

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Relaciones filogenéticas del género *Aetobatus*: un enfoque en
las rayas águila del Pacífico Oriental**

Gislayne Narcisa Mendoza Alcívar

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 21 de Diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Relaciones filogenéticas del género *Aetobatus*: un enfoque en las
rayas águila del Pacífico Oriental**

Gislayne Narcisa Mendoza Alcívar

Nombre del profesor, Título académico

Diana Pazmiño Jaramillo, Ph D.

Quito, 21 de Diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El género *Aetobatus* pertenece a la familia Aetobatidae y consta de 5 especies reconocidas y son: *A. narinari*, *A. laticeps*, *A. narutobiei*, *A. flagellum* y *A. ocellatus*. Su nombre común es raya águila pelágica y se la considera vulnerable ya que está expuesto a presiones pesqueras y actividades antropogénicas. En Galápagos, no se han registrado estudios sobre rayas águila, por ende, se tiene poca información de este género. El objetivo de este estudio se centró en utilizar técnicas moleculares para realizar una revisión del género específicamente en las rayas águila del Pacífico Oriental y así conocer la identidad de las especies de la isla San Cristóbal. Para esto, se colectaron 56 muestras de rayas águilas juveniles y adultas en cinco sitios de la Isla San Cristóbal y 6 muestras en Costa Rica. Para los análisis moleculares, se realizó extracción de ADN de cada individuo, se amplificó el gen mitocondrial Cyt B mediante PCR y se secuenció. Además se incluyeron para los análisis 41 accesiones de GenBank de cuatro especies de este género. Mediante la construcción de dos árboles filogenéticos, con Inferencia Bayesiana (BI) y Máxima Verosimilitud (ML), fue posible observar una asociación cercana de la especie en San Cristóbal con muestras de *A. ocellatus* del Indo-Pacífico y Pacífico Central. Asimismo, la única muestra de Costa Rica analizada en este estudio se agrupó con las secuencias de *A. laticeps* sugiriendo su asociación y distribución a zonas costeras del Pacífico Este Tropical. El cálculo de distancias genéticas y la red de haplotipos obtenidos en este estudio, generaron resultados similares que indicaron que la especie de San Cristóbal-Galápagos están estrechamente relacionadas con *A. ocellatus* y no con *A. laticeps* como indica la literatura. Se presentaron hallazgos importantes que ayudarán a la conservación y preservación de la especie en estudio. Es recomendable realizar futuras investigaciones donde se utilicen marcadores moleculares de mayor resolución para determinar relaciones dentro de *A. ocellatus* en las islas.

Palabras claves: *Aetobatus laticeps*, *Aetobatus ocellatus*, Cyt B, filogenia, red de haplotipo, San Cristóbal, Galápagos, distribución, conservación, leyes

ABSTRACT

The genus *Aetobatus* belongs to the Aetobatidae family and is divided into five recognized species and they are: *A. narinari*, *A. laticeps*, *A. narutobiei*, *A. flagellum* and *A. ocellatus*. Its commonly known as pelagic eagle ray and has been considered vulnerable due to continuous exposure to fishing pressures and anthropogenic activities. In Galapagos, no studies on eagle rays have been recorded, therefore, little information is available on this genus. The objective of this study was to use molecular techniques to develop a review of the genus, with emphasis on the eagle rays of the Eastern Pacific. Furthermore, to accurately identify the species of San Cristóbal Island. A total of 56 samples of juvenile and adult eagle rays were collected in five sites on San Cristóbal Island and 6 samples in Costa Rica. For the molecular analyzes, DNA extraction from each individual was performed, the mitochondrial Cyt B gene was amplified by PCR and sequenced. Additionally, 41 GenBank accessions of the four species of this genus were included for the analyses. Through the construction of two phylogenetic trees, with Bayesian Inference (BI) and Maximum Likelihood (ML), it was possible to observe a close association of the species on San Cristóbal Island, with *A. ocellatus* from the Indo-Pacific and Central Pacific localities. Likewise, the only sample from Costa Rica analyzed in this study grouped with the sequences of *A. laticeps*, suggesting its association and distribution to coastal areas of the Eastern Tropical. The calculation of genetic distances and the haplotype network obtained in this study, generated similar results that indicated that the San Cristóbal-Galapagos species are closely related to *A. ocellatus* and not to *A. laticeps* as previously indicated in the literature. Important findings were presented that will help the conservation and preservation of the species under study. Future research is recommended where higher resolution molecular markers are used to determine relationships within *A. ocellatus* on the islands.

Keywords: *Aetobatus laticeps*, *Aetobatus ocellatus*, Cyt B, phylogeny, haplotype network, San Cristóbal, Galapagos, distribution, conservation, laws.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Generalidades	10
1.2 Género <i>Aetobatus</i> : relaciones filogenéticas.....	11
1.3 Género <i>Aetobatus</i> : amenazas de conservación	12
1.4 Estudios genéticos y su importancia para la conservación de batoideos.....	13
2. MÉTODOS	15
2.1 Procedimiento de muestreo y Laboratorio.....	15
2.2 Extracción y cuantificación de ADN de <i>Aetobatus</i> sp.	16
2.3 Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN extraído.....	16
2.4 Selección de primers y Amplificación de PCR	17
2.5 Limpieza y edición de secuencias de ADN	17
2.6 Análisis filogenéticos	18
2.7 Distancias genéticas.....	19
2.8 Red de Haplotipos	19
3. RESULTADOS.....	20
3.1 Extracción y cuantificación de ADN de tejido de <i>Aetobatus</i> sp.....	20
3.2 Amplificación y secuenciación de ADN de <i>Aetobatus</i>	20
3.3 Análisis filogenéticos	20
3.4 Distancias Genéticas.....	21
3.5 Red de Haplotipos	22
4. DISCUSIÓN	23
4.1 Biogeografía del género <i>Aetobatus</i>	23
4.2 Metodología de laboratorio.....	25
5. CONCLUSIONES	27
6. TABLAS	28
7. FIGURAS	31
8. REFERENCIAS.....	36
9. ANEXOS	41
Anexo A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN genómico de algunas muestras, pertenecientes a las rayas del género <i>Aetobatus</i> obtenidas de la isla San Cristóbal-Galápagos y Costa Rica.	41
ANEXO B. Concentración e índices de calidad de ADN de las 62 muestras de tejido (aleta pélvica) recolectadas en San Cristóbal y Costa Rica del género <i>Aetobatus</i>	42
ANEXO C. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) del género <i>Aetobatus</i> : <i>Aetobatus</i> sp. de Galápagos y <i>A. ocellatus</i> , <i>A. narinari</i> , <i>A. laticeps</i> y <i>A. flagellum</i>	44
ANEXO D. Tabla de haplotipos y sus respectivas localidades.	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de GenBank de las especies <i>A. narinari</i> , <i>A. flagellum</i> , <i>A. ocellatus</i> y <i>A. laticeps</i> de distintas regiones distribuidas globalmente tomadas para la realización de comparación en el estudio.	28
Tabla 2. Modelos de evolución obtenidos mediante el programa Partition Finder2.	30
Tabla 3. Distancias genéticas de las especies <i>A. flagellum</i> , <i>A. laticeps</i> , <i>A. narinari</i> , <i>A. ocellatus</i> y <i>Aetobatus</i> sp. (San Cristóbal-Galápagos) obtenidas en MEGA-X.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Pacífico Este Tropical (PET) donde se indican las localidades muestreadas en la Isla San Cristóbal-Galápagos y Costa Rica.....	31
Figura 2. Fotografía de un ejemplar de <i>Aetobatus</i> sp. durante un viaje de muestreo.....	32
Figura 3. Vara Hawaiana modificada utilizada para obtener las biopsias de las rayas adultas.....	32
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% resultante de la amplificación del gen Cyt B de las muestras obtenidas de San Cristóbal y Costa Rica	33
Figura 5. Árbol Filogenético de Inferencia Bayesiana (BI) del género <i>Aetobatus</i>	34
Figura 6. Red de haplotipos de la especie <i>Aetobatus</i> realizada en PopArt.....	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Los elasmobranquios son peces pertenecientes a la clase Condrictios (Chondrichthyes), y se conocen comúnmente como peces cartilagosos. Este grupo se caracteriza por poseer esqueleto compuesto de tejido cartilaginoso, piel cubierta de escamas placoideas, sin vejiga natatoria ni pulmones y su forma de respiración es a través de cinco a siete pares de branquias (Greenberg, 2008). Existen dos grupos de elasmobranquios que son los tiburones o selacimorfos y las rayas o batoideos (Castro, 2015). Este último subgrupo es considerado como el más grande de peces Condrictios y actualmente se han reportado 26 familias y 633 especies con nombres válidos, pero es conocido que existen alrededor de 50 especies que no han sido descritas o reconocidas (Last et al., 2016). Están distribuidas a nivel mundial, habitando ambientes de agua salada, salobre y dulce, ya sea por una parte, o la totalidad de sus vidas (Castro, 2015). Se ha demostrado que extinciones locales de ciertas rayas en lugares como el Mar Negro pueden tener consecuencias serias en las redes tróficas (Flowers, Heithaus, & Papastamatiou, 2020). Es de fundamental importancia, por lo tanto, entender el rol de las rayas en la dinámica de la comunidad y su función en el ecosistema marino.

Los tiburones y rayas más grandes se encuentran en constante peligro, en especial los que viven en aguas poco profundas debido a que estas zonas son más accesibles para actividades humanas (Dulvy et al., 2014). La Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) indicó que el 33% de rayas y tiburones del mundo se encuentra en peligro de extinción, siendo las especies de rayas, las que se encuentran en mayor riesgo (IUCN, 2020). Dulvy et al. (2014) evaluó el estado de conservación de rayas a nivel global y encontró que, de un total de 539 especies, 28 están en peligro de extinción, 14 en peligro crítico, 65 son vulnerables, 62 están casi

amenazadas, 114 están categorizadas con menor preocupación y 256 se clasifican como especies con datos insuficientes. La última actualización de la UICN determinó que de estas 256 especies, 23 fueron asignadas a otras categorías: 13 especies en menor preocupación, 4 casi amenazadas, 3 vulnerables y 2 en peligro de extinción (IUCN, 2020).

Las amenazas que enfrentan estos grupos, junto con el desconocimiento general de un gran número de especies, resaltan la importancia de su estudio y monitoreo a largo plazo. En Ecuador existe legislación a nivel nacional (e.g. Decreto Ejecutivo 486 donde consta el Plan de Acción Nacional para la Conservación y Manejo de los Tiburones en el Ecuador, Vallejo, 2007) y local (e.g. Decreto Ejecutivo 3399, en la Reserva Marina de Galápagos) que busca apoyar la conservación de este grupo. Sin embargo, ésta última aplica a tiburones y mantarrayas únicamente (Coello, 2005). Adicionalmente, en el año 2019, el Gobierno de Ecuador prohibió la retención de las especies Raya pinta o rayas de manchas blancas (*Aetobatus laticeps*) y Raya pato (*Myliobatis longirostris*), según un Acuerdo Ministerial publicado en el Registro Oficial N° 475, donde se prohíbe la retención, transporte, procesamiento y/o comercialización de las especies señaladas, y se obliga a devolverlas al mar en caso de captura incidental (Gobierno del Ecuador, 2019).

1.2 Género *Aetobatus*: relaciones filogenéticas

En Galápagos existen aproximadamente 15 especies de batoideos, incluyendo a la raya águila del género *Aetobatus*, una de las especies más comunes y carismáticas (Galapagos Conservancy, 2018). Ésta pertenece a la familia Aetobatidae, que consta de cinco especies, todas pertenecientes al género *Aetobatus*: *Aetobatus flagellum* o raya águila de cabeza larga (en peligro de extinción); *Aetobatus narinari* o raya águila manchada (casi amenazada); *Aetobatus narutobiei* o raya águila Naru (No Evaluada); *Aetobatus ocellatus* o raya águila ocelada (Vulnerable) y *Aetobatus laticeps* o raya águila de manchas blancas del Pacífico que no ha sido evaluada (White & Naylor, 2016). Si bien

el género fue considerado anteriormente como parte de la familia Myliobatidae (Elasmodiver, 2007), un estudio confirmó su elevación a familia completa debido a caracteres diferentes en su morfología comparados con otros miembros de Myliobatidae (White & Naylor, 2016). Anteriormente, *A. laticeps*, *A. ocellatus* y *A. narinari* se consideraban como una misma especie. Sin embargo, un estudio morfológico, genético y parasitológico confirmó que se trata de especies diferentes estrechamente relacionadas que pueden identificarse fácilmente por su rango de distribución (Richards et al., 2009).

Mientras *A. narinari* se distribuye en el Atlántico occidental formado por un linaje genético único que está extendido entre Florida y sureste de Brasil, *A. laticeps* se restringe al Pacífico Este Tropical, y *A. ocellatus* se distribuye en el Indo-Pacífico y Pacífico Central (Sales et al., 2019). Los análisis que resolvieron la diferenciación de estas especies incluyeron análisis moleculares de marcadores mitocondriales. En el caso de *A. laticeps* y *A. narinari* se incluyeron especímenes de la costa Atlántica de Brasil (n=19) y Costa Pacífica de México (n=2) (Sales et al., 2019). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que incluyan muestras de otras localidades del Pacífico Este Tropical, que revisen estructura, o relaciones filogenéticas entre las rayas águila en la región. El único estudio en Ecuador, se enfoca en el comportamiento, distribución y fidelidad de sitio de la especie *Aetobatus laticeps* en la Reserva Marina El Pelado en Santa Elena, pero no incluye análisis genéticos (Ronquillo & Arteaga, 2019).

1.3 Género *Aetobatus*: amenazas de conservación

Entre las principales amenazas para el género *Aetobatus* se ha identificado la intensa presión pesquera en el Pacífico Oriental además de su bajo potencial reproductivo (Kyne et al., 2006). En Ecuador, tanto rayas como tiburones han formado parte de capturas incidentales en pesquerías artesanales donde su carne ha sido aprovechada para su comercialización, haciéndolas pasar por carne de pescado (como picudo o corvina) y

vendiéndolas a bajo precio; además, sus subproductos como aletas y cartílagos han sido exportados al mercado internacional (Mateo, 2014). Otra de las amenazas es la intensificación de la mortalidad natural debido a factores antropogénicos tales como contaminación o alteración de ciertas áreas para las poblaciones, así como también factores naturales como los fuertes impactos de eventos El Niño (Coello, 2005).

Aunque no existen estudios dirigidos específicamente en la población de rayas águila en las Islas Galápagos, es probable que compartan las mismas amenazas que las poblaciones del continente. Esto sumado al impacto del aumento de actividades turísticas que se han suscitado en las islas en los últimos años, y que en ocasiones coinciden con zonas críticas para las especies, como áreas de crianza. La cantidad de embarcaciones que se han construido para fines turísticos y de pesca suman en la actualidad 443 sólo en Puerto Baquerizo Moreno.

1.4 Estudios genéticos y su importancia para la conservación de batoideos

El uso de marcadores moleculares para mapeos genéticos, diversidad genética, estructura poblacional, filogenias, etc, se ha convertido en una práctica frecuente en conservación (Solís & Andrade, 2005), ha permitido estudiar una gran cantidad de especies y tener más información sobre las mismas y su relación con el ecosistema (Manriquez-Morán, 2013).

El gen mitocondrial CytB se ha considerado como uno de los genes más útiles para llevar a cabo trabajos filogenéticos y probablemente es uno de los genes mitocondriales más conocidos por su estructura y función de productos proteicos (Esposti et al., 1993). Su utilidad filogenética ha sido explotada ampliamente en estudios sistemáticos con el objetivo de resolver divergencias en varios niveles taxonómicos entre taxones vertebrados y particularmente en peces como es el caso del estudio en peces cíclidos (Farias et al.,

2000); estudios de filogenia molecular entre rayas marinas y de agua dulce Asiáticas (Sezaki et al., 1999); y en la misma delineación de especies e historia evolutiva del complejo de especies *Aetobatus narinari* (Richards et al., 2009), entre otros estudios con rayas del género *Aetobatus* (Sales et al., 2019; Sellas et al., 2015; Schluessel et al., 2010). Si bien estudios sobre *A. narinari* nos han llevado a concluir que especies cercanas podrían mostrar un comportamiento y biología similar; se necesitan estudios especie-específicos que permitan determinar con certeza la distribución de cada especie, así como señalar las similitudes y diferencias con otras especies de su género.

Este es el primer estudio que analiza relaciones filogenéticas de poblaciones de raya águila en las islas Galápagos, y el primero en incluir muestras de nuevas localidades del Pacífico Este Tropical para un análisis del género. Mediante este estudio pretendemos desarrollar recursos genéticos e información para responder preguntas sobre la relación filogenética de rayas águila en la Isla San Cristóbal y Costa Rica. El conocimiento aquí generado, proporcionará información útil para fines de conservación de esta especie, así como para resolver las relaciones filogenéticas de la raya águila dentro del Pacífico Este Tropical. Como objetivo general se realizó una revisión de género *Aetobatus*, incluyendo las muestras obtenidas de la isla San Cristóbal y Costa Rica.

2. MÉTODOS

2.1 Procedimiento de muestreo y Laboratorio

Para este estudio se recolectaron 56 muestras de *Aetobatus* sp. en las islas Galápagos, específicamente en la isla San Cristóbal. Aquí se tomaron muestras de rayas juveniles y adultas en cinco lugares alrededor de la isla San Cristóbal: 21 muestras al Este (Rosa Blanca 1 y Rosa Blanca 2) y 35 muestras al Oeste (Cerro Brujo, Puerto Grande y La Seca). Además se obtuvieron 6 muestras adicionales del Pacífico Norte de Costa Rica, (Figura 1). Se utilizó como grupo externo una muestra de *Dasyatis brevicaudata*. Para los análisis del género se utilizaron 41 secuencias de GenBank de las especies: *A. narinari*, *A. flagellum*, *A. ocellatus* y *A. laticeps* de distintas regiones del mundo (Tabla 1).

Para las rayas águilas juveniles o pequeñas (menos de 50 cm de ancho de disco) se extendió una red de pesca hasta formar un círculo o corral en el que se las encerró. Posterior a esto, con ayuda de una tina plástica, se sacó una por una a las rayas para subirlas al bote donde se tomaron medidas estándar. Una vez tomadas las medidas, se colectó un clip de aleta pélvica de cada individuo (Figura 2), y finalmente se la regresó al mar. Cabe recalcar que el proceso de manipulación duró menos de 3 minutos por individuo para no perjudicar la salud de los mismos. Para las rayas adultas (más de 50 cm de ancho de disco), se tomó la muestra mediante snorkel, y a una distancia prudente, usando una punta de biopsia atada a una vara hawaiana modificada (Figura 3); una vez tomadas las muestras de tejido en ambos casos, se almacenaron en alcohol al 96% y fueron llevadas al laboratorio donde se las colocó a 4°C para su preservación.

2.2 Extracción y cuantificación de ADN de *Aetobatus* sp.

El ADN genómico se extrajo de los clips de aletas de *Aetobatus* sp. mediante el protocolo de Broderick et al. (2011), estandarizado previamente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Se cortó y pesó 0.01 g de tejido (muscular) en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 495 μ L de buffer de lisis y 5 μ L de proteinasa K al tubo, y se mezcló varias veces. Se realizó vórtex por 2 minutos y se incubó por 16-19 horas a 53°C con agitación hasta que la mayor parte del tejido haya lisado. Se agregaron 250 μ L de acetato de amonio frío y se mezcló vigorosamente. Se centrifugaron los tubos a una velocidad de 13200 rpm durante 20 min a una temperatura de 4°C. Se trasladó el sobrenadante a tubos Eppendorf nuevos previamente rotulados, evitando resuspender el precipitado en el fondo de los tubos centrifugados, para este paso se colocó el sobrenadante de cada muestra en dos tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se añadió 750 μ L de etanol frío al 100% a cada tubo y se mezcló. Se centrifugó nuevamente a 13200 rpm por 20 min a 4°C y se comprobó que se haya formado un precipitado en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 μ L de etanol frío al 100%. Se resuspendió el precipitado que contenía el ADN para lavarlo y se volvió a centrifugar con las condiciones anteriores. Se dejó reposar el contenido por 30 minutos en la centrífuga. Se descartó la mayor cantidad de etanol sin levantar el precipitado y se colocó a los tubos en la cámara de flujo laminar por 30 minutos para que el etanol remanente se evapore. Finalmente, se resuspendió el ADN en 30 μ l de TE 1X y se almacenó a -20°C hasta ser utilizado.

2.3 Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN extraído

La concentración y pureza del ADN extraído se determinó usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Madison, 2009). Para la determinación de la pureza del ADN se utilizaron índices de absorbancia de 260/280,

siendo el rango de pureza óptima ≥ 1.8 y 260/230 con rango de pureza óptima $\geq 1.8-2.2$ (CIT, 2009). Se diluyeron las muestras a una concentración final de 10 ng/ μ L para las reacciones de PCR y se almacenaron a -20°C . La integridad del ADN se determinó mediante geles de agarosa al 1% (80V, 45 min) con el uso de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) y finalmente se observaron los resultados en el fotodocumentador BioRad Gel Doc XR (BIORAD).

2.4 Selección de primers y Amplificación de PCR

En este estudio se amplificó el gen Cyt B mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los primers AnarCBF1 (5'-GAGGGGCAACTGTCATCACTAACC-3'; Richards et al. 2009) y AnarCBR2 (5'-AGCAATTTGTCCGATGGTGA-3'; modificado de Richards et al. 2009). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 30 μ l compuestos por una concentración final de 1X y 3 μ l de Buffer α e PCR (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen), 1 μ M de los primers forward y reverse, 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen) y 5 ng de ADN genómico. El programa del termociclador se estableció con una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 1 min y una extensión final de 72°C por 7 min. Los productos de PCR se enviaron a purificar y secuenciar en Macrogen-Korea.

2.5 Limpieza y edición de secuencias de ADN

Las secuencias de CytB en este estudio se alinearon en Geneious versión 2020.1.2 (Kearse et al., 2012) utilizando la herramienta Geneious (Geneious, 2020) en modo predeterminado. Las secuencias alineadas automáticamente fueron inspeccionadas visualmente para verificar posibles incongruencias. Una vez terminado este proceso, se utilizó el programa Mesquite versión 2.75 (Maddison & Maddison, 2006) donde se

realizó una segunda inspección del alineamiento y se configuraron las particiones. Finalmente se exportó la matriz como archivo “.nexus” para el posterior análisis en el programa MrBayes, obteniendo un bloque de datos predefinidos con las posiciones de los codones. A continuación se utilizó el software Partition Finder2 versión 2.1.1 (Lanfear et al., 2016) con el objetivo de seleccionar modelos de evolución ideales para cada partición y ejecutar el análisis filogenético (Tabla 2). La búsqueda se realizó con una configuración básica donde se seleccionaron todos los modelos de evolución (all).

2.6 Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos se corrieron en base al criterio de inferencia bayesiana (BI) usando MrBayes v 3.2.7a (Ronquist et al., 2012), y el criterio de máxima verosimilitud (ML) usando RAxML v 0.9.0 (Kozlov, 2020). Para BI, se usaron los modelos evolutivos definidos en Partition Finder2 (Lanfear et al., 2016). Se realizó el muestreo MCMC (Markov Chain Monte Carlo), con dos corridas simultáneas de 10 millones de generaciones donde cada una constó de cuatro cadenas (nchains=4) es decir, tres cadenas calientes y una cadena fría. Finalmente se utilizó un Burn-in del 25%.

Para la corrida de ML se exportó el alineamiento en formato PHYLIP usando el conversor del programa Geneious (Geneious, 2020). Se usaron los modelos de evolución obtenidos a priori en Partition Finder2, el cual se especifica en la sección “multiple models” (Kozlov, 2020). Para el análisis en la búsqueda del árbol, se agregaron todas las opciones y para los árboles iniciales se seleccionó a parsimonia y aleatorio con valores predeterminados. Finalmente se utilizó un Bootstrapping automático con valor predeterminado del 0,03 (Kozlov, 2020).

2.7 Distancias genéticas

Las distancias genéticas para Cyt B se calcularon utilizando las muestras extraídas de Galápagos, Costa Rica y las secuencias de las diferentes especies y localidades descritas con anterioridad utilizando el programa MEGA-X v 10.1.8 (Kumar et al., 2018). Para construir este cálculo se utilizó una distancia por pares con el parámetro p-distance (MEGA, 2000). La matriz de distancias genéticas se exportó a Excel.

2.8 Red de Haplotipos

Para realizar la red de haplotipos, se utilizó el software DnasSP versión 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) y el alineamiento en formato “Fasta”. Se determinó la diversidad de haplotipos usando la opción generar datos de haplotipo. Posteriormente, el archivo generado se exportó en formato “Nexus haplotype data file” y con este se construyó la red de haplotipos en el programa PopArt utilizando el algoritmo Median Joining (Bandelt, Forster, & Röhl, 1999).

3. RESULTADOS

3.1 Extracción y cuantificación de ADN de tejido de *Aetobatus* sp.

Se extrajo con éxito el ADN de las 62 muestras procesadas proveniente de las islas Galápagos y Costa Rica (Anexo B). El ADN genómico presentó concentraciones dentro de un rango de 277 ng/μL a 22,044 ng/μL (Anexo B). Por otra parte, se evaluó la calidad del ADN con la relación de absorbancias 260/280 y 260/230, que se encontraron en un rango de 1.85-1.99 y 1.54-2.23, respectivamente (Anexo B). De acuerdo a los datos cuantificados obtenidos, las muestras registraron ADN de alta calidad. A excepción de las muestras de Costa Rica que presentaron valores menores a los ideales de calidad y pureza.

3.2 Amplificación y secuenciación de ADN de *Aetobatus*

Las 62 muestras de ADN de *Aetobatus* sp. fueron amplificadas exitosamente para el gen Cyt B. Todas estas muestras mostraron un tamaño de alrededor de 540 pares de base (Figura 4). De un total de 62 extracciones de ADN de *Aetobatus* sp., 38 (61,3%) fueron secuenciadas con éxito (36 muestras de San Cristóbal-Galápagos, 1 de Costa Rica y 1 del grupo externo). Se descartaron las 24 secuencias de mala calidad ya que estas debían secuenciarse nuevamente pero no se logró realizar dicho procedimiento debido a la pandemia por COVID-19. El tamaño obtenido de las secuencias luego de su limpieza y usadas para los siguientes análisis fue de 528 pares de bases.

3.3 Análisis filogenéticos

El árbol filogenético realizado bajo el criterio de inferencia bayesiana (Figura 5), muestra cuatro clados con alto soporte, una para cada especie del género *Aetobatus*. El primer clado con alto soporte (probabilidad posterior = 1) agrupó las 3 muestras de *Aetobatus flagellum* de China y Japón reportadas por Richards et al. (2009). El segundo

clado con alto soporte (probabilidad posterior = 0.96) agrupó a las muestras de *A. laticeps* de México y Mazatlán del Pacífico Este Tropical.

El tercer clado presentó alto soporte (probabilidad posterior = 0.98) y agrupó a las muestras de la especie *A. narinari* pertenecientes al Atlántico Norte, Centro y Sur; mientras que el cuarto clado, también con un soporte alto (probabilidad posterior = 1) agrupó a todas las muestras colectadas de San Cristóbal-Galápagos junto a las muestras obtenidas en GenBank reportadas como *A. ocellatus* provenientes del Indo-Pacífico y Pacífico Central.

El árbol calculado bajo máxima verosimilitud (ML) (Anexo C) fue congruente con el árbol de inferencia bayesiana (IB). Este árbol también mostró cuatro clados bien diferenciados. El primer clado con alto soporte bootstrap (bs = 96) agrupó a la especie *A. flagellum*, el segundo clado con alto soporte (bs = 99) agrupó a la especie *A. laticeps*, incluyendo a la muestra de Costa Rica. El tercer clado con soporte alto (bs = 93) agrupó a la especie *A. narinari* (bs = 99) y el cuarto clado correspondió a la especie *A. ocellatus* (bs = 96), incluyendo las muestras de Galápagos.

3.4 Distancias Genéticas

Al obtener la matriz de distancias genéticas para el gen Cyt B, se determinó que el rango de distancia genética entre el grupo externo y todas las muestras pertenecientes a *Aetobatus* fue del 19-21% (Tabla 3). La especie *Aetobatus flagellum* presentó el grado de diferenciación más alto dentro del género con un rango de entre 10-12%. A continuación, *A. laticeps* mostró un rango de diferenciación de entre 2-3% con respecto a *A. narinari* y *A. ocellatus* - incluyendo a las muestras de Galápagos.

El rango de distancias calculado entre el grupo de *A. narinari* y su clado hermano *A. ocellatus* fue del 3-4%. Finalmente, se evidenció que el rango de distancias entre las

muestras obtenidas de Galápagos (*Aetobatus* sp.) y las muestras de *A. ocellatus* obtenidas de Genbank fue de entre 0 al 1%.

3.5 Red de Haplotipos

Al analizar las 79 secuencias del género *Aetobatus* (Galápagos n=36, Grupo externo n=1, Costa Rica n=1, GenBank n= 41) se detectó un total de 25 haplotipos (Anexo D). De estos 25 haplotipos, 16 fueron únicos y 9 fueron haplotipos compartidos (el rango de individuos presentes en estos haplotipos fue de 2 hasta 25 individuos). Como se indica en la Figura 5, las secuencias provenientes de Galápagos se agruparon con las secuencias de *A. ocellatus* correspondientes a las localidades del Indo-Pacífico y Hawái.

La única secuencia de Costa Rica obtenida en este estudio se agrupó con las secuencias de *A. laticeps* del Pacífico Este de la localidad de México y Mazatlán, separadas por un evento mutacional. Mientras que las secuencias de *A. narinari* del Atlántico Norte, Central y Sur quedaron separadas de las secuencias de Galápagos-*A. ocellatus* y *A. laticeps* por 9 y 10 eventos mutacionales, respectivamente. Finalmente, las secuencias de la especie *A. flagellum* de China presentaron 42 eventos mutacionales con respecto a las otras especies de *Aetobatus*.

4. DISCUSIÓN

4.1 Biogeografía del género *Aetobatus*

Las rayas del género *Aetobatus* han sido poco estudiadas en general (Last et al., 2016). Tradicionalmente se consideraba que *A. narinari* era una especie con amplia distribución en todos los océanos del mundo, pero estudios basados en evidencia genética y morfológica realizados por Richards et al. (2009), Schluessel et al. (2010) y White et al. (2010) reconocieron que se trataba de un complejo de especies: *A. narinari* distribuida en el Océano Atlántico, *A. laticeps* distribuída en el Pacífico Este Tropical, y *A. ocellatus* distribuída en el Indo-Pacífico y Pacífico Central (White, 2014; White et al, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio brindan un nuevo enfoque sobre la distribución de las especies *A. laticeps* y *A. ocellatus*. Las muestras analizadas de Galápagos (Pacífico Este Tropical) se agruparon con las muestras de *A. ocellatus* (Indo-Pacífico y Pacífico Central), y no con *A. laticeps* como se esperaba de acuerdo a las descripciones de la literatura (Richards et al., 2009; Sales et al., 2019). Por lo tanto, este estudio sugiere la expansión de distribución de *A. ocellatus* del Indo Pacífico y Pacífico Central hacia el Pacífico Este Tropical, siendo así la especie con la distribución más amplia del género. Alternativamente, podría tratarse de un complejo de especies dentro de *A. ocellatus* distribuidas a ambos lados del Pacífico.

La única secuencia analizada de la costa del Pacífico de Costa Rica se agrupó con las muestras de *A. laticeps* de México y Mazatlán del Pacífico Este Tropical (Sales et al., 2019), lo que sugiere que la distribución de esta especie podría estar asociada a zonas costeras del PET. Este es el primer estudio genético que incluye muestras de localidades fuera de México para esta especie, y resalta la importancia de desarrollar información para especies poco estudiadas.

Asimismo, se evidenció que la especie *Aetobatus flagellum* fue la más lejana de las especies analizadas en esta investigación. Además, existen registros que mencionan diferencias fenotípicas bien marcadas entre *A. flagellum* comparadas con *A. narinari*, *A. laticeps* y *A. ocellatus*, como por ejemplo su coloración dorsal lisa fácilmente distinguible por su color pardusco a diferencia de *A. ocellatus*, que posee un color de gris verdoso a negruzco y manchas blancas formando patrones (White & Moore, 2013). White y Moore también señalan la longitud del lóbulo rostral el cual es más largo en *A. flagellum* comparada con *A. narinari* o *A. ocellatus*.

La distancia genética es conocida como una medida de divergencia genética entre especies o poblaciones, donde se establece que aquellas poblaciones con varios alelos similares tendrán distancias genéticas pequeñas, mientras que aquellos que sean diferentes tendrán distancias más grandes (Nei, 1987). En este estudio se obtuvo la menor distancia genética entre las muestras de Galápagos (la cual se denominó como *Aetobatus* sp.) y *Aetobatus ocellatus*, lo cual sugiere que se puede tratar de la misma especie, o de especies estrechamente relacionadas. Mientras que la mayor distancia genética se obtuvo entre la especie *Aetobatus flagellum* y las demás especies analizadas en este estudio, lo cual se corroboró con la literatura sobre su relación lejana en el género (White & Moore, 2013; Sales et al., 2019).

La red de haplotipos es congruente con los análisis filogenéticos y de distancias genéticas ubicando a *Aetobatus* sp. de Galápagos junto a *A. ocellatus* del Indo-Pacífico y Pacífico Central. La especie *A. ocellatus* se encuentra en estado vulnerable y por tal razón cuenta con protección en la costa Este de Australia, específicamente en el extenso Parque Marino de la Gran Barrera de Coral y en las islas Maldivas, situadas en el Océano Indico (Kyne et al., 2016). Sin embargo, esta especie no cuenta con protección legal en el Pacífico Este Tropical ya que su distribución se pensaba limitada al Pacífico Central e

Indo-Pacífico. (Sales et al., 2019). La información presentada aquí contradice la información descrita en la literatura, y representa un nuevo registro para Galápagos y Ecuador. Este es un paso fundamental para entender la distribución de especies poco estudiadas, y para desarrollar estrategias de conservación que las protejan a largo plazo.

En la isla San Cristóbal se identificó que ciertos lugares de muestreo de la especie en estudio coinciden con altas presiones pesqueras y actividades turísticas. Estas podrían tener un impacto negativo como la destrucción de su hábitat y decrecimiento poblacional (FAO, 2016). Este estudio ayudó a determinar la identidad de la especie en esta isla, la cual está actualmente catalogada como vulnerable (Kyne et al., 2016). Dicha información ayudará a tomar medidas estrictas de conservación, como por ejemplo la protección inmediata de sus hábitats y a la creación de un Acuerdo Ministerial que prohíba su captura o tenencia ilegal. Para complementar esta investigación, se deben realizar nuevos estudios donde se utilicen marcadores moleculares con mayor resolución para así determinar relaciones dentro de *A. ocellatus* y conocer si los individuos de Galápagos corresponden a ésta especie o se trata de una especie altamente relacionada no descrita.

4.2 Metodología de laboratorio

Finalmente, este estudio determinó que el protocolo de Broderick et al. (2011) fue efectivo para la extracción de ADN genómico de rayas águila ya que se obtuvo una concentración alta con un rango de 277,1 ng/μl a 3297,3 ng/μl de ADN (Anexo C), muy por encima del valor mínimo requerido para una reacción de PCR (5 ng/ μl); valores menores dificultarían el proceso de estandarización (Romero et al., 2014). La calidad de ADN obtenido de las 62 extracciones fue ideal y presentaron pureza óptima, considerando las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm ideales (1.8 y 1.8 – 2.2, respectivamente) (CIT, 2009). Sin embargo, las 9 muestras que están subrayadas en el Anexo C, en la relación de absorbancia 260/230, presentaron ADN contaminado

(absorbancia menor a 1.8). Este valor es indicativo de compuestos contaminantes como sales o fenoles en el ADN (Romero et al., 2014). Sin embargo, esta contaminación no impidió que dichas muestras fueran secuenciadas exitosamente.

Las 62 muestras se amplificaron idealmente para el gen mitocondrial Cyt B ya que presentaron bandas de aproximadamente 540 pares de bases (Figura 4), lo cual se aproxima con los valores reportados en el estudio de Richards et al. (2009). Con respecto al secuenciamiento, se obtuvo que solo 38 muestras de las 62 se secuenciaron exitosamente (entre estas una muestra de Costa Rica), esta problemática podría ser el resultado de problemas técnicos en la secuenciación, o primers de baja especificidad (Munshi, 2012). Se recomienda desarrollar primers específicos para futuro secuenciamiento. Es importante mencionar que la pandemia por COVID-19 limitó la posibilidad de re-secuenciamiento de muestras.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación utilizó el gen mitocondrial Cyt B para realizar la revisión sistemática del género *Aetobatus*, incluyendo muestras la colección de muestras de la Isla San Cristóbal-Galápagos y Costa Rica. Se determinó que contrario a lo indicado en la literatura, en San Cristóbal no se reportó a la especie *A. laticeps* ya que los resultados sugieren un mayor grado de relación de estas muestras con la especie *A. ocellatus*. Además, este estudio es el primero en registrar a la especie *A. ocellatus* en el Pacífico Este Tropical, un hallazgo muy relevante ya que se creía que esta especie se restringía al Indo-Pacífico y Pacífico Central. Para estudios futuros, se sugiere incluir nuevas localidades de Galápagos para entender mejor la estructura genética a escala local, y también para descartar completamente la presencia de otra especie de *Aetobatus* en las islas. Otro de los hallazgos importantes fue que se identificó a la única muestra obtenida de Costa Rica como *A. laticeps*. Sin embargo, se recomienda incluir muestras de otros puntos en el Pacífico Este para entender mejor los límites de distribución de esta especie en la región.

Las rayas han sido poco estudiadas y es conocido que gran parte de sus especies no han sido evaluadas en la actualidad. Además, se ha registrado que son vulnerables puesto a que están sujetas a presiones pesqueras y otras actividades antropogénicas. El presente estudio confirmó la identidad de la raya águila que habita en la Isla San Cristóbal situada en la provincia de Galápagos. Esta información permitirá desarrollar planes adecuados para su conservación.

6. TABLAS

Tabla 1. Secuencias de GenBank de las especies *A. narinari*, *A. flagellum*, *A. ocellatus* y *A. laticeps* de distintas regiones distribuidas globalmente tomadas para la realización de comparación en el estudio.

N°	NOMBRE	Paper	Año	Localidad	Especie reportada en GenBank
1	FJ812185	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	China-Indo-Pacífico	<i>Aetobatus narinari</i>
2	FJ812186	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Indonesia- Indo-Pacífico	<i>Aetobatus narinari</i>
3	FJ812187	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Hawái 1-Central Pacífico	<i>Aetobatus narinari</i>
4	FJ812188	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Hawái 2-Central Pacífico	<i>Aetobatus narinari</i>
5	FJ812189	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	México 1	<i>Aetobatus narinari</i>
6	FJ812190	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	México 2	<i>Aetobatus narinari</i>
7	FJ812191	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Golfo de México 1- Atlántico	<i>Aetobatus narinari</i>
8	FJ812192	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Bahamas- Central Atlántico	<i>Aetobatus narinari</i>
9	FJ812193	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Cayman 1	<i>Aetobatus narinari</i>
10	FJ812194	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Bahamas2- Central Atlántico	<i>Aetobatus narinari</i>

11	FJ812195	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Golfo de México 1-l Atlántico Norte	<i>Aetobatus narinari</i>
12	FJ812204	Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (<i>Aetobatus narinari</i>)	2009	Japón - Pacífico Indo-Occidental	<i>Aetobatus flagellum</i>
13-17	GQ925515-19	Evidence for extensive population structure in the white-spotted eagle ray within the Indo-Pacific inferred from mitocho	2010	Indo-Pacífico	<i>Aetobatus narinari</i>
18	JN184054	Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes: Batoidea)	2011	Japón - Pacífico Indo-Occidental	<i>Aetobatus flagellum</i>
19	KF482070	Mitochondrial genome of longheaded eagle ray <i>Aetobatus flagellum</i> (Chondrichthyes: Myliobatidae)	2014	China	<i>Aetobatus flagellum</i>
20	NC_022837	Mitochondrial genome of longheaded eagle ray <i>Aetobatus flagellum</i> (Chondrichthyes: Myliobatidae)	2014	China	<i>Aetobatus flagellum</i>
21-28	KJ814012-20	Population Structure and Seasonal Migration of the Spotted Eagle Ray, <i>Aetobatus narinari</i>	2015	Atlántico norte	<i>Aetobatus narinari</i>
29	KJ814021	Population Structure and Seasonal Migration of the Spotted Eagle Ray, <i>Aetobatus narinari</i>	2015	Atlántico norte - México	<i>Aetobatus narinari</i>
30-31	MK340528-29	Phylogeography of eagle rays of the genus <i>Aetobatus</i> : <i>Aetobatus narinari</i> is restricted to the continental western..	2019	México- MAZATLÁN	<i>Aetobatus narinari</i> (<i>A. laticeps</i>)
32-36	MK340530-34	Phylogeography of eagle rays of the genus <i>Aetobatus</i> : <i>Aetobatus narinari</i> is restricted to the continental western..	2019	Costa Atlántica de Brasil	<i>Aetobatus narinari</i>
37-41	MK340544-48	Phylogeography of eagle rays of the genus <i>Aetobatus</i> : <i>Aetobatus narinari</i> is restricted to the continental western..	2019	Costa Atlántica de Brasil	<i>Aetobatus narinari</i>

Tabla 2. Modelos de evolución obtenidos mediante el programa Partition Finder2.

Nombre	Partición	Modelo de evolución
Gene1_codon1	2-527/3	HKY
Gene2_codon2	3-528/3	F81
Gene3_codon3	1-526/3	TRN

Descripción de tabla: Se indican los modelos de evolución molecular más adecuados para cada partición generada en el programa Mesquite, necesarios para los análisis filogenéticos.

Tabla 3. Distancias genéticas de las especies *A. flagellum*, *A. laticeps*, *A. narinari*, *A. ocellatus* y *Aetobatus* sp. (San Cristóbal-Galápagos) obtenidas en MEGA-X.

	Grupo externo	<i>A. flagellum</i>	<i>A. laticeps</i>	<i>A. narinari</i>	<i>A. ocellatus</i>	<i>A. sp</i>
Grupo externo	-	19-21%	19-21%	19-21%	19-21%	19-21%
<i>A. flagellum</i>	-	-	11-12%	11-12%	11-12%	11-12%
<i>A. laticeps</i>	-	-	-	2-3%	2-3%	2-3%
<i>A. narinari</i>	-	-	-	-	3%	3%
<i>A. ocellatus</i>	-	-	-	-	-	0-1%

Descripción de tabla: Se indican las distancias genéticas de las 5 especies del género *Aetobatus*, calculadas con la opción distancia-p en el programa MEGA-X.

7. FIGURAS

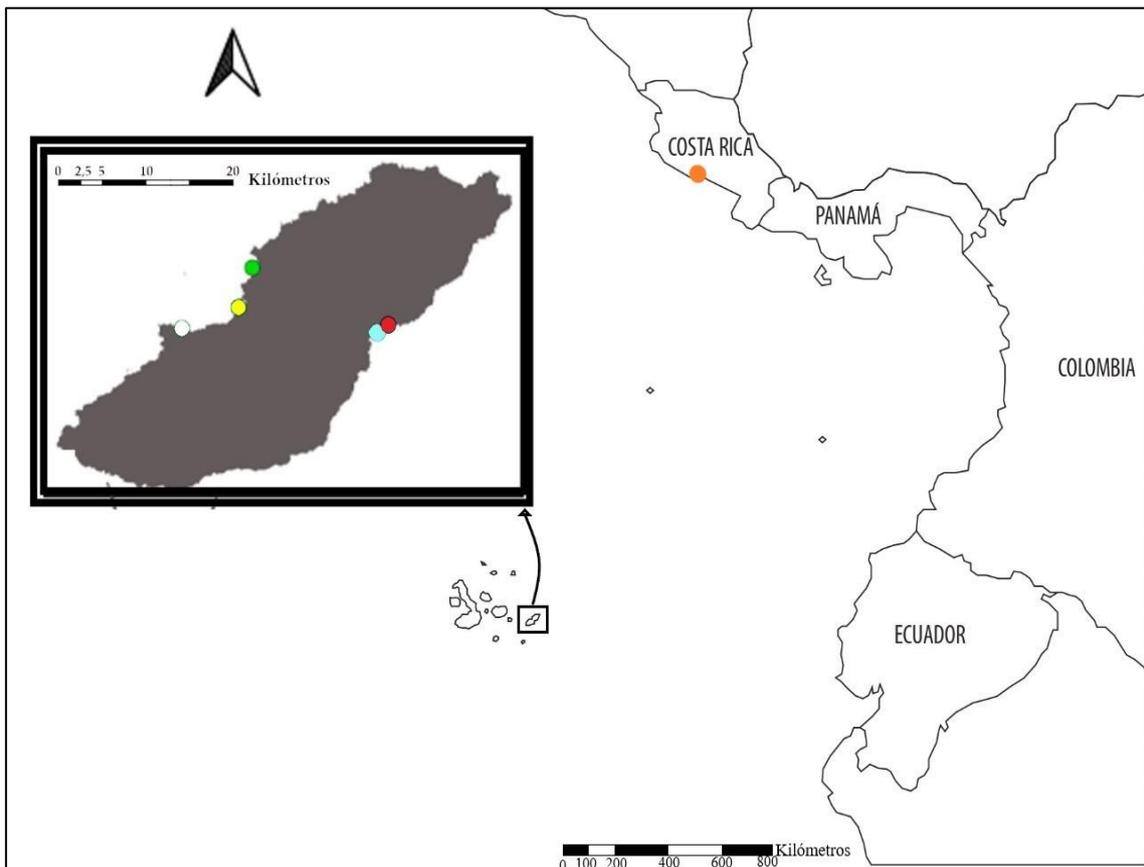


Figura 1. Mapa del Pacífico Este Tropical (PET) donde se indican las localidades muestreadas en la Isla San Cristóbal-Galápagos y Costa Rica.

Los círculos de colores indican los 5 lugares colección de *Aetobatus* sp. en San Cristóbal. Al Este, en color rojo se muestra la localidad Rosa Blanca 1 y en color celeste a Rosa Blanca 2. Al Oeste en color verde se muestra a Cerro Brujo, en color amarillo a Puerto Grande y en color blanco a La Seca. Así mismo se indica en color naranja la única localidad muestreada en Costa Rica.



Figura 2. Fotografía de un ejemplar de *Aetobatus* sp. durante un viaje de muestreo. Aquí se muestra el proceso de manipulación, toma de medidas, y se señala la ubicación de donde se toma el clip de aleta para el trabajo genético.



Figura 3. Vara Hawaiana modificada utilizada para obtener las biopsias de las rayas adultas. Objeto utilizado para extraer tejido de rayas adultas a una distancia prudente.



Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% resultante de la amplificación del gen Cyt B de las muestras obtenidas de San Cristóbal y Costa Rica. Se indican los fragmentos generados de la amplificación del gen Cyt B los cuales mostraron un tamaño aproximado de 540 pares de base.

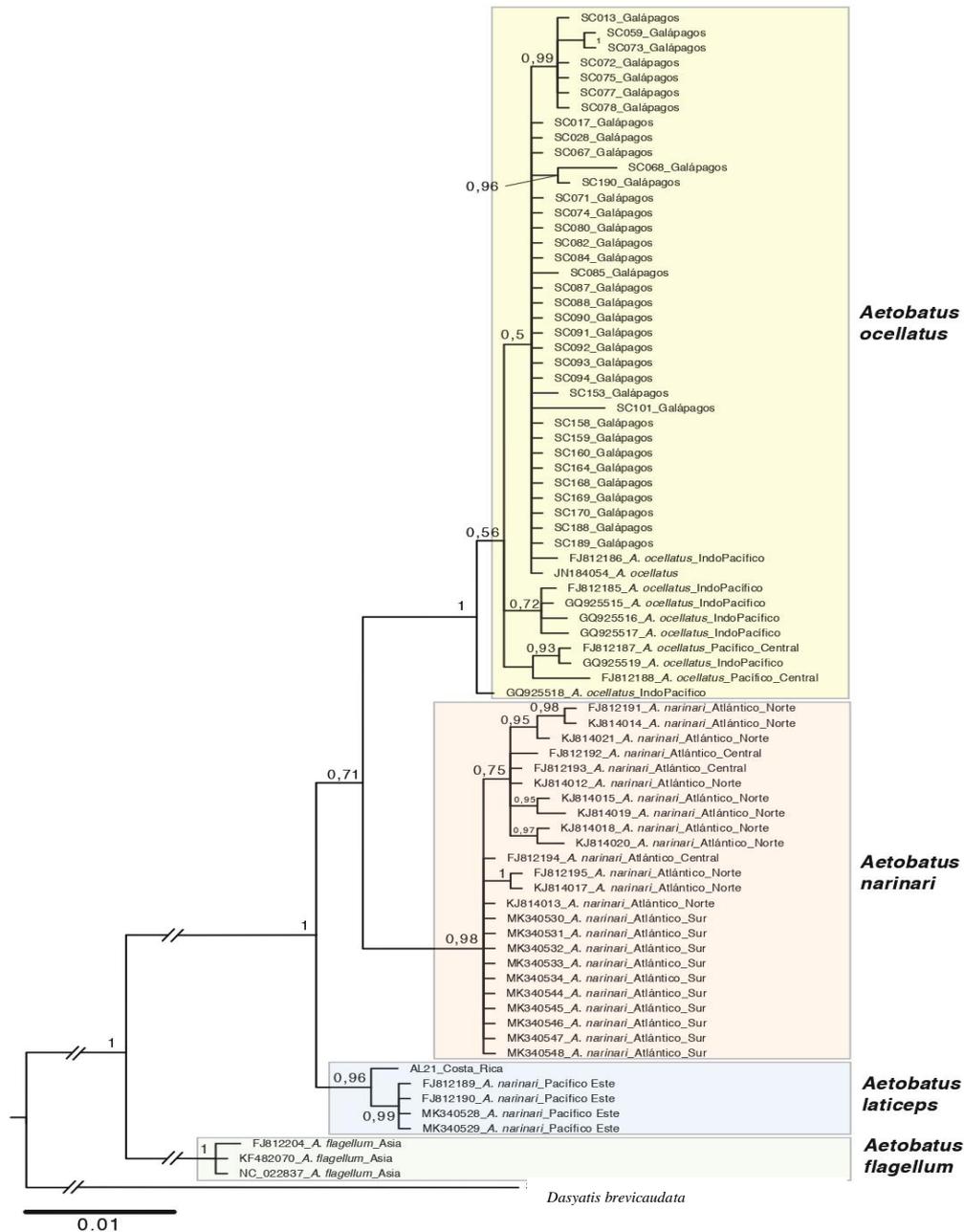


Figura 5. Árbol Filogenético de Inferencia Bayesiana (BI) del género *Aetobatus*. El cuadro de color amarillo indica las muestras obtenidas de San Cristóbal agrupadas con las muestras de la especie *A. ocellatus* pertenecientes al Indo-Pacífico, obtenidas de GenBank. En rosado están las especies *A. narinari* pertenecientes al Atlántico. En celeste se indica la única muestra de Costa Rica agrupada con las muestras *A. laticeps* (descritas antes como *A. narinari*) del Pacífico Este y Mazatlán. En el cuadro color verde se indican

las muestras de la especie *A. flagellum* y en la raíz de árbol al grupo externo con la especie *Dasyatis brevicaudata*.

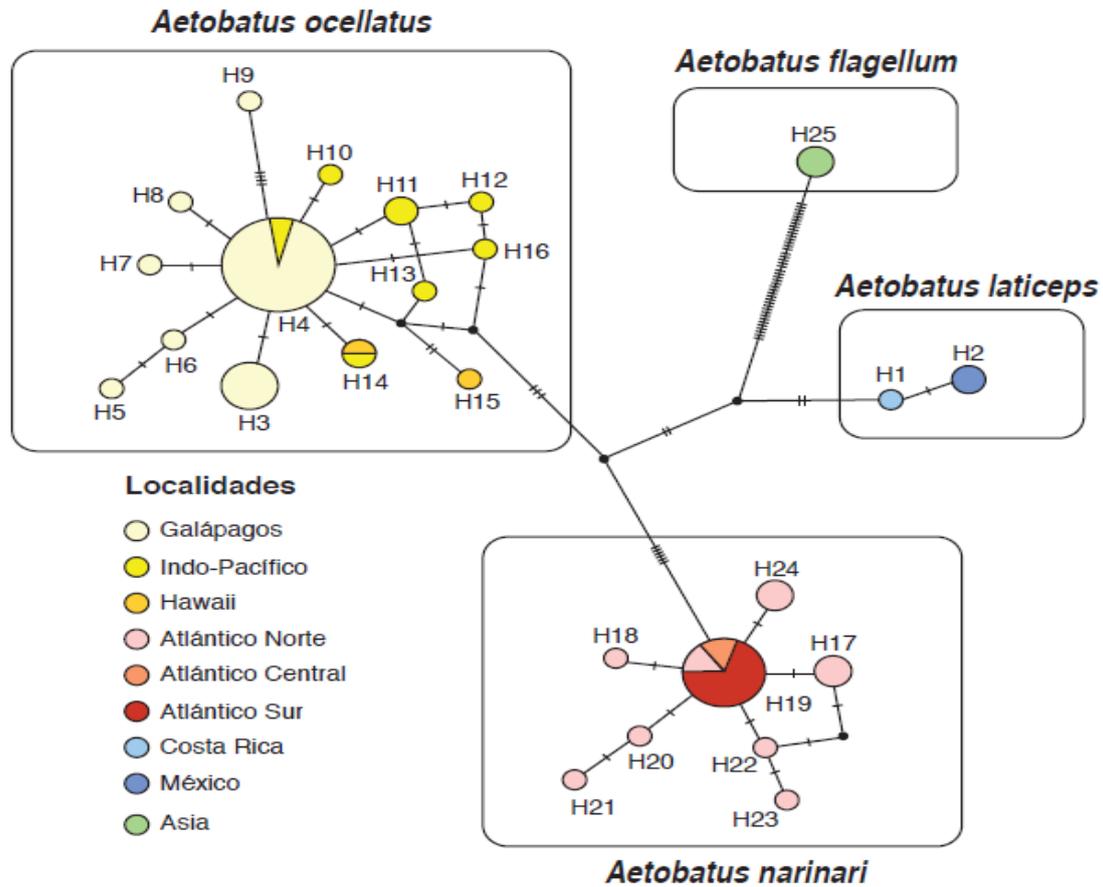


Figura 6. Red de haplotipos de la especie *Aetobatus* realizada en PopArt. Cada haplotipo generado se representa en un círculo. El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Las líneas transversales representan las posiciones nucleotídicas donde se ha generado una mutación. En el recuadro de la izquierda se indican por colores las localidades de cada haplotipo las cuales se relacionan con cada especie de *Aetobatus*. En color amarillo claro se indica a la localidad de Galápagos y en los colores amarillo oscuro las localidades Indo-Pacífico y Hawái, las cuales coincidieron con la especie *A. ocellatus*. En color rosado, naranja y rojo se indican las localidades del Atlántico Norte, Central y Sur respectivamente, los cuales contienen a las muestras de la especie *A. narinari*. En color celeste claro se indica la única localidad de Costa Rica cercana a las localidades de México representadas en color azul, las cuales contienen a las muestras de la especie *A. laticeps*. En color verde se indica la localidad de Asia con las muestras de la especie *A. flagellum*.

8. REFERENCIAS

- Aulicino, E. (2013). *Genetic Genealogy: The Basics and Beyond*. Author House.
- Bandelt, H., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*, 16(1), 37-48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Broderick, D., Ovenden, J., Buckworth, R., Newman, S., Lester, R., & Welch, D. (2011). Genetic population structure of grey mackerel *Scomberomorus semifasciatus* in northern Australia. *Journal of Fish Biology*, 79, 633-661.
- Castro, A. (2015, Octubre). *Elasmobranquis*. Retrieved from ASOCIACIÓN CHELONIA: <https://bycatch-reduction-project.jimdo.com/>
- CIT. (2009). *Carte d'Identité de Tumeurs*. Retrieved from DNA/ RNA extraction & Qualification. Quality Control Platform of the CIT Program: https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20SaintLouis%207%20avril%2009.pdf
- Coello, S. (2005). La Administración de los Chondrichthyes en Ecuador. *UICN*, 11. Retrieved from Aportes para el Plan Nacional de Tiburones.
- Dulvy, N., Fowler, S., Musick, J., Cavanagh, R., Kyne, P., Harrison, L., . . . Ebert, D. (2014). Extinction risk and conservation of the. *eLIFE*, 1-34. doi:10.7554/eLife.00590
- Elasmodiver. (2007, junio 03). *PACIFIC SPOTTED EAGLE RAY*. Retrieved from https://www.elasmodiver.com/Pacific_spotted_eagle_ray.htm
- Esposti, M., Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., & Meyer, A. (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta*, 1143(3), 243-71. doi:10.1016/0005-2728(93)90197-n.
- FAO. (2016). *National Plan of Action (NPOA)*. Retrieved from Ministry of Marine Affairs and Fisheries – Republic of Indonesia: <http://www.fao.org/3/a-bt661e.pdf>
- Farias, I., Orti, G., & Meyer, A. (2000). Total Evidence: Molecules, Morphology, and the Phylogenetics of Cichlid Fishes. *The Journal of experimental zoology*, 76-92. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(20000415)288:1<76::AID-JEZ8>3.0.CO;2-P

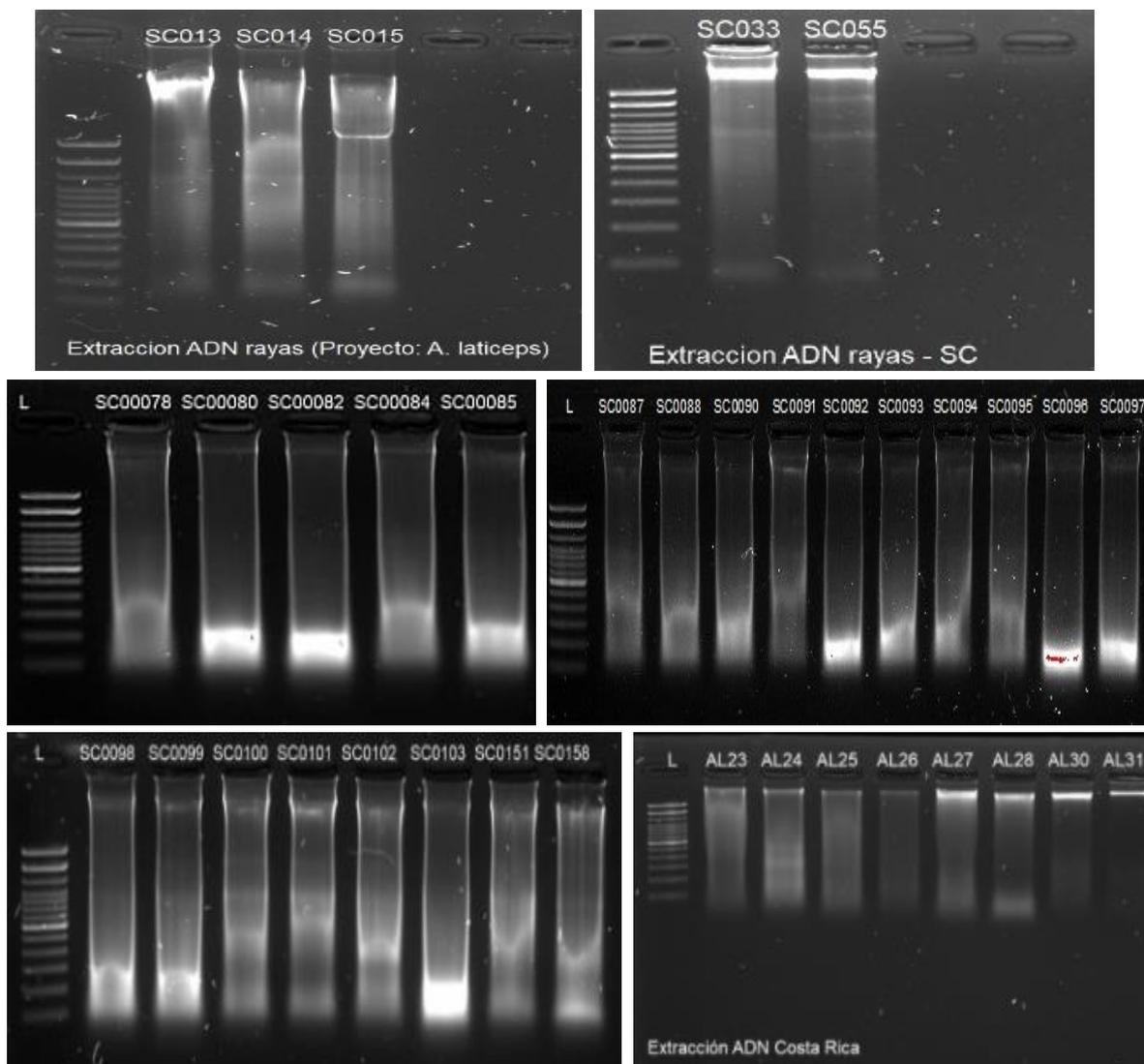
- Flowers, K. I., Heithaus, J. M., & Papastamatiou, Y. P. (2020). Buried in the sand: Uncovering the ecological roles and importance of rays. *Fish and Fisheries*, 1-23. doi:10.1111/faf.12508
- Galapagos Conservancy. (2018, enero 03). *Marine Life*. Retrieved from https://www.galapagos.org/about_galapagos/about-galapagos/biodiversity/marine-animals/
- Geneious. (2020, september 16). *User Manual*. Retrieved from <https://assets.geneious.com/manual/2020.2/index.html>
- Gobierno del Ecuador. (2019, abril 25). *Registro Oficial Organo del Gobierno del Ecuador*. Retrieved from https://www.eluniverso.com/sites/default/files/archivos/2019/04/ro_190425_0475_1_0.pdf
- Greenberg, R. (2008, Octubre). *Guía de los Elasmobranchios de Europa*. (M. Madina, Ed.) Retrieved from Oceana: https://eu.oceana.org/sites/default/files/reports/Guia_Elasmobranchios_Europa_ESP_oct2008.pdf
- IUCN. (2020, July 9). *Table 7: Species changing IUCN Red List Status (2018-2020)*. Retrieved from IUCN Red List version 2020-2: <https://sharks.panda.org/news-blogs-updates/latest-news/iucn-releases-the-only-2020-red-list-update-for-elasmobranchs>
- IUCN. (2020, December 10). *The IUCN Red List of Threatened Species*. Retrieved from <https://www.iucnredlist.org/>
- Kozlov, A. (2020, octubre 14). *Input data*. Retrieved from <https://github.com/amkozlov/raxml-ng/wiki/Input-data#single-model>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Kyne, P. M., Ishihara, H., Dudley, S., & White, W. (2006). *Aetobatus narinari*. Retrieved from The IUCN Red List of Threatened Species: <https://www.iucnredlist.org/species/39415/10231645>

- Kyne, P., Dudgeon, C., Ishihara, H., Dudley, S., & White, W. (2016). *The IUCN Red List of Threatened Species: Aetobatus ocellatus*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T42566169A42566212.en>
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 8-26. doi:dx.doi.org/10.1093/molbev/msw260
- Last, P., White, W., Carvalho, M., Séret, B., Stehmann, M., & Naylor, G. (2016). *Rays of the World*. Australia: CSIRO.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2006). *Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.75*. Retrieved from http://mesquiteproject.org/mesquiteArchives/mesquite2.75/Mesquite_Folder/docs/mesquite/manual.html
- Manriquez-Morán, N. (2013). Uso de técnicas moleculares como herramienta para conservar la diversidad biológica. *ResearchGate*, 3-79. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/272507902>
- Mateo, M. J. (2014). *¿Comemos tiburón?: Identificación molecular de carne de tiburón de venta en mercados y pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito (Tesis de pregrado)*. Retrieved from Universidad San Francisco de Quito: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3149/1/000110391.pdf>
- MEGA. (2000). *Distance estimation: Nucleotide Substitutions*. Retrieved from https://www.megasoftware.net/mega1_manual/Distance.html
- Munshi, A. (2012, October). *DNA Sequencing: Methods and Applications*. Croatia: Teodora Smiljanic. Retrieved from https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/DNA-sequencing-failed-reaction.html
- Nei, M. (1987). *Genética evolutiva molecular*. New York: Columbia University Press.

- Solís, L., & Andrade, A. (2005). Marcadores moleculares. *La ciencia y el hombre*, 1-3. Retrieved from <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>
- Thermo Fisher Scientific Madison. (2009). *Technical Bulletin: 260/280 and 260/230 Ratios*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Zx_Chong/post/Low_260_230_ratio/attachment/5c74a938cfe4a781a5834be0/AS%253A730387542179840%25401551149368146/download/nanodrop.pdf+%&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec
- White, W. T. (2014). A revised generic arrangement for the eagle ray family Myliobatidae, with definitions for the valid genera. *Zootaxa*, 3860(2), 149-166.
- White, W. T., & Moore, A. B. (2013). Redescription of *Aetobatus flagellum* (Bloch & Schneider, 1801), an endangered eagle ray (Myliobatoidea: Myliobatidae) from the Indo–West Pacific. *Zootaxa*, 199–213 .
- White, W. T., Last, P. R., Naylor, G. J., Jensen, K., & Caira, J. N. (2010). Clarification of *Aetobatus ocellatus* (Kuhl, 1823) as a valid species, and a comparison with *Aetobatus narinari* (Euphrasen, 1790) (Rajiformes: Myliobatidae). *CSIRO Marine and Atmospheric Research Paper*, 32, 141-164.
- White, W., & Naylor, G. (2016). Resurrection of the family Aetobatidae (Myliobatiformes) for the pelagic eagle rays, genus *Aetobatus*. *Zootaxa*, 4139(3):435-8. doi:10.11646/zootaxa.4139.3.10
- Zhao, Y., Xu, Y., Zhang, Q., & Chen, G. (2007). An overview of the haplotype problems and algorithms. *Frontiers of Computer Science in China*, 272-282.

9. ANEXOS

Anexo A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN genómico de algunas muestras, pertenecientes a las rayas del género *Aetobatus* obtenidas de la isla San Cristóbal-Galápagos y Costa Rica.



ANEXO B. Concentración e índices de calidad de ADN de las 62 muestras de tejido (aleta pélvica) recolectadas en San Cristóbal y Costa Rica del género *Aetobatus*.

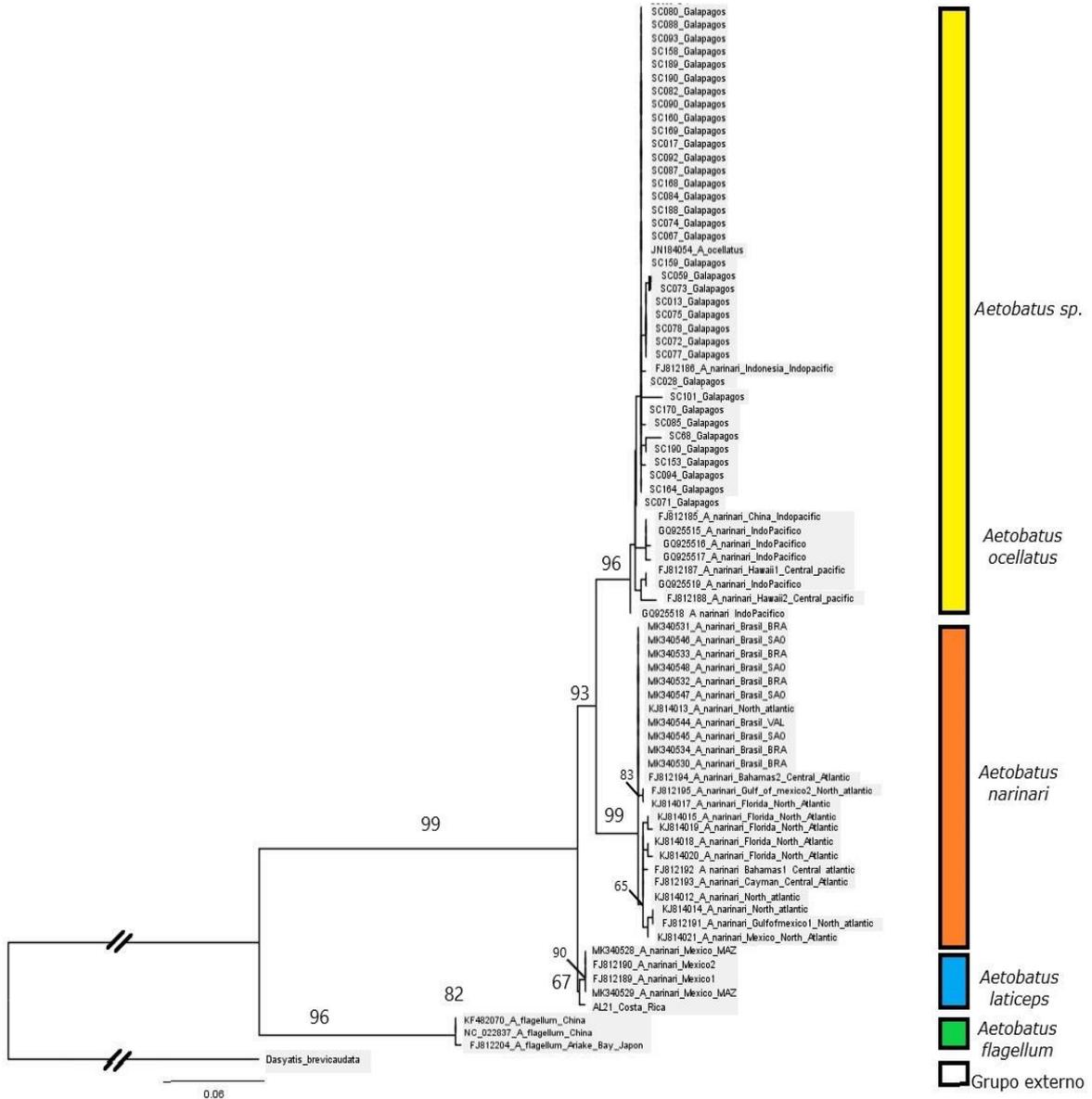
Nº muestra	Identificación de muestras	Ácido nucleico ng/µl	260/280	260/230
1	SC00013	881,6	1,92	2,17
2	SC00014	1005,1	1,95	2,17
3	SC00015	812,3	2,04	2,04
4	SC00016	416,5	1,94	2,42
5	SC00017	675,7	1,93	2,28
6	SC00026	1243,8	1,94	2,04
7	SC00032	572,6	1,92	2,35
8	SC00033	497,6	1,96	2,12
9	SC00055	477,3	1,96	1,95
10	SC00058	2250,6	1,91	2,07
11	SC00059	2609,6	1,91	2,14
12	SC00067	786,8	1,93	1,86
13	SC00069	2898,3	1,85	1,72
14	SC00072	1064,0	1,90	2,18
15	SC00073	1059,4	1,88	2,11
16	SC00074	1240,1	1,92	1,94
17	SC00075	2416,5	1,92	2,09
18	SC00077	1551,1	1,93	2,17
19	SC00078	2207,8	1,92	2,09
20	SC00080	2745,6	1,91	2,09
21	SC00082	1887,1	1,95	2,13
22	SC00084	1529,0	1,94	2,06
23	SC00085	1367,9	1,95	2,13
24	SC00087	1479,4	1,96	2,07
25	SC00088	1015,0	1,98	2,14
26	SC00090	1197,0	1,97	2,06
27	SC00091	1179,8	1,98	2,12
28	SC00092	1160,0	1,97	2,11
29	SC00093	1126,2	1,99	2,04

30	SC00094	1767,5	1,95	2,13
31	SC00095	800,6	1,98	2,07
32	SC00096	1588,0	1,96	2,11
33	SC00097	1008,8	1,98	2,10
34	SC00098	1391,1	1,96	2,26
35	SC00099	1710,1	1,91	2,15
36	SC00100	1900,7	1,91	2,22
37	SC00101	1330,0	1,92	2,14
38	SC00102	1255,7	1,94	2,13
39	SC00103	2267,2	1,91	2,1
40	SC00151	1522,2	1,94	2,06
41	SC00158	713,4	1,92	2,23
42	SC00159	1938,5	1,93	2,10
43	SC00160	1430,3	1,88	2,19
44	SC00164	1944,7	1,92	2,12
45	SC00169	828,9	1,92	2,05
46	SC0153	1273,0	1,94	2,15
47	SC0166	3075,2	1,88	2,11
48	SC0168	1751,3	1,94	2,15
49	SC0170	2204,4	1,93	2,12
50	SC0177	3297,3	1,92	2,04
51	SC0028	897,7	1,88	2,24
52	SC0068	2065,3	1,91	2,13
53	SC071	277,1	1,85	1,54
54	SC188	555,5	1,95	1,96
55	SC189	477,4	1,97	1,75
56	SC190	1892,5	1,92	1,78
57	AL01	604,1	1,79	1,15
58	AL03	137,3	1,75	1,52
59	AL12	321,7	1,89	1,61
60	AL16	450,1	1,91	1,75
61	AL20	146,1	1,93	1,94
62	AL21	96,3	1,7	1,06

ANEXO C. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) del género

Aetobatus: *Aetobatus* sp. de Galápagos y *A. ocellatus*, *A. narinari*, *A. laticeps* y *A.*

flagellum.



La barra amarilla indica las muestras obtenidas de San Cristóbal (*Aetobatus* sp.) agrupadas con las muestras de la especie *A. ocellatus* pertenecientes al Indo-Pacífico, obtenidas de GenBank. En color naranja están las especies *A. narinari* pertenecientes al Atlántico. En color celeste se indica la única muestra de Costa Rica obtenida en este estudio agrupada con las muestras *A. laticeps* (descritas antes como *A. narinari*) del Pacífico Este y Mazatlán. En color verde se indican las muestras de la especie *A. flagellum* pertenecientes a China y en la raíz del árbol, al grupo externo con la especie *Dasyatis breviceaudata*.

ANEXO D. Tabla de haplotipos y sus respectivas localidades.

N° Haplotipo	Secuencia	Muestra/ código	Localidad
Haplotipo 1	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTACTTACACTCCTGACGCTATTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATACTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCCAAGTCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	AL21	Costa Rica
Haplotipo 2	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTGCCCTTTATTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTACTTACACTCCTGACGCTATTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATACTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCCAAGTCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	FJ812189-90	México
		MK340528-29	Mazatlán
Haplotipo 3	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAATGCAACATTAACCGATTCTTCACATTTCACTCWCCTCMCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCgTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	SC013-59, 73,72,75,77,78	San Cristóbal
Haplotipo 4	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAATGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	SC017-28 67,71,74,8082 ,84,87,88 90,91,92,93 94,158,159,16 0,164,168,169 ,170,188,189 JN184054	San Cristóbal
Haplotipo 5	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAATGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCTCAiDCAT	SC068	San Cristóbal
Haplotipo 6	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAATGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT	SC190	San Cristóbal

	ACGCTCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCCACACCATCATCCTCACATGAAT		
Haplotipo 7	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAATGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCiCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCCTACCGGCCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCGTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTTACACCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATATTTCCATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGA--	SC085	San Cristóbal
Haplotipo 8	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAATGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCCTCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCCTACCGGCCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCiACTTCTCCTTCAAAGACATCCtAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACtCCTGACGCTATTTACACcCAACCTCTTAACAGAC ACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATATTTSGtATTGcTATGCCATCtTACGC TCAATTCCCAAtAAAcTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCtTAATTCTCCTTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAAAC GAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCAC-----	SC163	San Cristóbal
Haplotipo 9	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAATGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCiCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCtACCGGCCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCAcC CTACTTCTCCTTCAAAGACATCCtAGGCTTCTTCATCMiCCTACTCCTGCTTACACWCCTGACGCTATTTACACaCAACCTCTTAACAGA CACAGAAAACCTTCATCACAGCaAACccCCTGGTAACACCACCCACATTitACCCGAAaGATATTTCCATTTGCMtATGCCATCCTACGC TCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAAACA ACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGA--	SC101	San Cristóbal
Haplotipo 10	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAATGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCCTCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCCTACCGGCCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTTACACCAACCTCTTAACAG ACACAGAGAACTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATATTTCCATTTGCTTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	FJ812186_A_ narinari	Indonesia
Haplotipo 11	ATGGATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCCTCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCCTACCGGCCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTTACACCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATATTTCCATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCCATGCTTCACACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	FJ812185_A_ narinari GQ925515_A_ narinari	China Indo- Pacífico
Haplotipo 12	ATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCCTCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCTCACAATAATCCATCTTCTCTTT CTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCCTACCGGCCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACCCCTACTTCTCCTTCAAAGACA TCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTTACACCAACCTCTTAACAGACACAGAAAACCTTCATCCCA GCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATATTTCCATTTGCCTATGCCATCCTACGCTCAATTCCCAATAAACT GGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCCATACTTCACACTTCCAAACAACGAAGCCTCACATTT GCCAATTACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCA-----	GQ925516_A_ narinari	Indo- Pacífico
Haplotipo 13	ATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCCTCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCTCACAATAATCCATCTTCTCTTT	GQ925517_A_ narinari	Indo- Pacífico

	CTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCTACCGGCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACCCCTACTTCTCCTTCAAAGACA TCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTTACACCCAACCTCTTAACAGACACAGAAAACCTTCATCCCA GCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCTATTTGCCTATGCCATCCTACGCTCAATTCCATAAACT GGGAGGAGTCTCGCCCTTGCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATGCTTCACTTCCAAACAACGAAGCCTCACATTC GCCAATTACCCAAATCCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCA-----		
Haplotipo 14	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCTACCGGCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATAATTTCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATTCCCAATAAACTGGGGGAGTCTCGCCCTTGCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATGCTTCACTTCCAA ACAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAAATCCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	FJ812187_A_ narinari_	Hawái1
		GQ925519_A _narinari	Indo- Pacífico
Haplotipo 15	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTTTCTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCTACCGGCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACC CCTACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTATCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATAATTTCTATTTGCCTATGCCATCCTA CGCTCAATTCCCAATAAACTGGGAGGAGTCTCGCCCTTGCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATGCTTCACTTCCAAA CAACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATTACCCAAATCCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	FJ812188_A_ narinari	Hawái2
Haplotipo 16	----- ATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTCCCCTTTGTTATCGTAGCTCTCACAATAATCCATCTTCTTTT CTCCATGACACAGGCTCAAACAACCCTACCGGCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTCCACCCCTACTTCTCCTTCAAAGACA TCCTAGGCTTCTTCATCCTCCTACTCCTGCTTACACTCCTGACGCTATTTACACCCAACCTCTTAACAGACACAGAAAACCTTCATCCCA GCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATAATTTCTATTTGCCTATGCCATCCTACGCTCAATTCCCAATAAACT GGGAGGAGTCTCGCCCTTGCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCCATACTTCACTTCCAAACAACGAAGCCTCACATTC GCCAATTACCCAAATCCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCA-----	GQ925518_A _narinari	Indo- Pacífico
Haplotipo 17	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTTTCTTCATGACACAGGCTCAAACAACCACCGGCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTTCACC CATACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTACTACTCCTGCTTACACTCCTGACACTATTTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCTCACATTAACCCGAATGATACTTCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCAATACTCCACACTTCCA AACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCACAAATCCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATTATCCTCACATGAAT	FJ812191_ A_narinari	Golfo de México_ Atlántico
		KJ814014_ A_narinari	Atlántico_ Norte
		KJ814021 _A_narinari	México_ Atlántico_ Norte
Haplotipo 18	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTTTCTTCATGACACAGGCTCAAATAACCCACCGGCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTTCACC CATACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTACTACTCCTGCTTACACTCCTGACACTATTTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCAATACTCCACACTTCCA AACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCACAAATCCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	FJ812192_ A_narinari	Bahamas1 Atlántico Central

Haplotipo 19	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTTCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTTACC CATACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTACTACTCCTGCTTACACTCCTGACACTATTTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCAATACTCCACACTTCCA AACACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	FJ812193_ A_narinari	Cayman Atlántico Central
		KJ814012 A_narinari	Atlántico Norte
		FJ812194 A_narinari	Bahamas2 Atlántico Central
		KJ814013 A_narinari	Atlántico Norte
		MK340530-31,32,33,34,44,45,46,47,48 A_narinari	Brasil
Haplotipo 20	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTTCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTTACC CATATTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTACTACTCCTGCTTACACTCCTGACACTATTTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCAATACTCCACACTTCCA AACACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	KJ814015 A_narinari_	Florida
Haplotipo 21	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCCTTCTTCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTTACC CATATTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTACTACTCCTGCTTACACTCCTGACACTATTTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCAATACTCCACACTTCCA AACACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	KJ814019_ A_narinari	Florida
Haplotipo 22	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTTCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTTACC CATACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTACTACTCCTGCTTACACTCCTGACACTATTTACACCCAACCTCTTGACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCAATACTCCACACTTCCA AACACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	KJ814018_ A_narinari	Florida
Haplotipo 23	ATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAATCCATCTTCTCTTTCTTCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCTCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTTACC CATACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTACTACTCCTGCTTACACTCCTGACACTATTTACACCCAACCTCTTGACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATCCCAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCTTGCCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTTAATTCCAATACTCCACACTTCCA AACACGAAGCCTCACATTTGCGCCAATCACCCAAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	KJ814020 A_narinari	Florida

Haplotipo 24	ATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAATTGACAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCTCCTGCCCTTTGTTATCGTAGCTCT CACAATAACCCATCTTCTCTTTCTTCATGACACAGGCTCAAACAACCCACCGGCCCTCCCCTCAGATATAGATAAAAATCCCATTTACC CATACTTCTCCTTCAAAGACATCCTAGGCTTCTTCATCCTACTACTCCTGCTTACACTCCTGACACTATTTACACCCAACCTCTTAACAG ACACAGAAAACCTTCATCCCAGCAAACCCCTGGTAACACCACCCACATTAACCCGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCCATCCT ACGCTCAATCCCAATAAACTAGGAGGAGTCCTCGCCCTTGCCTTCTCAATCCTAATTCTCCTTTAATTCCAATACTCCACACTTCCA AAACAACGAAGCCTCACATTTGCCCCAATCACCCAATCCTCTTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATCCTCACATGAAT	FJ812195 A narinari	Golfo de México2
	KJ814017 A narinari	Florida Atlántico Norte	
Haplotipo 25	ATGAGTTTGAGGGGGCTTCTCAATTGACAACGCAACACTAACCCGATTCTTCACATTTCACTTCCTCCTACCCTTTGTCATTGTAGCCC TTACCATAATCCACCTACTTTTCCTTCATGACACAGGCTCAAACAATCCAATCGGTCTCCCCTCCGACATAGATAAAAATCCCATTCCAC CCCTACTACTCATTCAAAGACCTACTAGGCTTCTTTGTCCTCCTATTCTTACTTACTCTCCTAACCCCTATTCACACCCAACCTCCTAACC GACACAGAAAACCTTTATCCCAGCAAATCCTCTAGTAACACCACCTCACATTAACCAGAATGATACTTCCTATTTCGCCTACGCCATCC TACGCTCAATTCCCAACAACTAGGAGGAGTCCTCGCCCTTGCAATTCTCAATCCTAATCCTCCTTTAATCCCCATCCTCCACACCTCT AAACAACGAAGCCTCACATTTGCCCCAATCACCCAATCCTATTCTGAATGCTCGTAACCAACACCATCATTCTCACATGAAT	FJ812204 A flagellum	Bahía Ariake
	KF482070 A flagellum	China	
	NC_022837 A flagellum	China	