

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio preliminar de la diversidad genética de posibles especies de rayas
presentes en Galápagos**

Carla Vanessa Armijos Tapia

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito para la obtención del
título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 04 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Estudio preliminar de la diversidad genética de posibles especies de rayas
presentes en Galápagos**

Carla Vanessa Armijos Tapia

Nombre del profesor, Título académico María de Lourdes Torres, Ph.D.

Quito, 04 de mayo de 2020

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 el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Carla Vanessa Armijos Tapia

Código: 00125093

Cédula de identidad: 1719654145

Lugar y fecha: Quito, mayo 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UNPUBLISHED DOCUMENT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 *Dasyatis* abarca aproximadamente 27 especies de rayas que se encuentran distribuidas en todos los océanos en aguas tropicales y subtropicales. Se les conoce comúnmente con el nombre de rayas látigo porque tienen una cola delgada y larga. En Ecuador se ha reportado la presencia de dos especies principales: *Dasyatis longa* y *Dasyatis dipterura*; que han sido vistas y pescadas en las costas del continente y del Archipiélago de Galápagos. Debido a la poca información que hay de las especies del género *Dasyatis*, no se tiene una idea clara sobre su estado de conservación, pero se sospecha que pueden estar en peligro debido a la pesca incidental e intencional descontrolada. El objetivo de este proyecto fue realizar la extracción de ADN de tejido de rayas para su uso en futuros estudios moleculares. Se extrajeron 56 muestras de diferentes tipos de tejido de varias especies de rayas provenientes de las Islas San Cristóbal e Isabela, en Galápagos. Se utilizó un protocolo de extracción para pequeñas cantidades de tejido (0.1 g) previamente utilizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito para otras especies como *Mobula birostris* y *Aetobatus laticeps*. Las concentraciones de ADN obtenidas se encontraron en un rango de 41 – 3067 ng/ μ L mientras que los valores del índice de calidad de ADN 260/280 y 260/230 estuvieron en un rango de 1.51 – 2.39 y 0.73 – 2.17 respectivamente. La diferencia en la concentración de ADN obtenido pudo deberse a que se trabajó con diferentes cantidades y tipos de tejido. Los resultados obtenidos sugieren que el protocolo de extracción de ADN utilizado fue apropiado para la obtención de ADN de tejido de diferentes especies de rayas. Se recomienda utilizar este protocolo para realizar futuros estudios moleculares de *D. longa* y *D. dipterura*.

Palabras clave: *Dasyatis*, *Dasyatis longa*, *Dasyatis dipterura*, estado de conservación, Islas Galápagos, estudios moleculares, protocolo de extracción de ADN.

ABSTRACT

Dasyatis genus encompasses approximately 27 species of rays that are distributed throughout the oceans in tropical and subtropical waters. They are commonly known as whip rays because they have a long, thin tail. In Ecuador, the presence of two main species has been reported: *Dasyatis longa* and *Dasyatis dipterura*; that have been seen and fished on the coasts of the mainland and the Galapagos Archipelago. Due to the lack of information available on species of the genus *Dasyatis*, there is no clear idea about its conservation status, but it is suspected that they may be in danger due to incidental and intentional uncontrolled fishing. The aim of this project was to extract DNA from rays' tissue to be used in future molecular studies. Fifty-six samples of different tissue types were extracted from various species of rays from the San Cristobal and Isabela Islands in Galapagos. An extraction protocol was used for small amounts of tissue (0.1 g), which was previously used at the Plant Biotechnology Laboratory of the Universidad San Francisco de Quito for other species such as *Mobula birostris* and *Aetobatus laticeps*. The DNA concentrations obtained were in a range from 41 to 3067 ng/ μ L, while the DNA quality index values 260/280 and 260/230 were in a range from 1.51 to 2.39 and 0.73 to 2.17 respectively. The difference in the DNA concentration obtained could be due the fact of working with different amounts and types of tissue. The results obtained suggest that the DNA extraction protocol used was appropriate for obtaining DNA from tissue of different rays' species. It is recommended to use this protocol to conduct future molecular studies of *D. longa* and *D. dipterura*.

Key words: *Dasyatis*, *Dasyatis longa*, *Dasyatis dipterura*, conservation status, Galapagos Islands, molecular studies, DNA extraction protocol.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	10
1.1.	Género <i>Dasyatis</i>	10
1.1.1.	Taxonomía e historia.....	10
1.1.2.	Morfología y características.....	10
1.1.3.	Reproducción y desarrollo.....	11
1.1.4.	Distribución y comportamiento.....	12
1.1.5.	Estado de conservación, pesca y comercio de <i>Dasyatis spp.</i>	12
1.2.	<i>Dasyatis</i> en Ecuador: <i>Dasyatis longa</i> y <i>Dasyatis dipterura</i>	13
1.2.1.	Generalidades y distribución.....	13
1.2.2.	Situación actual.....	13
1.3.	Estudios de diversidad genética y su importancia para la conservación de rayas que habitan en el Archipiélago de Galápagos	14
1.3.1.	Marcadores mitocondriales en estudios filogenéticos.....	15
1.3.1.1.	Marcador mitocondrial <i>COI</i>	15
2.	METODOLOGÍA	17
2.1.	Extracción de ADN de <i>Dasyatis spp.</i>	17
2.2.	Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN extraído del tejido de <i>Dasyatis</i>	18
2.3.	Evaluación de la integridad del ADN extraído del tejido de <i>Dasyatis</i>	18
3.	RESULTADOS.....	19
3.1.	Extracción y cuantificación de ADN de tejido de <i>Dasyatis spp.</i>	19
3.2.	Evaluación de la integridad del ADN	19
4.	DISCUSIÓN.....	20
4.1.	Extracción de ADN de diferentes tipos de tejidos de <i>Dasyatis spp.</i>	20
4.2.	Marcador molecular <i>COI</i> para futuros estudios de identificación de especies de <i>Dasyatis</i>	22
5.	CONCLUSIONES	25
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	26
7.	TABLAS	29
8.	FIGURAS.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de tejido muscular, cutáneo y mucoso del género <i>Dasyatis</i> recolectadas en las islas San Cristóbal e Isabela y datos de la concentración e índices de calidad de ADN después de la extracción.	29
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la extracción de ADN genómico de 56 muestras de varios tipos de tejido de diferentes especies de rayas del género <i>Dasyatis</i> pertenecientes a las islas San Cristóbal e Isabela – Galápagos – Ecuador.	30
---	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Género *Dasyatis*

1.1.1. Taxonomía e historia.

Dasyatis pertenece a la clase de los Condriictios, dentro de la subclase Elasmobranquios, del orden Myliobatiformes y de la familia Dasyatidae. Se han reportado 9 géneros y alrededor de 70 especies dentro de esta familia (Sarmiento y otros, 2015). *Dasyatis* y *Pteroplatytrygon* son los géneros más estudiados (Last y otros, 2006). El género *Dasyatis* comprende alrededor de 27 especies de las cuales *Dasyatis pastinaca* y *Dasyatis americana* son las más estudiadas (Last y otros, 2016).

Existen registros fósiles de la familia Dasyatidae desde el periodo Cretácico superior. Son el grupo más antiguo sobreviviente de vertebrados que poseen mandíbulas pertenecientes a la clase Chondrichthyes (Bleckmann y Hofmann, 1999). Debido a su amplia distribución se ha podido clasificar e identificar a los géneros de esta familia de acuerdo a su hábitat. Sus patrones de migración y anidación hacen que sean las rayas más estudiadas que habitan en mares tropicales (Sarmiento y otros, 2015).

1.1.2. Morfología y características.

El género *Dasyatis* se caracteriza por tener aletas pectorales en forma de disco romboide, ovalado o circular; y un cuerpo relativamente plano con ojos ubicados en la parte superior de la cabeza. Poseen espiráculos que les permiten respirar junto con 5 pares de branquias ventrales. También, carecen de vejiga natatoria y absorben alimentos por una válvula espiral en su intestino (Isai y otros, 2012).

Su piel es lisa o puede cubierta de espinas. La pigmentación de la misma es uniforme, camuflándose en la arena del fondo marino. Sin embargo, existen pocas especies que presentan estos patrones de pigmentación (Sarmiento y otros, 2015). El tamaño aproximado de los individuos adultos va de 1.0 m hasta 1.8 m de longitud, reportándose ejemplares de hasta 2.57 m con un diámetro de disco de 1.17 m (Guerrón, 2007).

1.1.3. Reproducción y desarrollo.

Su sistema de apareamiento es complejo con una fertilización interna. El macho inserta uno de sus dos ganchos en la cloaca de la hembra para depositar el esperma (Bleckmann y Hofmann, 1999). Este proceso es regulado hormonalmente, por lo que las hembras son capaces de enviar señales químicas a los machos cuando se encuentran listas para el apareamiento (Bleckmann y Hofmann, 1999). Su periodo de gestación es aproximadamente de 5 a 6 meses (Villavicencio y otros, 1994).

En su etapa de madurez sexual se reproducen y tienen una sola camada al año, de 2 a 6 crías. La supervivencia de las mismas es importante para la supervivencia de toda la especie (Last y White, 2006). Durante el desarrollo, la madre proporciona un líquido lechoso llamado histótrofo, que es secretado por el útero. El estómago y el intestino se desarrollan primero, permitiendo que los embriones digieran el histótrofo para desarrollarse. El epitelio del útero de *Dasyatis* ha evolucionado para formar unas vellosidades alargadas, conocidas también como trophonemata, que permiten un intercambio respiratorio exitoso para la cría. El histótrofo actúa como un lubricante que facilita la salida de la cría del cuerpo de la madre. Cuando las crías nacen son perfectamente capaces de alimentarse y valerse por sí mismas porque su desarrollo desde la etapa de huevo a un estadio juvenil se da dentro del útero de la madre (Villavicencio y otros, 1994).

1.1.4. Distribución y comportamiento.

Se distribuyen en los mares tropicales y subtropicales, y se conoce que hay una mayor abundancia del género cuando la temperatura del agua baja hasta los 14°C (Arauz y otros, 2009). Generalmente viven en el fondo marino enterradas parcialmente en la arena. Sin embargo, también han sido vistas cerca de arrecifes de coral (Last y White, 2006).

Interactúan con el ambiente por medio de canales sensoriales (vista, oído, tacto y olfato). Poseen una sensibilidad eléctrica superior a la de los demás peces por sus órganos electrorreceptores, que detectan señales enviadas por contracción muscular, diferencia iónica de un cuerpo (presa) o por patrones eléctricos enviados por una conducción nerviosa (Isai y otros, 2012; Last y otros, 2006). Esto les sirve para navegar, orientarse, y para localizar a sus presas, las cuales capturan utilizando las púas de su larga cola (Bleckmann y Hofmann, 1999). También les sirve para defenderse de los depredadores (Last y White, 2006).

1.1.5. Estado de conservación, pesca y comercio de *Dasyatis spp.*

La pesca indiscriminada, que ha aumentado en la última década debido a la alta demanda y a la renovación de tecnología pesquera, ha causado la reducción de las poblaciones de diferentes especies de rayas en el mundo. En la actualidad el valor comercial de la carne de raya ha aumentado y como consecuencia su demanda en el mercado mundial (Guerrón, 2007). Las especies del género *Dasyatis* son las más apetecidas por el gran tamaño que alcanzan aún en estado juvenil (Cartamil y otros, 2003). Por esta razón, diferentes especies del género, como *D. americana*, *D. colarensis* y *D. fluviorum* han sido clasificadas como vulnerables a la explotación pesquera según la IUCN (Smith, 2006).

1.2. *Dasyatis* en Ecuador: *Dasyatis longa* y *Dasyatis dipterura*

1.2.1. Generalidades y distribución.

En Ecuador, se ha reportado la presencia de dos principales especies del género: *Dasyatis longa* y *Dasyatis dipterura*. Ambas comparten una morfología similar. La coloración de su piel va desde tonos grisáceos hasta negros, y poseen una cola delgada y larga con espinas en la punta (Isai y otros, 2012). Han llegado a ser catalogadas como la misma especie, por falta de estudios moleculares e información filogenética (Last y otros, 2016).

Se tiene evidencia de que las especies *D. longa* (o raya coluda) y *D. dipterura* se distribuyen desde California baja hasta Ecuador, incluyendo el Archipiélago de Galápagos. Si bien no suelen vivir en mar abierto, pueden trasladarse en grupos grandes a aguas más profundas y cálidas para su apareamiento (López y Zanella, 2015).

1.2.2. Situación actual.

En Ecuador, la pesca de rayas empezó en el 2003 con el aumento de la demanda su carne, y de sus espinas, comercializadas como artesanías. *D. longa* es una de las especies más pescadas dentro del territorio, seguida de la especie *D. dipterura*. Estas son víctimas de la pesca tanto en las costas de Ecuador como en las costas de Colombia y Venezuela, donde se ha reportado un alto porcentaje de pesca de estas especies (Guerrón, 2007). Ambas son pescadas a lo largo del océano Pacífico para ser exportadas a México donde tienen un alto valor comercial (Arauz y otros, 2009).

Hasta la actualidad, no se tienen estudios filogenéticos ni ecológicos concretos de las especies *D. longa* y *D. dipterura* en Ecuador. Por tal razón, no ha sido posible determinar el tamaño de su población y por lo tanto su estado de conservación. La falta de información del

estado de ambas especies está relacionada con la falta de medidas que permitan prevenir su vulnerabilidad (Sarmiento y otros, 2015).

1.3. Estudios de diversidad genética y su importancia para la conservación de rayas que habitan en el Archipiélago de Galápagos

La diversidad genética de las especies se define como las variaciones heredables en cada organismo o entre poblaciones. Es importante para la conservación de las mismas, ya que les va a permitir adaptarse a su entorno o a los cambios que ocurren en él. Una diversidad genética alta implica una mayor probabilidad de adaptarse, por el contrario, una diversidad genética baja se relaciona con una menor probabilidad de supervivencia y por ello es un indicador de la vulnerabilidad de una especie dentro de un ecosistema (Piñero y Munguía, 2008) . De esta forma, al determinar la diversidad genética de las especies de rayas del género *Dasyatis* que habitan en las Islas Galápagos se podrá tener un amplio conocimiento del estado de su población y así poder establecer programas de conservación y protección para las mismas (Lai y otros, 2006).

Diferentes técnicas moleculares como la extracción de ADN, la amplificación de material genético, o la secuenciación de genomas, han permitido estudiar varias especies y tener más información sobre las mismas y su relación con el ecosistema (Zamora y otros, 2003). Los marcadores moleculares son secuencias de ADN cuya ubicación dentro de un locus en un cromosoma está bien definida, son rastreables y cuantificables. Por tal razón, se los utiliza para hacer mapeos genéticos, ubicar genes específicos, y determinar la diversidad genética de las especies por los polimorfismos o mutaciones (FAO, 2017).

1.3.1. Marcadores mitocondriales en estudios filogenéticos.

Los polimorfismos del ADN mitocondrial (mtADN) se han utilizado en varios estudios de filogenia y de diversidad genética (FAO, 2017). El ADN mitocondrial tiene una alta tasa de mutación, no se recombina y se transmite maternalmente, es decir, la descendencia hereda el mtADN de sus madres (Lai y otros, 2006). Debido a estas características se ha utilizado el mtADN para hacer reconstrucciones evolutivas de las especies y estudiar la relación que existe entre estas tomando como referencia las mutaciones existentes en el mtADN (FAO, 2017).

Los polimorfismos que se han encontrado en la región de control o D-loop del mtADN han permitido determinar la diversidad genética en una determinada especie (Lai y otros, 2006). La región D-loop es una región no codificante que está involucrada con la replicación y transcripción del ADN, además es la que más rápido evoluciona en el mtADN (Larissa y otros, 2002). Por lo tanto, al hacer tipificaciones (metodología que se utiliza para identificar genes y genotipos diferentes que se heredan a la descendencia) a partir de secuencias de mtADN se obtiene una huella genética de las mismas y también se puede determinar su origen geográfico. De esta forma, se puede establecer las relaciones que existen entre las especies que tienen conductas migratorias, como las rayas (Jiménez, 2016).

1.3.1.1. Marcador mitocondrial COI.

El gen COI del mtADN codifica para la enzima Citocromo C Oxidasa I (COI) que participa al final de la cadena respiratoria de la mitocondria y cataliza la transferencia de electrones (Rojas, 2014). Se utiliza como un código de barras de ADN para identificar especies animales. Presenta una variación intraespecífica muy amplia, permitiendo

identificar genéticamente especies. Además, es un gen altamente conservado y por ello se utiliza como una herramienta para su identificación y caracterización (Rentarías, 2007).

Es ampliamente utilizado como marcador en especies marinas para identificar a aquellas que son complejas de identificar morfológicamente y que han sido caracterizadas erróneamente (Rojas, 2014). El marcador mitocondrial COI es útil para relacionar especies de rayas emparentadas y clasificarlas de forma correcta (López y otros, 2006; Quiñónez, 2011). Utilizar este marcador en las especies de *Dasyatis*, que habitan en las Islas Galápagos, sería útil para su identificación y estado de conservación. Actualmente existe muy poca información de la especies del género *Dasyatis* en el Archipiélago. Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto de investigación fue probar un protocolo de extracción de ADN genómico de tejido de rayas para su uso en futuros estudios moleculares sobre las especies *D. longa* y *D. dipterura* que habitan las costas del Archipiélago de Galápagos.

En este proyecto se probó un protocolo de extracción de ADN para tejido de rayas del género *Dasyatis*, el mismo que fue previamente estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito para tejido de mantarraya. Se determinó la calidad y cantidad del ADN extraído mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 2000. También, se evaluó la integridad del mismo por medio de la visualización de bandas de alto peso molecular en geles de agarosa al 1%. Finalmente con los resultados obtenidos se demostró que el protocolo de extracción de ADN utilizado puede emplearse en futuros estudios moleculares para la identificación de especies de *Dasyatis* en Galápagos.

2. METODOLOGÍA

2.1. Extracción de ADN de *Dasyatis spp.*

Se extrajo ADN genómico a partir de 56 muestras de tejido cutáneo, muscular y mucoso de individuos del género *Dasyatis* previamente colectados las Islas San Cristóbal e Isabela en Galápagos. Las muestras se encontraban conservadas a -20°C en etanol al 96% en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Se utilizó el protocolo de extracción reportado por Kashiwagi y otros, (2012), previamente estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, para la extracción de ADN de otras especies de mantarrayas y rayas como la mantarraya gigante o la raya águila.

En primer lugar, se cortó el tejido con un bisturí y se pesó con una balanza analítica aproximadamente de 0.0065 a 0.01 g. Se transfirió el tejido a un tubo Eppendorf de 1,5 ml previamente rotulado. Se añadieron 495 μL de buffer de lisis (10mM NaCl, 10mM Tris, 25 mM EDTA; pH 8) y 5 μL de proteinasa K al tubo, y se mezcló varias veces. Se incubó por 16 - 19 horas a 56°C en una cama de arena hasta que la mayor parte del tejido sufrió lisis. Se agitaron los tubos incubados con ayuda de un vórtex y se agregaron 250 μL de acetato de amonio frío, mezclando vigorosamente. Los tubos se centrifugaron 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 transferir el precipitado que se encontraba en el fondo de los tubos centrifugados. Se añadieron 750 μL de etanol frío al 100% y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó nuevamente a 13200 rpm durante 20 min a 4°C y se observó el precipitado o pellet en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 μL de etanol frío al 100%. Se resuspendió el pellet y se volvió a centrifugar durante 20 min a 4°C a una velocidad de 13200 rpm. Se descartó la mayor cantidad de etanol con ayuda de

una micropipeta procurando no tocar el pellet y se colocaron los tubos dentro de una sorbona para que el etanol remanente se evapore. Finalmente, se resuspendió el ADN en 50 μ l de TE 1X y se almacenó a una temperatura de -20°C hasta ser utilizado para su cuantificación.

2.2. Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN extraído del tejido de

Dasyatis

La concentración y pureza del ADN se determinó con la ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para determinar la pureza del ADN se utilizaron los índices de absorbancia 260/280 y 260/230. Se determinaron estos valores de tomando 2 μ l de cada una de las 56 muestras de ADN previamente extraído, y colocándolos en el equipo NanoDrop 2000.

2.3. Evaluación de la integridad del ADN extraído del tejido de *Dasyatis*

La integridad del ADN se determinó mediante la visualización de bandas de alto peso molecular en geles de agarosa al 1% con el uso de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen). Para la electroforesis se pesó 0.5 g de agarosa y se diluyó en 50 ml de TBE 1X. Para obtener un gel homogéneo y sin grumos se calentó la mezcla en el microondas hasta que se observó que toda la agarosa quedó completamente diluida. Se enfrió y se colocó el Syber safe, luego con una micropipeta se tomó 3 μ l de Blue Juice y se mezcló con 5 μ l de la muestra de ADN para cargarlos en los pocillos del gel previamente solidificado. Las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis por 45 min a 80 V. Finalmente, se observaron los resultados en fotodocumentador Biorad Gel Doc XR.

3. RESULTADOS

3.1. Extracción y cuantificación de ADN de tejido de *Dasyatis spp.*

Se logró extraer con éxito ADN de las 56 muestras procesadas. La concentración del ADN extraído se encontró dentro de un rango 41 – 6834 ng/μL. Para las muestras de tejido muscular el rango de concentración de ADN se encontraba entre 177 – 6834 ng/μL, para las muestras de tejido cutáneo fue de 41 – 3067 ng/μL y para el tejido mucoso la concentración de ADN fue de 51 ng/μL. Los valores para los índices de absorbancia para determinar la calidad del ADN extraído 260/280, 260/230 también presentaron una variación que se encontraba en un rango de 1.51 – 2.39 y 0.73 – 2.17 respectivamente. Para las muestras de tejido muscular el índice de la relación 260/280 se encontraba entre 1.78 – 2.13, mientras que para los tejidos cutáneos y el mucoso el índice de la relación 260/280 se encontraba entre 1.51 – 2.39. Por otro lado, el índice 260/230 en las muestras de tejido muscular fue de 1.34 – 2.17. En las muestras de tejido mucoso este índice se encontraba entre 0.9 – 2.23, y en el tejido cutáneo presentó un valor de 0.9. De acuerdo a estos datos obtenidos sabemos que no todas las muestras tenían ADN de alta calidad de acuerdo con los índices de ambas relaciones, y que el ADN extraído a partir de tejido mucoso presentó la menor concentración (Tabla 1).

3.2. Evaluación de la integridad del ADN

En la electroforesis de agarosa al 1 % se pudo comprobar la integridad del ADN extraído. En los geles se pudo observar que hubo bandas de alto peso molecular (por encima de los 1300 pb) (Figura 1), con lo cual se pudo comprobar que el ADN genómico no estaba degradado en la mayoría de las muestras. Sin embargo, en tres muestras (SC00172, SC00175 y SC00002) se observaron bandas de alto peso molecular difusas. Adicionalmente, múltiples

muestras presentaron bandas a un tamaño aproximado de 500 pb que sugieren la presencia de ARN.

4. DISCUSIÓN

4.1. Extracción de ADN de diferentes tipos de tejidos de *Dasyatis spp.*

El protocolo de extracción utilizado se basa en la digestión de proteínas, es decir, que utiliza acetato de amonio para degradar las proteínas presentes en la muestra y que pueden contaminar al ADN extraído (Broderick y otros, 2011). Este protocolo fue efectivo para la extracción de ADN genómico de diferentes tipos de tejidos de *Dasyatis*. Se obtuvo una buena concentración de ADN en la mayoría de las muestras donde la mayor concentración fue de 6834 ng/μL. Pero en algunas se obtuvo una muy baja concentración, como es el caso de las muestras SC0046 y SC0051 donde se obtuvieron concentraciones de 41 ng/μL y 52,6 ng/μL respectivamente (Tabla 1). Las concentraciones obtenidas en las muestras SC0046 y SC0051 pueden ser el resultado de haber trabajado con una cantidad de tejido de aproximadamente 0.005 que es menor a 0.01 gramos como sugiere el protocolo. Esto lo corrobora la investigación hecha por Hleap y otros (2009), donde extrajeron muestras de ADN de peces cartilagosos con 5 protocolos diferentes y se demuestra que la diferencia en peso del tejido usado influye significativamente en la concentración de ADN extraído, es decir, que a mayor cantidad (peso) de tejido se obtendrá una mayor concentración de ADN. Es importante tomar en cuenta que los estudios en rayas utilizan tanto tejido muscular como cutáneo debido a que el muestreo de los mismos busca no afectar a la salud de los individuos y por ello se realizan procesos rápidos (tejido muscular se utiliza una punta de biopsia) (Hleap y otros, 2009).

Cabe recalcar que diferentes estudios en rayas y otros peces cartilagosos sugieren el uso de tejido muscular y cutáneo para obtención de altas concentraciones de ADN, lo que

podría explicar la baja concentración obtenida en la muestra de tejido mucoso (SC0051), ya que este tipo de tejido se caracteriza por poseer muy pocas células (Hleap y otros, 2009; Kashiwagi y otros, 2012 y Lompera y otros, 2008). De acuerdo con Nam y otros (2003) el tipo y la cantidad de tejido con el que se está trabajando y los métodos de muestreo y preservación que hayan sido empleados, son factores críticos que influyen significativamente en la cantidad (concentración) y en la calidad (índices 260/280 y 260/230) de ADN que se pueda extraer de una muestra, lo cual afectará a los resultados de otros estudios, especialmente los que se basan en PCR.

En cuanto a la calidad de ADN que se obtuvo podemos decir que las 56 muestras presentaron ADN de buena calidad con respecto al índice 260/280. De acuerdo con la literatura se sabe que para que el ADN extraído sea considerado de buena calidad los valores del índice de absorbancia 260/280 y 260/230 deben estar entre 1.8 – 2.0 para ambos índices (Lompera y otros, 2008). En la Tabla 1 se observan 20 muestras que presentan valores que están por debajo de este límite (1.8-2.0) para el índice 260/230, de las cuales, las muestras SC0044, SC0045, SC0046 Y SC0051, presentaron los valores 0.75, 0.81, 0.86 y 0.90 respectivamente, que son los valores más bajos encontrados para este índice (260/230), lo que sugiere una contaminación con fenoles o compuestos orgánicos (Lompera y otros, 2008). Para el índice 260/280 la muestra SC0040 mostró un valor de 1.51, el valor más bajo con respecto a las demás muestras. De acuerdo con la literatura, esto sugiere una contaminación con proteínas que puede haberse dado debido a que en el proceso de purificación se acarrearon estos contaminantes junto con el ADN, por lo cual se sugiere el uso de proteasas y un extremo cuidado al remover el remanente del pellet (Alejos y otros, 2010). Los valores superiores a 2.0 para los índices de calidad 260/280 y 260/230 pueden deberse a la presencia

de ARN en las muestras de ADN, debido a que no se utilizó RNAsas que ayudan a degradar el ARN de las muestras. Esto concuerda con las bandas de aproximadamente 500 pb observadas en los geles. Sin embargo, se ha reportado que si ambos índices se presentan valores mayores a 1.8, se puede considerar que el ADN extraído es de buena calidad y puede utilizarse para futuros procesos (Lompera y otros, 2008).

Es así que analizando los resultados obtenidos y comparándolos con otros estudios en los que se hizo extracción de ADN de tejido de rayas, podemos sugerir que las diferentes concentraciones que se obtuvieron están relacionadas con la cantidad de tejido de cada muestra. De acuerdo con Lompera y otros, (2016) la concentración de ADN que se va a obtener es directamente proporcional a la cantidad de tejido con la que se trabaja. Por otro lado, las diferencias de calidad de ADN obtenidas se pueden deber a que las muestras provienen de diferentes tipos de tejido (Last y otros, 2016; Lompera y otros, 2008; Molina y otros, 2004). El protocolo con el que se realizó las extracciones en este estudio fue utilizado en otras especies de elasmobranquios como las mantarrayas, donde también se obtuvieron buenos resultados, como es el caso del trabajo realizado por Yumiceba, (2014) y Vinueza, (2018).

4.2. Marcador molecular COI para futuros estudios de identificación de especies de *Dasyatis*

La morfología es una de las técnicas tradicionales para indentificar especies, ya que a partir de las diferencias en el fenotipo se pueden clasificar a las especies y partir de estas diferencias para realizar estudios moleculares que permitan confirmar y tener una clasificación más precisa de las especies (Rojas, 2014). Sobre todo en aquellas especies que son crípticas, es decir, que son muy similares morfológicamente, como es el caso de algunas

especies del género *Dasyatis* que comparten una gran similitud tanto en la forma y pigmentación de su cuerpo y cola así como en sus patrones de comportamiento (Last y otros, 2016).

Tal es el caso de la raya redonda o raya marmoleada perteneciente al género *Taenuria* que tiene una morfología muy similar a especies del género *Dasyatis* ya que pertenecen a la misma familia pero su patrón de pigmentación es diferente, sin embargo, no siempre es fácilmente visible esta diferencia (Froese y Pauly, 2010). También es importante mencionar a *Rhinoptera steindachneri*, esta especie de raya presenta una coloración similar a las especies del género *Dasyatis* en especial a *D. longa*, porque la cola de *Rhinoptera steindachneri* también es larga y delgada. Por lo tanto, suele haber confusiones entre estas dos especies, sin embargo, si se les puede diferenciar por la forma de su cuerpo, porque *D. longa* tiene un cuerpo en forma de disco y *R. steindachneri* tiene una morfología que asemeja unas alas y por ello se la conoce como Raya Águila Dorada (Burgos y otros, 2019). Por lo tanto, la identificación de especies de *Dasyatis* así como de otras especies marinas representan un grado de complejidad mayor por lo que se ha optado por el uso del ADN para poder clasificar e identificar de forma correcta a estas especies de las que se tiene muy poca información a partir de pequeños segmentos de su genoma (Rojas, 2014).

En el estudio realizado por Schmidt y otros (2015) se utilizó el marcador mitocondrial COI para identificar 4 especies de rayas del género *Dasyatis* presentes en las costas de Brasil. Los investigadores llevaron a cabo el estudio a partir de muestras de tejido muscular obteniendo ADN de buena calidad para llevar a cabo el proceso de identificación molecular de estas especies de rayas. En este y varios estudios se observó que el gen COI es el método más efectivo para identificación de especies de rayas (Roldán y otros, 2014 y Schmidt y otros,

2015). Se tiene poca información de estas especies, en especial de *Dasyatis*, por lo que el uso del marcador molecular COI va a permitir clarificar estas ambigüedades a partir de las diferentes muestras de ADN que se extrajeron, las mismas que provienen de diferentes especies de rayas que habitan en el Archipiélago de Galápagos (Froese y Pauly, 2010).

Las Islas Galápagos albergan una enorme biodiversidad y se las conoce a nivel mundial como un laboratorio natural de la evolución (Molina y otros, 2004). Por ello es muy importante poder identificar las especies de rayas que se encuentran en las costas de las Islas Galápagos, pues la mayoría de estas especies es víctima de la pesca incidental y accidental y sus poblaciones pueden estar en peligro (López y Zanella, 2015). Las especies de las que fueron tomadas las 56 muestras procesadas para extracción de ADN pertenecen al género *Dasyatis*, las especies reportadas en las costas del Ecuador continental y las Islas Galápagos son *Dasyatis longa* y *Dasyatis dipterura*, estas especies habitan los mares tropicales. De acuerdo con los testimonios de los pescadores, estas especies han sido vistas en las redes de pesca en los puertos de Manabí y Galápagos (Guerrón, 2007). Es así que con este proyecto se obtuvo ADN genómico de rayas del género *Dasyatis* que será utilizado para futuros estudios moleculares utilizando el marcador mitocondrial COI como una de las herramientas para una identificación confiable y rápida de estas especies y así se podrá conocer el estado de conservación de las mismas (Schmidt y otros, 2015).

5. CONCLUSIONES

El protocolo utilizado para la extracción de ADN genómico fue exitoso para los tejidos muscular y cutáneo de rayas. Para el tejido mucoso se sugiere probar con más muestras, y si los resultados se mantienen, se debería probar un protocolo diferente.

Se determinó que los valores en las concentraciones y calidad del ADN obtenidos dependen del tipo de tejido y su cantidad.

El ADN obtenido podrá utilizarse en futuros estudios moleculares para la identificación de las especies *D. longa* y *D. dipterura*.

Los métodos de identificación molecular son un enfoque práctico y rentable para desarrollar planes del uso sostenible de los recursos pesqueros naturales y apoyar estrategias de conservación de especies de *Dasyatis* presentes en las Islas Galápagos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alejos, L., Aragón, M., y Cornejo, A. (2010). *Extracción y Purificación de ADN*. México D.F.: INECC.
- Arauz, R., López, A., y Zanella, I. (2009). *Acción por los tiburones: Análisis de las capturas y avistamientos de elasmobranquios en las aguas costeras y pelágicas del Pacífico de Costa Rica*. San José: Costa Rica: Pretoma para Conservación Internacional.
- Bleckmann, H., y Hofmann, M. (1999). Sharks, Skates, and Rays. En H. Bleckmann, y M. Hofmann, *Special Senses* (págs. 300-328). Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Broderick, D., Ovenden, J., Buckworth, R., Newman, S., Lester, R., y Welch, D. (2011). Genetic population structure of grey mackerel *Scomberomorus semifasciatus* in northern Australia. *Journal of Fish Biology*, 79, 633–661.
- Burgos, M., Chávez, V., Cruz, V., Navia, A., y Mejía Paola. (2019). Estrategia reproductiva del rayo cownose pacífico *Rhinoptera steindachneri* en el sur del Golfo de California. *Investigación marina y de agua dulce*, 70(1), 93-106.
- Cartamil, D., Vaudo, C., Lowe, B., Wetherbee, B., y Holland, K. (2003). Diel movement patterns of the Hawaiian stingray, *Dasyatis lata*: Implications for ecological interactions between sympatric elasmobranch species. *Marine Biology*, 142, 841-847. Recuperado el 13 de Febrero de 2020
- Froese, R., y Pauly, D. (2010). *Taenuria meyeri*. UK: FishBase.
- Guerrón, J. (2007). *La nueva pesquería de rayas en Puerto López, zona de amortiguamiento del Parque Nacional Machalilla*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Hleap, J. S., Cárdenas, H., y García, F. (2009). Preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN: una aplicación para peces cartilaginosos. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4), 545-555.
- Isai, V., Michele, A., y Vicente, A. (2012). *ESTIMACIÓN DE LA EDAD Y CRECIMIENTO PARA LA RAYA LÁTIGO*. México D.F.: 4to Congreso Juvenil.
- Kashiwagi, T., Broderick, D., Lance, S., Bennett, M., y Ovenden, J. (2012). Development and characterization of ten microsatellite loci for the reef mantaray *Manta alfredi*. *Conservation Genetics Resources*, 4(4), 1055-1058.
- Larissa, A., Pesole, G., Reyes, A., Sbisa, G., y Saccone, C. (2002). Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-loop region. *Molecular Evolution*, 54(1), 145-155.

- Last, Manjaji, y Kailola. (2006). *Himantura hortlein*. sp., a new species of whipray (Myliobatiformes: Dasyatidae) from Irian Jaya, Indonesia. *ZOOTAXA*, 19-34. Recuperado el 12 de Febrero de 2020
- Last, P., Naylor, G., y Manjaji-Matsumoto, B. (2016). A revised classification of the family Dasyatidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes) based on new morphological and molecular insights. *Zootax*, 4139(3), 345-368.
- Last, P., y White, W. (2006). Two new stingrays (Chondrichthyes: Dasyatidae) from the eastern Indonesian Archipelago. *ZOOTAXA*, 19-34. Recuperado el 12 de Febrero de 2020
- Lompera, N., Povh, J., Ribeiro, R., Gomes, P., Jacometo, C., y da Silva, T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 77-86. Recuperado el 8 de Abril de 2020, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ciagr/v35n1/art08.pdf>
- López, A., y Zanella, I. (Abril de 2015). Capturas de la raya *Dasyatis longa* (Myliobatiformes: Dasyatidae) en las pesquerías artesanales de Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 73(1), 319-327. Recuperado el 5 de Abril de 2020, de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v63s1/0034-7744-rbt-63-s1-319.pdf>
- López, J., Ryburn, J., Fedrigo, O., y Naylor, G. (2006). Phylogeny of sharks of the family Triakidae (Carcharhiniformes) and its implication for the evolution of carchariniform placental viviparity. *Mol Phylogenet Evol*, 50–60.
- Molina, L., Danault, E., Oviedo, M., y González, J. (2004). *Guía de especies de interés pesquero en la Reserva Marina de Galápagos*. Ecuador: Charles Darwin Foundation.
- Nam, Y., Park, J., Kim, K., y Kim, S. (2003). A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fish tissue. *Transgenic Research*, 12, 523-525.
- Piñero, D., y Munguía, A. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En D. Piñero, y A. Munguía, *Conocimiento actual de la Biodiversidad* (págs. 437- 494). México D.F.: CONABIO.
- Quiñonez, A. (2011). *ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE CITOCROMO OXIDASA C, SUBUNIDAD I (COI) Y EVALUACIÓN DE SU CONTENIDO INFORMATIVO EN DOS POBLACIONES DE Urotrygon aspidura DEL PACÍFICO VALLECAUCANO*. Cali: UNIVERSIDAD DEL VALLE .
- Rentaría, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En L. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre, *Ecología Molecular* (págs. 541-566). México D.F.: Instituto Nacional de Ecología (México).

- Rojas, F. (2014). *CÓDIGO DE BARRAS DE ADN DE SQUALUS ACANTHIAS LINNÉ, 1758 (CHONDRICHTHYES, SQUALIDAE) DEL SUR DE CHILE*. Valparaíso : Universidad de Valparaíso.
- Roldán, E., López, J., Ramírez, R., y Velásquez, L. (2014). Análisis morfológico del sistema reproductor e identificación molecular a través de los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA de *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Strophocheilidae) de Colombia. *Revista peruana de biología*, 21(1), 79-88.
- Sarmiento, J., Carvajal, F., Barrera, S., Lizarro, D., Miranda, G., Álvarez, G., y Osinaga, K. (2015). Diversidad, uso y conservación de las rayas (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) en Bolivia. XV. *RAYAS DE AGUA DULCE (POTAMOTRYGONIDAE) DE SURAMÉRICA PARTE II*, 229-247.
- Schmidt, B., Amorim, A., y Hilsdorf, A. (2015). PCR-RFLP analysis to identify four ray species of the genus *Dasyatis* (Elasmobranchi, Dasyatidae) fished along the southeastern and southern coast of Brazil. *Fisheries Research*, 167, 71-74.
- Smith, W. (2006). *Lista Roja de especies amenazadas de la UICN*. Ecuador: International Union for Conservation.
- Villavicencio, C., Hoffmann, C., y Melendez, E. (1994). Tamaño y reproducción de la raya *Dasyatis longus* (Pisces: Dasyatidae), en Baja Almejas, Baja California Sur, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 42, 375-377. Recuperado el 13 de Febrero de 2020.
- Vinueza, S. (2018). *Diversidad genética y estructura poblacional de individuos de Manta birostris muestreados en la Isla de la Plata en las temporadas de los años 2010 al 2013*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Yumiceba, V. (2014). *Estudio Preliminar de Diversidad Genética de Manta birostris que visitaron la Isla de la Plata durante los años 2010, 2011 y 2012*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.

7. TABLAS

Tabla 1. Muestras de tejido muscular, cutáneo y mucoso del género *Dasyatis* recolectadas en las Islas San Cristóbal e Isabela y datos de la concentración e índices de calidad de ADN después de la extracción.

N. de muestra	Concentración de ácido nucleico	260/280	260/230	Fecha de extracción
SC172	549,8 ng/μl	1,97	1,9	30-ene-20
SC175	1057,9 ng/μl	1,91	1,84	30-ene-20
SC1	616,4 ng/μl	1,94	1,72	06-feb-20
SC2	1616,7 ng/μl	1,93	2,02	06-feb-20
SC3	392,8 ng/μl	1,9	1,95	06-feb-20
SC4	575,8 ng/μl	1,91	1,98	06-feb-20
SC5	1419,9 ng/μl	1,89	2,16	06-feb-20
SC12	2687,2 ng/μl	1,96	2,23	12-feb-20
SC18	5938 ng/μl	1,91	2,05	12-feb-20
SC34	4342 ng/μl	1,94	2,07	12-feb-20
SC60	1224,3 ng/μl	1,93	2,02	12-feb-20
SC89	229,8 ng/μl	1,88	1,87	12-feb-20
SC6	177,9 ng/μl	1,94	1,79	13-feb-20
SC7	196,0 ng/μl	1,98	1,6	13-feb-20
SC8	801,0 ng/μl	1,91	1,76	13-feb-20
SC9	282,2 ng/μl	1,93	1,67	13-feb-20
SC10	567,3 ng/μl	1,89	1,37	13-feb-20
SC11	2227 ng/μl	1,91	2,04	13-feb-20
SC19	939 ng/μl	1,96	2,02	13-feb-20
SC20	874,6 ng/μl	1,93	2,02	13-feb-20
SC21	1086,4 ng/μl	1,96	1,95	13-feb-20
SC22	1016,2 ng/μl	1,94	1,85	13-feb-20
SC23	555,7 ng/μl	1,92	1,99	28-feb-20
SC24	1772,9 ng/μl	1,97	2,14	28-feb-20
SC25	838,5 ng/μl	1,95	2,17	28-feb-20
SC27	775,6 ng/μl	1,96	2,12	28-feb-20
SC29	1597,1 ng/μl	1,91	1,45	28-feb-20
SC31	2777,5 ng/μl	1,91	2,04	28-feb-20
SC35	1271,9 ng/μl	1,87	1,85	28-feb-20
SC39	1922,5 ng/μl	1,92	1,98	28-feb-20
SC40	1325,4 ng/μl	1,51	1,37	28-feb-20
SC42	3067,4 ng/μl	1,94	1,79	03-mar-20
SC43	1449,6 ng/μl	1,9	1,91	03-mar-20
SC44	105,3 ng/μl	2	0,73	03-mar-20
SC45	49,6 ng/μl	2,11	0,81	03-mar-20
SC46	41,7 ng/μl	2,11	0,86	03-mar-20
SC47	205,7 ng/μl	1,91	1,39	03-mar-20
SC49	117,1 ng/μl	2,18	1,15	03-mar-20
SC50	91,5 ng/μl	1,99	1,05	03-mar-20
SC51	52,6 ng/μl	2,02	0,9	03-mar-20
SC52	6834,3 ng/μl	1,89	2,07	03-mar-20
SC53	2099,2 ng/μl	1,98	2,01	12-mar-20
SC54	720,3 ng/μl	1,94	1,78	12-mar-20
SC56	634,1 ng/μl	2,01	1,55	12-mar-20
SC57	186,8 ng/μl	2,39	1,24	12-mar-20
SC61	1810,2 ng/μl	1,94	2	12-mar-20
SC62	593,2 ng/μl	1,97	1,7	12-mar-20
SC63	1415,6 ng/μl	1,95	2,09	12-mar-20
SC64	922,6 ng/μl	1,94	2,02	12-mar-20
SC65	2659,6 ng/μl	1,91	1,78	12-mar-20
SC66	2478,5 ng/μl	1,94	1,94	12-mar-20
SC70	832,5 ng/μl	1,9	1,53	12-mar-20
SC76	280,2 ng/μl	1,78	1,34	12-mar-20
SC81	721,0 ng/μl	2,13	1,77	12-mar-20
SC83	755,0 ng/μl	2,04	1,66	12-mar-20
SC86	3019,9 ng/μl	1,94	1,85	12-mar-20

Color verde = tejido cutáneo; Color rosa = tejido muscular; Color amarillo = tejido mucoso.

8. FIGURAS

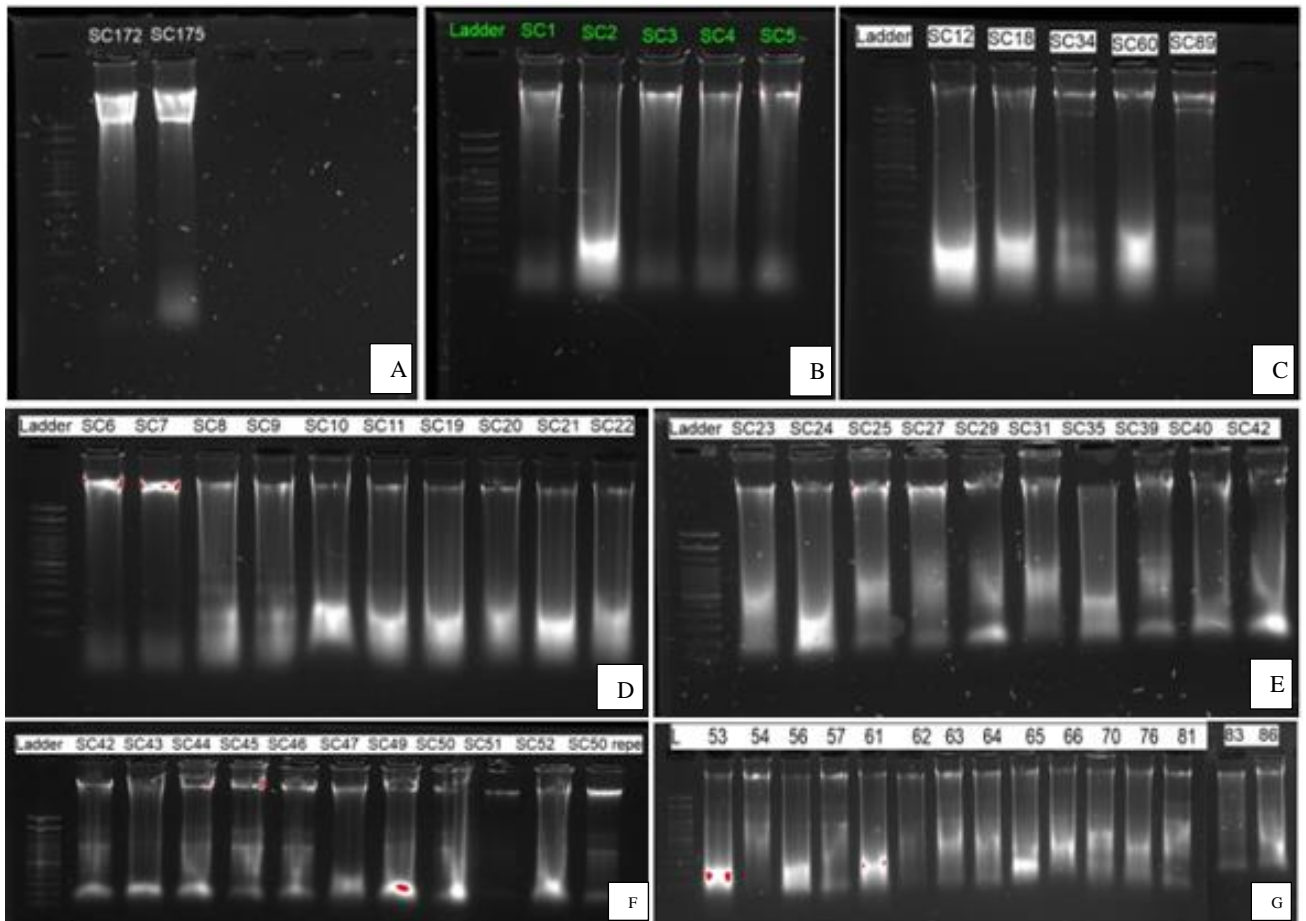


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la extracción de ADN genómico de 56 muestras de varios tipos de tejido de diferentes especies de rayas del género *Dasyatis* pertenecientes a las islas San Cristóbal e Isabela – Galápagos – Ecuador.