironomidae (bioindicación) constituyen una alternativa viable al monitoreo físico y químico de cuerpos de agua, para la detección de alteraciones ambientales de origen natural y antropogénico. Una de las grandes limitaciones de la bioindicación es la falta de taxas que puedan realmente indicar cambios en los ambientes acuáticos y la necesidad de establecer identificaciones de especies con precisión, que permitan sin incertidumbre, relacionar especies con el ambiente.

Se propone el uso de Chironomidae de dos regiones hidrológicas prioritarias de México, que abastecen de agua a las poblaciones cercanas, en el área de Sierra la Laguna se desempeña la ganadería extensiva, agricultura extensiva e intensiva, turismo y plantación de palmares, que si bien, son de beneficio económico a la población, el mal desarrollo de estas actividades ha causado problemas como la contaminación del agua (por el turismo, desechos humanos, de animales de granja y constructoras), sobreexplotación del agua, ganadería extensiva y deforestación, por lo que la implementación de procedimientos de manejo de los recursos naturales son indispensables para el desarrollo sustentable de esta zona.

Se realizará por primera vez en México, la estandarización de un protocolo de identificación a nivel género o especie de Chironomidae, usando fragmentos de restricción de longitud polimórfica, caracterizado por su bajo costo y de aplicación rápida (no mayor a 3 h).

La integración de este método con las premisas de la bioindicación permitirá generar panoramas de la condición ambiental en un sistema o región hidrológica determinada. Uno de los impactos relevantes adicionales de este proyecto es que, al estandarizarse el protocolo a un grupo de insectos, caracterizados por ser variable genéticamente, sería posible escalar el proceso y estandarizar el método hacia otros grupos taxonómicos de las regiones en estudio. Una posible

aplicación podría estar dirigida hacia organismos terrestres y de esta manera abordar temas complejos en la detección de especies invasivas y patógenas, tráfico de especies, entre otros. Este proyecto tendrá impacto a nivel académico puesto que es un método aplicable en investigaciones científicas en donde es necesaria la identificación de especies. Impactará también a nivel de gobierno porque se aportan herramientas para la vigilancia ambiental y la detección rápida de alteraciones ambientales en sistemas acuáticos. A nivel social, el proyecto permitirá mejorar el monitoreo de cuerpos de agua en zonas rurales y comunidades donde el acceso a metodologías especializadas es limitado y con esto, asegurar aguas de calidad para el uso humano.

Este proyecto incide en problemas prioritarios de México como lo es el derecho al agua y saneamiento.

5. Objetivos

5.1. General

- Estandarizar la técnica de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) utilizando el gen COI para la determinación de taxas de Chironomidae en las regiones hidrológicas prioritarias de México: Sierra La Laguna y oasis aledaños y sureste de la Península de Yucatán.

5.2. Específicos

- Optimizar y adaptar procedimientos para la selección y generación de RFLP en especies de Chironomidae.
- Determinar los patrones de polimorfismos presentes en morfotipos de Chironomidae para la identificación de especies.
- Comparar la identificación por RFLP con la identificación morfológica de Chironomidae.

5.3. Pregunta de investigación

- ¿La técnica de Fragmentos de Restricción Polimórficos (empleando COI) en especies de Chironomidae generará patrones de polimorfismos específicos para la identificación de especies en ambas regiones?
- ¿Existe concordancia entre la identificación molecular de Chironomidae mediante RFLP y la identificación basada en características morfológicas?

6. Metodología

6.1. Área de estudio

El área de estudio comprendió dos regiones de México caracterizadas por condiciones altamente contrastantes, con la finalidad de tener la máxima diferenciación genética entre individuos, Sierra la Laguna en Baja California Sur y el sur de la Península de Yucatán.

La región hidrológica Sierra La Laguna y oasis aledaños tienen una extensión de 5,398.63 Km^2, presentan un clima templado subhúmedo con lluvias en verano e invierno, semiseco semicálido, seco semicálido, muy seco muy cálido y seco muy cálido (Arriaga et al., 2000). Los suelos son de tipo Regosol, Litosol, Cambisol y Fluvisol; también presenta un manto subterráneo (Santiago), zonas de meseta, arroyos y oasis formados por un manantial (San Bartolo) (Arriaga et al., 2000). La región de estudio cuenta con la mayor diversidad biológica del estado de Baja California Sur.

Dentro de esta región hidrológica se localiza La Reserva de la Biósfera Sierra La Laguna (Figura 1); formada por una cadena montañosa a lo largo del área, presenta bosques de encino-pino y selva baja caducifolia, alberga una amplia diversidad biológica con un alto grado de endemismos (Ortega et al., 2015), así como especies representativas de la biodiversidad nacional de acuerdo al artículo 48 de la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, 1988). En 2004 recibió designación por parte de la UNESCO en el Programa MAB (El Hombre y la Biósfera) (Romero & Ortega-Rubio, 2012).

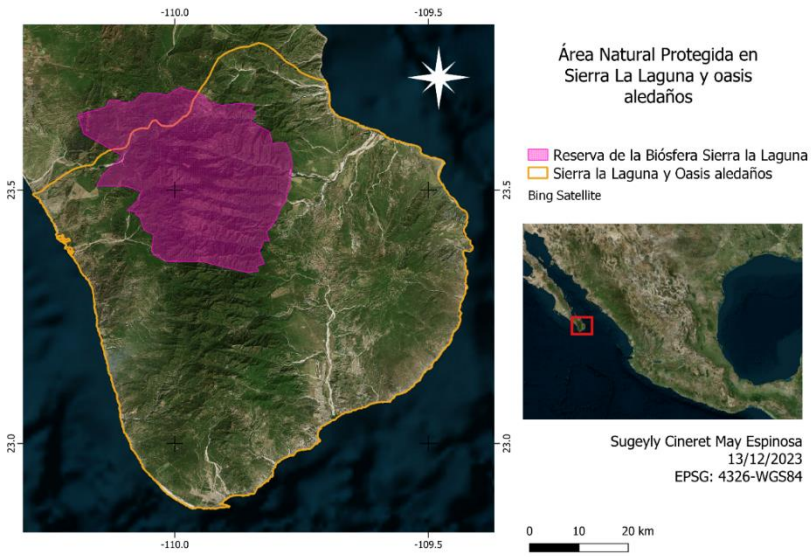


Figura 1. Mapa de la Reserva de la Biósfera Sierra La Laguna dentro de la región hidrológica Sierra La Laguna y oasis aledaños.

La Península de Yucatán tiene una extensión de 181 000 km^2 y el sur de esta región es una región hidrológica definida por la presencia de aguas oligo-mesotróficas, con altos contenidos de carbonatos y sulfatos (Schmitter-Soto et al., 2002). Se caracteriza por la presencia de aguas en lagos menores a 10hc, excepto por la laguna de Bacalar que es el segundo lago más grande de México en relación con su longitud. En esta región se ubica el sistema Bacalar-Bahía de Chetumal, donde existen al menos 8 lagunas interconectadas con flujo norte a sur y que desembocan en el río Hondo y la Bahía de Chetumal (Mar Caribe) (Cervantes-Martínez et al., 2009). El clima en esta región es cálido tropical todo el año, con lluvias en el periodo junio-octubre. El periodo de sequía ocurre entre los meses de febrero y mayo (Bautista et al., 2003; Pérez et al., 2010).

6.1.1. Sitios de muestreo

En BCS la colecta comprendió 18 cuerpos de agua que se enlistan a continuación (Figura 2):

- San Blas-Divisaderos
- Poza de Todos Santos
- San Pedrito de las Palmas
- Estero San José del Cabo
- Arroyo boca de la sierra (altura Miraflores)
- Laguna de Santiago

- Ojo de agua San Bartolo
- El “aguaje”
- Primer valle en zona núcleo de la Reserva
- Segundo valle- La cascada
- Arroyo en la comunidad Boca de la Sierra
- Aguas termales “El Chorro”
- Aguas termales “Santa Rita”
- Cañón de la Zorra-Sol de mayo
- La Buena Mujer
- Santa Inés
- San Lázaro
- La Palma

En la Península de Yucatán la colecta se realizó previamente en 2021, las cápsulas cefálicas de los organismos se encontraban suspendidas en alcohol etílico al 96%. Los sitios de muestreo comprendieron 10 cuerpos de agua y se enlistan a continuación (Figura 2):

- Bacalar
- Miguel Hidalgo
- Noh-Bec
- Chacchoben
- Buenavista
- Xul-Ha
- Milagros
- Estero de Chac
- La Sabana de Chetumal
- Laguna Encantada

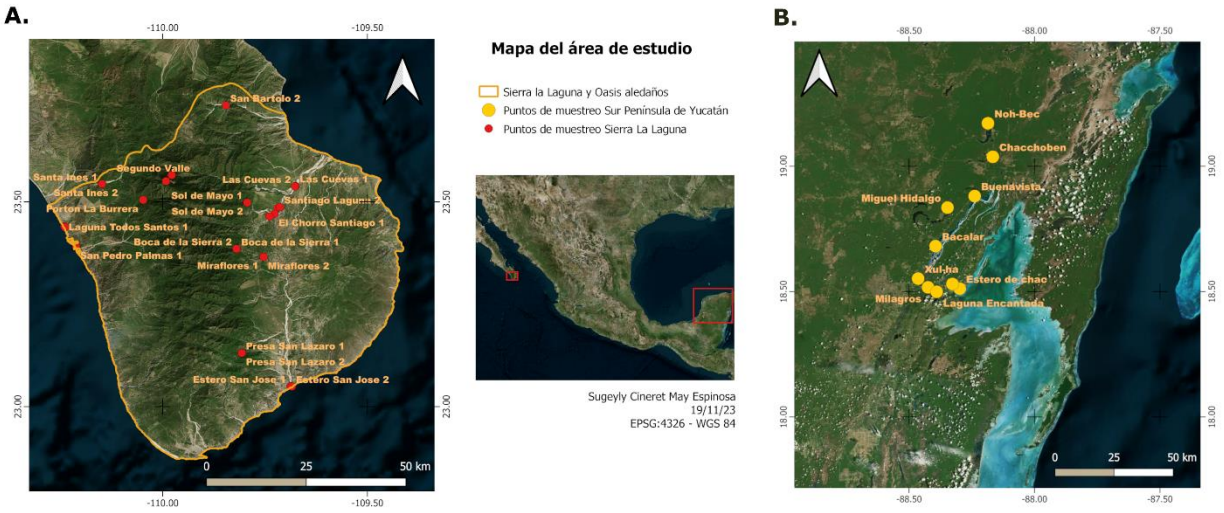


Figura 2. Mapa del área de estudio. A. Región hidrológica prioritaria Sierra La Laguna y oasis aledaños; B. Sur de la Península de Yucatán. Se señalan los puntos de muestreo.

6.2. Colecta de muestras

La colecta de las muestras de plancton se realizó utilizando una red de arrastre cilindro-cónica de 150 µm de luz de malla por un periodo de 10 minutos; las muestras se fijaron con etanol al 96% con un recambio a las 24 horas.

Los organismos pertenecientes a Chironomidae se separaron de las muestras del resto de plancton recolectado. La identificación morfológica se realizó utilizando un microscopio estereoscopio y óptico, y las claves de identificación de Epler (2001), Hamerlik et al. (2018), Madden (2010), Prat et al. (2018), Ruiz Moreno et al. (2000) y (Hernández, 2021). La región cefálica de cada organismo se aclaró con Hidróxido de Potasio al 10 % y se fijó con líquido de Hoyer, se mantuvieron como material de referencia (Carew et al., 2003 & Torrejon & Rodríguez, 2022).

6.3. Extracción de ADN

La extracción del ADN de Chironomidae del sur de la Península de Yucatán la realizó ECOSUR Unidad Chetumal con el método Hot-Shot (Truett et al., 2000).

Para tener un control positivo en la extracción se empleó el kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen) en organismos pertenecientes a la Sabana y Laguna Guadalupe. Seguidamente se realizó la extracción de los organismos de Sierra la Laguna y Oasis aledaños usando el kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

La extracción se llevó a cabo utilizando la parte posterior de cada organismo. Se agregaron 180 µl de amortiguador de buffer de lisis ATL y 20 µl de proteinasa K, se maceró al organismo y se mezclaron por vórtex. Las muestras se incubaron a 56°C durante 2 horas. Posteriormente se agregaron 200 µl de amortiguador AL y se agitó en vórtex. Se incubaron nuevamente las muestras a 56 °C durante 10 min. Se agregaron 200 µl de etanol absoluto frío y se agitó en vórtex. En un tubo nuevo se colocó una columna con filtro DNeasy y se adicionó la muestra colocándola en el centro del filtro. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Se desechó el sobrenadante y se pasó la columna a un tubo nuevo, agregándole 500 µl de amortiguador AW1, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, se desechó el sobrenadante y se conservó la columna. Se realizó el procedimiento anterior adicionando 500 µl de amortiguador AW2. Se centrifugó por 3 min a 14 000 rpm, se desechó el filtrado y finalmente se pasó la columna a otro tubo nuevo para adicionar 40 µl de buffer de elución AE. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente para permitir que el ADN se desprendiera de la columna y pudiera ser eluído en la siguiente centrifugación que se realizó a 9000 rpm durante 1 min. Las muestras fueron refrigeradas a 4 °C hasta su uso.

6.4. Cuantificación de ADN

Se analizó la cantidad y pureza del ADN por medio de espectrofotometría en un eppendorf BioSpectrometer de kinetic®. Los valores reportados como óptimos en la pureza del ADN son entre 1.7 – 1.9 (Green y Sambrook, 2012).

6.5. Reacción de PCR y visualización de productos de amplificación

La amplificación se llevó a cabo para obtener buena concentración de ADN, y utilizar para el análisis el gen citocromo C oxidasa. Se utilizaron los cebadores *ZplankF1_t1*: 5' - tgtaaaacgacggccagtTCTASWAATCATAARGAARAATCA-3´ (Reverse) publicados por (Prosser et al., 2013) que amplifican el gen mitocondrial citocromo C oxidasa (COI) y el siguiente esquema de termociclado: 1 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 40 seg a 95°C, 40 seg a 38°C y 40 seg a 72°C; por último 2 min a 72°C. Se utilizó un termociclador TC 1000-G (DLAB, China). La mezcla de reacción contenía: 10 µL Mix My Taq (Meridian Bioscience, China), 5 µL de agua ultrapura, 1 µL de cada cebador y para un volumen total de 20 µL. Se utilizó 3 µL de templado de ADN.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, empleando 30 ml de TAE al 1X y 0.45 gr de agarosa. La electroforesis se realizó a 90 Volts durante 35 minutos. El tamaño de las bandas se verificó corriendo en paralelo un marcador de tamaño molecular en escalera de 1000 pb (Thermo Scientific, USA) y visualizados con luz UV previa tinción con bromuro de etidio (5 µg/ml).

6.6. Selección de la enzima de restricción

La selección de las enzimas de restricción para llevar a cabo la técnica de RFLP, se realizó consultando diferentes literaturas (Carew et al., 2003, 2007; Medlock et al., 2018; Proulx et al., 2013; Sharley et al., 2004). Se seleccionaron 4 enzimas y mediante un análisis bioinformático con ayuda del software SnapGene, usando como base las secuencias del Gen COI disponibles en la plataforma Bold systems se realizaron pruebas *in sillico* en geles de agarosa y se identificaron y escogieron aquellas que generaron perfiles diferentes por cada clúster formado en el árbol de identificación molecular. Cada patrón genero cortes, creando fragmentos con diferente peso molecular visibles en las imágenes de gel in silico y en la tabla creada a partir de estos. Los patrones de los diferentes morfotipos se compararon y se indicaron los que resultaron iguales o muy parecidos, no se tomaron en cuenta los fragmentos menores a 55 pb ya que resulta difícil diferenciarlos.

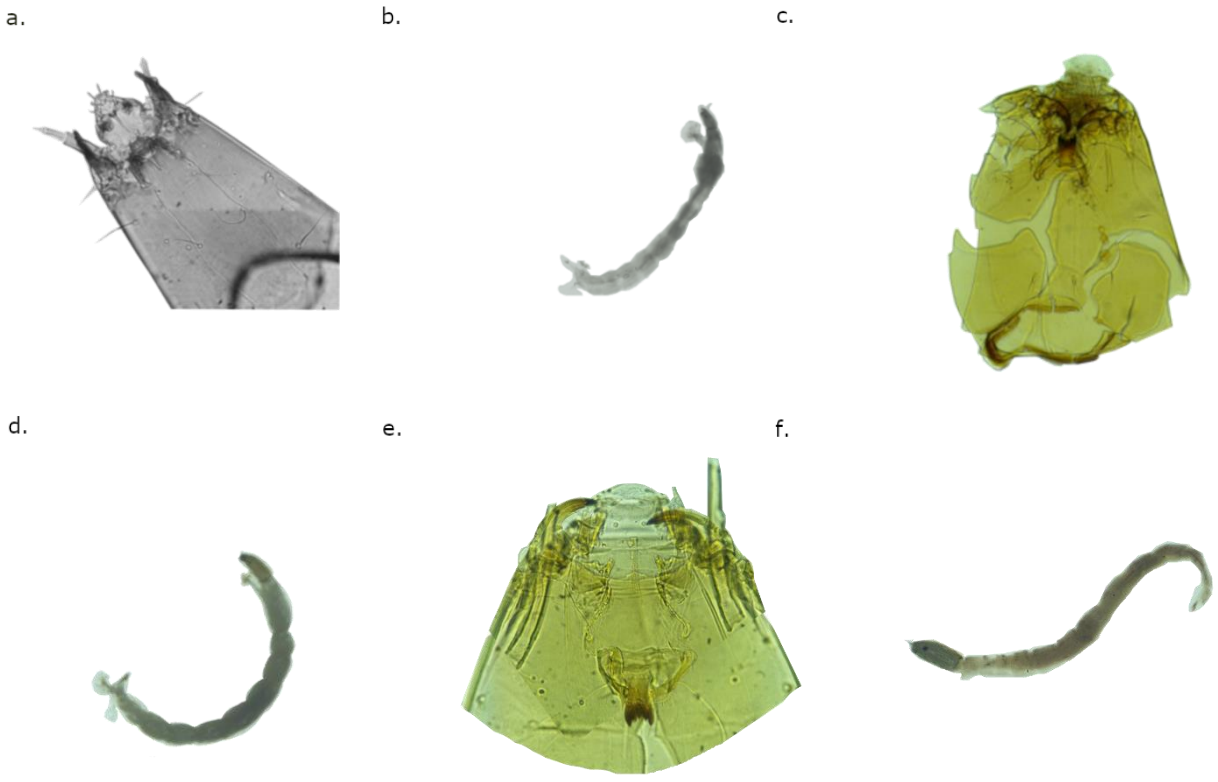
6.7. Digestión enzimática de los productos de amplificación

Los productos de PCR obtenidos con los cebadores *ZplankF1_t1 y ZplankB1_t1* fueron digeridos con la enzima de restricción *Alu I* (10U/µL) (Thermo Scientific, USA) a 37°C durante 15 minutos y los patrones obtenidos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 3%, utilizando 30 ml de solución de TAE 1x y 0.9 gr de agarosa. Para la confirmación de los tamaños de los productos de la digestión los patrones fueron comparados con un marcador de tamaño molecular de 100 pb (BIOLINE, UK) y visualizados con luz UV previa tinción con Prime Juice (1 µg/ml). Los resultados fueron registrados en formato de fotos digitales y analizados con el software Image Lab (BIO-RAD, USA).

7. Resultados

7.1. Colecta de muestras e identificación morfológica

Se identificaron un total de 23 morfoespecies (9 de Sierra La Laguna y Oasis aledaños y 14 del sur de la Península de Yucatán), pertenecientes a 18 géneros. En Sierra la Laguna y Oasis aledaños se encontraron los géneros *Onconeura, Rheopelopia, Ablabesmyia, Goeldichironomus, Kiefferulus, Dicrotendipes, Procladius, Monopelopia, Chironomus* (Figura 3)*;* en el sur de la Península de Yucatán se encontraron los géneros *Apedilum, Labrundinia, Parachironomus, Polypedilum, Chironomus, Dicrotendipes, Larsia, Coelotanypus, Corynoneura, Monopelopia, Tanytarsus* y *Nilotanypus.*



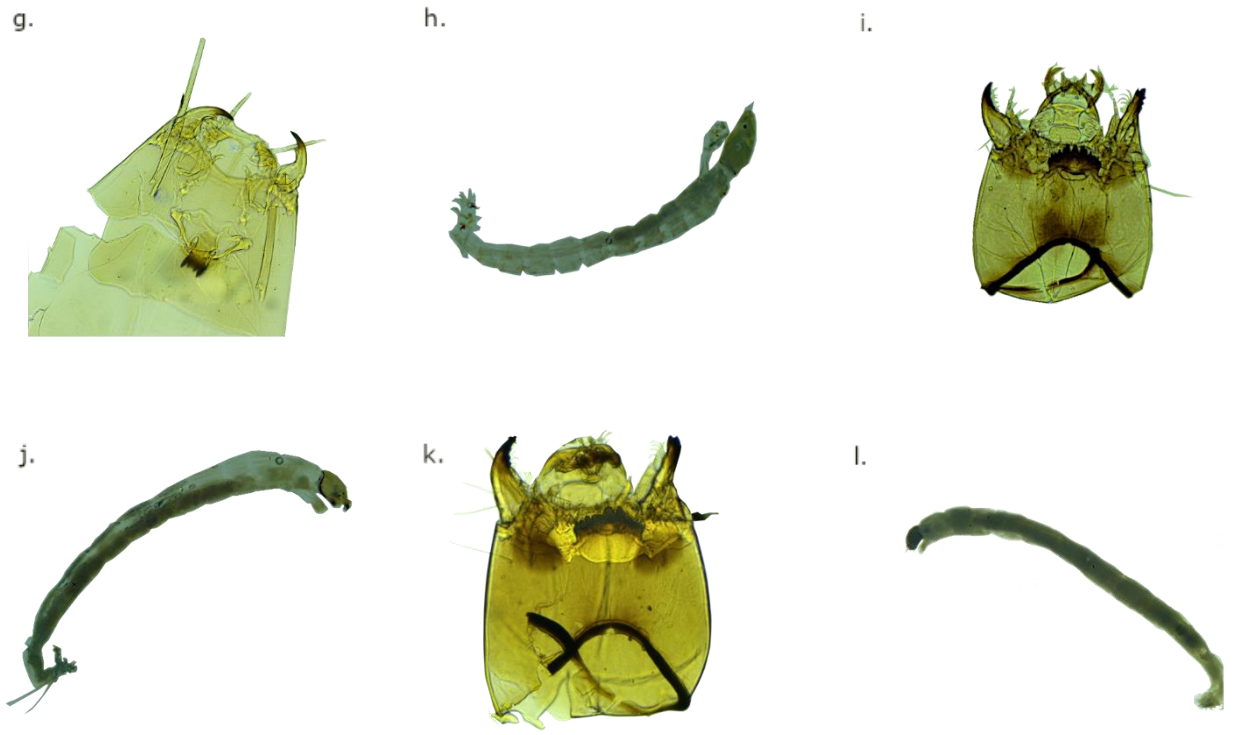


Figura 3. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae identificadas en Sierra la Laguna y Oasis aledaños. **a.** Cápsula cefálica de *Oncononeura sp.* **b**. Organismo completo de *Onconeura sp.* **c.** Cápsula cefálica de *Rheopelopia sp.* **d.** Organismo completo de *Rheopelopia sp* **e**. Cápsula cefálica de *Monopelopia sp. 2*. **f.** Organismo completo de *Monopelopia sp. 2*. **g.** Cápsula cefálica de *Ablabesmyia sp* **h.** Organismo completo de *Ablabesmyia sp*. **i.** Cápsula cefálica de *Goeldichironomus sp.* **j.** Organismo completo de *Goeldichironomus sp.* **k.** Cápsula cefálica de *Kiefferulus sp.* **l.** Organismo completo de *Kiefferulus sp.*

7.2. Extracción y cuantificación de ADN

Las concentraciones de ADN fueron desde 1.8 a 14 µg/µL y 5 de 8 muestras obtuvieron absorbancias óptimas (tabla 2). La extracción de ADN con el kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen), para los organismos de Sierra la Laguna y oasis aledaños y el sur de PY (Sabana y Laguna de Guadalupe), se realizó exitosamente en el 52% de las muestras (Figuras 4, 5 y 6).

Se emplearon un total de 9 morfoespecies. *Chironomus sp. 2* y *Procladius sp.* pertenecientes a Sierra la Laguna y Oasis aledaños se visualizaron en el gel de agarosa por electroforesis (Figura 4 y 6).

Tabla 1. Relación de la concentración de ADN extraído y absorbancias (A2607A280 y A260/A230) cuantificado en un espectrofotómetro Eppendorf.

Muestra	Concentración	Absorbancias A260/A280	Absorbancias A260/A230
1 *Oncononeura sp.*	14 µg/µL	0.95	0.99
2 *Dicrotendipes sp. 2*	7.7 µg/µL	2.52	1.46
3 *Goeldichironomus sp.*	2.4 µg/µL	8.98	0.49
4 *Procladius sp.*	7.7 µg/µL	2.11	2.19
5 *Ablabesmyia sp.*	3 µg/µL	2.41	1.91
6 *Kiefferulus sp.*	3.2 µg/µL	2.12	1.52
7 *Monopelopia sp. 2*	3.2 µg/µL	1.99	1.73
8 *Rheopelopia sp.*	1.8 µg/µL	2.39	1.25

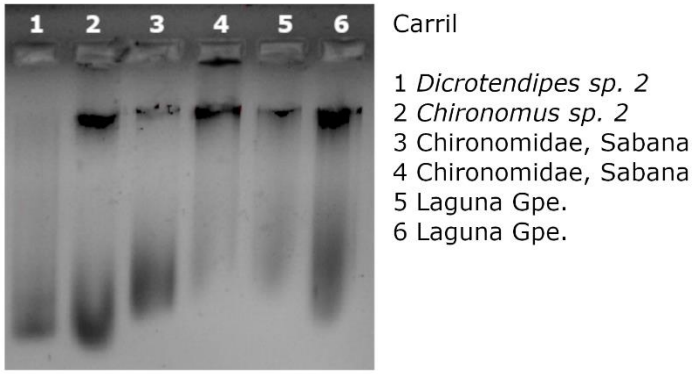
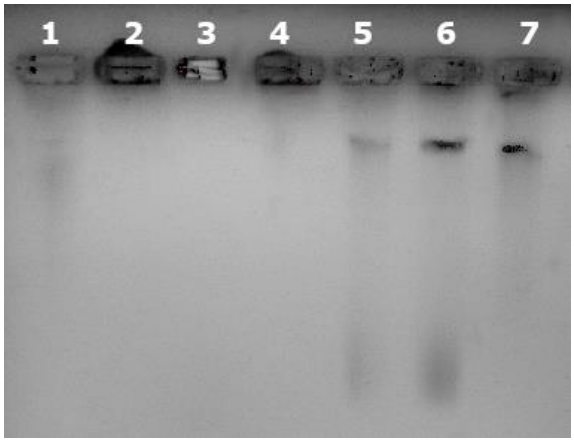


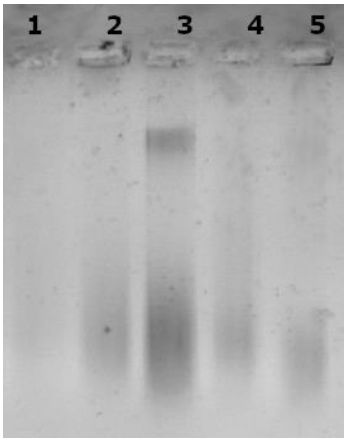
Figura 4. Gel de agarosa al 1.5 % de la extracción de ADN con Kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen) de Chironomidae, empleando 6 carriles. Del lado derecho se indica la morfoespecie a la que pertenece cada ADN. De los organismos extraídos de Sierra la Laguna *Chironomus sp. 2* se visualizó en el gel de agarosa.



Carril

1 *Goeldichironomus sp.*
2 *Onconeura sp.*
3 –
4 Laguna Gpe.
5 Laguna Gpe.
6 Chironomidae Sabana
7 Chironomidae Sabana

Figura 5. Electroforesis al 1.5 % de la extracción de ADN de Chironomidae con el Kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen). Solo se visualizaron las extracciones de organismos pertenecientes a sitios de sur de la Península de Yucatán.



Carril

1 *Rheopelopia sp.*
2 *Kiefferelus sp.*
3 *Procladius sp.*
4 *Monopelopia sp. 2*
5 *Ablabesmyia sp.*

Figura 6. Electroforesis al 1.5 % de la extracción de ADN de Chironomidae con Kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen). Únicamente *Procladius sp*. (perteneciente a Sierra la Laguna y Oasis aledaños) se visualizó en el gel de agarosa, con una concentración de 7.7 µg/µL.

7.3. PCR de gen COI y amplificación.

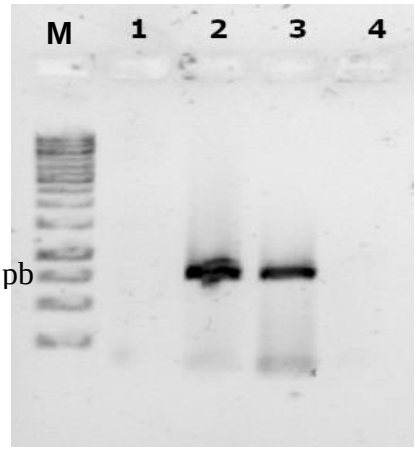


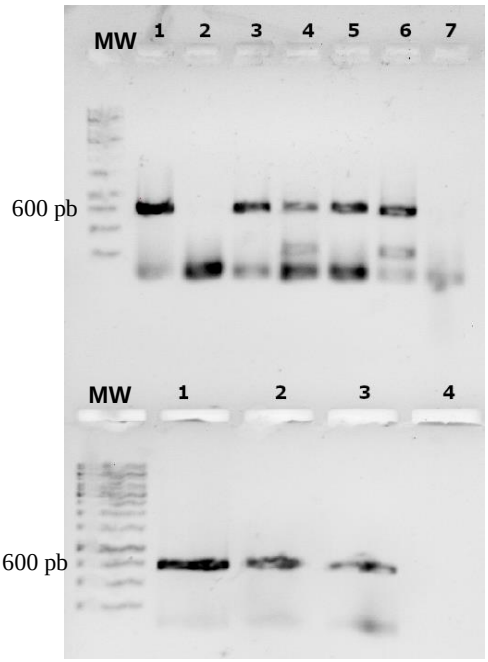
Figura 7 Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chrinomidae de la Península de Yucatán. M= Marcador de peso molecular (1Kb). Se observa el amplificado de ADN en dos muestras.

Los organismos extraídos con Hot-Shot por ECOSUR amplificaron en un 72% (Figuras 8, 9, 10, 11 y 12); los organismos extraídos con el kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen), pertenecientes a la Sabana y Laguna Guadalupe, amplificaron en un 100% (Figura 7 y 13), por último, los organismos de Sierra la Laguna y oasis aledaños extraídos con el kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen) amplificaron en un 45% (Figuras 13, 14 y 15). Las bandas esperadas tienen un peso aproximado de 650-654 pares de bases (Ordinola-Zapata et al., 2019).

Los amplicones obtenidos de Chironomidae de la Sabana y Laguna Guadalupe fueron empleadas posteriormente como control positivo de PCR.

Para identificar las amplificaciones exitosas se corrió un gel de agarosa al 3% con un marcador de peso molecular 1 Kb y un compuesto intercalante (Primer Juice), para identificar cualitativamente el gen COI de acuerdo con la banda generada en la visualización de con luz UV (Tamay de Dios et al., 2013). Los organismos del sur de PY amplificaron un total 9 morfoespecies (Figuras 8, 9, 10, 11 y 12), con un total de 28 organismos, la morfoespecie con mayor número de organismos amplificados fue *Parachironomus sp.* (con 9 organismos). Los organismos de BCS amplificaron

un total de 3 morfoespecies: *Dicrotendipes sp.*, *Procladius sp*. y *Chironomus sp. 2* (Figuras 13, 14 y 15).

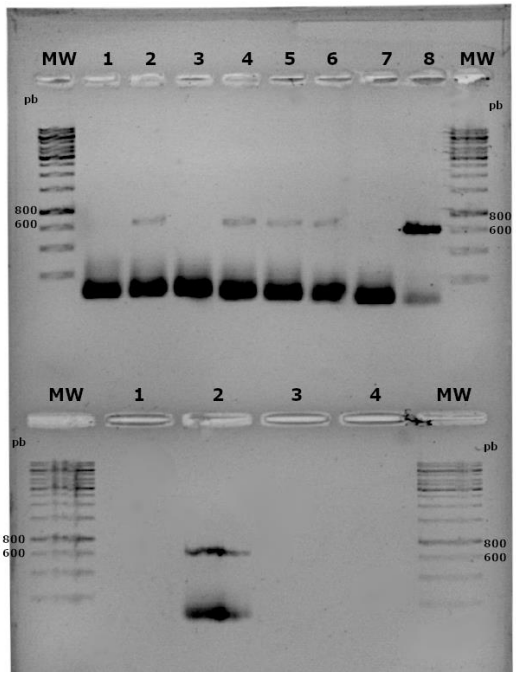


Carril

Línea 1
1 Chironomidae Laguna Gpe. (+)
2 *Apedilum sp.*
3 *Labrundinia sp*
4 *Parachironomus sp.*
5 *Polypedilum sp. 2*
6 *Parachironomus sp.*
7 *Parachironomus sp.*

Línea 2
1 Chironomidae Laguna Gpe. (+)
2 *Chironomus sp. 1*
3 *Dicrotendipes sp. 1*

Figura 8. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 6 muestras, las morfoespecies *Labrundinia sp*., *Parachironomus sp.* (2 muestras), *Polypedilum sp. 2*, *Chironomus sp. 1* y *Dicrotendipes sp. 1*.



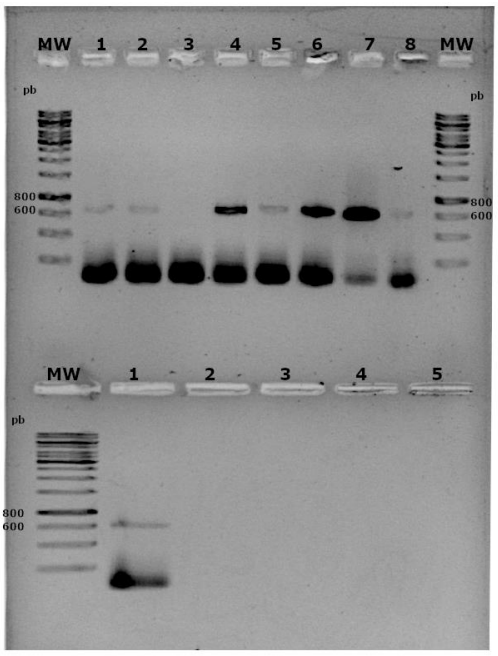
Carril

Línea 1
1 *Tanytarsus sp. 1*
2 *Larsia sp.*
3 C4
4 *Parachironomus sp.*
5 *Dicrotendipes sp*
6 *Dicrotendipes sp*
7 H4
8 *Coelotanypus sp.*

Línea 2

2 +

Figura 9. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 5 muestras, en los morfotipos de *Larsia sp.*, *Parachironomus sp.* y *Dicrotendipes sp* (2 muestras).



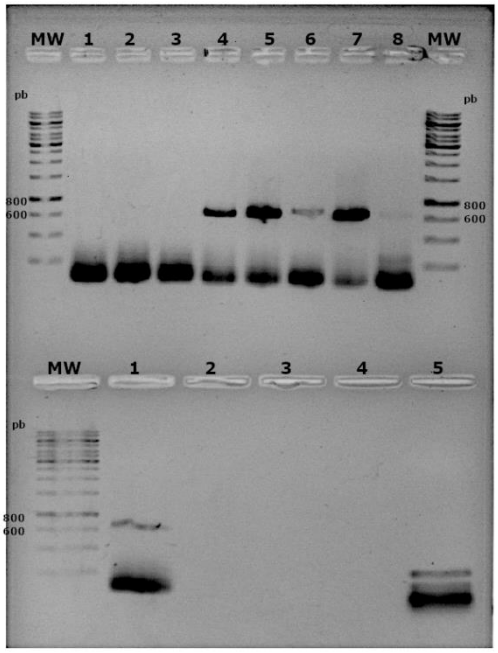
Carril

Línea 1
1 *Corynoneura sp.*
2 B5 (no quironómido)
3 C5
4 *Dicrotendipes sp. 1*
5 *Chironomus sp. 1*
6 *Parachironomus sp.*
7 *Coelotanypus sp.*
8 *Parachironomus sp.*

Línea 2

1 +

Figura 10. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 6 muestras, en los morfotipos *Corynoneura sp*., *Dicrotendipes sp. 1*, *Chironomus sp. 1*, Parachironomus *sp.* (2 muestras), *Coelotanypus sp.*



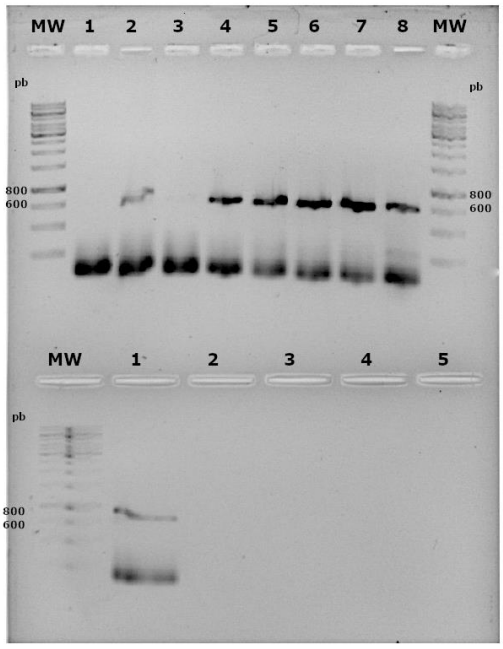
Carril

Línea 1
1 *Tanytarsus sp. 1*
2 *Apedilum sp.*
3 C6
4 *Dicrotendipes sp. 1*
5 *Parachironomus sp.*
6 *Dicrotendipes sp. 1*
7 *Monopelopia sp. 1*
8 *Parachironomus sp.*

Línea 2

2 +

Figura 11. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 5 muestras, en los morfotipos *Dicrotendipes sp. 1* (2 muestras), *Parachironomus sp.* (2 muestras) y *Monopelopia sp. 1.*



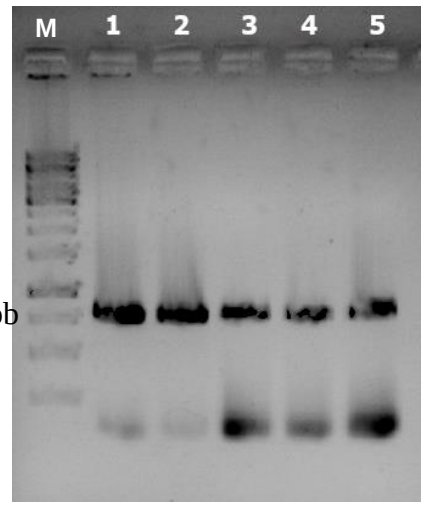
Carril

Línea 1
1 *Tanytarsus sp. 2*
2 *Polypedilum sp. 2*
3 *Larsia sp.*
4 *Dicrotendipes sp. 1*
5 *Parachironomus sp.*
6 *Chironomus sp.1*
7 *Monopelopia sp.1*
8 *Parachironomus sp.*

Línea 2

1 +

Figura 12. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 6 muestras *Polypelipedilum sp. 2*, *Dicrotendipes sp. 1*, *Parachironomus sp.* (2 muestras), *Chironomus sp. 1*, *Monopelopia sp. 1*.

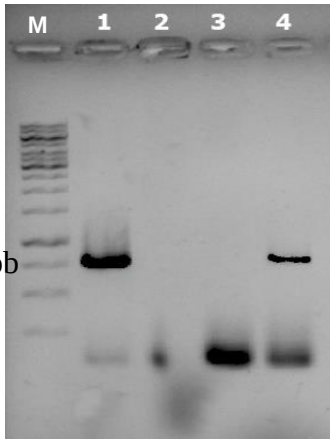


600 pb

Carril

1 Chironomidae Sabana
2 Chironomidae Sabana
3 *Chironomus sp. 2*
4 *Chironomus sp. 2*
5 *Chironomus sp. 2*

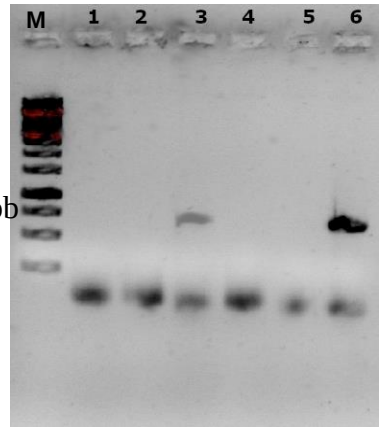
Figura 13. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán y Sierra la Laguna (*Chironomus sp. 2*). MW= marcador de peso molecular (1Kb). En todas las muestras se visualiza el amplicón. Los amplicones están a diferentes diluciones (el carril 1 y 3 a 1:10, el carril 2 y 4 a 1:5, y el carril 5 a 1:20).



Carril

1 +
2 *Onconeura sp.*
3 *Goeldichironomus sp. 1*
4 *Dicrotendipes sp. 2*

Figura 14. Amplificación por PCR del gen **COI** con templete de ADN de Chironomidae de Sierra la Laguna. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en una muestra, *Dicrotendipes sp. 2.*



Carril

1 *Rheopelopia sp.*
2 *Kiefferelus sp. 1*
3 *Procladius sp.*
4 *Monopelopia sp. 2*
5 Ablabesmyia sp.
6 +

Figura 15. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de Sierra la Laguna MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en una muestra, *Procladius sp.*

7.4. Análisis in sillico de enzimas de restricción

Con la finalidad de elegir secuencias representativas de la formación de los clústeres y posteriormente utilizarlos en el análisis informático para la selección de enzimas de restricción y primers, se obtuvo el árbol de identificación (Figura 16) con el programa MEGA X realizado con secuencias de Chironomidae del sureste de la península de Yucatán (publicadas en Gen Bank y Bold Systems), así como algunas secuencias disponibles en estados cercanos a Baja California Sur, algunas identificadas hasta género mientras que otras únicamente hasta familia. Se definieron un total de 25 MOTUs con una divergencia intraespecífica máxima de 2% y un mínimo de 4% de divergencia interespecífica (anexo, tabla 5).

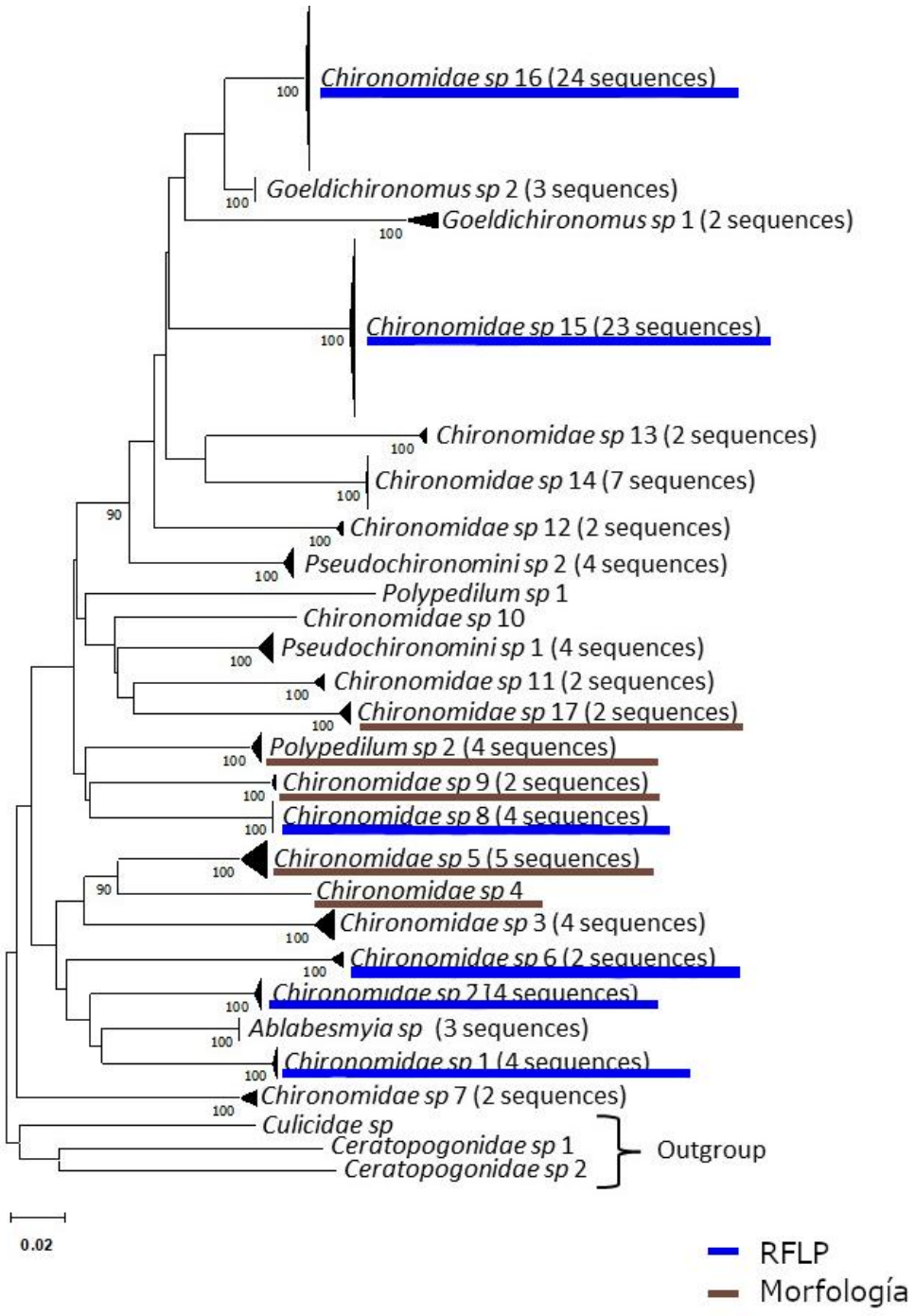


Figura 16. Árbol de identificación de Chironomidae realizado con MEGA X, con alineación a 550 pares de bases con Clustal por codones método estadístico de Máxima Verosimilitud, con un Bootstrap de 500 repeticiones y calculando las distancias genéticas con el modelo de dos parámetros de Kimura (K2P). La simbología indica los clústeres que cuentan con identificación morfológica y RFLP (línea azul) y los que cuentan únicamente con identificación morfológica (línea café).

Se presenta una tabla que relaciona el nombre de las morfoespecies y el identificador en el árbol de identificación con RFLP y/o caracteres morfológicos (tabla 2).

Tabla 2. Relación de la identificación de PY con el nombre asignado en el árbol de identificación. En la columna izquierda se indica la morfoespecie de los organismos de PY, y en la derecha se indica el nombre el MOTU en el árbol de identificación.

Morfoespecie	**Nombre del MOTU en el árbol**
Monopelopia sp.	Chironomidae sp. 1
Larsia sp.	Chironomidae sp. 2
Nilotanypus sp.	Chironomidae sp. 4
Labrundinia sp.	Chironomidae sp.5
Coelotanypus sp.	Chironomidae sp. 6
Polypedilum sp. 1	Chironomidae sp.8
Apedilum sp.	Chironomidae sp. 9
Parachironomus sp.	Chironomidae sp. 15
Dicrotendipes sp. 1	Chironomidae sp. 16
Tanytarsus sp. 2	Chironomidae sp.17
Chironomus sp. 1	Chironomus sp.
Tanytarsus sp. 1	Tanytarsus sp.
Polypedilum sp. 2	Polypedilum sp. 2

Para seleccionar la enzima de restricción que corte y cree mejores perfiles en los geles de agarosa a un 3.5%, recurrimos al software SnapGene, poniendo a prueba Taq I, Alu I, Mnl I y Mse I en 24 MOTUs; la enzima seleccionada fue Alu I, ya que es más comercial, y formó perfiles de restricción específicos por cada MOTU obtenido del árbol de identificación molecular (Figuras 17, 18 y 19; y tabla 3).

Taq I presenta en *Monopelopia sp., Larsia sp., Nilotanypus sp., Corynoneura sp., Polypedilum sp. 2, Polypedilum sp. 1, Chironomidae sp. 10, Chironomidae sp. 11, Chironomus sp. 1, Tanytarsus sp. 1, Dicrotendipes sp.* y *Parachironomus sp.* un mismo patrón (color verde claro). Un segundo patrón recurrente en varios morfotipos con la enzima Taq I se presenta en *Labrundinia sp*., *Ablabesmyia sp. 1*, *Apedilum sp.* y *Chironomidae sp. 12* (color morado). En la enzima Mse I se presentan 3 patrones iguales ente morfoespecies, lo que dificulta su diferenciación: el primero está presente en *Monopelopia sp.* y *Labrundinia sp.* (color azul); el segundo lo presentan *Larsia sp.*, *Ablabesmyia sp.* 1 y *Parachironomus sp.* (color amarillo); por último, *Polypedilum sp. 2*, *Chironomidae sp. 10, Chironomidae sp.11*, *Tanytarsus sp. 1* y *Dicrotendipes sp.* presentan un mismo patrón (color verde fosforescente). Con la enzima Mnl I se obtuvieron 3 patrones con más de un morfotipos en cada uno, estos se presentaron en: *Polypedilum sp. 2*, *Apedilum sp.* y *Parachironomus sp.* (color azul cielo); el segundo se presentó en *Goeldichironomus sp. 2* y *Dicrotendipes sp.* (color naranja); por último, el tercero se presentó en *Tanytarsus sp.1* y *Tanytarsus sp.* (color gris).

La enzima elegida para la creación de RFLP fue Alu I, debido a que a diferencia de las otras, presentó un patrón diferente para cada una de las 24 morfoespecies. Aunque según los patrones in silico es la mejor hay que tomar en cuenta que *Dicrotendipes sp* presentó dos patrones y *Parachironomus sp.* tres patrones.

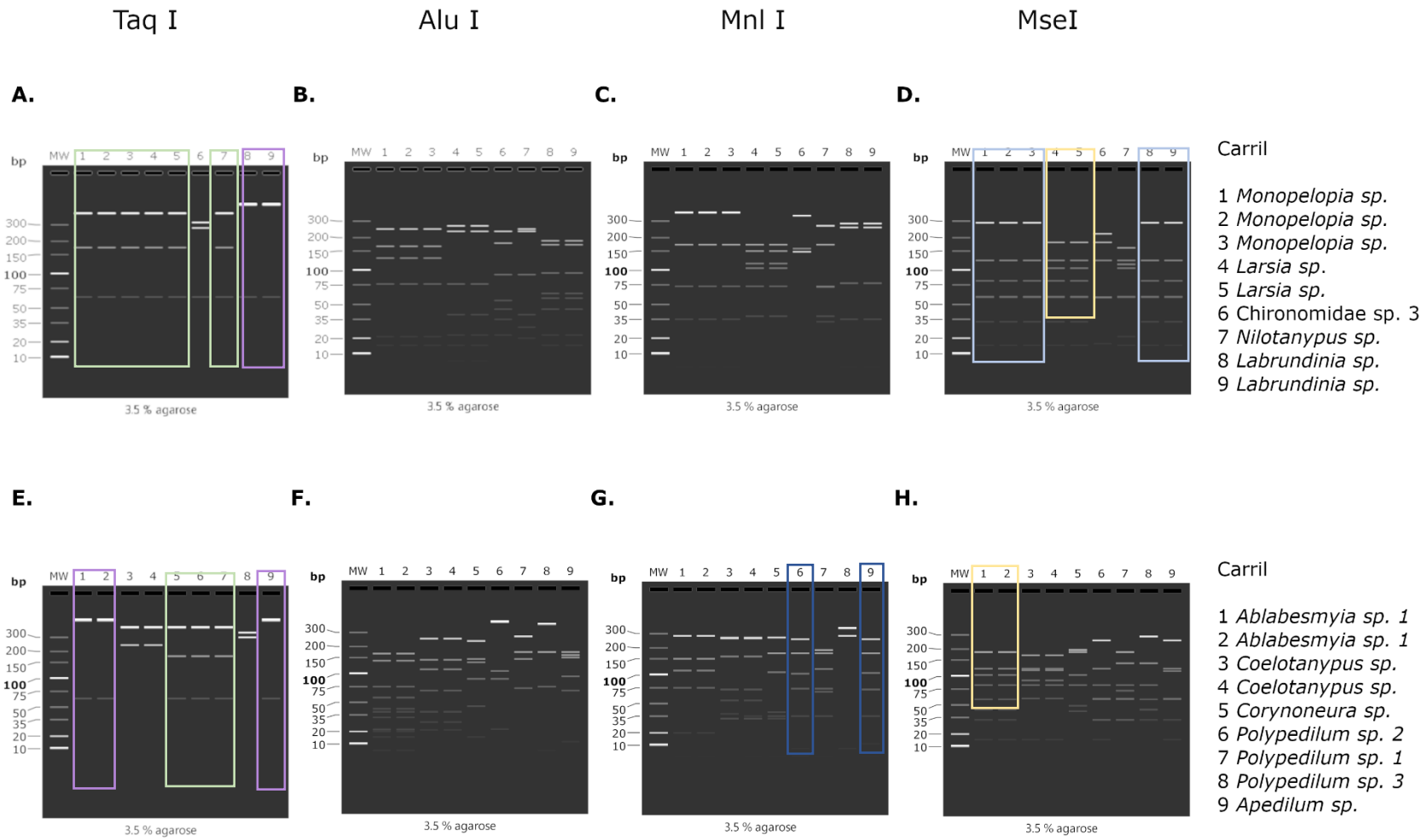


Figura 17. Imágenes de geles de agarosa (al 3.5%) in sillico realizados en el software SnapGene. Del lado derecho de cada fila se indica a qué morfotipo pertenece cada muestra, y en el encabezado de la columna la enzima que se utilizó para crear los diferentes cortes. Se indican 5 patrones en recuadros con diferentes colores que están presentes en dos o más morfotipos.

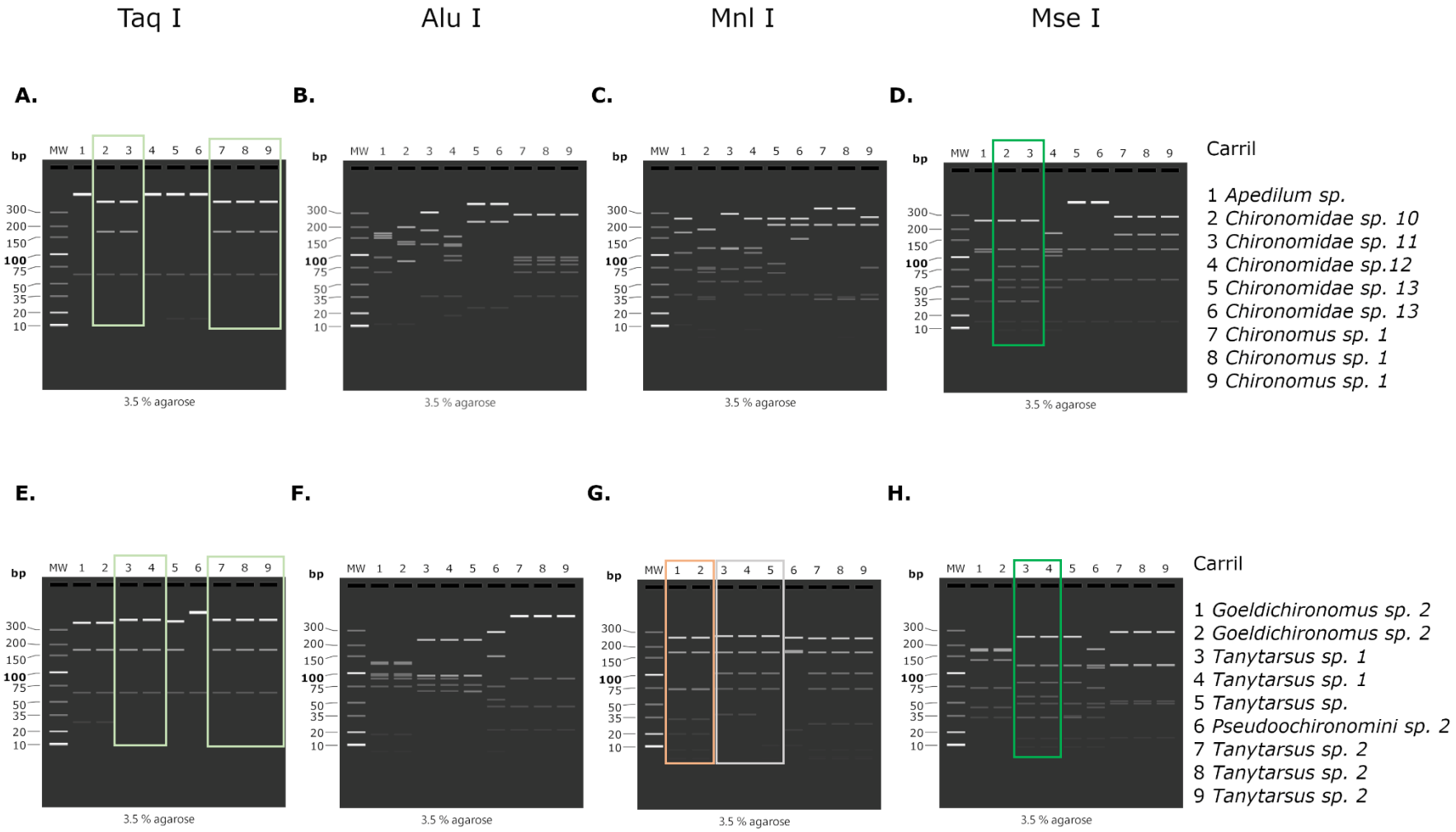


Figura 18. Imágenes de geles de agarosa (al 3.5%) in sillico realizados en el software SnapGene. Del lado derecho de cada fila se indica a qué morfotipo pertenece cada muestra, y en el encabezado de la columna la enzima que se utilizó para crear los diferentes cortes. Se indican 4 patrones en recuadros con diferentes colores que están presentes en dos o más morfotipos

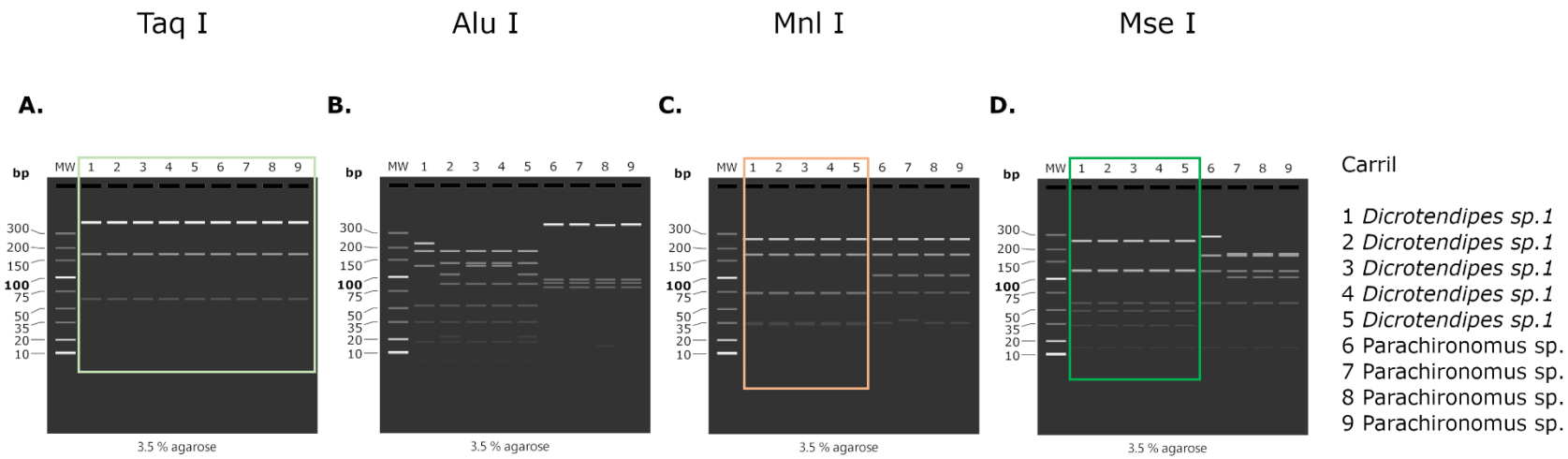


Figura 19. Imágenes de geles de agarosa (al 3.5%) in sillico realizados en el software SnapGene. Del lado derecho de cada fila se indica a qué morfotipo pertenece cada muestra, y en el encabezado de la columna la enzima que se utilizó para crear los diferentes cortes. Se indican 3 patrones en recuadros con diferentes que están presentes en dos o más morfotipos.

Tabla 3. Cortes generados a partir de RFLP in silico. La primera columna indica la morfoespecie a la que pertenece, la segunda columna la enzima empleada para generar los cortes y las columnas posteriores los cortes correspondientes (medidos en pb). Los colores resaltan los patrones iguales en los diferentes morfotipos empleando una enzima de restricción.

Morfoespecie	Enzima	1 corte	2 corte	3 corte	4 corte	5 corte	6 corte	7 corte	8 corte	9 corte	10 corte	11 corte	12 corte	13 corte
Monopelopia sp.	Taq I	417	174	63										
	Alu I	245	166	130	77	21	15							
	Mnl I	371	172	73	35	3								
	Mse I	286	122	81	59	58	33	15						
Larsia sp.	Taq I	417	174	63										
	Alu I	266	229	77	39	22	15	6						
	Mnl I	172	150	116	105	73	38							
	Mse I	181	122	105	81	59	58	33	15					
Chironomidae sp. 3	Taq I	317	274	63										
	Alu I	229	177	92	54	45	35	22						

	Mnl I	350	156	148	146									
	Mse I	219	181	122	58	58	16							
Nilotanypus sp.	Taq I	417	174	63										
	Alu I	245	229	93	39	28	20							
	Mnl I	266	172	73	72	38	33							
	Mse I	160	122	114	105	59	58	21	15					
Labrundinia sp.	Taq I	591	63											
	Alu I	186	171	95	63	57	45	22	15					
	Mnl I	282	256	78	35	3								
	Mse I	286	122	81	59	58	33	15						
Ablabesmyia sp. 1	Taq I	576	63											
	Alu I	166	138	74	57	42	39	33	22	21	20	15	6	6
	Mnl I	278	150	113	75	20	3							
	Mse I	181	122	105	81	58	44	33	15					
Coelotanypus sp.	Taq I	417	237											
	Alu I	245	141	113	67	39	28	21						
	Mnl I	266	256	158	72	54	38 / 35	33	33	3				
	Mse I	169	122	117	91	81	59	15						
Corynoneura sp.	Taq I	417	174	63										
	Alu I	229	144	132	89	45	15							
	Mnl I	263	172	108	40	35	33	3						
	Mse I	196	181	105	81	49	42							
Polypedilum sp. 2	Taq I	417	174	63										
	Alu I	435	108	89	22									
	Mnl I	255	172	105	73	35	8	3	3					
	Mse I	253	122	81	59	58	33	33	15					
Polypedilum sp. 1	Taq I	417	174	63										
	Alu I	266	171	145	72									
	Mnl I	187	172	116	73	68	35	3						
	Mse I	181	137	81	72	59	58	33	33					

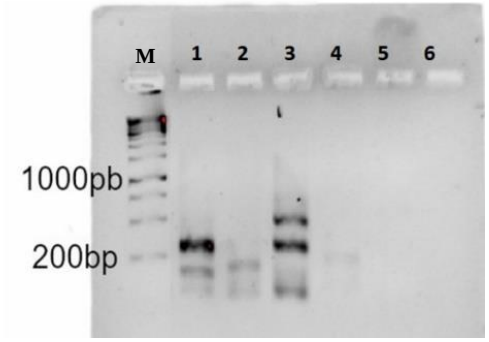
Polypedilum sp. 3	Taq I	341	298								
	Alu I	388	171	74	6						
	Mnl I	353	278	8							
	Mse I	286	137	81	58	44	33				
Apedilum sp.	Taq I	591	63								
	Alu I	171	159	150	95	67	12				
	Mnl I	255	172	106	72	35/38	11	3			
	Mse I	253	122	114	59	58	33	15			
Chironomidae sp. 10	Taq I	417	174	63							
	Alu I	200	138	130	87	12					
	Mnl I	187	118	75	73	68	54	35	33	8	3
	Mse I	253	122	81	59	49	33	33	15	9	
Chironomidae sp.11	Taq I	417	174	63							
	Alu I	303	185	130	36						
	Mnl I	293	118	116	73	54					
	Mse I	253	122	81	59	49	33	33	15	9	
Chironomidae sp. 12	Taq I	591	63								
	Alu I	156	130	126	99	89	36	18			
	Mnl I	255	118	106	75	54	38	8			
	Mse I	181	122	114	105	59	49	15	9		
Chironomidae 13	Taq I	579	63	15							
	Alu I	400	229	25							
	Mnl I	255	212	83	66	38					
		255	212	149	38						
	Mse I	458	122	59	15						
Chironomus sp. 1	Taq I	417	174	63							
	Alu I	285	96	89	81	67	36				
	Mnl I	338	212	38	33	33	3				
	Mse I	289	172	122	59	15					
Goeldichironomus sp. 2	Taq I	374	174	63	28						
	Alu I	130	126	99	96	90	74	18	6		

	Mnl I	255	172	73	72	33	20	8	3	3
	Mse I	181	172	137	72	44	33			
Tanytarsus sp. 1	Taq I	417	174	63						
	Alu I	229	96	96	89	77	67			
	Mnl I	266	172	105	73	38				
	Mse I	253	122	81	59	49	33	33	15	9
Tanytarsus sp.	Taq I	393	174	63						
	Alu I	229	96	96	77	67	65			
	Mnl I	266	172	105	73	11	3			
	Mse I	253	122	81	49	35	33	33	15	9
Pseudochironomini sp. 2	Taq I	276	63							
	Alu I	288	150	74	54	45	22	6		
	Mnl I	255	178	172	23	11				
	Mse I	181	122	114	72	49	44	33	15	9
Tanytarsus sp. 2	Taq I	411	174	63						
	Alu I	492	89	45	22					
	Mnl I	251	172	105	73	29	8	4	3	3
	Mse I	286	123	122	52	49	16			
Dicrotendipes sp.	Taq I	417	174	63						
	Alu I	225	186	130	54	35	18	6		
		186	138	108/130	87	54	35	22	18	6
	Mnl I	255	172	73	72	35	33	8	3	3
	Mse I	253	123	122	59	49	33	15		
Parachironomus sp.	Taq I	417	174	63						
	Alu I	388	96	89	81					
		373	96	89	81	15				
		388	177	89						
	Mnl I	255	172	108	73	35/38	8	3		
	Mse I	286	172	122	59	15				
		181	172	122	105	59	15			

7.5. Digestión con la enzima

Se obtuvo RFLP para 13 morfoespecies; 10 pertenecientes al sur de Península de Yucatán: *Larsia sp.*, *Parachironomus sp*., *Dicrotendipes sp.* 1, *Coelotanypus sp*., *Corynoneura sp*., *Dicrotendipes sp.*, *Monopelopia sp. 1*, *Polypedilum sp. 1*, *Chironomus sp. 1* y *Labrundinia sp.*; y 3 pertenecientes a Sierra La Laguna y Oasis aledaños: *Chironomus sp. 2*, *Dicrotendipes sp. 2* y *Procladius sp.*

Se presentan imágenes de la digestión con la enzima, con las imágenes utilizadas para la identificación morfológica y los RFLP con Alu I generados in silico (excepto para los de Sierra La Laguna y Oasis aledaños debido a que estos no fueron secuenciados) para relacionar los patrones generados in silico con los in vitro; así como identificar a los organismos morfológicamente.



Carril
1 Laguna Gpe.
2 *Labrundinia sp.*
3 *Parachironomus sp.*

Figura 20. Digestión del amplicón de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán con Alu I, empleando un marcador de 10,000 pares de bases. Del lado derecho se indica la morfoespecie al que pertenece cada carril.

La digestión in vitro generó un total de 18 RFLP diferentes (Figuras 20, 21, 22, 23, 24 y 25), únicamente 3 morfoespecies presentan similitud entre los RFLP in silico e in vitro. Un organismo de *Monopelopia sp. 1* presentó 3 de 6 bandas in vitro de la misma cantidad de pares de bases que in silico (Figura 22, d.), en el otro organismo de esta morfoespecie solo se puede diferenciar una banda in vitro igual que in silico (Figura 23, f.); en la tabla 4 se presenta subrayado de color amarillo las bandas in vitro visibles que son iguales a las in silico. *Coelotanypus sp*., en 1 organismo presentó 3 de 7 bandas iguales que in silico (Figura 21, h.) y en el otro organismo sólo una banda resulto igual (Figura 22, d.) en la tabla 4 se presenta subrayado de color verde las bandas

in vitro visibles que son iguales a las in silico. En *Parachironomus sp.*, se visualizaron 5 RFLP distintos (tabla 4), únicamente se presentó una banda que coincide in vitro e in silico, (con peso de 100 pb) en 5 organismos (Figuras 21, 22 y 23), en tabla 4 se presenta subrayado de diferentes colores la banda que es igual en los diferentes patrones in silico e in vitro.

Dicrotendipes sp. 1 presentó 3 RFLP, una de las cuales (con dos bandas una de 200 pb y otra de 100 pb), también se presenta en *Dicrotendipes sp. 2*, *Parachironomus sp.* y *Corynoneura sp.*

Un patrón de dos bandas (200 y 100) se repite 4 veces en diferentes morfotipos: P*arachironomus sp*., *Dicrotendipes sp. 1*, *Coelotanypus sp.*, *Corynoneura sp.* y *Dicrotendipes sp. 2* esto está representado en la tabla 4 con recuadros de color rojo.

Debajo de 100 pares de bases no se diferencian las bandas generadas, si se presentan se observan como una sola de gran tamaño. Otros RFLP no se diferencian bien ya que las bandas no se observan bien definidas o separadas.

Al analizar la digestión de la enzima Alu I in silico, con sus respectivos morfotipos se observan que los Chironomidae de sur de PY obtuvieron patrones diferentes entre los diferentes morfotipos para cada uno. Entre el mismo morfotipo *Coelotanypus sp.* y *Monopelopia sp.* presentaron en todos los organismos el mismo patrón para su morfotipo respectivo. *Parachironomus sp.* presentó en 1 de 6 organismos 1 RFLP diferente, *Dicrotendipes sp.* presentó 2 patrones diferentes, con 3 organismos de cada tipo.

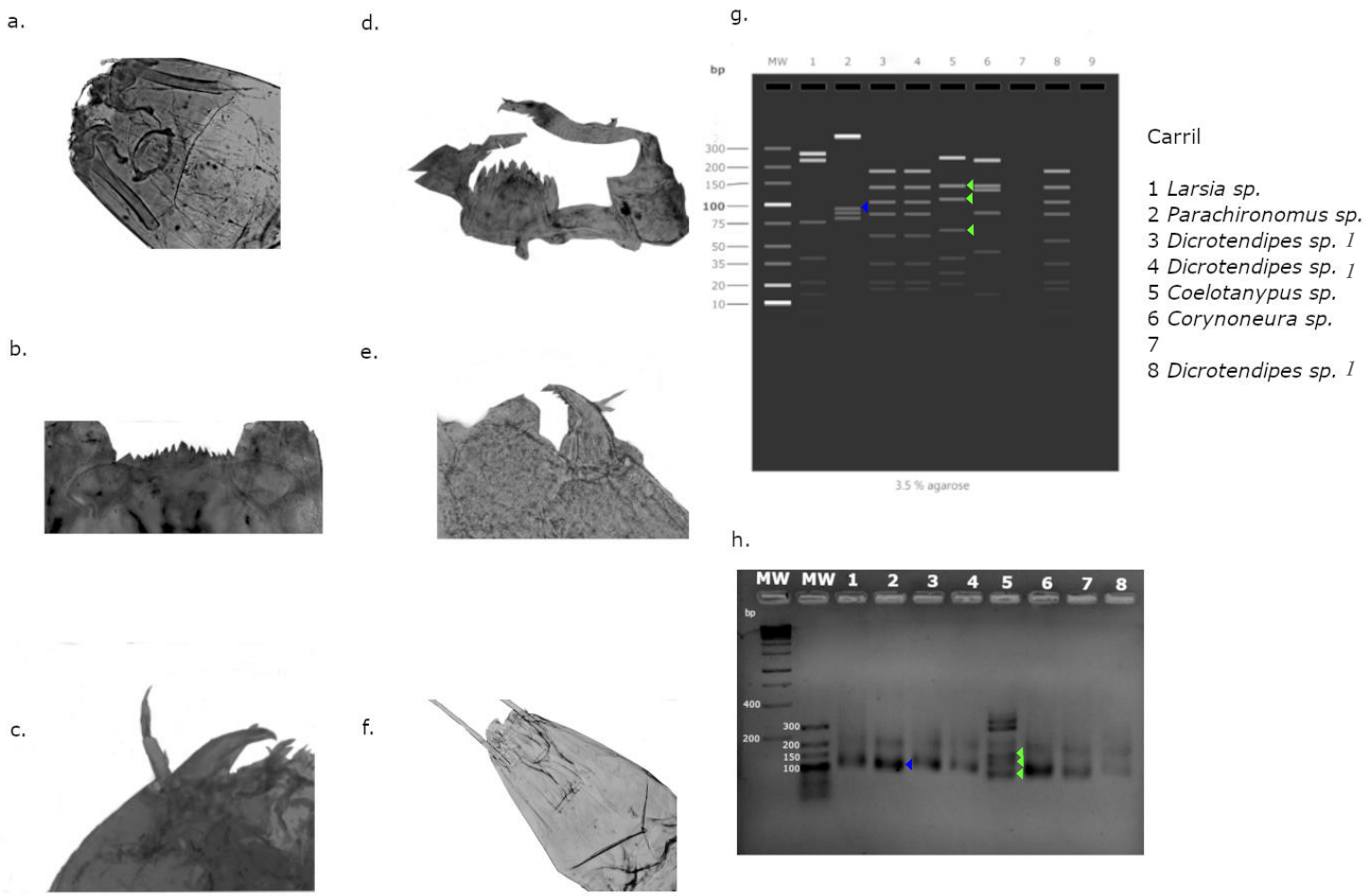


Figura 21. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae de la Península de Yucatán con sus RFLP in silico e in vitro. **a.** cápsula cefálica de *Larsia sp*. **b.** Placas ventromentales y méntum de *Parachironomus sp*. **c.** Mandíbula y antena de *Parachironomus sp.* **d.** Méntum y placas ventromentales de *Dicrotendipes sp. 1* **e**. Mandíbula de *Dicrotendipes sp. 1* **f.** Cápsula cefálica de *Coelotanypus sp.* **g.** Gel in silico de RFLP de 7 organismos (5 morfotipos) de PY; con un marcador de 300 bp h. Gel in vitro de RFLP de 7 organismos (5 morfotipos) de PY; con dos marcadores, uno de 10,000 bp y otro de 300 bp. Los triángulos indican las bandas iguales in silico e in vitro: verde Coelotanypus sp. y azul Parachironomus sp.

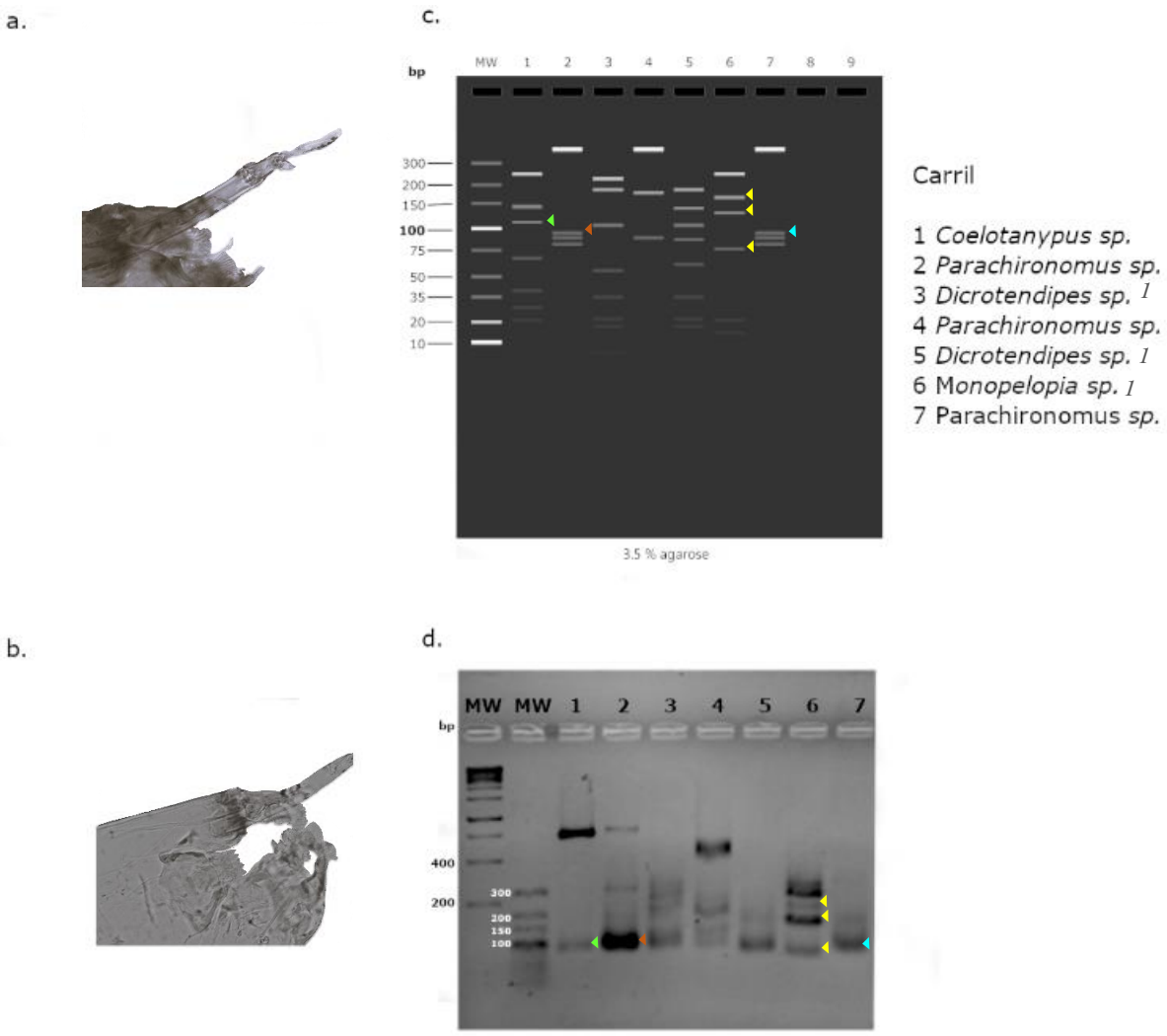


Figura 22. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae de la Península de Yucatán con sus RFLP in silico e in vitro. **a.** Antena de *Monopelopia sp.* **b.** Imagen de la lígula y mandíbula de *Monopelopia sp.* **c.** Gel in silico de RFLP de 7 organismos (4 morfotipos) de PY; con un marcador de 300 bp **d.** Gel in vitro de RFLP de 7 organismos (4 morfotipos) de PY; con dos marcadores, uno de 10,000 bp y otro de 300 bp. Los triángulos indican las bandas iguales in silico e in vitro: verde *Coelotanypus sp*., naranja *Parachironomus sp.* patrón 2, amarillo *Monopelopia sp.*, cian *Parachironomus sp.* patrón 4.

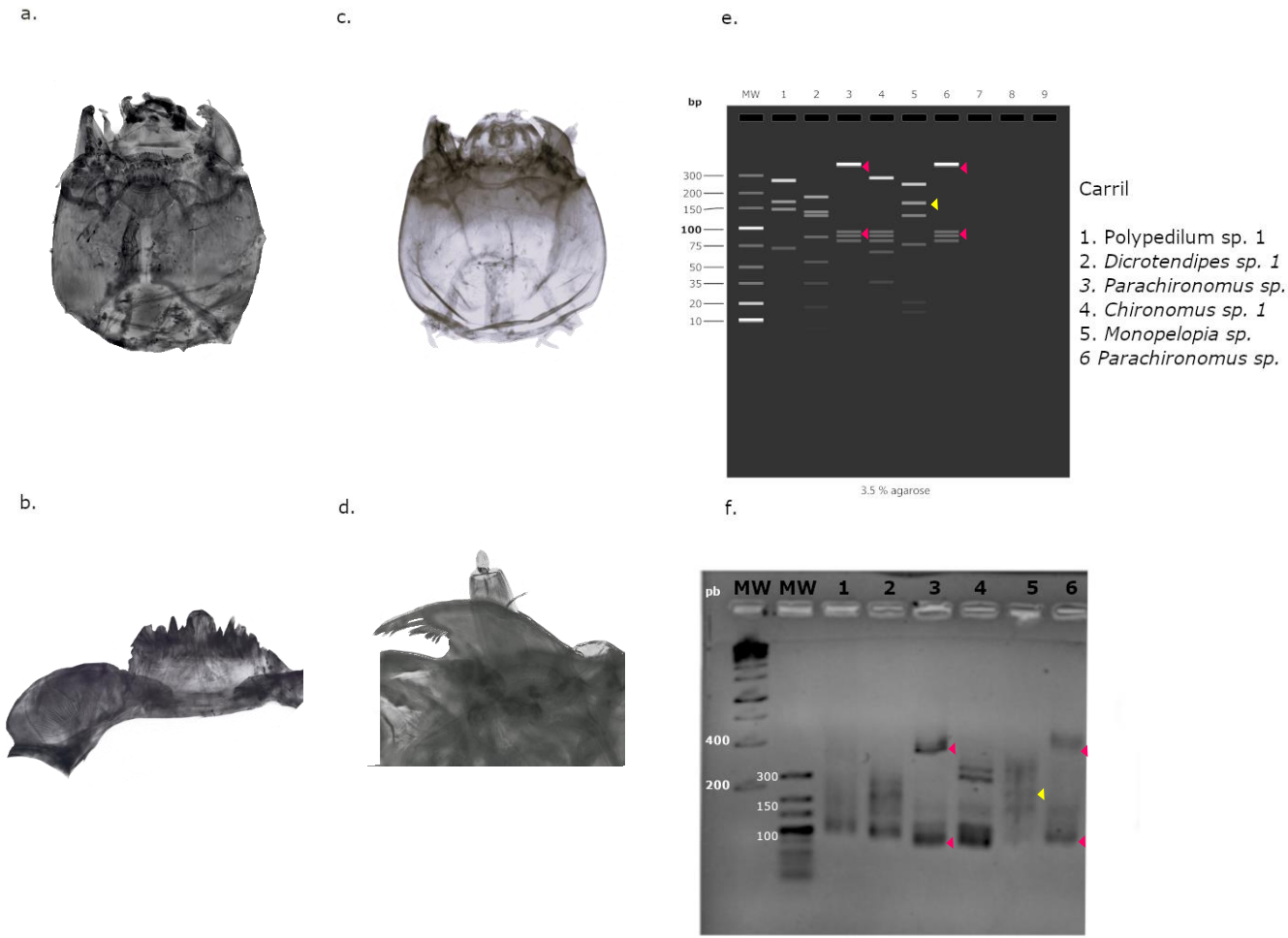


Figura 23. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae de la Península de Yucatán con sus RFLP in silico e in vitro. **a.** Estructura cefálica de *Polypedilum sp.1* **b.** Estructura cefálica de *Chironomus sp.1* **c.** Méntum y placa ventromental de *Chironomus sp.1* **d.** antena y mandíbula de *Chironomus sp.*1 **e.** Gel in silico de RFLP de 6 organismos (5 morfotipos) de PY; con un marcador de 300 bp **f.** Gel in vitro de RFLP de 6 organismos (5 morfotipos) de PY; con dos marcadores, uno de 10,000 bp y otro de 300 bp. Los triángulos indican las bandas iguales in silico e in vitro: rosa *Parachironomus sp.* patrón 5 y amarillo *Monopelopia sp.*

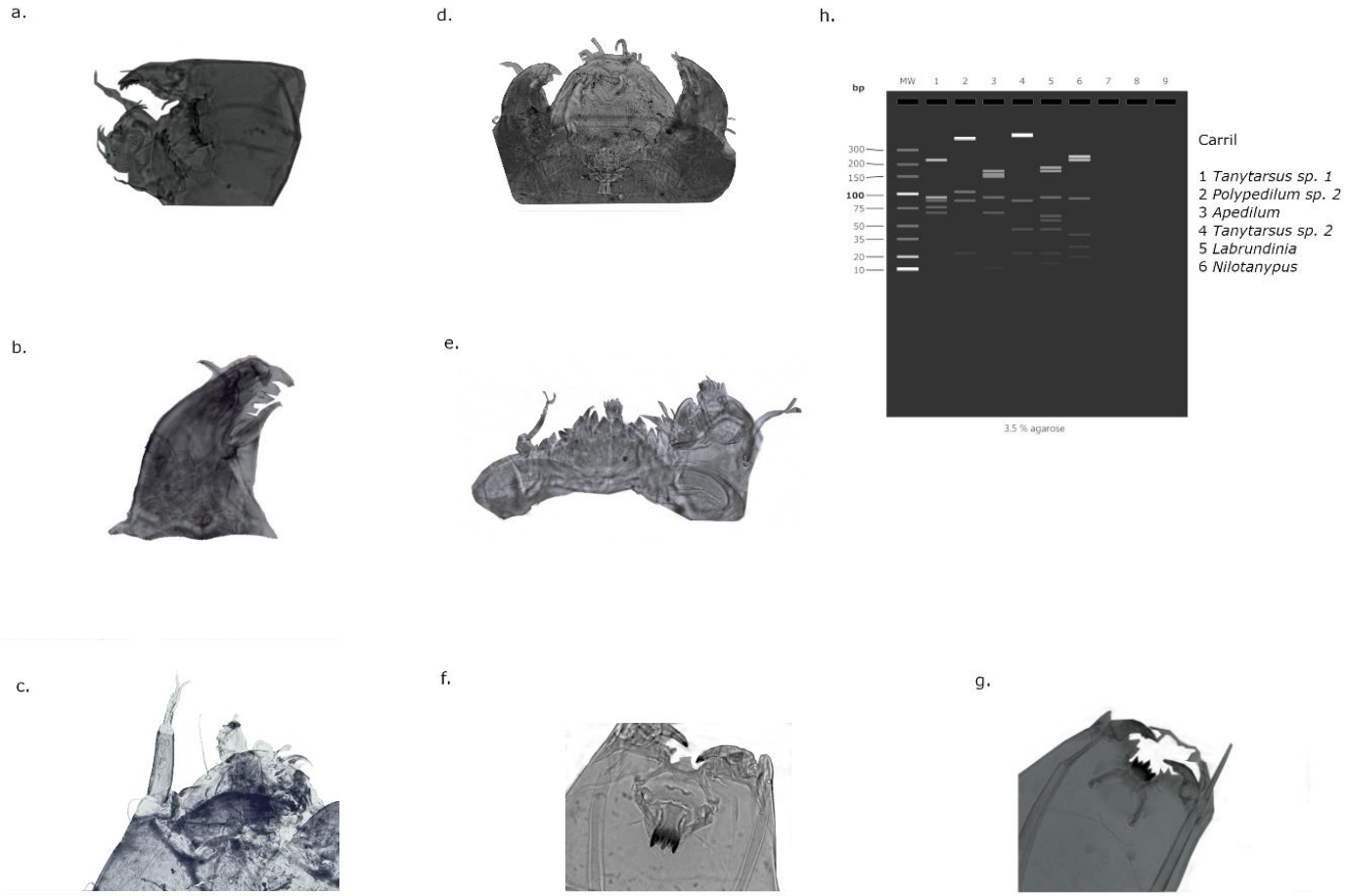


Figura 24. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae de la Península de Yucatán con sus RFLP. **a.** Cápsula cefálica de *Tanytarsus sp.* **b.** Mandíbula de *Apedilum sp.* **c.** Antena de *Apedilum sp*. **d.** Mitad superior de la cápsula cefálica de *Polypedilum sp. 2*, se observan las mandíbulas, antena y placas. **e.** Méntum y placas ventromentales de *Apedilum sp.* **f.** Parte superior de cápsula cefálica de *Labrundinia sp.* **g.** Parte superior de cápsula cefálica de *Nilotanypus sp.* **h.** Gel in silico de RFLP de 6 organismos de PY; con un marcador de 300 bp.

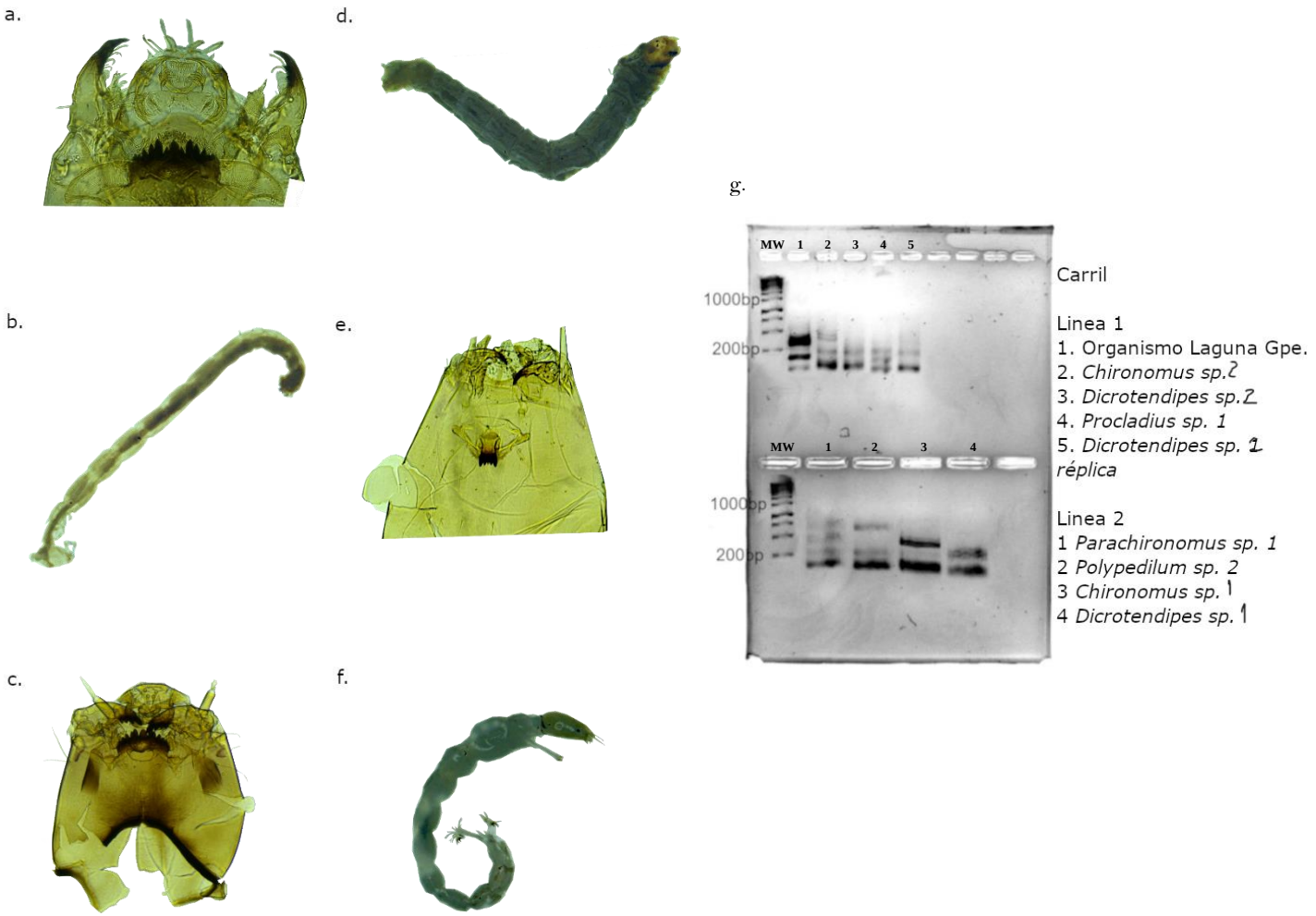


Figura 25. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae con sus RFLP, la primera línea corresponde a organismos de Baja California Sur y la segunda línea a organismos de la Península de Yucatán. **a.** Parte superior de la estructura cefálica de *Chironomus sp. 2* donde se observa el méntum, las placas ventromentales, mandíbula y antena. **b.** Organismo completo de *Chironomus sp. 2* **c.** Cápsula cefálica de *Dicrotendipes sp. 2* **d.** Organismo completo de *Dicrotendipes sp. 2* **e.** Parte superior de la cápsula cefálica de *Procladius sp.* se observa las mandíbulas y la lígula **f.** Organismo completo de *Procladius sp.* **g.** Gel in vitro de RFLP de 9 organismos con un marcador de 10,000 bp.

Tabla 4 Corte con Alu I, en la columna izquierda se presenta el nombre del morfotipo, en las siguientes los cortes visibles (medidos en pb) y en las filas se presentan los patrones para cada uno. Se presentan subrayadas las bandas iguales in silico e in vitro. Lo recuadros rojos son los patrones que son iguales en más de un morfotipo.

Morfoespecie	1 corte	2 corte	3 corte	4 corte	5 corte	6 corte
Larsia sp.	77					
Parachironomus sp.	200	100				
	600	300	100			
	450	200				
	100					
	388	100				
Dicrotendipes sp. 1	200	100				
	150	100				
	250	200	100			
Coelotanypus sp.	300	245	200	141	113	67
	600	100				
Corynoneura sp.	200	100				
Monopelopia sp. 1	300	245	166	77		
Polypedilum sp. 1	100					
	400	200	100			
Chironomus sp. 1	305	285	150	67		
	400	100				
Chironomus sp. 2	300	200	100			
Dicrotendipes sp. 2	200	100				
Procladius sp.	200	150	100			

8. Discusión

Se identificaron un mayor número de géneros en la identificación morfológica en comparación con la molecular. La extracción con el kit DNeasy Blood and Tissue tuvo un éxito de 52%, es posible que el ADN de estas muestras no fuera de la mejor calidad debido a problemas en la fijación. Elías-Gutiérrez et al., 2018 obtuvo un mayor éxito en la fijación de plancton de agua dulce al lavar las muestras con etanol frío al 96% y seguidamente transferir la muestra a un frasco con 1/3 de muestra y lo demás con etanol, así como mantenerlo congelado a -18°C por lo menos una semana. En el caso de las muestras de Sierra la Laguna y oasis aledaños, no se conservaron en hielo por una semana después de su colecta en campo, asimismo la exposición a diferentes condiciones ambientales en el traslado (desde baja California al Sur de la Península de Yucatán) es otro factor que influyó.

El uso del kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen) permitió que el ADN de Chironomidae de Sierra la Laguna y oasis aledaños, para muestras amplificadas con éxito, tuviera una concentración de 7.7 µg/µl y calidad aceptable, con absorbancias de 2.11-2.52 en A260/280 y de 1.46-2.19 en A260/230.

Las muestras de PY tenían 4 años desde ser recolectadas, por lo que algunas muestras se perdieron o degradaron; la preservación por largos periodos de tiempo aún presenta dificultades para la extracción de ADN, (Buko et al., 2023). Se ha registrado que la preservación de ADN ha tenido alto éxito con el uso de sistemas de estabilización en seco, Ivanova y Kuzmina (2013) compararon tres métodos en seco para la preservación de ADN de insectos (Lepidóptera) por largos periodos de tiempo, Biomatrica (estabilizador comercial) fue el que tuvo mayor éxito (98%) con 4 años de preservación a 56°C (Ivanova & Kuzmina, 2013).

Los primers Z plank en el presente estudio tuvieron una amplificación en el 72.3% del total de las muestras, pero con ADN bien preservado se ha registrado un promedio de éxito de 87.36% para la clase Insecta (Elías-Gutiérrez et al., 2018); en comparación a los primers Folmer, ha demostrado tener un aumento en la tasa media de éxito de 20% (Prosser et al., 2013). Se ha reportado el uso de los primers Z plank para plancton de agua dulce para describir nuevas especies, taxonomía integrativa e identificación para exámenes toxicológicos (Cortés-Carrasco et al., 2022; Gutiérrez-Aguirre & Cervantes-Martínez, 2016; Hose et al., 2016).

El árbol de similitud creado con las secuencias de la Península de Yucatán disponibles en la plataforma Bold Systems, nos ayudó a elegir las enzimas de restricción y cebadores necesarios para los organismos de Baja California Sur.

El árbol de identificación separó 25 MOTUs con divergencia interespecífica mínimo de 4%, los 19 RFLP generados in silico fueron diferentes para cada morfotipo a excepción de *Parachironomus sp.* y *Dicrotendipes sp*. El género *Chironomus* presenta dos morfotipos diferentes, los RFLP in vitro generaron diferentes cortes para cada patrón. Cuando se presenta transversiones en el ADN de los organismos se pueden generar diferentes RFLP para una misma especie, como lo reportó Cienfuegos et al (2011) en *Anopheles albimanus*.

Sharley et al., 2004 con el uso de la enzima Alu I, evidenciaron la diferenciación especie-específica de Chironomidae del género *Chironomus*, logrando diferenciar 6 de 10 especies, así como diferenciar los géneros no pertenecientes a *Chironomus*. Carew et al., 2003 en su estudio evidencian que la enzima Alu I, fue la más informativa de 8 enzimas. Creó 49 patrones y separó la mayoría de taxones identificadas con la cápsula cefálica, pero presentó problemas para diferenciar especies con un número alto de variación intraespecífica y problemas en la diferenciación de los cortes en el gel de agarosa; Se recomienda emplear dos enzimas de digestión

a la vez para generar los RFLP, debido a que el éxito para la diferenciación aumenta, Carew et al., 2003 utilizaron patrones compuestos de las enzimas Ssp I, Hinf I, Rsa I y Taq I y obtuvieron baja variación intraespecífica al compararlos con la morfología de la cápsula cefálica, asimismo se cuenta con una clave diagnóstica para la identificación de especies pertenecientes a Tanytarsini.

En el estudio realizado los patrones in vitro no son claros para identificar los diferentes morfotipos, las bandas no se diferencian bien, se presentan como una sola y no se visualiza debajo de los 100 pb; este resultado está relacionado en primer lugar a la pureza del ADN: nuestras muestras tuvieron errores en la preservación, los valores de las absorbancias A260/A230 son menores a 1.8 en un 75% de las muestras lo que indica contaminación con fenol y EDTA (Berthold Technologies GmbH y Co.KG, s. f.). En cuanto al uso de enzimas de restricción para generar los patrones se realizó una sola digestión, por lo que los cortes no son del todo claros. La velocidad, tiempo y voltaje en la electroforesis también está relacionada a la visualización de los geles ya que dependiendo de esto los fragmentos se separan o agrupan. Matson et al., 2008 y Cienfuegos et al., 2011 han realizado identificación de *Anopheles* (orden Diptera) con PCR-RFLP en el gen ITS2, con doble digestión obteniendo patrones específicos para todos los estadios de vida y con una concordancia entre la identificación morfológica y molecular de 100%.

Una técnica de hibridación que permite obtener una mejor resolución en fragmentos de ADN es Southern Blood; para lo cual el ADN se desnaturaliza del gel de agarosa, previamente obtenido por RFLP, y se adsorbe en una membrana de nitrocelulosa o nylon (hibridación) y posteriormente con una sonda se verifica tamaño, frecuencia y abundancia (Peña-Castro et al., 2013; M. R. Green & Sambrook, 2021).

La identificación de Chironomidae actualmente presenta dificultades, sin embargo, el avance en este tema es fundamental para otras áreas de investigación como son los bioindicadores; calidad

de agua; importancia médica, como generadores de alergias, plagas, vectores de enfermedades, entre otros (Failla et al., 2015); las etapas del ciclo de vida de las diferentes especies; entre otras.

9. CONCLUSIONES

La falta de conocimiento en la identificación de Chironomidae impide su uso como bioindicadores, en este estudio se aplicó la estandarización de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica en organismos de Baja California Sur y de la Península de Yucatán, y se obtuvieron patrones de bandeo para 7 morfoespecies.

La etapa de extracción de ADN y amplificación del gen COI resultó en una etapa crítica, debido a que posiblemente existieron errores en el proceso de fijación de muestras en campo, especialmente en las muestras de Sierra la Laguna y oasis aledaños. Una de las primeras aportaciones de este proyecto es la optimización de técnicas de muestreo y fijación de Chironomidae, para asegurar la preservación de ADN en zonas desérticas y tropicales, que por sus condiciones climáticas podrían favorecer la degradación de ADN.

Se ha realizado la identificación morfológica de especies de la región Sierra la Laguna y de sitios del sur de la Península de Yucatán. Se estima que el 70% de las especies en la Península de Baja California y el 30% en la Península de Yucatán podrían representar nuevas especies para la ciencia. La descripción de especies se podrá realizar eventualmente a nivel molecular y vinculando los estadios larvales con los adultos.

Los estudios moleculares son de gran utilidad, pero requieren una estandarización y procedimiento meticuloso, las muestras deben tener buena calidad de ADN, con una mejor técnica de fijación o preservación para las muestras preservadas por largos periodos de tiempo.

Los RFLP in silico resultaron eficientes para diferenciar 22 de los 24 MOTUs; por otro lado, los patrones in vitro no son adecuados para diferenciar las morfoespecies debido a que no se distinguen las bandas generadas, 5 morfoespecies presentaron más de 1 patrón y algunos organismos no se digirieron (presentando solo una banda) hay un patrón que se presenta en más de una morfoespecie.

La identificación morfológica aún no se puede relacionar con los patrones in vitro, debido a lo antes mencionado.

La diferenciación de las especies en estudios futuros se puede complementar con la digestión de las enzimas Rsa I y Taq 1, ya que fueron utilizadas exitosamente en los estudios mencionados e incluso diferenciaron especies con ambigüedades taxonómicas, con una doble digestión. Asimismo, utilizar un método de hibridación de ADN mejora la resolución de los fragmentos.

Debido a que los patrones de bandeo no son claros para todas las personas y podría existir subjetividad para interpretarlos, se colabora, además, con el centro de cómputo del Instituto Tecnológico de Chetumal, para generar una aplicación Android e IOS, capaz de interpretar los patrones RFLP y generar una identificación a nivel más bajo posible de especies, evitando la subjetividad.

10.FUENTES DE INFORMACIÓN

- Acosta, R., Prat, N., Ribera, C., & Michailova, P. (2019). El gusano de sangre. En *Lago Achichica: Una joya de la biodiversidad.* (Alcocer, Javier, pp. 168-151). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Acosta, R., Prat, N., Ribera, C., Michailova, P., Hernández-Fonseca, M., & Alcocer, J. (2017). Chironomus alchichica sp. n. (Diptera: Chironomidae) from Lake Alchichica, Mexico. *Zootaxa*, 53-70. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4365.1.3
- Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, *7*(10), e08093. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093
- Armitage, P., Cranston, P., & Pinder, L. (Eds.). (1995). *The Chironomidae*. Springer Dordrecht.
- Arriaga, L., Aguilar, V., & Alcocer, J. (2000). *Aguas continentales y diversidad biológica de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. https://doi.org/10.5962/bhl.title.118993
- Beebe, N. W., Cooper, R. D., Morrison, D. A., & Ellis, J. T. (2000). A Phylogenetic Study of the Anopheles punctulatus Group of Malaria Vectors Comparing rDNA Sequence Alignments Derived from the Mitochondrial and Nuclear Small Ribosomal Subunits. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *17*(3), 430-436. https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0853

- Berthold Technologies GmbH & Co.KG. (s. f.). *Influence of DNA purity on quantification*. Berthold Technologies GmbH & Co.KG. Recuperado 24 de abril de 2025, de https://www.berthold.com/en/bioanalytic/applications/dna-quantification/purity/
- Buko, T., Tuczko, N., & Ishikawa, T. (2023). DNA Data Storage. *BioTech*, *12*(2), 44. https://doi.org/10.3390/biotech12020044
- Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. (1988). *Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente*. 145.
- Capaldi, R. A. (1990). Structure and Function of Cytochrome C Oxidase. *Annual Review of Biochemistry*, *59*(1), 569-596. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.003033
- Carew, M. E., Pettigrove, V., Cox, R. L., & Hoffmann, A. A. (2007). DNA identification of urban Tanytarsini chironomids (Diptera:Chironomidae). *Journal of the North American Benthological Society*, *26*(4), 587-600. https://doi.org/10.1899/06-120.1
- Carew, M. E., Pettigrove, V., & Hoffmann, A. A. (2003). Identifying chironomids (Diptera: Chironomidae) for biological monitoring with PCR–RFLP. *Bulletin of Entomological Research*, *93*(6), 483-490. https://doi.org/10.1079/BER2003268
- Cheng, L., & Hogue, C. L. (1974). New distribution and habitat records of biting midges and mangrove flies from the coasts of southern Baja California, Mexico (Diptera: Ceratopogonidae, Culicidae, Chironomidae, and Phoridae. *Entomological News*, *85*(7-8), 211-218.
- Chowdhury, S., Dubey, V. K., Choudhury, S., Das, A., Jeengar, D., Sujatha, B., Kumar, A., Kumar, N., Semwal, A., & Kumar, V. (2023). Insects as bioindicator: A hidden gem for environmental monitoring. *Frontiers in Environmental Science*, *11*. https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1146052

- Cienfuegos, A. V., Rosero, D. A., Naranjo, N., Luckhart, S., Conn, J. E., & Correa, M. M. (2011). Evaluation of a PCR-RFLP- ITS2 assay for discrimination of Anopheles species in northern and western Colombia. *Acta tropica*, *118*(2), 128-135. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.004
- Cortés-Carrasco, F., Elías-Gutiérrez, M., & García-Madrigal, M. D. S. (2022). Holothuriophilus trapeziformis Nauck, 1880 (Decapoda: Pinnotheridae) from the Pacific coast of Mexico: taxonomic revision based on integrative taxonomy. *PeerJ*, *10*, e12774. https://doi.org/10.7717/peerj.12774
- Daza, L. (2018). *Uso del gen Citocromo Oxidasa I (COI) Y código de barras en estudios de genética Y biología molecular para la identificación de especies animales*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia Escuela de Ciencias Agrícolas, Agropecuarias y del Medio Ambiente.
- Elías-Gutiérrez, M., Valdez-Moreno, M., Topan, J., Young, M. R., & Cohuo-Colli, J. A. (2018). Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton. *Ecology and Evolution*, *8*(5), 3002-3018. https://doi.org/10.1002/ece3.3742
- Esparza, M. (2014). La sequía y la escasez de agua en México. Situación actual y perspectivas futuras. *Secuencia. Revista de historia y ciencias sociales*, *89*, 193-219. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319131309008
- Eurofins Genomics. (s. f.). *SimpleSeq™ Prepaid Sequencing Kits*. Recuperado 1 de mayo de 2025, de https://eurofinsgenomics.com/en/products/dna-sequencing/simpleseq-kits/

- Failla, A., Vasquez, A., Fujimoto, M., & Ram, J. (2015). The ecological, economic and public health impacts of nuisance chironomids and their potential as aquatic invaders. *Aquatic Invasions*, *10*(1), 1-15. https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.1.01
- González, C., Vallarino, A., Pérez, J. C., & Low, A. (Eds.). (2014). *BIOINDICADORES: GUARDIANES DE NUESTRO FUTURO AMBIENTAL* (Primera). Colegio de la Frontera Sur; Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2021). Analysis of DNA by Southern Blotting. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2021*(7). https://doi.org/10.1101/pdb.top100396
- Green, M., & Sambrook, J. (2021). *Restriction Enzymes*. Cold Spring Harb Protoc.
- Gutiérrez-Aguirre, M. A., & Cervantes-Martínez, A. (2016). A new species of Mastigodiaptomus Light, 1939 from Mexico, with notes of species diversity of the genus (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae). *ZooKeys*, *637*, 61-79. https://doi.org/10.3897/zookeys.637.10276
- Hamerlik, L., Silva, F. L. D., & Jacobsen, D. (2018). Chironomidae (Insecta: Diptera) of Ecuadorian Highaltitude Streams: A Survey and Illustrated Key. *Florida Entomologist*, *101*(4), 663. https://doi.org/10.1653/024.101.0404
- Hamerlík, L., Silva, F. L., & Massaferro, J. (2022). *An illustrated guide of subfossil Chironomidae (Insecta: Diptera) from waterbodies of Central America and the Yucatan Peninsula*. https://doi.org/10.1007/s10933-021-00225-6
- Hernández, P. (2021). *Caracterización del ensamble de quironómidos (Diptera: Chironomidae) en sistemas acuáticos del sur de Quintana Roo y su posible uso como bioindicadores de cambios tróficos* [Tesis para obtener el Grado de: Maestría en Manejo de Zona Costera]. Instituto Tecnológico de Chetumal.

- Hose, G. C., Symington, K., Lott, M. J., & Lategan, M. J. (2016). The toxicity of arsenic(III), chromium(VI) and zinc to groundwater copepods. *Environmental Science and Pollution Research International*, *23*(18), 18704-18713. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7046-x
- Ivanova, N. V., & Kuzmina, M. L. (2013). Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature. *Molecular Ecology Resources*, *13*(5), 890-898. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12134
- Karima, Z. (2021). Chironomidae: Biology, Ecology and Systematics. En *The Wonders of Diptera—Characteristics, Diversity, and Significance for the World's Ecosystems*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.95577
- Maurya, G. (2019). Restriction Enzyme. En *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_210-1
- Medlock, J., Balenghien, T., Alten, B., Versteirt, V., & Schaffner, F. (2018). Field sampling methods for mosquitoes, sandflies, biting midges and ticks. *EFSA Supporting Publications*, *15*(6), 1435E. https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1435
- Michailova, P., Sella, G., & Petrova, N. (2012). Chironomids (Diptera) and their salivary gland chromosomes as indicators of trace-metal genotoxicity. *Italian Journal of Zoology*, *79*(2), 218-230. https://doi.org/10.1080/11250003.2011.622084
- Mittal, B., Chaturvedi, P., & Tulsyan, S. (2013). Restriction Fragment Length Polymorphism. En S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (pp. 190-193). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01314-0

- Moreno, J., Massaferro, J., Caballero, M., Oseguera, L., Moreno, J., Massaferro, J., Caballero, M., & Oseguera, L. (2020). First record of the Pseudodiamesa branickii species-group (Diptera: Chironomidae: Diamesinae) from central Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *91*. https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3228
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, *262*(4), 56-65. https://www.jstor.org/stable/24996713
- Navarrete-Salgado, N. A., Fernández-Guillermo, E., & Contreras-Rivero, G. (2004). Abundancia de Quironómidos (Diptera: Chironomidae) en el bordo «JC» del norte del Estado de México en el periodo de secas. *Hidrobiológica*, *14*(2), 157-160. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0188-88972004000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Oliver, D. R. (1971). Life History of the Chironomidae. *Annual Review of Entomology*, *16*(1), 211-230. https://doi.org/10.1146/annurev.en.16.010171.001235
- Ordinola-Zapata, A., Siccha, Z., Castillo-Carrillo, P., & Luque, C. (2019). *Identificación mediante ADN barcode de peces invasores en el manglar de Tumbes (Perú). 16*(2), 91-97.
- Ortega, A., Pinkus, M., & Espitia, I. (Eds.). (2015). *Las Áreas Naturales Protegidas y la investigación científica en México* (Primera). Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste S.C., La Paz B.C.S, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: Introducción Y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, *16*(3), 161-176. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-548X2011000300011&lng=en&nrm=iso&tlng=es

- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: Historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*, *24*(2), 237-246. https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72468-6
- Pérez, A., & Picó, M. (2014). *Marcadores basados en restricción e hibridación: RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pérez, L., Lorenschat, J., Massaferro, J., Pailles, C., Sylvestre, F., Hollwedel, W., Brandorff, G.-O., Brenner, M., Gerald, I., Lozano, M. del S., Scharf, B., & Schwalb, A. (2013). Bioindicators of climate and trophic state in lowland and highland aquatic ecosystems of the Northern Neotropics. *Revista de Biología Tropical*, *61*(2), 603-644. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442013000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Pinilla, G., Cubillos, K., & Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *REVISTA NOVA*, *6*(9), Article 9. https://doi.org/10.22490/24629448.397
- Prat, N., Acosta, R., & Rieradevall, M. (2018). Guia para el reconocimiento de las larvas de Chironomidae (Diptera) de los ríos altoandinos de Ecuador y Perú. *Universidad de Barcelona*.
- Prat, N., & Castro-López, D. (2023). Chironomidae as indicators of water pollution in Pesquería River (México). *Journal of Entomological and Acarological Research*, *55*(1). https://doi.org/10.4081/jear.2023.10861

- Prosser, S., Martínez-Arce, A., & Elías-Gutiérrez, M. (2013). A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources*, *13*(6), 1151-1155. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12132
- Proulx, I., Martin, J., Carew, M., & Hare, L. (2013). Using various lines of evidence to identify Chironomus species (Diptera: Chironomidae) in eastern Canadian lakes. *Zootaxa*, *3741*(4), 401. https://doi.org/10.11646/zootaxa.3741.4.1
- Roberts, R. J., & Murray, K. (1976). Restriction Endonuclease. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 4(2), 123–164. doi:10.3109/10409237609105456
- Romero, H., & Ortega-Rubio, A. (2012). Reserva de la Biósfera Sierra La Laguna. Salud ambiental versus mineria a cielo abierto. *Ciencia y Desarrollo*, 3-9.
- Rosero, D. A., Gutiérrez, L., Cienfuegos, A. V., Luz, J., & Correa, M. M. (2010). Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *ResearchGate*, *36*(2), 260-263. https://doi.org/10.25100/socolen.v36i2.9156
- Serrano Balderas, E. C., Grac, C., Berti-Equille, L., & Armienta Hernandez, Ma. A. (2016). Potential application of macroinvertebrates indices in bioassessment of Mexican streams. *Ecological Indicators*, *61*, 558-567. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.10.007
- Shahidi, F., & Vatandoost, H. (2021). The Importance of Artificial Rearing of Chironomidae Insect (Blood Worm) as Fish and Shrimp Food. *Journal of Marine Science Research and Oceanography*, *4*(2), 223-227.
- Sharley, D. J., Pettigrove, V., & Parsons, Y. M. (2004). Molecular identification of Chironomus spp. (Diptera) for biomonitoring of aquatic ecosystems. *Australian Journal of Entomology*, *43*(4), 359-365. https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2004.00417.x

- Shoubridge, E. A. (2001). Cytochrome c oxidase deficiency. *American Journal of Medical Genetics*, *106*(1), 46-52. https://doi.org/10.1002/ajmg.1378
- Singh, A., Singh, M. P., Sharma, V., Verma, H. N., & Arora, K. (2012). Molecular Techniques. En *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* (pp. 407-461). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00013-3
- Sotelo-Casas, R. C., Cupul-Magaña, A. L., & Rodríguez-Troncoso, A. P. (2014). Primer registro del género Clunio (Diptera: Chironomidae) asociado a las comunidades coralinas de islas Marietas, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, *85*(1), 14-23. https://doi.org/10.7550/rmb.38165
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, *2*(2), 70-78. https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427
- Torrejon, D. S. E., & Rodríguez, N. V. (2022). *SERIE: CONOCIENDO LA FLORA Y FAUNA DE LOS AMBIENTES ACUÁTICOS DE LA PROVINCIA DE JUJUY*.
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., & Warman, M. L. (2000). *Preparation of PCR Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT)*. *1*(29), 52-54.
- Valdez-Moreno, M., Mendoza-Carranza, M., Rendón-Hernández, E., Alarcón-Chavira, E., & Elías-Gutiérrez, M. (2021). DNA Barcodes Applied to a Rapid Baseline Construction in Biodiversity Monitoring for the Conservation of Aquatic Ecosystems in the Sian Ka'an Reserve (Mexico) and Adjacent Areas. *Diversity*, *13*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/d13070292

- Vinogradova, E., & Wolfgang Riss, H. (2024). (PDF) Chironomids of the Yucatán peninsula. *ResearchGate*.

11.Anexos

Tabla 5. Tabla de análisis de secuencias de MOTUS generados a partir del árbol de identificación. Z=clave de identificación en Bold Systems.

z	Divergencia promedio	Divergencia máxima	MOTU	Divergencia interespecífica más cercana
COQ003-22	0	0	*Ablabesmyia sp1*	10.798122
COQ004-22	0	0	*Ablabesmyia sp1*	10.798122
COQ007-22	0	0	*Ablabesmyia sp1*	10.798122
COQ001-22	1.4	1.4	*Goeldichironomus sp1*	8.920188
MZ517768.1	1.4	1.4	*Goeldichironomus sp1*	8.920188
COQ005-22	0	0	*Goeldichironomus sp2*	4.3818464
COQ006-22	0	0	*Goeldichironomus sp2*	4.3818464
COQ013-22	0	0	*Goeldichironomus sp2*	4.3818464
COQ011-22	0.7594292	1.1111112	*Tanytarsus sp*	11.620795
CSYP004-22	0.7594292	1.1111112	*Tanytarsus sp*	11.620795
CSYP006-22	0.7594292	1.1111112	*Tanytarsus sp*	11.620795
CSYP021-22	0.7594292	1.1111112	*Tanytarsus sp*	11.620795
COQ008-22	0	0	*Polypedilum sp3*	15.408805
COQ002-22	0.84	1.1	*Pseudochironomini sp2*	11.893584
MG449589.1	0.84	1.1	*Pseudochironomini sp2*	11.893584
MG449326.1	0.84	1.1	*Pseudochironomini sp2*	11.893584
MZ517364.1	0.84	1.1	*Pseudochironomini sp2*	11.893584
CSYP078-22	0.076452605	0.15290521	*Chironomidae sp1*	10.798122
CSYP079-22	0.076452605	0.15290521	*Chironomidae sp1*	10.798122
CSYP080-22	0.076452605	0.15290521	*Chironomidae sp1*	10.798122
CSYP081-22	0.076452605	0.15290521	*Chironomidae sp1*	10.798122
CSYP016-22	0.38226303	0.4587156	*Chironomidae sp2*	10.954617
CSYP031-22	0.38226303	0.4587156	*Chironomidae sp2*	10.954617
CSYP032-22	0.38226303	0.4587156	*Chironomidae sp2*	10.954617
CSYP034-22	0.38226303	0.4587156	*Chironomidae sp2*	10.954617
CSYP009-22	0.92	1.38	*Chironomidae sp3*	13.3027525
MT888431.1	0.92	1.38	*Chironomidae sp3*	13.3027525
MG450190.1	0.92	1.38	*Chironomidae sp3*	13.3027525

MZ517694.1	0.92	1.38	*Chironomidae sp3*	13.3027525
CSYP033-22	0	0	*Chironomidae sp4*	11.926605
CSYP013-22	1.83	1.83	*Chironomidae sp5*	11.926605
CSYP014-22	1.83	1.83	*Chironomidae sp5*	11.926605
CSYP026-22	1.83	1.83	*Chironomidae sp5*	11.926605
CSYP027-22	1.83	1.83	*Chironomidae sp5*	11.926605
CSYP015-22	1.83	1.83	*Chironomidae sp5*	1.8348624
CSYP076-22	0.61162084	0.61162084	*Chironomidae sp6*	15.29052
CSYP077-22	0.61162084	0.61162084	*Chironomidae sp6*	15.29052
CSYP005-22	0.76	0.76	*Corynoneura sp*	15.596331
MG174186.1	0.76	0.76	*Corynoneura sp*	15.596331
CSYP037-22	0.61	0.77	*Polypedilum sp2*	12.385322
MZ517388.1	0.61	0.77	*Polypedilum sp2*	12.385322
MZ518029.1	0.61	0.77	*Polypedilum sp2*	12.385322
MZ517930.1	0.61	0.77	*Polypedilum sp2*	12.385322
CSYP019-22	0	0	*Chironomidae sp8*	12.385322
MZ517806.1	0	0	*Chironomidae sp8*	12.385322
MZ517692.1	0	0	*Chironomidae sp8*	12.385322
MZ517542.1	0	0	*Chironomidae sp8*	12.385322
CSYP001-22	0.15290521	0.15290521	*Chironomidae sp9*	12.538226
CSYP018-22	0.15290521	0.15290521	*Chironomidae sp9*	12.538226
CSYP058-22	0	0	*Chironomidae sp10*	11.620795
CSYP012-22	0.46	0.46	*Chironomidae sp11*	12.079511
HQ945349.1	0.46	0.46	*Chironomidae sp11*	12.079511
CSYP051-22	0	0	*Chironomidae sp12*	9.702661
MZ517554.1	0	0	*Chironomidae sp12*	9.702661
CSYP093-22	0.30581042	0.30581042	*Chironomidae sp13*	12.844036
CSYP094-22	0.30581042	0.30581042	*Chironomidae sp13*	12.844036
CSYP073-22	0.17474882	0.30581042	*Chironomus sp*	11.580595
CSYP044-22	0.17474882	0.30581042	*Chironomus sp*	11.580595
CSYP053-22	0.17474882	0.30581042	*Chironomus sp*	11.580595
CSYP067-22	0.17474882	0.30581042	*Chironomus sp*	11.580595
CSYP068-22	0.17474882	0.30581042	*Chironomus sp*	11.580595

CSYP072-22	0.17474882	0.30581042	*Chironomus sp*	11.580595
CSYP069-22	0.17474882	0.30581042	*Chironomus sp*	11.580595
CSYP011-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP020-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP022-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP023-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP024-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP025-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP038-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP039-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP040-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP048-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP049-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP054-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP055-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP056-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP057-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP061-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP065-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP083-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP087-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP089-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP090-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP091-22	0.8569944	1.6819572	*Chironomidae sp15*	12.050078
CSYP035-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP041-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP042-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP043-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP045-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP046-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP047-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP050-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP052-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464

CSYP059-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP060-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP062-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP063-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP064-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP066-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP070-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP071-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP074-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP075-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP082-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP084-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP085-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP086-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP092-22	0.9894522	1.9877676	*Chironomidae sp16*	4.3818464
CSYP002-22	0.30864197	0.46296296	*Chironomidae sp17*	12.380953
CSYP003-22	0.30864197	0.46296296	*Chironomidae sp17*	12.380953
CSYP007-22	0.30864197	0.46296296	*Chironomidae sp17*	12.380953

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la Reserva de la Biósfera Sierra La Laguna dentro de la región hidrológica Sierra La Laguna y oasis aledaños. 20

Figura 2. Mapa del área de estudio. A. Región hidrológica prioritaria Sierra La Laguna y oasis aledaños; B. Sur de la Península de Yucatán. Se señalan los puntos de muestreo. 22

Figura 3. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae identificadas en Sierra la Laguna y Oasis aledaños. **a.** Cápsula cefálica de *Oncononeura sp.* **b**. Organismo completo de *Onconeura sp.* **c.** Cápsula cefálica de *Rheopelopia sp.* **d.** Organismo completo de *Rheopelopia sp* **e**. Cápsula cefálica de *Monopelopia sp. 2.* **f.** Organismo completo de *Monopelopia sp. 2.* **g.** Cápsula cefálica de *Ablabesmyia sp* **h.** Organismo completo de *Ablabesmyia sp*. **i.** Cápsula cefálica de *Goeldichironomus sp.* **j.** Organismo completo de *Goeldichironomus sp.* **k.** Cápsula cefálica de *Kiefferulus sp.* **l.** Organismo completo de *Kiefferulus sp.* 27

Figura 4. Gel de agarosa al 1.5 % de la extracción de ADN con Kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen) de Chironomidae, empleando 6 carriles. Del lado derecho se indica la morfoespecie a la que pertenece cada ADN. De los organismos extraídos de Sierra la Laguna *Chironomus sp. 2* se visualizó en el gel de agarosa..... 28

Figura 5. Electroforesis al 1.5 % de la extracción de ADN de Chironomidae con el Kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen). Solo se visualizaron las extracciones de organismos pertenecientes a sitios de sur de la Península de Yucatán..... 29

Figura 6. Electroforesis al 1.5 % de la extracción de ADN de Chironomidae con Kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen). Únicamente *Procladius sp*. (perteneciente a Sierra la Laguna y Oasis aledaños) se visualizó en el gel de agarosa, con una concentración de 7.7 µg/µL. 29

Figura 7. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chrinomidae de la Península de Yucatán. M= Marcador de peso molecular (1Kb). Se observa el amplificado de ADN en dos muestras. 30

Figura 8. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 6 muestras, las morfoespecies *Labrundinia sp*., *Parachironomus sp.* (2 muestras), *Polypedilum sp. 2*, *Chironomus sp. 1* y *Dicrotendipes sp. 1.* 31

Figura 9. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 5 muestras, en los morfotipos de *Larsia sp.*, *Parachironomus sp.* y *Dicrotendipes sp* (2 muestras). 32

Figura 10. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 6 muestras, en los morfotipos *Corynoneura sp*., *Dicrotendipes sp. 1*, *Chironomus sp. 1*, Parachironomus *sp.* (2 muestras), *Coelotanypus sp.* 32

Figura 11. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 5 muestras, en los morfotipos *Dicrotendipes sp. 1* (2 muestras), *Parachironomus sp.* (2 muestras) y *Monopelopia sp. 1*. 32

Figura 12. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en 6 muestras *Polypelipedilum sp. 2, Dicrotendipes sp. 1, Parachironomus sp.* (2 muestras), *Chironomus sp. 1*, *Monopelopia sp. 1.* 33

Figura 13. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán y Sierra la Laguna (*Chironomus sp. 2*). MW= marcador de peso molecular (1Kb). En todas las muestras se visualiza el amplicón. Los amplicones están a diferentes diluciones (el carril 1 y 3 a 1:10, el carril 2 y 4 a 1:5, y el carril 5 a 1:20). 33

Figura 14. Amplificación por PCR del gen **COI** con templete de ADN de Chironomidae de Sierra la Laguna. MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en una muestra, *Dicrotendipes sp. 2.* 34

Figura 15. Amplificación por PCR del gen COI con templete de ADN de Chironomidae de Sierra la Laguna MW= marcador de peso molecular (1Kb). Se visualiza el amplicón en una muestra, *Procladius sp.* 34

Figura 16. Árbol de identificación de Chironomidae realizado con MEGA X, con alineación a 550 pares de bases con Clustal por codones método estadístico de Máxima Verosimilitud, con un Bootstrap de 500 repeticiones y calculando las distancias genéticas con el modelo de dos parámetros de Kimura (K2P). La simbología indica los clústeres que cuentan con identificación morfológica y RFLP (línea azul) y los que cuentan únicamente con identificación morfológica (línea café). 35

Figura 17. Imágenes de geles de agarosa (al 3.5%) in sillico realizados en el software SnapGene. Del lado derecho de cada fila se indica a qué morfotipo pertenece cada muestra, y en el encabezado de la columna la enzima que se utilizó para crear los diferentes cortes. Se indican 5 patrones en recuadros con diferentes colores que están presentes en dos o más morfotipos..... 38

Figura 18. Imágenes de geles de agarosa (al 3.5%) in sillico realizados en el software SnapGene. Del lado derecho de cada fila se indica a qué morfotipo pertenece cada muestra, y en el encabezado

de la columna la enzima que se utilizó para crear los diferentes cortes. Se indican 4 patrones en recuadros con diferentes colores que están presentes en dos o más morfotipos..... 39

Figura 19. Imágenes de geles de agarosa (al 3.5%) in sillico realizados en el software SnapGene. Del lado derecho de cada fila se indica a qué morfotipo pertenece cada muestra, y en el encabezado de la columna la enzima que se utilizó para crear los diferentes cortes. Se indican 3 patrones en recuadros con diferentes que están presentes en dos o más morfotipos. 40

Figura 20. Digestión del amplicón de ADN de Chironomidae de la Península de Yucatán con Alu I, empleando un marcador de 10,000 pares de bases. Del lado derecho se indica la morfoespecie al que pertenece cada carril. 44

Figura 21. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae de la Península de Yucatán con sus RFLP in silico e in vitro. **a.** cápsula cefálica de *Larsia sp*. **b.** Placas ventromentales y méntum de *Parachironomus sp*. **c.** Mandíbula y antena de *Parachironomus sp.* **d.** Méntum y placas ventromentales de *Dicrotendipes sp. 1* **e**. Mandíbula de *Dicrotendipes sp. 1* **f.** Cápsula cefálica de *Coelotanypus sp.* **g.** Gel in silico de RFLP de 7 organismos (5 morfotipos) de PY; con un marcador de 300 bp h. Gel in vitro de RFLP de 7 organismos (5 morfotipos) de PY; con dos marcadores, uno de 10,000 bp y otro de 300 bp. Los triángulos indican las bandas iguales in silico e in vitro: verde Coelotanypus sp. y azul Parachironomus sp. 46

Figura 22. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae de la Península de Yucatán con sus RFLP in silico e in vitro. **a.** Antena de *Monopelopia sp.* **b.** Imagen de la lígula y mandíbula de *Monopelopia sp.* **c.** Gel in silico de RFLP de 7 organismos (4 morfotipos) de PY; con un marcador de 300 bp **d.** Gel in vitro de RFLP de 7 organismos (4 morfotipos) de PY; con dos marcadores, uno de 10,000 bp y otro de 300 bp. Los triángulos indican las bandas iguales in silico e in vitro:

verde *Coelotanypus sp.*, naranja *Parachironomus sp.* patrón 2, amarillo *Monopelopia sp.*, cian *Parachironomus sp.* patrón 4. 47

Figura 23. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae de la Península de Yucatán con sus RFLP in silico e in vitro. **a.** Estructura cefálica de *Polypedilum sp.1* **b.** Estructura cefálica de *Chironomus sp.1* **c.** Méntum y placa ventromental de *Chironomus sp.1* **d.** antena y mandíbula de *Chironomus sp.*1 **e.** Gel in silico de RFLP de 6 organismos (5 morfotipos) de PY; con un marcador de 300 bp **f.** Gel in vitro de RFLP de 6 organismos (5 morfotipos) de PY; con dos marcadores, uno de 10,000 bp y otro de 300 bp. Los triángulos indican las bandas iguales in silico e in vitro: rosa *Parachironomus sp.* patrón 5 y amarillo *Monopelopia sp.* 48

Figura 24. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae de la Península de Yucatán con sus RFLP. **a.** Cápsula cefálica de *Tanytarsus sp.* **b.** Mandíbula de *Apedilum sp.* **c.** Antena de *Apedilum sp*. **d.** Mitad superior de la cápsula cefálica de *Polypedilum sp. 2*, se observan las mandíbulas, antena y placas. **e.** Méntum y placas ventromentales de *Apedilum sp.* **f.** Parte superior de cápsula cefálica de *Labrundinia sp.* **g.** Parte superior de cápsula cefálica de *Nilotanypus sp.* **h.** Gel in silico de RFLP de 6 organismos de PY; con un marcador de 300 bp. 49

Figura 25. Imágenes de las morfoespecies de Chironomidae con sus RFLP, la primera línea corresponde a organismos de Baja California Sur y la segunda línea a organismos de la Península de Yucatán. **a.** Parte superior de la estructura cefálica de *Chironomus sp. 2* donde se observa el méntum, las placas ventromentales, mandíbula y antena. **b.** Organismo completo de *Chironomus sp. 2* **c.** Cápsula cefálica de *Dicrotendipes sp. 2* **d.** Organismo completo de *Dicrotendipes sp. 2* **e.** Parte superior de la cápsula cefálica de *Procladius sp.* se observa las mandíbulas y la lígula **f.** Organismo completo de *Procladius sp.* **g.** Gel in vitro de RFLP de 9 organismos con un marcador de 10,000 bp. 50

Índice de tablas

Tabla 1. Relación de la concentración de ADN extraído y absorbancias (A2607A280 y A260/A230) cuantificado en un espectrofotómetro Eppendorf. 28

Tabla 2. Tabla de análisis de secuencias de MOTUS generados a partir del árbol de identificación. 68

Tabla 3. Relación de la identificación de PY con el nombre asignado en el árbol de identificación. En la columna izquierda se indica la morfoespecie de los organismos de PY, en la columna izquierda se indica el nombre el MOTU en el árbol de identificación. 36

Tabla 4 Corte con Alu I, en la columna izquierda se presenta el nombre del morfotipo, en las siguientes los cortes visibles y en las filas se presentan los patrones para cada uno. 51