

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Identificación molecular, análisis de diversidad genética e  
inferencia de la historia evolutiva de rayas sartén  
(*Hypanus*) en la Isla San Cristóbal, Galápagos-Ecuador**

**Pamela Elizabeth Moreno Fiallos**

**Biología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Bióloga

Quito, 22 de mayo de 2023

# UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Identificación molecular, análisis de diversidad genética e inferencia de la historia evolutiva de rayas sartén (*Hypanus*) en la Isla San Cristóbal, Galápagos-Ecuador**

**Pamela Elizabeth Moreno Fiallos**

**Nombre del profesor, Título académico**

Diana Alexandra Pazmiño, PhD

María de Lourdes Torres, PhD

Quito, 22 de mayo de 2023

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Pamela Elizabeth Moreno Fiallos

Código: 00212981

Cédula de identidad: 1726020595

Lugar y fecha: Quito, 22 de mayo de 2023

## **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## **UNPUBLISHED DOCUMENT**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>.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría dar las gracias a Diana Pazmiño y María de Lourdes Torres, mi directora y codirectora de tesis, por su financiación, orientación y apoyo durante el desarrollo de este proyecto. Al Equipo de Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Pablo Alarcón y Martina Albuja por su apoyo en los procedimientos de laboratorio. Mateo Vinuesa por su ayuda con los análisis estadísticos. Al Galápagos Science Center por proporcionar las instalaciones para la investigación y a su equipo en la recolección de muestras, y al Parque Nacional Galápagos por otorgar los permisos de investigación PC-19-22 y de uso de ADN MAATE-DBI-CM-2021-0174.

A mi familia, amigos y profesores por su amor, aliento y apoyo.

Gracias a todos por sus contribuciones y por creer en este esfuerzo.

## RESUMEN

Los individuos del superorden batoida, incluyendo a las rayas bentónicas, desempeñan un papel de meso-depredador y pueden crear hábitats para otros organismos marinos. Por ejemplo, crean grandes franjas de agua abierta mientras nadan, lo que atrae a otros organismos, como al plancton y peces pequeños. Además, las rayas pueden crear pequeñas depresiones en la arena que sirven de refugio a pequeños organismos. A pesar de su importante papel ecológico, la información sobre la ecología de las rayas en lugares como Galápagos es muy limitada. Faltan estudios moleculares que ayuden a levantar información sobre este grupo taxonómico en estas islas. En 2014 se presentó una lista actualizada de la fauna marina y terrestre de las islas Galápagos. Sin embargo, ésta no incluye la confirmación molecular de muchas especies, incluida la del género *Hypanus*, cuya taxonomía ha cambiado en las últimas décadas. El objetivo principal de este trabajo fue utilizar la información molecular para confirmar la identificación de la especie del género *Hypanus* presente en la isla San Cristóbal, Galápagos.

Los resultados en base al uso de marcadores mitocondriales (COI y CytB) mostraron que la especie encontrada en Galápagos es efectivamente *Hypanus dipterurus*, de acuerdo con la última clasificación publicada en 2016. Se observó, además, que la población de San Cristóbal presenta una diversidad genética baja (diversidad de haplotipos de  $1.000 \pm 0,0037$ , y diversidad nucleotídica de 0,000), lo que podría representar un problema para su conservación a largo plazo. Finalmente, análisis filogenéticos revelan una cercanía con individuos de Perú. Este trabajo permitió identificar zonas clave para esta especie en función del tamaño de los individuos capturados durante los meses de seguimiento. Esta información proporciona la primera visión de la ecología y dinámica de esta especie en Galápagos.

**Palabras clave:** *Hypanus dipterurus*, Galápagos, San Cristóbal, marcadores mitocondriales, diversidad genética

### ABSTRACT

Individuals of the superorder batoids, such as benthic rays play a meso-predator role and can create habitats for other marine organisms. For example, they create large swaths of open water while swimming, which attracts other organisms, such as plankton and small fish. In addition, rays can create small depressions in the sand that serve as refuges for small organisms. Despite their important ecological role, information on the ecology of stingrays is very limited. Molecular studies analyzing the population dynamics of this taxonomic group on the islands are still lacking. An updated list of the marine and terrestrial fauna of the Galapagos Islands was presented in 2014. However, it does not include molecular confirmation of many species, including that of the genus *Hypanus*, whose taxonomy has changed in recent decades. The main objective of this work was to use molecular information to confirm the identification of the *Hypanus* species present on San Cristobal Island. The results based on the use of mitochondrial markers (COI and CytB) showed that the species found in Galapagos is indeed *Hypanus dipterurus*, according to the latest classification published in 2016. It was observed that the San Cristóbal population has a low genetic diversity (haplotype diversity of  $1,000 \pm 0.0037$ , and nucleotide diversity of 0.000), which could represent a problem for its long-term conservation. Phylogenetic analyses reveal a close relationship with individuals from Peru. Finally, we were able to identify key breeding areas for this species based on the size of individuals captured during the monitoring months. This information provides the first insight into the ecology and dynamics of this species in Galapagos.

**Key words:** *Hypanus dipterururs*, Galápagos, San Cristóbal, mitochondrial markers, genetic diversity

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
1.1 Familia Dasyatidae .....	14
1.2 Distribución y comportamiento de <i>Hypanus dipterururs</i> .....	16
1.3 Género <i>Hypanus</i> en Galápagos .....	16
<b>2 METODOLOGÍA.....</b>	<b>18</b>
2.1 Área de Estudio .....	18
2.2 Recolección de muestras de tejido de rayas sartén .....	18
2.3 Extracción de ADN .....	19
2.4 Diseño de primers para amplificación de genes mitocondriales .....	19
2.5 Amplificación de marcadores mitocondriales (COI y CytB) .....	21
2.6 Protocolo de PCR par región COI.....	22
2.7 Protocolos de PCR para región CytB .....	22
2.8 Diversidad genética.....	22
2.9 Análisis de datos .....	23
2.9.1 Análisis de secuencias CytB y COI para determinación de diversidad genética haplotipos .....	23
2.9.2 Reconstrucción filogenética .....	24
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Extracción y secuenciación de ADN .....	24



3.2 Análisis de Diversidad Genética .....	25
3.3 Análisis de Reconstrucción Filogenética.....	26
<b>4 DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
4.1 Identificación de la especie de <i>Hypanus</i> en la Isla San Cristóbal-Galápagos .....	26
4.2 Diversidad genética de <i>Hypanus dipterurus</i> en la Isla San Cristóbal-Galápagos.....	27
4.3 Análisis Filogenéticos de <i>Hypanus dipterurus</i> en la Isla San Cristóbal-Galápagos y el Pacífico .....	29
<b>5 CONCLUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>6 TABLAS .....</b>	<b>33</b>
<b>7 FIGURAS.....</b>	<b>34</b>
<b>8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los Primers COI y CytB utilizados .....	33
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localidades de recolección de muestras en la Isla San Cristóbal, Galápagos.....	34
Figura 2. Red de haplotipos por individuos de rayas sartén analizadas (COI y CytB) .....	34
Figura 3. Heatmap basado en el número de diferencias de nucleótidos entre los haplotipos (COI y CytB).....	35
Figura 4. Árbol Filogenético de Muestras recolectadas de San Cristobal y de Pacífico de <i>Hypanus dipterurus</i> . .....	36

**INDICE DE ANEXOS**

ANEXO 1. Resultado de Cuantificación de extracción de ADN .....	42
ANEXO 2. Resultado de Blast en NCBI para 53 muestras secuenciadas para COI y CytB ...	44

## 1 INTRODUCCIÓN

Las Islas Galápagos se encuentran entre los lugares con mayor endemismo de especies, siendo declarada Reserva de la Biosfera de la UNESCO en 1984. Esto se debe a la gran variedad de hábitats costeros y marinos, que son el resultado de la convergencia de corrientes oceánicas frías y cálidas que al chocar en el archipiélago crean ecosistemas diversos y complejos (Peck, 1994). Estos ecosistemas son esenciales para el bienestar de las especies nativas y endémicas no solo a nivel local sino de toda la región. La conservación tanto de los ecosistemas como de su biodiversidad se traduce en la preservación de los servicios que éstos ecosistemas brindan a la comunidad (Cruz y Urresta, 2019).

La diversidad única que se observa en las islas ha hecho de Galápagos una zona de interés para estudiar la evolución y la ecología de su flora y fauna (Bustamanete et al., 2000). La fauna marina ha sido objeto de interés para los investigadores por décadas. Sin embargo, la atención ha sido desproporcionada hacia los ecosistemas de fácil acceso y las especies más carismáticas. Esto ha dejado a muchos grupos taxonómicos y zonas marino-costeras importantes con vacíos grandes de información (Bustamanete et al., 2000). El objetivo principal de este trabajo fue utilizar la información molecular para confirmar la identificación de la especie del género *Hypanus* presente en la isla San Cristóbal en Galápagos.

A pesar de tratarse de un grupo de interés para la conservación, los elasmobranchios y en especial los batoides (rayas) no han recibido mucha atención y aún se desconocen muchos aspectos de su ecología básica y el estado de sus poblaciones (López, 2013). Este conocimiento es crucial para proteger a este grupo tan importante y para mantener el equilibrio en la red trófica de los ecosistemas marinos (López, 2013). De igual manera esta información puede ayudar al desarrollo de políticas y estrategias informadas para preservar la biodiversidad y la sostenibilidad de los recursos marinos.

## 1.1 Familia Dasyatidae

La familia Dasyatidae forma parte del grupo de los Myliobatiformes. Los miembros de esta familia se caracterizan por presentar un tamaño en etapa adulta de 22 cm a 60 cm de ancho del disco (disc width, DW), que hace referencia a la dimensión entre las puntas más externas de las aletas pectorales. Su cuerpo se distingue por un disco oval que incorpora completamente la cabeza, presenta una cortina nasal desarrollada en forma rectangular con cinco hendiduras branquiales (Last, 2016; Lim et al., 2015). Su cola es robusta a veces muy alargada y en forma de látigo, en la superficie dorsal presenta espinas no tan llamativas y puede poseer de uno o cuatro aguijones caudales prominentes situados en la cola muy por detrás de las aletas pélvicas (Lim et al., 2015). La clasificación de esta familia a nivel de género es compleja ya que existen muchas incertidumbres taxonómicas en los géneros que la componen.

La primera clasificación de la familia Dasyatidae fue realizada Jordan and Gilbert en 1879 nombrando a la familia como Dasybatidae, pero en 1888 fue renombrada a Dasyatidae por Jordan y colegas (1888). A lo largo de esta clasificación se mencionan cuatro subfamilias Neotrygoninae, Urogymninae, Hypolophinae y la subfamilia Dasyatinae; siendo esta última donde se clasifican los géneros *Dasyatis*, *Pteroplatytrygon* y *Taeniurops* (Rosenberger, 2001). Mediante un estudio de clasificación revisada de la familia Dasyatidae basada en nuevos conocimientos morfológicos y moleculares (Last et al. 2016) se logró identificar siete géneros que representan a esta subfamilia. Se mantuvo a los tres primeros géneros *Dasyatis*, *Pteroplatytrygon* y *Taeniurops*, pero se agregó cuatro géneros nuevos anteriormente incluidos en *Dasyatis* (*Bathytoshia*, *Hemitrygon*, *Hypanus* y *Telatrygon*) (Last et al. 2016).

Los géneros *Dasyatis* e *Hypanus* han mostrado gran dificultad en su clasificación.

Anteriormente se creía que el género *Dasyatis* era polifilético con 36 especies al igual que con una amplia distribución en mares tropicales y templados (Rosenberger, 2001). Mientras

que en la clasificación de Last et al. (2016) se lo define como un grupo monofilético de cinco especies que se encuentra restringido al Atlántico oriental y al suroeste del océano Índico. Su morfología se basa en individuos de tamaño pequeño a mediano con adultos de entre 38-60cm DW. Presentan un disco robusto; su hocico es ancho y corto con forma angular; presentan ojos de tamaño medio ligeramente prominente, su aguijón es caudal típicamente adelantado en la cola, sin espinas medianas en el disco y banda de dentículos ausente; piel típicamente lisa, excepto en los adultos de mayor tamaño que pueden tener una cobertura escasa de dentículos y a veces espinas desarrolladas en la cola anterior (Saadaoui et al., 2016).

Por otro lado, el género *Hypanus* pasó de ser un subgénero de *Dasyatis* a ser un género hermano, de ocho especies algo heterogéneas morfológicamente (Kottelat, 2013) *Hypanus americanus*, *Hypanus dipterurus*, *Hypanus guttatus*, *Hypanus longus*, *Hypanus marianae*, *Hypanus rudis*, *Hypanus sabinus* y *Hypanus say* (Last et al., 2016). Esta diferenciación se dio gracias a características morfológicas, moleculares y geográficas que han facilitado su identificación. Este género presenta una distribución en el Atlántico y El Océano Pacífico Oriental Tropical (OPTO) que se extiende a lo largo de la costa del Pacífico de América Central, desde el sur de México, hasta el norte de Perú (Last et al., 2016). Se caracteriza por presentar individuos pequeños a muy grandes machos adultos de 43–46 cm de DW y hembras de 57–66 cm de DW. Presentan un disco deprimido a robusto, débilmente rómbico en la aleta pectoral estrechamente anguloso a ampliamente redondeado; hocico obtuso a puntiagudo y corto, su cola es poco alargada y en forma de látigo o filamentosa (Last et al., 2016; Petean et al., 2020). Las aletas pélvicas son de tamaño medio y sobresalen poco del disco; el aguijón caudal está cerca de la base de la cola (la distancia desde la inserción de la aleta pectoral hasta la base del aguijón caudal es de 1-2,6 veces la distancia interrespiracular. Presenta espinas medianas en el disco en una hilera bien definida; banda de dentículos

típicamente muy pequeña o ausente, piel lisa o con una cobertura irregular (Petean et al., 2020).

### **1.2 Distribución y comportamiento de *Hypanus dipterurus***

*Hypanus dipterurus* presenta una distribución en el Pacífico central oriental; desde el sur de California, hasta el norte de Perú, incluyendo las Islas Galápagos (Last, 2016), mientras que *Dasyatis* se encuentra restringido al Atlántico oriental y al suroeste del océano Índico. Su comportamiento y ecología se caracterizan por vivir en aguas costeras poco profundas sobre fondos de arena y fango, o cerca de arrecifes rocosos y lechos de algas (Last, 2016) como son las zonas de manglar en los alrededores de las Isla San Cristóbal. Tienen la capacidad de crear hábitats para otros organismos marinos, mediante depresiones en la arena, que pueden servir de refugio a pequeños organismos (William, 2016).

La protección de especies como las rayas sartén al ser bentónicas es crucial para la salud y sostenibilidad a largo plazo del archipiélago (Hearn et al., 2014). Por lo general se alimentan de diversos organismos más pequeños, como crustáceos y moluscos, esto permite controlar las poblaciones manteniendo un equilibrio saludable en la red trófica marina. Además, forman parte de la fauna marina de interés en actividades turísticas y recreativas.

### **1.3 Género *Hypanus* en Galápagos**

Galápagos presenta gran diversidad de fauna marina tanto endémica como nativa, incluyendo especies altamente migratorias. Si bien las islas Galápagos y los elasmobranquios que aquí habitan se encuentran protegidos desde hace 25 años desde la creación de la Reserva Marina de Galápagos (RMG) bajo los acuerdos ministeriales Nro. MPCEIP-SRP-2019-0019-A del 11 de marzo de 2019 y Nro. MPCEIP-SRP-2022-0078-A del 06 de abril de 2022; donde se prohíbe la pesca dirigida a rayas y mantarrayas, con cualquier arte de pesca y la tenencia y transporte, de sus partes (Hearn et al., 2014; Ministerio de Producción Comercio Exterior



Consumo y Pesca, 2023). Sin embargo, la pesca de rayas continúa siendo una práctica común en el Ecuador continental, debido a la demanda ilegal de su carne y espinas. En Ecuador las especies del género *Dasyatis* más pescadas dentro del territorio son *Dasyatis longa* seguida de la especie *Dasyatis dipterura* (Armijos, 2020). Sin embargo, esta identificación no ha sido confirmada molecularmente en el país, y es posible que las especies capturadas correspondan a uno de los siete géneros hermanos de *Dasyatis*, descritos para dentro de la familia Dasyatidae en el 2016.

En el 2013 se presentó una lista actualizada sobre fauna marina y terrestre de las islas, pero esta lista no incluye confirmación molecular para las especie del géneros *Dasyatis* (Hearn et al., 2014). Esta lista incluía treinta y tres especies de tiburones y veinte especies de rayas. En éste último grupo, se identifican seis especies de rayas que habitan en el cinturón tropical, seis especies del Pacífico oriental, dos especies del Indo-Pacífico y tres especies de rayas que posiblemente son endémicas de las Islas Galápagos (Hearn et al., 2014). Cabe recalcar que por primera vez se incluía a la especie *Dasyatis dipterura* con datos insuficientes en las islas Galápagos, basada únicamente en información morfológica (Hearn et al., 2014).

En un estudio del 2020 se realizó un análisis preliminar de las rayas presentes en Galápagos, donde se emplearon muestras de San Cristóbal, sin embargo no se confirmó las especies encontradas en el estudio: *Dasyatis longus* o *Dasyatis diptetura* (Armijos, 2020)

Tomando en cuenta la reclasificación dentro de la familia Dasyatidae, que separa el género *Hypanus* del género *Dasyatis*, es importante confirmar la identificación de estas especies mediante el uso de herramientas moleculares. Este trabajo se enfoca en el uso de los marcadores COI y CytB para confirmar la identificación de la especie *Hypanus dipterurus*, anteriormente conocida como *Dasyatis dipterura* en la clasificación de Jordan & Gilbert, 1880. Además, este trabajo busca entender la relación genética de la especie fuera la Isla San Cristóbal, mediante análisis filogenéticos. Con esta información esperamos llenar los vacíos

de conocimiento existentes sobre que especies de rayas están presentes en Galápagos, su distribución y ecología, así como definir los sitios clave para su conservación en la Isla San Cristóbal.

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Área de Estudio

Este estudio se desarrolló en la Isla San Cristóbal, Galápagos- Ecuador ( $0^{\circ} 40' 40''$  y  $0^{\circ} 57'00''$  de latitud sur, y  $89^{\circ} 14' 10''$  y  $89^{\circ} 37' 30''$  de longitud oeste). Esta isla se encuentra situada en la parte oriental del archipiélago y presenta diversas áreas como: agrícola, urbana, bosque húmedo costero y matorral y zonas de manglar. Para la toma de tejido se seleccionó cinco zonas costeras de manglar alrededor de la isla, esto debido a que las rayas sartén de interés para este trabajo presentan una distribución muy costera y en zonas de poca profundidad para facilitar su crecimiento y alimentación. Estas zonas fueron: Puerto Grande, Manglecito, La seca, Cerro brujo al oeste de la isla y Rosa blanca al extremo este de la Isla

**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

### 2.2 Recolección de muestras de tejido de rayas sartén

Se realizó la recolección de muestras de rayas sartén *Hypanus* en cinco localidades (zonas de manglar) alrededor de la Isla San Cristóbal, Galápagos-Ecuador. Para ello se usaron los permisos PC-19-22 para coleccionar las muestras y permiso MAATE-DBI-CM-2021-0174 para los análisis genéticos. Se tomó 53 muestras de tejido, 22 de las cuales se encontraban almacenadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ y 31 en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular en el Galápagos Science Center (GSC).

La Figura 1 muestra las localidades donde se realizó la recolección de muestras de tejido, la cantidad de muestras recolectadas por localidad, lo cual dependió de la abundancia de individuos presentes en las zonas, es así que se presenta esta variabilidad en el número de

muestras. Esto se ve reflejado en el tamaño de los círculos en cada localidad siendo Puerto Grande el sitio con mayor cantidad: 19 muestras, seguido por Rosa Blanca con 13 muestras y el menor Manglecito con 3 muestras. De igual manera se refleja la profundidad de las localidades siendo de color claro menos profundidad (zonas costeras) y de color oscuro más profundidad (mar abierto).

Para capturar las rayas y recolectar la muestra de tejido se siguió los siguientes pasos: a) se colocó una red (tipo chinchorro) desde la orilla del manglar formando una especie de corral; b) una vez capturada la raya, se la colocó en un ictiómetro con agua; c) seguido, se tomó medidas estándar de tamaño para cada individuo, incluyendo: longitud total (TL), ancho del disco (DW), longitud del disco (DL), longitud hocico-espiráculo (SL), cabeza (H), tronco (Tr), y cola (T); (d) se tomó una muestra de tejido de 1 cm<sup>2</sup> de la parte posterior del disco usando una tijera; y e) como paso final se determinó el sexo de cada individuo en base a la presencia/ausencia de las estructuras reproductivas “claspers”, presentes únicamente en los machos (Pérez, 2011).

### **2.3 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN genómico de las 53 muestras seleccionadas, se extrajo el ADN de 31 muestras, debido a que las muestras sobrantes (22) ya se encontraban extraídas y almacenadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Se siguió el protocolo descrito en el Kit DNeasy Blood & Tissue (QAIGEN, 2013). Una vez extraído el ADN, se cuantificó y se determinó la calidad del mismo mediante el uso de Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 2015). Adicionalmente, se determinó la integridad del ADN mediante un gel de agarosa al 1%.

### **2.4 Diseño de primers para amplificación de genes mitocondriales**

Para el análisis molecular, se seleccionó los genes mitocondriales COI y CytB. Esto es debido a que estos marcadores han sido ampliamente utilizados en la literatura para la

identificación molecular de *Dasyatis*, así como para la reconstrucción de su historia evolutiva (Armijos, 2020). Como primer paso se realizó la obtención de secuencias de los genomas de interés, utilizando el NCBI para buscar *Dasyatis* mitochondrion y se seleccionó todos los genomas mitocondriales y los genomas parciales, se guardó en formato fasta. para que se puedan leer en los programas.

Como segundo pasó se realizó un alineamiento de secuencias en la herramienta MAFFT: (Kato y Standley, 2013), se subió todas la secuencias seleccionadas y se procedió a alinearlas para obtener Secuencias Consenso de genomas mitocondriales alineados para *Dasyatis*. Como tercer paso, y una vez alineadas se subió las secuencias a Unipro Ugene (Okonechnikov et al., 2012) con los siguientes parámetro: Consensu type: “Default”, Threshold: bajar a “99%” y Copy: “FASTA”, Sort sequence: “Sort by name”; Sort order: “Ascending”. Esta secuencia generada presenta letras mayúsculas y minúsculas lo cual se tomó en cuenta para el diseño de primers.

Luego se realizó una modificación de la secuencia consenso donde se buscó y reemplazó el símbolo “+” (representa los gaps de las secuencias) por “N” para que lo pueda leer el programa MEGA, con el fin de encontrar la región de interés en la secuencia consenso. Se identificó la región de interés y se prosiguió con la generación de primers, para esto se utilizó el programa Primer 3web (Untergasser A et al., 2012), donde se copió la secuencia consenso de *Dasyatis* con la región de interés a ser amplificada.

Se modificaron los siguientes parámetros en Primer 3: longitud de los primers: 18-24 pb (para asegurar la unión específica y evitar la inestabilidad de la unión entre el ADN molde y el primer); contenido GC: 40-60% (esto permite que se unan los primers al molde para que sea eficiente la PCR); temperatura de melting (T<sub>m</sub>): 52-59°C (una T<sub>m</sub> sobre 65°C puede generar annealing no específico) (Dieffenbach et al., 1993). El tamaño del producto de amplificación: entre 600pb hasta máximo 1000 pb (para evitar errores en la amplificación por

tamaños de fragmentos muy grandes); número de resultados de primers: hasta 50 (evaluar todos las posibles combinaciones y escoger la ideal); estabilidad máxima en el extremo 3':6 (entre más bajo el valor, más específica la unión en este extremo, la ADN polimerasa solo puede sintetizar el ADN desde el extremo 3', por lo tanto, se debe mantener la unión en este extremo lo más específica posible) (Dieffenbach et al., 1993).

De todas las opciones que Primer 3 arroja se escogió dos pares de primers, y se tomó en cuenta que en su extremo 3' al menos las últimas 5-6 bases estén conservadas. Con los primers seleccionados se determinó la especificidad de los mismos usando la herramienta primer Blast de NCBI (NCBI, 1999). Una vez analizada su especificidad se envió a secuenciar los primers en MACROGEN Corea.

## **2.5 Amplificación de marcadores mitocondriales (COI y CytB)**

Se realizó la amplificación de una región del gen COI (posición 5512-6506) y CytB (posición 14973-15747). El marcador mitocondrial COI se secuenció para obtener una identificación específica del espécimen en cuestión. Para esto se compara la secuencia obtenida con secuencias obtenidas de una base de datos pública (Holmes et al., 2009). El marcador CytB se amplifica ya que se considera como uno de los genes más útiles para llevar a cabo trabajos filogenéticos, gracias a su gran sensibilidad en la detección de especies (Ming Wei Su et al., 2011).

Para poder llevar a cabo la amplificación del marcador COI (1084pb), se empleó la Phusion High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Estados Unidos). Se escogió esta Taq debido a que tiene una mayor precisión de amplificación para fragmentos > 1000 pb y tiene la capacidad de corregir errores (INVITROGEN, 2008). Para la amplificación de la región CytB, el fragmento presentaba un tamaño de 820pb, por lo cual se empleó una Taq DNA

Polimerasa Platinum, que permite amplificar fragmentos menores a 1000pb con gran precisión y sensibilidad (INVITROGEN, 2011).

## **2.6 Protocolo de PCR par región COI**

Para la preparación del Master Mix se usaron los siguientes reactivos con las siguientes concentraciones finales: H<sub>2</sub>O PCR 14.85ul, Buffer HF 1X (6ul), dNTPs 0.2mM (0.6ul), Primer forward y reverse 0.5uM (1.5ul) y Taq Platinum DNA Polymerase 0.5U (0.25ul). Se uso 40ng como concentración final de ADN en un volumen final de 30 µL. De igual manera se agregó 3.3ul de DMSO para muestras que presentaban dificultad en la amplificación.

El programa del termociclador fue el siguiente: 98°C por 3 minutos (denaturación inicial), 98°C por 10 segundos (denaturación), 62°C por 30 segundos (annealing), 72°C por 40 segundos (extensión) por 35 ciclos , y 72°C por 5 minutos (extensión final) (INVITROGEN, 2011)

## **2.7 Protocolos de PCR para región CytB**

La preparación Master Mix se basó en el protocolo establecido por Holmes et al. 2009 que consistía en: en H<sub>2</sub>O PCR 20.3µL, Buffer con 1X (3µL), MgCl<sub>2</sub> 1.5mM (0.9µL), dNTPs 0.2mM (0.6µL), Primer forward y reverse 0.5uM (1.5µL), Phusion High Fidelity Taq Polymerase(Invitrogen, Estados Unidos). 1U (0.2µL). Se uso 40ng como concentración final de ADN en un volumen final de 30 µL. El programa del termociclador fue el siguiente: 94°C por 2 minutos (denaturación inicial), 94°C por 30 segundos (denaturación), 61°C por 30 segundos (annealing), 72°C por 49 segundo (extensión) por esto por 35 ciclos 72°C por 5 minutos (extensión final).

## **2.8 Diversidad genética**

Las secuencias fueron limpiadas manualmente con la herramienta Geneious Primer. En primer lugar, se alineó las 53 secuencias de COI y aparte las de CytB y se cortó los extremos

(de baja calidad) para que todas las secuencias de cada gen tengan el mismo tamaño.

Adicionalmente, se extrajeron las secuencias en formato FASTA para que puedan ser leídas por la herramienta Arlequin. Se importaron las secuencias limpias en Arlequin y se corrió un análisis de diversidad de haplotipos y de nucleótidos.

## **2.9 Análisis de datos**

### **2.9.1 Análisis de secuencias CytB y COI para determinación de diversidad genética haplotipos**

El primer paso para la identificación molecular de las muestras, fue realizar un análisis de homología con la base de datos de NCBI, usando la herramienta BLAST con los siguientes parámetros: Database Standard databases (nr etc.) Nuceotide Collection (nr/nt) y Optimize for Highly similar sequences (megablast), el resto de los parámetros se mantiene por defecto. BLAST es un software bioinformático que se utiliza para buscar secuencias similares en diferentes bases de datos, como secuencias de proteínas, secuencias de nucleótidos y secuencias genómicas, finalmente la herramienta calcula una puntuación en función del grado de similitud y devuelve una lista de las principales coincidencias (Wheeler & Bhagwat, 2007).

Una vez obtenida la posible similitud a nivel de especies, se concatenó las dos regiones COI y CytB y se realizó un análisis de frecuencia de haplotipos de las 53 muestras. Para esto se siguió el protocolo descrito por Toparslan et al., 2020 en el que se utiliza diferentes paquetes de análisis estadísticos en Rstudio, esto permitió extraer el número de haplotipos, la frecuencia de haplotipos y las regiones variables mediante una red de haplotipos. Como siguiente paso, se extrajo la matriz de frecuencias poblacionales y continuación, se utilizó esta matriz para la visualización del heatmap (Toparslan et al., 2020).

### 2.9.2 Reconstrucción filogenética

Para realizar árbol filogenético se utilizó la herramienta Geneious Prime y se trabajó con 53 muestras más un outgroup: *Gymnura micrura*. Este outgroup se escogió en base a una búsqueda bibliográfica corta, que ubica a *Gymnura micrura* como un clado hermano de las especies del género *Dasyatis*. (Rosenberger, 2001). De igual manera al querer comparar la relación de las muestras de San Cristóbal recolectadas en Galápagos (SC) con muestras del Pacífico, se seleccionó cuatro secuencias de ADN del marcador COI, las cuales eran muestras del género *Hypanus* presentes en diferentes localidades del Pacífico.

Se realizó un Multiple alignment de las 53 muestras, el outgroup y las secuencias de la familia Dasyatidae para construir el árbol filogenético utilizando Genetic Distance Model Máxima verosimilitud, teniendo en cuenta un método de Resample en base a un Bootstrap con un número de 500 repeticiones y Soporte threshold de 60% y exportar los resultados. Finalmente el árbol fue modificado con la herramienta Fig Tree 1.4.4 (FigTree, 2018).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Extracción y secuenciación de ADN

En total, fue posible extraer ADN con éxito de las 31 de 53 muestras de tejido colectadas debido a que 22 muestras ya se encontraban extraídas. Los resultados de calidad considerando el parámetro de A260/280 mostró valores entre 1.6-2.2, mientras que para el parámetro A260/230 mostró valores entre 1.3-2.2 ANEXO 1. Una ratio menor de 1.8 se relaciona con presencia de contaminantes en la muestra, las concentraciones de ADN variaron entre 200-2999 ng/ul presentando valores óptimos para llevar a cabo el PCR, con los primers que se envió a secuenciar en MACROGEN Corea.

En la **Tabla 1. Características de los** se ven las características de los primers utilizados. En las secuencias de los primers se muestran bases degeneradas (letras minúsculas), esto quiere



decir que estas bases no son conservadas entre diferentes especies de *Dasyatis* por lo que se deben colocar de esta forma para asegurar su amplificación (Onodera, 2007). Como resultado de las amplificaciones de PCR se obtuvo en total 106 amplicones de buena calidad para los marcadores COI (n=53, 994 pb) y CytB (n=53, 774 pb). Siendo un secuenciamiento exitoso para todos los amplicones.

La identificación molecular de cada muestra para ambos marcadores, realizada mediante la herramienta BLAST, mostró coincidencia de todas las secuencias analizadas con la especie *Dasyatis dipterura* e *Hypanus dipterurus*. En el caso de las secuencias de CytB se observó un porcentaje de identidad (per. Ident. %) de entre 94.9-95.45 y un Query coverage (porcentaje de bases idénticas al genoma de referencia) de 98%. Las secuencias de COI mostraron un porcentaje de identidad de entre 96.21-96.24 y un Query coverage de 98% (Anexo B). Estos valores son interesantes, puesto que brindan una guía de la relación y la cercanía que pueden tener las muestras analizadas con la especie identificada en la base de datos de NCBI, en este caso es *Hypanus dipterurus*.

### **3.2 Análisis de Diversidad Genética**

El análisis de frecuencias de haplotipos muestra dos haplotipos H1 y H2 Figura 2 De las 53 muestras analizadas, 52 muestras (9 provenientes de Cerro Brujo, 9 de La Seca, 2 de Manglecito, 19 de Puerto Grande y 13 de Rosa Blanca) pertenecen al H1, mientras que solo una muestra (SC22) proveniente de Manglecito pertenece al H2. Las líneas que unen a los círculos representan las relaciones entre los haplotipos y las líneas sobre éstas representan las mutaciones que separan un haplotipo de otro.

El heatmap de los haplotipos Figura 3 muestra en cada rama los haplotipos H1 y H2. Para la construcción del heatmap se definió las relaciones cercanas con el color "rojo oscuro" y las

relaciones lejanas con el color "blanco". Un heatmap tiene la función de mostrar en relación a los colores, la cercanía de los valores en este caso los haplotipos encontrados.

Finalmente, los análisis de diversidad genética muestran una diversidad de haplotipos de  $1.000 \pm 0.0037$  y una diversidad nucleotídica de 0.000.

### **3.3 Análisis de Reconstrucción Filogenética**

El análisis filogenético se llevó a cabo usando las secuencias de COI únicamente debido a la ausencia de información de secuencias del marcador CytB en la base de datos de NCBI. En la Figura 4 se muestra la relación genética de las muestras de San Cristóbal con muestras del Pacífico Norte y Sur se muestran sobre las ramas los valores bootstrap superiores a 70 se identifican dos clados donde se relaciona las muestras de California y México; y el segundo clado de *Hypanus dipterurus* de Perú con las muestras recolectadas en San Cristóbal (color rosado). Como resultado se muestra que las muestras de San Cristóbal (SC) de todas las localidades presentan una mayor cercanía con muestras de *Hypanus dipterurus* de Perú presentando un valor de 97.2 en relación a las muestras de California. Las muestras de México y California (se agrupan más cercanas entre ellas que con las muestras de Galápagos.

## **4 DISCUSIÓN**

### **4.1 Identificación de la especie de *Hypanus* en la Isla San Cristóbal-Galápagos**

Este trabajo permitió alcanzar el objetivo de identificar la especie de raya sartén en la Isla San Cristóbal en Galápagos-Ecuador, siendo *Hypanus dipterurus*, lo cual fue posible gracias al protocolo de extracción de ADN genómico de tejido de rayas sartén, donde se obtuvo una buena concentración para las muestras siendo entre 200-2999ng/ul (Anexo A), lo cual permitió un correcto análisis debido a que se tuvo una buena cantidad de ADN para ver resultado en la secuenciación.

Por otro lado, mediante el uso de la herramienta Blast de NCBI, se pudo observar coincidencias para las 53 muestras con especies reportadas en esta base de datos como *Hypanus dipterurus* y *Dasyatis dipterura*. El primero corresponde al nombre de la especie en la clasificación de Last en el 2016, mientras que el segundo corresponde a un sinónimo de esta misma especie conforme a la clasificación de 1888. Esto resalta la importancia de una correcta clasificación que permita unificar la forma en que se utiliza los nombres de las especies.

Para las 53 muestras recolectadas y analizadas se encontró un Porcentaje de Identidad alto (aprox. 99.26%). Este valor describe cuán similar es la secuencia Query a la secuencia blanco, es decir cuántos caracteres en cada secuencia son idénticos (Madden, 2000). Esto confirma que las muestras de San Cristóbal corresponden a la especie encontrada en la base de datos de NCBI al tener un alto porcentaje de similitud a muestras anteriormente reportadas de otras localidades del Pacífico.

#### **4.2 Diversidad genética de *Hypanus dipterurus* en la Isla San Cristóbal-Galápagos**

El genoma de un individuo puede diferir de los demás de muchas maneras, incluidas las diferencias de bases conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones o deleciones (INDEL), o diferencias en el número de copias de una secuencia o gen (CNV) (Prediger, 2022). A lo largo del análisis estadístico obtenido en Rstudio, se pudo identificar solo dos haplotipos para las 53 muestras analizadas. Un análisis detallado de las secuencias identificó cinco polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs responsables de esos haplotipos, uno para COI y cuatro para CytB.

La diversidad de haplotipos también conocida como diversidad de genes, representa la probabilidad de que dos alelos muestreados aleatoriamente sean diferentes, mientras que la diversidad de nucleótidos se define como el número promedio de diferencias de nucleótidos

por sitio en comparaciones por pares entre secuencias de ADN (Copestake et al., 2012).

Tanto la diversidad haplotípica como la nucleotídica están afectadas por eventos demográficos históricos y contemporáneos, los valores de diversidad iguales a 1 son indicativos de baja diversidad, y valores  $<1$  indican alta diversidad.

En comparación con otros estudios de análisis molecular del género *Hypanus*, se muestra que para el caso de *Hypanus americanus* esta presenta una diversidad global de haplotipos y nucleótidos con valores de 0.948 y 0.01803 respectivamente; siendo valores bajos en el caso de la diversidad de haplotipos, pero moderadamente altos en relación a la diversidad nucleótidos (Richards et al., 2018). En relación a los resultados obtenidos en las muestras de San Cristóbal se puede observar, que los valores son más bajos que los presentados en este estudio, por lo cual al ser valores cercanos a 1 no se muestra una partición genética variable, esto quiere decir que no se hay una diferencia a nivel genético entre las poblaciones analizadas, por lo cual, son muy semejantes.

Richards et al, menciona que esta partición genética baja se debe a que la distancia entre localidades donde se distribuyen las muestras, no es tan amplia mostrando una estructura no tan variable, mientras que como recomendación se menciona que los sitios de muestreo de aproximadamente 1800 km de la costa de Estados Unidos si pueden mostrar una partición genética. Si analizamos la geografía de las zonas de recolección de muestras, cuatro localidades se encuentran al oeste de la isla y una localidad al este. En el caso de la distancia por localidad estas consisten de 3,22 km entre Cerro Brujo y Puerto Grande; 8,52 km entre Puerto Grande y Manglecito, 2,07 km entre Manglecito y La Seca; y 50.75 km entre Manglecito y Rosa Blanca (Google Maps, 2023). Por lo tanto, la diversidad genética baja de las muestras analizadas, surge por no presentar altos niveles migración costera o cruces con otras poblaciones que facilitan el flujo génico provocando que las poblaciones sean menos divergentes a lo largo de sitios costeros continuos.

De igual manera Richards et al, sugiere que el agua profunda en distancias cortas no parece restringir el flujo génico en *Hypanus americanus*. Por ejemplo, los sitios de muestreo en las Islas en Estados Unidos, separados por aproximadamente 340 km de agua con una profundidad de 1915m, no mostraron una partición significativa (Richards et al., 2018). En el medio marino, las barreras flujo génico entre especies están presente pero no son tan evidentes como en el terrestre, y estas pueden llegar a influir en la variabilidad genética de las especies como su estructura genética poblacional (Rimieri, 2017). La diversidad genética, también entendida como la variedad en la composición de genes a entre los individuos de una misma especie (Rimieri, 2017), es fundamental para la supervivencia de una población a largo plazo. Por lo tanto, una diversidad baja se puede traducir en la disminución en su capacidad de adaptarse ante potenciales cambios ambientales (Rimieri, 2017).

#### **4.3 Análisis Filogenéticos de *Hypanus dipterurus* en la Isla San Cristóbal-Galápagos y el Pacífico**

Se sabe que las rayas sartén son susceptibles a la pesca, tanto de manera selectiva como accidental, ya que la presión pesquera en su área de distribución no se gestiona de una manera correcta (Pollom et al., 2020). Los análisis demográficos indican que esta especie tiene un bajo potencial de crecimiento intrínseco y una capacidad limitada para soportar la presión pesquera. En otros lugares de su distribución, como Perú, la especie ha experimentado en el pasado reducciones drásticas (hasta del 88%) de su población en tres generaciones (Pollom et al., 2020). Sin embargo, se cree que hay algunos refugios de pesca en el sur de California y en las islas de Hawaii y Galápagos (Pollom et al., 2020) a los cuales se desplazó esta especie para evitar estrés por parte de la pesca.

En los resultados de relación filogenética **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar, que hay más relación entre *Hypanus* de la parte sur del Pacífico que con *Hypanus* el norte debido a que hay una mayor cercanía de las localidades

(Richards et al., 2018). Si se observa la relación filogenética en San Cristóbal-Galapagos (SC) con muestras del Pacífico Norte y Sur. Se muestra que con un bootstrap de 97.2 las muestras de Galápagos están más cercanamente relacionados a los individuos de *H. dipterus* de Perú formando un clado, que con muestra de California o incluso México que forma el segundo clado.

Con este antecedente podría encontrar en Galápagos un refugio cercano. Dado que en esta localidad varias especies se han especializado (Tobar, 2019) a protección de las zonas costeras de Galápagos adquiere una mayor importancia para la supervivencia de esta especie. Es fundamental profundizar en el conocimiento de la ecología de *Hypanus dipterurus* y tomar medidas para corregir los factores adversos que amenazan su supervivencia. Esto destaca la necesidad de conservar y proteger los hábitats marinos en Galápagos, no solo para garantizar la supervivencia de esta especie, sino también para otras especies que dependen de estos ecosistemas. Los refugios de fauna marina desempeñan un papel esencial en la protección y conservación de la vida silvestre marina, contribuyendo a la conservación de la biodiversidad, ofreciendo un entorno seguro para especies amenazadas, protegiendo hábitats críticos, facilitando la investigación científica y promoviendo la educación y el turismo sostenible.

## 5 CONCLUSIÓN

El uso de herramienta moleculares es muy importante para realizar una clasificación taxonómica precisa de las especies, en especial cuando los caracteres morfológicos no son capaces de diferenciar especies cercanamente relacionadas. En este caso, los géneros *Dasyatis* e *Hypanus* no presentan diferencias marcadas a nivel morfológico, con excepción de su tamaño siendo *Hypanus* más grande. En el caso de San Cristóbal en Galápagos, esta

herramienta permitió confirmar la presencia de la especie *Hypanus dipterurus*, conforme a su nueva clasificación del 2016 (Last et al., 2016).

El análisis genómico también puede contribuir a la identificación de especies en Galápagos al proporcionar información sobre su diversidad genética y estructura de población. Al estudiar los patrones genéticos de diferentes individuos dentro de una especie, se pueden identificar unidades genéticas distintas que pueden corresponder a subespecies o poblaciones locales.

Este enfoque es especialmente relevante en Galápagos, donde la presencia de barreras geográficas y condiciones ambientales particulares ha llevado a la diferenciación genética de muchas especies. Al comprender la estructura genética de las poblaciones y las relaciones entre ellas, se puede obtener una visión más completa de la biodiversidad de la región y se pueden tomar decisiones de conservación más informadas.

Además, puede ayudar a identificar patrones de migración y dispersión de especies en Galápagos. Al examinar los patrones de flujo genético entre diferentes poblaciones, se puede determinar la conectividad entre los ecosistemas y comprender cómo las especies se mueven y colonizan diferentes áreas. Estos conocimientos son fundamentales para el diseño de estrategias de conservación efectivas.

Hoy en día *Hypanus dipterurus* es una especie que se encuentra en la categoría de vulnerabilidad según la clasificación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Esta clasificación se basa en los efectos y en la susceptibilidad, debido a que son particularmente vulnerables a los efectos de la actividad humana en sus hábitats. La pesca incidental, en la cual las rayas quedan atrapadas accidentalmente en redes de pesca dirigidas a otras especies, es una amenaza importante para su supervivencia. Esta actividad puede causar una disminución en el tamaño de las poblaciones y la pérdida de información genética.

En el caso específico de la Isla San Cristóbal en Galápagos, se ha observado que la diversidad genética de *Hypanus dipterurus* es baja. Esto se evidencia por la presencia de únicamente dos haplotipos en las muestras recolectadas. Es así que la reducción en la diversidad genética es una preocupación, ya que puede disminuir la capacidad de la especie para adaptarse a cambios ambientales y aumentar su vulnerabilidad a la extinción. Dado este antecedentes es importante tener en cuenta estos hallazgos en la gestión y conservación de las poblaciones de *Hypanus dipterurus* en Galápagos, debido a que facilita la implementación de medidas adecuadas a la ecología de las especies para reducir la pesca incidental y proteger los hábitats costeros puede contribuir a la conservación de esta especie.

Este trabajo es el primero en usar herramientas moleculares para la especie *Hypanus dipterurus* en la Isla San Crsitóbal Galápagos Ecuador. Sin embargo, está limitado a una única isla, por lo que sugerimos que estudios futuros incluyan análisis con muestras de otras islas, así como el uso de otros marcadores genéticos o genómicos para un mejor entendimiento sobre la dinámica poblacional en el archipiélago. De la misma forma, análisis comparativos a nivel regional serán claves para conocer la conectividad de la especie, y desarrollar recomendaciones de manejo.

Finalmente, trabajos como éste, con un enfoque en especies poco estudiadas son necesarios para levantar información ecológica complementaria para promover la conservación de la fauna marina de Galápagos. El esfuerzo de campo de este estudio permitió identificar zonas clave para la ecología de esta especie. Por ejemplo, en base al tamaño de los individuos muestreados, fue posible identificar potenciales zonas de crianza y reproducción para las rayas *Hypanus*, siendo las localidades donde se obtuvieron las muestras, debido a que en su mayoría de individuos recolectados eran juveniles; las cuales se desconocían para esta especie. Como se puede observar este tipo de estudios moleculares son importantes debido a que permiten llenar vacíos informativos como el poder identificar de forma correcta a una



especie, lo cual a largo plazo puede ser el inicio de programas de conservación para estos individuos ya que esto permitirá conocer más sobre su biología y ecología para poder conservarlas.

## 6 TABLAS

**Tabla 1. Características de los Primers COI y CytB utilizados**

<b>Gen</b>	<b>Tamaño esperado</b>	<b>Primer F</b>	<b>Primer F secuencia (5'-3')</b>
COI 1	1084pb	COI_Dasya_F	GGActTgAACCTCTCTTTACGGA
		COI_Dasya_R	tCAAAGgAGRGGTGTtTCTCA
CytB	813pb	CytB_Dasya_Fb	CtGCCCTYCCcTATATTGGA
		CytB_Dasya_Rb	TGGGAGCCAAGGATRAGGG

## 7 FIGURAS

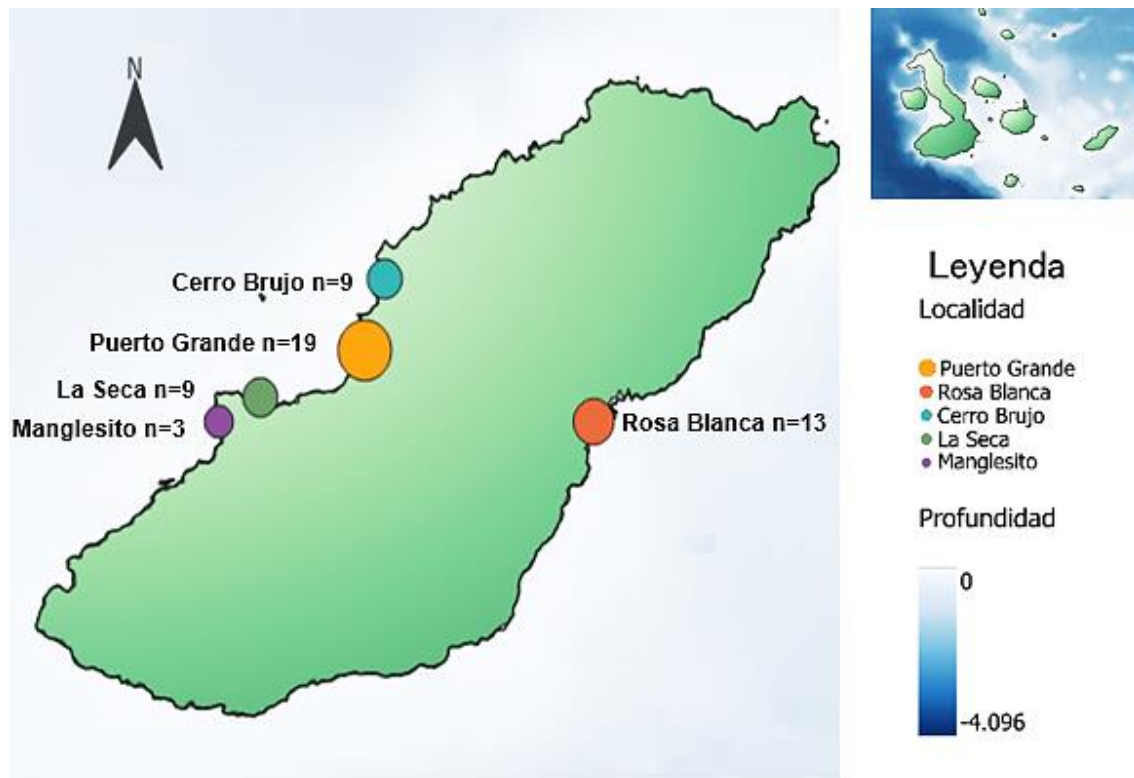


Figura 1. Mapa de localidades de recolección de muestras en la Isla San Cristóbal, Galápagos.

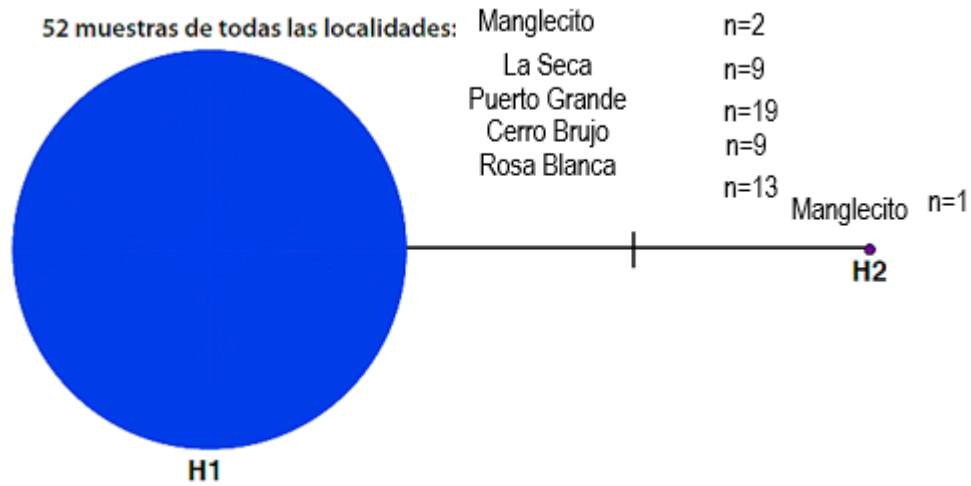


Figura 2. Red de haplotipos por individuos de rayas sartén analizadas (COI y CytB)

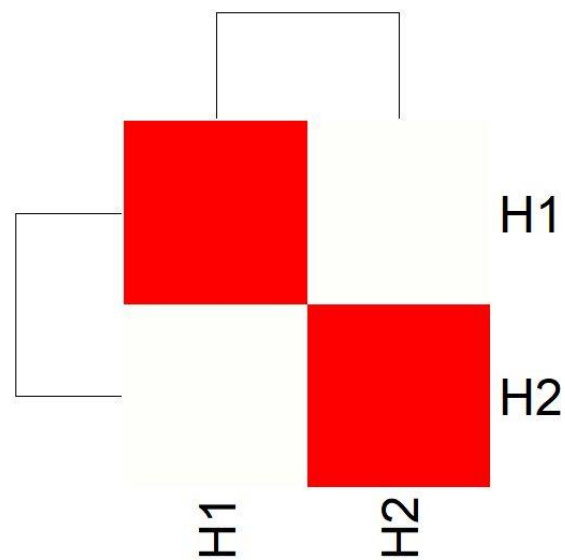
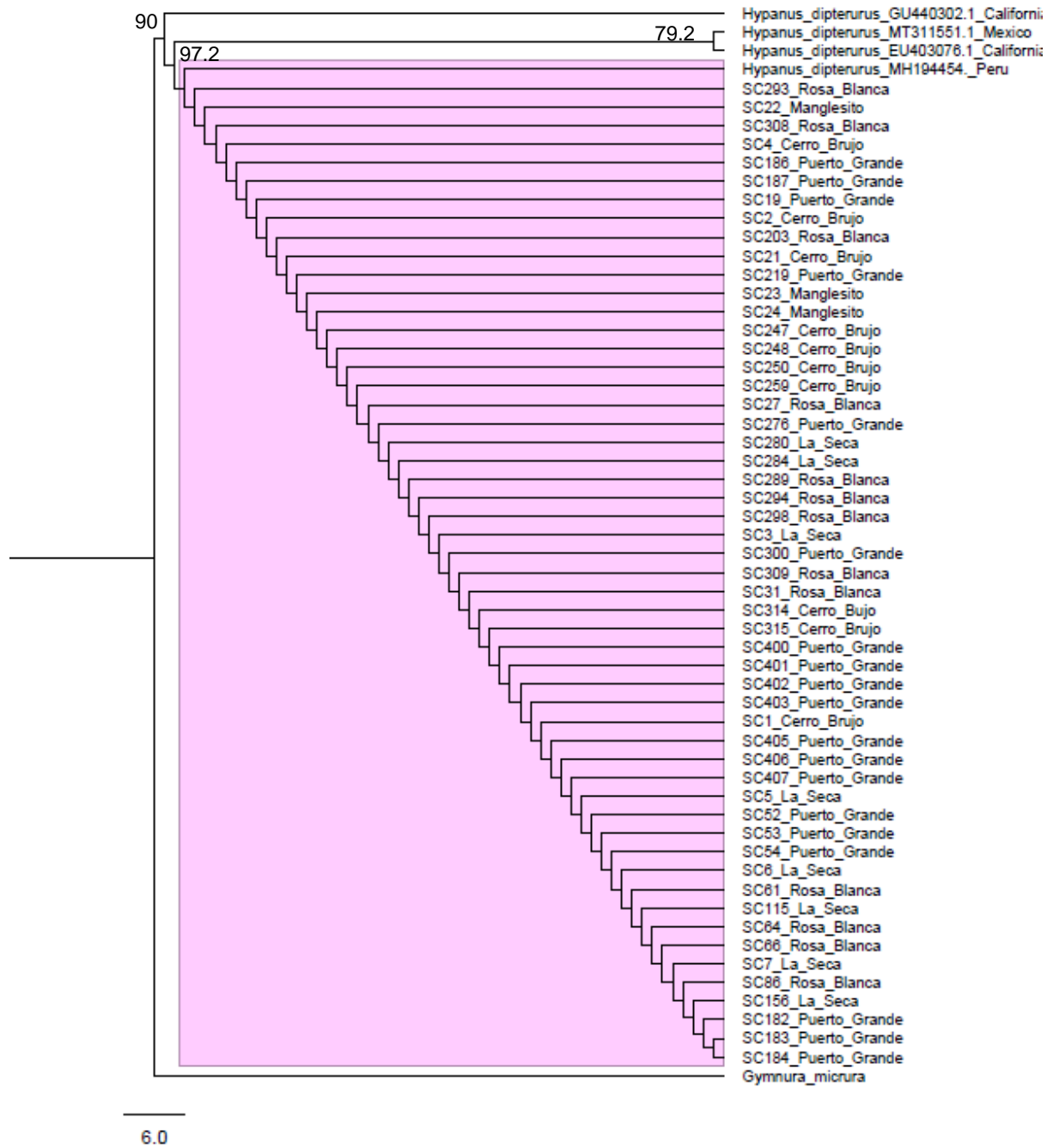


Figura 3. Heatmap basado en el número de diferencias de nucleótidos entre los haplotipos (COI y CytB).



**Figura 4.** Árbol Filogenético de Muestras recolectadas de San Cristobal y de Pacífico de *Hypanus dipterurus*.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bronwyn H. Holmes, Dirk Steinke, & Robert D. Ward. (2009). *Identification of shark and ray fins using DNA barcoding*.
- Carla Armijos. (2020). *Estudio preliminar de la diversidad genética de posibles especies de rayas presentes en Galápagos*.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3(3), S30–S37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>
- FigTree. (2018). *Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology*.  
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Goodall-Copestake, W. P., Tarling, G. A., & Murphy, E. J. (2012). On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: A case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity*, 109(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.1038/hdy.2012.12>
- Google Maps. (2023). *Playa El Manglecito · 5F97+P3J, Isla de San Cristóbal, Ecuador, San Cristóbal*. Playa El Manglecito · 5F97+P3J, Isla de San Cristóbal, Ecuador, San Cristóbal.  
[https://www.google.com.ec/maps/dir/5F97%2BP3J+Playa+El+Manglecito,+Isla+de+San+Crist%C3%B3bal,+Ecuador,+San+Crist%C3%B3bal/"@-0.8752137,-89.8018018,11.08z/data=!4m14!4m13!1m5!1m1!1s0x9000e609b8239ea3:0x618674ce131a8ba0!2m2!1d-89.5373521!2d-0.830653!1m5!1m1!1s0x9000e609b8239ea3:0x618674ce131a8ba0!2m2!1d-89.5373521!2d-0.830653!3e3?hl=es](https://www.google.com.ec/maps/dir/5F97%2BP3J+Playa+El+Manglecito,+Isla+de+San+Crist%C3%B3bal,+Ecuador,+San+Crist%C3%B3bal/)

- Hearn, A., David, Ketchum, J., Peñaherrera, C., Green, J., Marshall, A., Guerrero, M., & Shillinger, G. (2014). *Elasmobranchs of the Galapagos Marine Reserve* (pp. 23–59). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-02769-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-02769-2_2)
- INVITROGEN. (2008). *Platinum® Taq DNA Polymerase*. [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/100004289\\_PlatinumTaqDNApolymerase\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/100004289_PlatinumTaqDNApolymerase_man.pdf)
- INVITROGEN. (2011). *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity*.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Konstantin Okonechnikov, Olga Golosova, & Mikhail Fursov. (2012). *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit | Bioinformatics | Oxford Academic*. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/8/1166/195474?login=false>
- Last, P., Naylor, G., & Manjaji-Matsumoto, B. (2016). A revised classification of the family Dasyatidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes) based on new morphological and molecular insights. *Zootaxa*, *4139*, 345. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4139.3.2>
- Last, P. R. (Ed.). (2016). *Rays of the world*. Comstock Publishing Associates, a division of Cornell University Press ; CSIRO Publishing.
- Lim, K. C., Lim, P.-E., Chong, V. C., & Loh, K.-H. (2015). Molecular and Morphological Analyses Reveal Phylogenetic Relationships of Stingrays Focusing on the Family Dasyatidae (Myliobatiformes). *PLOS ONE*, *10*(4), e0120518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120518>
- Madden, T. (2000). *The BLAST Sequence Analysis Tool*.
- Maurice Kottelat. (2013). (PDF) *The fishes of the inland waters of Southeast Asia: A catalogue and core bibliography of the fishes known to occur in freshwaters*,

*mangroves and estuaries.*

[https://www.researchgate.net/publication/270453231\\_The\\_fishes\\_of\\_the\\_inland\\_waters\\_of\\_Southeast\\_Asia\\_A\\_catalogue\\_and\\_core\\_bibliography\\_of\\_the\\_fishes\\_known\\_to\\_occur\\_in\\_freshwaters\\_mangroves\\_and\\_estuaries](https://www.researchgate.net/publication/270453231_The_fishes_of_the_inland_waters_of_Southeast_Asia_A_catalogue_and_core_bibliography_of_the_fishes_known_to_occur_in_freshwaters_mangroves_and_estuaries)

Ming Wei Su, Hong Ming Chen, & Deng Fwu Hwang. (2011). *Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences of Five Common Stingrays in Taiwan.*

Ministerio de Producción Comercio Exterior Consumo y Pesca. (2023). *Reporte del Ecuador referente a la Resolución C-15-04 sobre Conservación de las Rayas Mobulidae.*

Navia López, A. F. (2013). *Función ecológica de tiburones y rayas en un ecosistema costero tropical del Pacífico colombiano.* Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

NCBI. (1999). *NCBI Primer Blast designing tool.*

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?INPUT\\_SEQUENCE=%20EU563945.2&LINK\\_LOC=nucore](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?INPUT_SEQUENCE=%20EU563945.2&LINK_LOC=nucore)

Onodera, K. (2007). Selection for 3'-End Triplets for Polymerase Chain Reaction Primers. *PCR Primer Design*, 402, 61–74. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_3)

Peck, S. B. (1994). *LA DIVERSIDAD DE ESPECIES DE LAS GALAPAGOS: ¿ESTA EN LA TIERRA O EN EL MAR?*

Pérez-Jiménez, J. C. (2011). *Biología reproductiva de la raya *Rhinoptera bonasus* (Elasmobranchii) en el sureste del Golfo de México. 21(2).*

Petean, F., Naylor, G., & Lima, S. (2020). Integrative taxonomy identifies a new stingray species of the genus *Hypanus* Rafinesque, 1818 (Dasyatidae, Myliobatiformes) from the Tropical Southwestern Atlantic. *Journal of Fish Biology*, 97, 1120–1142. <https://doi.org/10.1111/jfb.14483>

- Pollom, R., Bizarro, J., Burgos Vázquez, M., Cevallos - Garcias, A., Velez-Zuazo, X., Avalos Castillo, C., Espinoza, M., Herman, K., Mejía-Falla, P., Navia, A., Pérez-Jiménez, J., & Sosa-Nishizaki, O. (2020). *Hypanus dipterurus* -THE IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES™.
- QAIGEN. (2013). *DNeasy Blood & Tissue Kits*.  
<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit>
- Ricardo Cruz & Daniela Urresta. (2019). *Convivencia entre la fauna y la gente a través de relatos en Santa Cruz—Puerto Ayora: Un documental social de Galápagos*.
- Richards, V., DeBiase, M., & Shivji, M. (2018). Deep mitochondrial lineage divergence among populations of the southern stingray (*Hypanus americanus* (Hildebrand & Schroeder, 1928)) throughout the Southeastern United States and Caribbean. *Marine Biodiversity*, 49. <https://doi.org/10.1007/s12526-018-0930-5>
- Rimieri, P. (2017). *LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y LA VARIABILIDAD GENÉTICA: DOS CONCEPTOS DIFERENTES ASOCIADOS AL GERMOPLASMA Y AL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL*.
- Rodrigo Bustamanete, Ken Collins, & Robert Bensted. (2000). *Biodiversity conservation in the Galápagos Marine Reserve*. [https://biblio.naturalsciences.be/rbins-publications/bulletins-de-linstitut-royal-des-sciences-naturelles-de-belgique-entomologie/70-sup-2000/entomo70sup\\_31-38.pdf](https://biblio.naturalsciences.be/rbins-publications/bulletins-de-linstitut-royal-des-sciences-naturelles-de-belgique-entomologie/70-sup-2000/entomo70sup_31-38.pdf)
- Rosenberger, L. J. (2001). Phylogenetic Relationships within the Stingray Genus *Dasyatis* (Chondrichthyes: Dasyatidae). *Copeia*, 2001(3), 615–627.
- Saadaoui, A., Saïdi, B., Elglid, A., Seret, B., & Bradai, M. (2016). Taxonomic observations on stingrays of the genus *Dasyatis* (Chondrichthyes: Dasyatidae) in the Gulf of Gabès



(Southeastern Mediterranean Sea). *Zootaxa*, 4173, 101–113.

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4173.2.1>

Stevens William. (2016). *Conservation and Population Ecology of Manta Rays in the Maldives*.

Thermo Fisher Scientific. (2015). *Thermo Fisher Scientific—Waltham, MA, USA*.

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>

Tobar, O. B. (2019). El origen de nuevas especies. *Revista Anales*, 1(377), Article 377.

Toparslan, E., Karabag, K., & Bilge, U. (2020). A workflow with R: Phylogenetic analyses and visualizations using mitochondrial cytochrome b gene sequences. *PloS One*, 15(12), e0243927–e0243927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243927>

Untergasser A, Cutcutache I, & Koressaar T. (2012). *Primer3web*. <https://primer3.ut.ee/>

Wheeler, D., & Bhagwat, M. (2007). BLAST QuickStart. En *Comparative Genomics: Volumes 1 and 2*. Humana Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1734/>

## ANEXO

### ANEXO 1. Resultado de Cuantificación de extracción de ADN

Serie de Campo (SC)	Sample Location	Date	Place	Concentración extracción ng/ul
SC00001	USFQ-2019	2019	Cerro Brujo	400.9
SC00002	USFQ-2019	2019	Cerro Brujo	699.7
SC00003	USFQ-2019	2019	La Seca	342.6
SC00005	USFQ-2019	2019	La Seca	1736.9
SC00006	USFQ-2019	2019	La Seca	175.9
SC00019	USFQ-2019	2019	Puerto Grande	2082.7
SC00020	USFQ-2019	2019	Cerro Brujo	483.6
SC00021	USFQ-2019	2019	Cerro Brujo	728.9
SC00022	USFQ-2019	2019	Manglecito	811.6
SC00023	USFQ-2019	2019	Manglecito	358.6
SC00024	USFQ-2019	2019	Manglecito	2234.7
SC00027	USFQ-2019USFQ-2031	2019	Rosa Blanca	1618.8
SC00031	USFQ-2019USFQ-2032	2019	Rosa Blanca	2457.9
SC00052	USFQ-2019USFQ-2033	2019	Puerto Grande	2678.2
SC00053	USFQ-2019USFQ-2034	2019	Puerto Grande	2261.9
SC00054	USFQ-2019USFQ-2035	2019	Puerto Grande	934.9
SC00061	USFQ-2019USFQ-2036	2019	Rosa Blanca	2997.4
SC00064	USFQ-2019USFQ-2037	2019	Rosa Blanca	559.4
SC00066	USFQ-2019USFQ-2038	2019	Rosa Blanca	1803.7
SC00086	USFQ-2019USFQ-2039	2019	Rosa Blanca	369.3
SC00115	GSC Freezer	2021	La Seca	180.4
SC00156	GSC Freezer	2021	La Seca	110.5
SC00182	USFQ-2019USFQ-2041	2022	Puerto Grande	229.4
SC00186	USFQ-2019USFQ-2042	2022	Puerto Grande	691.1
SC183	USFQ-2019USFQ-2043	2022	Puerto Grande	691.1

SC184	USFQ-2019USFQ-2043	2022	Puerto Grande	691.1
SC00203	GSC Freezer	20222021	Rosa Blanca	185.9
SC00219	GSC Freezer	20222021	Puerto Grande	280.6
SC00247	GSC Freezer	20222021	Cerro Brujo	275.30
SC00248	GSC Freezer	20222021	Cerro Brujo	392.2
SC00250	GSC Freezer	20222021	Cerro Brujo	1071.6
SC00259	GSC Freezer	20222021	Cerro Brujo	213
SC00276	GSC Freezer	20222021	Rosa Blanca	398.6
SC00280	GSC Freezer	2022	La Seca	509.8
SC00283	GSC Freezer	2022	La Seca	465.3
SC00284	GSC Freezer	2022	La Seca	1189.8
SC00289	GSC Freezer	2022	Manglecito	317.3
SC00293	GSC Freezer	2022	Rosa Blanca	967.2
SC00294	GSC Freezer	2022	Rosa Blanca	213.8
SC00298	GSC Freezer	2022	Rosa Blanca	184.4
SC00300	GSC freezer	20222021	Puerto Grande	694.2
SC00308	GSC Freezer	23/6/2021	Rosa Blanca	276.4
SC003098	GSC Freezer	23/6/2021	Rosa Blanca	276.4
SC00314	GSC Freezer	2022	Cerro Brujo	871.5
SC00315	GSC Freezer	2022	Cerro Brujo	191.5
SC00401	GSC Freezer	2022	Puerto Grande	744.4
SC00402	GSC Freezer	2022	Puerto Grande	166.9
SC00403	GSC Freezer	2022	Puerto Grande	211.7
SC00404	GSC Freezer	2022	Puerto Grande	504.2
SC00405	GSC Freezer	2022	Puerto Grande	97.7
SC00406	GSC Freezer	2022	Puerto Grande	95.7
SC00407	GSC Freezer	2022	Puerto Grande	267.3

SC00007	USFQ-2019USFQ-2019	2019	La Seca	398.6
---------	--------------------	------	---------	-------

**ANEXO 2. Resultado de Blast en NCBI para 53 muestras secuenciadas para COI y CytB**

Muestras CytB						
Muestra	Blast SP	Per.ident %	Query Cover%	Max score	Total Score	Query Length
SC00407	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00406	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00405	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00403	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00402	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00401	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00400	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00315	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00314	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1077	1077	774
SC00309	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00308	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1079	1079	774
SC00300	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00298	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1083	1083	774
SC00294	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1079	1079	774
SC00293	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.3	86	1079	1079	774
SC00289	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00284	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00280	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.44	86	1085	1085	774

SC00276	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.31	86	1081	1081	774
SC00259	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00250	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	87	1070	1070	774
SC00248	<i>Hypanus dipterurus</i>	94.9	85	1072	1072	774
SC00247	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.4	86	1068	1068	774
SC00219	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00203	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	87	1072	1072	774
SC00187	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00186	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.45	85	1088	1088	774
SC00184	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00183	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.38	86	1068	1068	774
SC00182	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.38	86	1068	1068	774
SC00156	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00115	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00086	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.31	86	1081	1081	774
SC00066	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.3	86	1079	1079	774
SC00064	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00061	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.45	86	1086	1086	774
SC00054	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.45	87	1088	1088	774
SC00053	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.45	86	1086	1086	774
SC00052	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00031	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1072	1072	774
SC00027	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.46	86	1090	1019	774
SC00024	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.36	86	1094	1094	774

SC00023	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1086	1086	774
SC00022	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.45	87	1088	1088	774
SC00021	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.45	86	1086	1086	774
SC00019	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	86	1070	1070	774
SC00007	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.6	86	1068	1068	774
SC00006	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.3	86	1079	1079	774
SC00005	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.45	86	1088	1088	774
SC00004	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	85	1070	1070	774
SC00003	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.45	86	1088	1088	774
SC00002	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.16	86	1075	1075	774
SC00001	<i>Hypanus dipterurus</i>	95.39	85	1072	1072	774

### Muestras COI

Muestra	Blast SP	Per.ident %	Query Cover%	Max score	Total Score	Query Length
SC00407	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00406	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00405	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00403	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00402	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00401	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00400	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00315	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00314	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00309	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00308	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994

SC00300	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00298	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00294	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00293	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00289	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00284	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00280	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00276	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00259	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00250	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00248	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00247	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00219	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00203	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00187	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00186	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00184	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00183	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00182	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00156	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00115	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00086	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00066	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00064	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994

SC00061	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00054	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00053	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00052	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00031	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00027	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00024	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00023	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1569	1569	994
SC00022	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00021	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00019	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00007	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1596	1596	994
SC00006	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00005	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00004	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.21	98	1600	1600	994
SC00003	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.22	98	1600	1600	994
SC00002	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.23	98	1600	1600	994
SC00001	<i>Hypanus dipterurus</i>	96.24	98	1600	1600	994