

Diseño de Cebadores y amplificación por PCR de los genes mitocondriales COI y *Cyt b* en *Potamotrygon magdalenae* (Duméril, 1865) a partir del modelo de pérdida de ADN

Iván Yesid López Ardila

Trabajo de grado presentado para optar al título de biólogo

Director  
Fernando Rondón González  
Doctor en Ciencias-Biología

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2019

### **Agradecimientos**

A mi familia por su apoyo, paciencia, motivación y soporte a lo largo de todos estos años. En especial a mi madre y padre por su apoyo incondicional.

Al profesor Fernando Rondón, por su paciencia, apoyo, motivación y confianza durante el desarrollo del presente trabajo de grado, además del respaldo brindado.

Al profesor Francisco Martínez por su apoyo y conocimientos aportados durante el desarrollo del presente proyecto.

A los laboratorios LGB-UIS, LGC-UIS, LMA-UIS, que me permitieron el uso de materiales y equipos utilizados durante la ejecución de este proyecto.

A todos los miembros de los laboratorios que me brindaron su apoyo durante el desarrollo durante la ejecución y culminación del presente proyecto.

A los parceros Carlitos, Lau, Angii, el Mono, quienes me han brindado apoyo constante e incondicional durante este proceso.

A los miembros de las comunidades en los que se realizaron muestreos, al igual que a las personas que me acompañaron en las salidas de campo.

A todos aquellos que aportaron en mi formación profesional.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Objetivo General .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Competencias .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiales Y Métodos .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Fase De Campo .....</b>	<b>15</b>
3.1.1 Área De Estudio.....	15
3.1.2 Toma Y Almacenamiento De Muestras .....	15
<b>3.2 Fase De Laboratorio .....</b>	<b>16</b>
3.2.1 Diseño De Cebadores.....	16
3.2.2 Extracción De Adn.....	17
3.2.3 Estandarización De Productos Amplificados .....	17
3.2.4 Visualización De Productos De Pcr.....	17
3.2.5 Secuenciación De Los Genes Coi Y Cyt B. ....	18
<b>4. Resultados .....</b>	<b>18</b>
<b>5. Discusión.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>28</b>
<b>7. Recomendaciones .....</b>	<b>29</b>
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>30</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>34</b>

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Ubicación Geográfica De Las Ciénagas Que Comprenden El Área De Estudio. ....	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Fragmento Del Gen <i>Coi</i> De <i>P. Magdalenae</i> Amplificado Con La Pareja De Cebadores Fwrywfecoi531-75 Y R3rywfecoi1432-56. ....	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Fragmento Del Gen <i>Cyt B</i> De <i>P. Magdalenae</i> Amplificado Con La Pareja De Cebadores F1rywfecytb182-205 Y Rwrywfecytb932-54. ....	<b>22</b>
<b>Figura 4.</b> Homología En La Secuencia De <i>Potamotrygon Magdalenae</i> Obtenidas A Partir De Secuencias Amplificadas Con Cebadores Diseñados En El Presente Estudio. A. Secuencia Del Gen <i>Coi</i> Y B. Secuencia Del Gen <i>Cyt B</i> . ....	<b>23</b>

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Cantidad de secuencias disponibles en el GenBank del gen Citocromo C Oxidasa subunidad I.....	<b>18</b>
<b>Tabla 2.</b> Cantidad de secuencias disponibles en el GenBank del gen Citocromo b. ....	<b>19</b>
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de cebadores propuestos para amplificar una región del gen COI de <i>P. magdalenae</i> . ....	<b>20</b>
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de cebadores propuestos para amplificar una región del gen <i>Cyt b</i> de <i>P. magdalenae</i> . ....	<b>20</b>
<b>Tabla 5.</b> Cebadores COI y <i>Cyt b</i> sintetizados para <i>P. magdalenae</i> . ....	<b>20</b>
<b>Tabla 6.</b> Concentración de reactivos requeridos para amplificar fragmentos de los genes COI y <i>Cyt b</i> a partir de los cebadores diseñados. ....	<b>21</b>

### Resumen en español

**TÍTULO:** DISEÑO DE CEBADORES Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES MITOCONDRIALES COI Y *CYT B* EN *POTAMOTRYGON MAGDALENAE* (DUMÉRIL, 1865) A PARTIR DEL MODELO DE PÉRDIDA DE ADN\*

**AUTOR:** IVAN YESID LÓPEZ ARDILA\*\*

**PALABRAS CLAVES:** ESPECIE ENDÉMICA, PÉRDIDA DE ADN, *POTAMOTRYGON MAGDALENAE*.

#### DESCRIPCION:

Los miembros de la familia Potamotrygonidae son los únicos dentro del grupo de los Elasmobranchios que se encuentran restringidos a ambientes dulceacuícolas y su distribución es exclusiva de Sudamérica. Comprenden 34 especies y para Colombia han sido reportadas 11 dentro de las que se destaca *Potamotrygon magdalenae* como el único representante de estos peces dulceacuícolas endémico para el país. De esta especie se cuenta con estudios que componen diversas áreas de su biología. No obstante, existe un vacío de información en áreas relacionadas con su genética molecular. Con el objetivo de proporcionar herramientas que permitan ampliar el conocimiento en diversas áreas tales como sistemática y genética poblacional, entre otras, se diseñaron cebadores para los genes mitocondriales COI y *Cyt b* siguiendo lo propuesto por el modelo de pérdida de ADN. Para esto se realizaron alineamientos siguiendo los parámetros: Gap open penalty (5), Gap extension penalty (0.2) y Terminal gap penalties (0.1), con los cuales se identificaron regiones conservadas en la superfamilia Dayastoidea a objeto de determinar regiones que potencialmente sirvan como cebadores. Se diseñaron nueve secuencias de las cuales fwRyWFECOI531-75, R3RyWFECOI1432-56, f1RyWFECytb182-205 y RwRyWFECytb932-54 sirvieron en la obtención de amplicones de los genes COI y *Cyt b* de *P. magdalenae*, respectivamente, con los que se generaron secuencias >99% de similitud cuando fueron comparadas con las disponibles en las bases de datos para los genes indicados. Estos cebadores pueden proporcionar una herramienta útil al momento de profundizar en áreas que impliquen el análisis genético molecular de esta especie de raya de agua dulce endémica de Colombia.

---

\*Trabajo de Grado

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director Ph.D Fernando Rondón González

### Resumen en Ingles

**TITLE:** PRIMER DESIGN AND AMPLIFICATION BY PCR OF THE MITOCHONDRIAL GENES COI AND *CYT B* IN *POTAMOTRYGON MAGDALENAE* (DUMÉRIL, 1865) FROM THE MODEL OF DNA LOSS\*

**AUTHOR:** IVAN YESID LOPEZ ARDILA\*\*

**KEYWORDS:** ENDEMIC SPECIE, DNA LOSS, *POTAMOTRYGON MAGDALENAE*.

#### DESCRIPTION:

The members of the family Potamotrygonidae are the only ones within the group of Elasmobranchs that are restricted to freshwater environments and their distribution is exclusive to South America. They comprise 34 species and for Colombia 11 have been reported, among which stands out *Potamotrygon magdalenae* as the only representative of these freshwater fish endemic to the country. Of this specie has studies that make up various areas of its biology. However, there is a lack of information in areas related to its molecular genetics. With the aim of providing tools to broaden knowledge in diverse areas such as systematics and population genetics, among others, primers were designed for the mitochondrial genes COI and *Cyt b* following the proposal of the model DNA loss. For this, alignments were made following the parameters: Gap open penalty (5), Gap extension penalty (0.2) and Terminal gap penalties (0.1), with which regions conserved in the superfamily Dayastoidea were identified in order to determine regions that could potentially serve as primers. Nine sequences were designed, of which fwRyWFECOI531-75, R3RyWFECOI1432-56, f1RyWFECytb182-205 and RwRyWFECytb932-54 were used to obtain amplicons of the genes COI and *Cyt b* of *P. magdalenae*, respectively, with which were generated sequences >99% similarity when compared to those available in the databases for the indicated genes. These primers can provide a useful tool to deepening in areas that involve the molecular genetic analysis of this species of stingrat freshwater endemic to Colombia.

---

\*Bachelor thesis

\*\*Faculty of Sciences. School of Biology. Director Ph. D Fernando Rondón González

## Introducción

*Potamotrygon magdalenae* (Duméril, 1865) es una especie de raya dulceacuícola distribuida en Colombia, registrada para los afluentes de los Ríos Magdalena, Atrato y Cauca (Maldonado-Ocampo et al., 2008). Son organismos vivíparos aplacentarios histotróficos, con fertilización interna, de baja fecundidad y bajo crecimiento (Caldas et al., 2010; Gemaque et al., 2017), que, como consecuencia de diferentes actividades antropogénicas conducentes a alteraciones en el ciclo reproductivo de la especie (Lasso et al., 2016) y la falta de conocimiento de aspectos biológicos asociados a la genética de sus poblaciones, ha sido ubicada en categoría de menor preocupación según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2014), y vulnerable de acuerdo al Libro Rojo de Peces de Colombia (Mojica et al., 2012), lo que permite suponer que esta especie de raya dulceacuícola y endémica de Colombia se encuentra bajo presiones que pueden estar llevando a la disminución de sus poblaciones.

De esta especie de Elasmobranquio se tiene conocimiento de aspectos de su biología relacionados con dieta (Ramos-Socha & Grijalba-Bendeck, 2011), reproducción (Pedreros-Sierra & Ramírez-Pinilla, 2014; Pedreros-Sierra et al., 2016; Ruiz & Flores, 2016), sistemática (García et al., 2015), hábitat (Caldas et al., 2010), ecología (Almeida et al., 2010) y amenazas (Lasso et al., 2016), entre otros. De hecho, el impacto que tienen actividades como el uso de este pez en la alimentación humana y de animales domésticos (observación personal), así como organismo ornamental, sumado a la falta de conocimiento en cuanto a diversas áreas de la biología de *P. magdalenae* (Ramírez & Davenport, 2013; García et al., 2015; Lasso et al., 2016), motiva la puesta en marcha de estudios dirigidos a conocer aspectos todavía inexplorados en esta especie, considerada con prioridad muy alta según el Plan de Acción Nacional para la conservación de Tiburones, Rayas y Quimeras de Colombia (PAN - Tiburones Colombia) (Caldas et al., 2010).

Precisamente, dentro de los aspectos poco estudiados en muchas especies de peces están los que incluyen herramientas desarrolladas desde la biología molecular con potencial uso en genética poblacional. En la actualidad la obtención de segmentos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es ampliamente usada en varias aplicaciones de biología molecular, en donde básicamente se amplifica un fragmento deseado de una región del ADN a partir de cebadores que reconocen secuencias del fragmento en cuestión (Andreson et al., 2008).

En la literatura se cuenta con un gran número de secuencias que sirven para la amplificación de ciertas regiones genómicas comunes en la mayoría de taxones, como lo es el ADNmt, el cual presenta el mismo orden genético y dirección de transcripción en todos los vertebrados y su utilidad se ha visto reflejada en filogenética molecular y genética de poblaciones (Harrison, 1989; Boore et al., 2005; Hajibabaei et al., 2007). En este contexto, la información sobre la obtención de cebadores que permitan amplificar regiones del ADNmt en rayas de agua dulce pertenecientes a la familia Potamotrygonidae, y en especial, trabajos adelantados en referencia a la especie *Potamotrygon magdalenae*, aunque existente no es clara.

Precisamente, los trabajos que resaltan la obtención de secuencias en el gen Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI) para miembros de la familia Potamotrygonidae (Frederico et al., 2012; Renza-Millán et al., 2019), utilizan cebadores que fueron desarrollados para la determinación de especies de peces australianas (Ward et al., 2005); generando aparentes productos en los Elasmobranquios (Holmes et al., 2009). Sin embargo, el alto número en los sitios de enlace no permite la obtención de un único producto amplificado y por lo tanto las secuencias a las que se llegue no serían confiables (Andreson et al., 2008).

Con lo descrito anteriormente, el presente trabajo de grado modalidad pasantía de investigación tuvo como finalidad profundizar en el conocimiento de herramientas moleculares a partir de

aprovechar la información disponible en plataformas de almacenamiento de datos, con el objeto de diseñar cebadores que generen productos amplificados confiables que en futuras investigaciones puedan ser utilizados para acceder a la información presente en las secuencias susceptibles de ser indagadas en el genoma mitocondrial de *P. magdalенаe*. Por tanto, se diseñaron cebadores y se estandarizó la PCR que permite amplificar fragmentos de los genes mitocondriales Citocromo b (*Cyt b*) y COI a partir de muestras de ADN extraídas de tejido y sangre de individuos capturados en campo.

Se espera que los cebadores obtenidos amplíen aspectos desconocidos de la biología molecular de *P. magdalенаe* y tengan uso en futuras investigaciones orientadas a refinar la relaciones filogenéticas, ampliar el estudio genético de sus poblaciones y que profundicen el análisis evolutivo de esta especie de pez endémica de Colombia.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Diseñar cebadores que permitan la amplificación de los genes mitocondriales COI y *Cyt b* en la especie *Potamotrygon magdalenae*.

### 1.2 Objetivos Específicos

1. Establecer patrones de cambio en los codones en genes del ADN mitocondrial de *P. magdalenae* con base en el modelo de pérdida de ADN que permitan la obtención de cebadores.
2. Estandarizar las condiciones de amplificación por PCR de los genes mitocondriales COI y *Cyt b* a partir de los cebadores diseñados.
3. Obtener secuencias a partir de productos amplificados con los cebadores diseñados para los genes COI y *Cyt b* en muestras de *P. magdalenae*.

## 2. Competencias

La pasantía del estudiante estuvo enfocada en el diseño de iniciadores de dos genes mitocondriales de *P. magdalenae* a partir del modelo de pérdida de ADN, que permitieran su amplificación en el Laboratorio de Genética y Biotecnología (LGB-UIS), adscrito al Grupo de Investigación en Microbiología y Genética de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial

de Santander. Una vez obtenidos los amplificados, el estudiante constató la correspondencia de los amplicones con las secuencias de los genes para los que fueron diseñados los cebadores.

Para lograr lo anterior, el estudiante:

- Obtuvo muestras de especímenes de *P. magdalenae* recolectadas en ciénagas del Magdalena medio.
- Diseñó cebadores aplicando el modelo de pérdida de ADN a partir de secuencias disponibles de *P. magdalenae* en el NCBI.
- Extrajo ADN genómico a partir de sangre y tejido en muestras de la especie de estudio.
- Amplificó por PCR fragmentos de los genes para los cuales diseñó los cebadores.
- Obtuvo secuencias que corresponden a los genes *Cyt b* y *COI* de *P. magdalenae* reportados en el NCBI.
- Escribió informes técnicos con suficiencia y rigor científico.

### 3. Materiales y Métodos

Para dar cumplimiento a las competencias enmarcadas dentro de los objetivos, el presente trabajo de grado fue desarrollado en su fase de campo en distintas ciénagas del valle medio del río Magdalena y en los laboratorios adscritos al Grupo de Investigación en Microbiología y Genética de la Universidad Industrial de Santander (GIMG-UIS).

### 3.1 Fase de Campo

**3.1.1 Área de Estudio.** En el presente trabajo de grado el área de estudio estuvo comprendida por tres ciénagas ubicadas en la región nororiental de Colombia (**Figura 1**). Estas corresponden a: 1. Ciénaga de Paredes, ubicada entre los municipios de Puerto Wilches y Sabana de Torres (Santander); 2. Ciénaga de Zapatosa, ubicada entre los municipios de Chimichagua, Curumaní, Tamalameque (César) y El Banco (Magdalena); y 3. Ciénaga de Simití, ubicada en el municipio de Simití (Bolívar). En cada una de las localidades se realizó la captura de especímenes mediante técnicas de pesca artesanal llevadas a cabo por pescadores locales.

**3.1.2 Toma y Almacenamiento de Muestras.** A cada individuo de *P. magdalenae* se le extrajo una muestra de sangre proveniente de la vena caudal empleando jeringas estériles desechables de 1ml y una muestra de tejido proveniente del disco, con el uso de tijeras estériles. Cada muestra de sangre o tejido se almacenó en 100 $\mu$ l y 700 $\mu$ l de etanol absoluto, respectivamente, contenidos en tubos de microcentrífuga y mantenidos a una temperatura 4°C para su posterior procesamiento en el LGB-UIS.

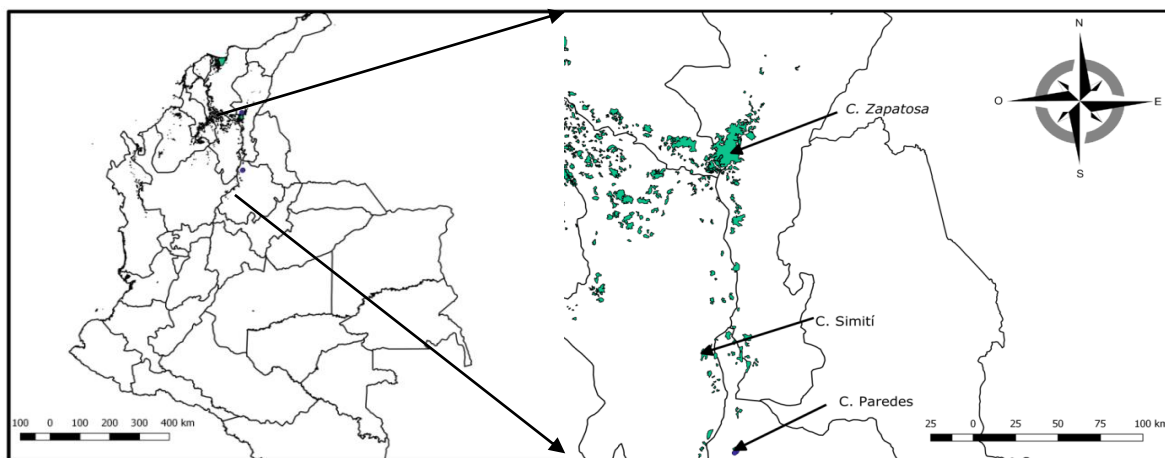


Figura 1. Ubicación geográfica de las ciénagas que comprenden el área de estudio

Las muestras se rotularon con las tres iniciales del epíteto genérico y las dos iniciales del específico, además de un número indicador de la localidad donde fue muestreado, así: Ciénaga de Paredes número 1, Ciénaga de Zapatosa número 2 y Ciénaga de Simití número 4 (**Anexo A**). Los individuos capturados tendrán la marca del corte del tejido, a objeto de evitar replicas en el muestreo; y aquellos que sobrevivieron al arte de pesca fueron retornados a su hábitat.

### 3.2 Fase de Laboratorio

Los procedimientos de esta fase se realizaron en LBG-UIS, Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA-UIS) y Laboratorio de Genómica en Celomados (LGC-UIS).

**3.2.1 Diseño de Cebadores.** Se realizaron búsquedas de las secuencias de los genes COI y *Cyt b* en el National Center of Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés) disponibles para organismos cercanamente relacionados con la especie de estudio (**Anexo B**). Se construyó un archivo en formato .xml en el cual se registraron las secuencias utilizadas en el análisis, con el objetivo de obtener un correcto manejo de datos en los *clusters* almacenados.

Se realizaron alineamientos con el programa *Kaling* (Lassmann & Sonnhammer, 2005) siguiendo el método de alineamiento de múltiples secuencias (MSA) implementado en dicho programa, con el cual se obtuvieron secuencias consenso de acuerdo a los niveles taxonómicos que se trabajaron. En todos los casos se implementaron los parámetros: *Gap open penalty* (5), *Gap extension penalti* (0.2) y *Terminal gap penalties* (0.1). El análisis, a partir de la similaridad en las secuencias de los *clusters*, reveló patrones de evolución mediante interrelación que permitieron el establecimiento de regiones conservadas en los taxa y genes involucrados.

Teniendo en cuenta estas regiones conservadas, se aplicaron los métodos propuestos por diversos autores (Degen et al., 2006; Untergasser et al., 2012; Contreras-Moreira, 2018) para establecer secuencias que puedan ser utilizadas como iniciadores (**Anexo C**).

**3.2.2 Extracción de ADN.** El ADN genómico se extrajo a partir de muestras de sangre y tejido, estas fueron disueltas en una solución SDS/Proteinasa K y el ADN genómico total fue separado usando el protocolo de extracción estándar de fenol-cloroformo propuesto por Sambrook & Green (2012). La concentración del ADN extraído se estimó indirectamente a partir del método de dot-blot, comparando con muestras de ADN de concentración conocidas en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio.

**3.2.3 Estandarización de Productos Amplificados.** La obtención de los productos amplificados se realizó mediante PCR. Esta se estandarizó a partir de los parámetros para el diseño de cebadores descritos por Degen et al., (2006), que corresponden a: agua grado PCR en volumen variable, buffer 1X, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTPs, 0.2μM de cada cebador diseñado y 2U de Taq DNA Polimerasa. Las condiciones descritas se utilizaron para llevar a cabo PCR por separado de cada gen mitocondrial (COI y *Cyt b*) que fue estandarizado.

**3.2.4 Visualización de Productos de PCR.** El tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR fue estimado usando corridas de electroforesis en gel de agarosa al 1% comparando con un marcador de peso molecular (MPM) de 1000 pb (Thermo Scientific). Para visualizar los productos amplificados se adicionó el intercalante EZ-Vision (Amresco) a cada muestra cargada en el gel y la detección se hizo en un transiluminador de luz ultravioleta UV TFX-35M (Life Technologies), cuya imagen fue capturada en un equipo foto-documentador CLS-MDOCBASIC (Clever scientific).

**3.2.5 Secuenciación de los genes COI y Cyt b.** Un volumen de 50µl de cada producto amplificado por PCR, se envió al servicio de secuenciación y análisis molecular (SSIGMOL) de la universidad nacional de Colombia, para la purificación y posterior secuenciación utilizando los iniciadores mencionados en la sección de resultados.

#### 4. Resultados

El presente constituye un esfuerzo que involucra la puesta a prueba del modelo de pérdida de ADN al momento de diseñar cebadores funcionales en peces. De acuerdo a la taxonomía de la especie objeto de estudio, se realizaron búsquedas para cada grupo que recoge a *P. magdalenae* según los reportes disponibles. Para el gen COI se obtuvo un total de 596.633 (**Tabla 1**), mientras que se obtuvieron 781.440 para el gen Cyt b (**Tabla 2**).

**Tabla 1.**  
*Cantidad de secuencias disponibles en el GenBank del gen Citocromo C Oxidasa subunidad I.*

	Palabra de búsqueda	Número de secuencias
<b>Gen</b>	cytochrome c oxidase subunit I	596633
<b>Superkingdom</b>	Eukaryota	484178
<b>Kingdom</b>	Metazoa	409359
<b>Phylum</b>	Chordata	110429
<b>Subphylum</b>	Craniata	109226
<b>Class</b>	Chondrichthyes	2122
<b>Subclass</b>	Elasmobranchii	1950
<b>Superorder</b>	Batoidea	670
<b>Order</b>	Myliobatiformes	340
<b>Superfamily</b>	Dasyatoidea	174
<b>Family</b>	Potamotrygonidae	16
<b>Genus</b>	<i>Potamotrygon</i>	4

Del total de secuencias disponibles, se tuvieron en cuenta los reportes realizados desde especie hasta Superfamilia con un total de 75 secuencias entre completas y parciales para el gen COI y 41

secuencias entre completas y parciales correspondientes al gen *Cyt b*. El número de secuencias utilizadas, se fundamentó en el hecho que muchas de estas no corresponden al patrón observado o a los organismos en cuestión; en el Anexo B se pueden observar los números de acceso de las secuencias utilizadas disponibles en el NCBI.

**Tabla 2.**  
*Cantidad de secuencias disponibles en el GenBank del gen Citocromo b.*

	<b>Palabra de búsqueda</b>	<b>Número secuencias</b>
<b>Gen</b>	Cytochrome b	781440
<b>Superkingdom</b>	Eukaryota	571757
<b>Kingdom</b>	Metazoa	505000
<b>Phylum</b>	Chordata	426485
<b>Subphylum</b>	Craniata	426128
<b>Class</b>	Chondrichthyes	1724
<b>Subclass</b>	Elasmobranchii	1658
<b>Superorder</b>	Batoidea	736
<b>Order</b>	Myliobatiformes	473
<b>Superfamily</b>	Dasyatoidea	363
<b>Family</b>	Potamotrygonidae	32
<b>Genus</b>	<i>Potamotrygon</i>	20

Materiales y métodos para el diseño de cebadores, se realizaron alineamientos y se construyeron secuencias consenso para ambos genes implicados en el estudio a partir de secuencias disponibles de: a) la especie hermana más representativa en el GenBank, *Potamotrygon motoro*; b) género; c) familia; y d) superfamilia. A partir de las secuencias alineadas y las consenso (**anexo D**), se establecieron regiones que permiten obtener una mayor proporción de los genes para el que se diseñaron los cebadores.

De los alineamientos obtenidos para el caso del gen COI, se tomaron en cuenta dos secuencias establecidas mediante los consensos como posibles parejas de cebadores uno “forward” y el otro “reverse” (**Tabla 3**). Para el caso del gen *Cyt b* se tomaron en cuenta tres secuencias presentadas como potenciales cebadores, de estas, dos son “forward” y una “reverse” (**Tabla 4**). Con estos

cebadores presentados, se obtuvo de la síntesis de los iniciadores cinco secuencias COI y cuatro secuencias *Cyt b* (**Tabla 5**), de uso potencial para estudiar las secuencias de dichos genes en *P. magdalenae*.

**Tabla 3.**

*Secuencias de cebadores propuestos para amplificar una región del gen COI de P. magdalenae.*

Cebador	Secuencia
fwRyWFECOI531-75	5'-GCAATCTCTCAATACCAAACACCACT-3'
RwRyWFECOI1432-56	5'-CTCTGAGARGCATTYGCATCAAAACG-3'

**Tabla 4.**

*Secuencias de cebadores propuestos para amplificar una región del gen Cyt b de P. magdalenae.*

Cebador	Secuencia
fwRyWFECYtb182-205	5'-CATCAGCCTTCTCCTCMATCGCAC-3'
fwRyWFECYtb581-604	5'-CTATAATTCACCTTCTCTTCCTTC-3'
RwRyWFECYtb932-54	5'-CCAAACAACGAAGCCTCACCTTCCG-3'

**Tabla 5.**

*Cebadores COI y Cyt b sintetizados para P. magdalenae.*

Cebadores COI	Secuencias
fwRyWFECOI531-75	5'-GCAATCTCTCAATACCAAACACCACT-3'
R1RyWFECOI1432-56	5'-CGTTTTGATGCGAATGCTTCTCAGAG-3'
R2RyWFECOI1432-56	5'-CGTTTTGATGCGAATGCCTTCTCAGAG-3'
R3RyWFECOI1432-56	5'-CGTTTTGATGCAAATGCTTCTCAGAG-3'
R4RyWFECOI1432-56	5'-CGTTTTGATGCAAATGCCTTCTCAGAG-3'
Cebadores Cyt b	Secuencias
f1RyWFECYtb182-205	5'-CATCAGCCTTCTCCTCAATCGCAC-3'
f2RyWFECYtb182-205	5'-CATCAGCCTTCTCCTCCATCGCAC-3'
fwRyWFECYtb581-604	5'-CTATAATTCACCTTCTCTTCCTTC-3'
RwRyWFECYtb932-54	5'-CGGAAGGTGAGGCTTCGTTGTTTGG-3'

A partir de las consideraciones presentadas por Degen et al., (2006), en cuanto a la amplificación de fragmentos por PCR, los parámetros iniciales se pueden modificar en el proceso de estandarización. Con base en lo anterior, para cada gen se realizaron series de tratamientos determinados empíricamente con intervalos que permitieron estimar la concentración óptima de cada reactivo requerido en la PCR, y en la cual se visualizó producto amplificado (**Tabla 6**).

En cuanto a la determinación de la temperatura de hibridación de los cebadores diseñados para ambos genes, los resultados difieren significativamente con respecto a los valores de temperatura

calculados teóricamente cuando se utilizó la opción OligoAnalyzer Tool implementada en el programa Integrated DNA Technologies (**Anexo E**).

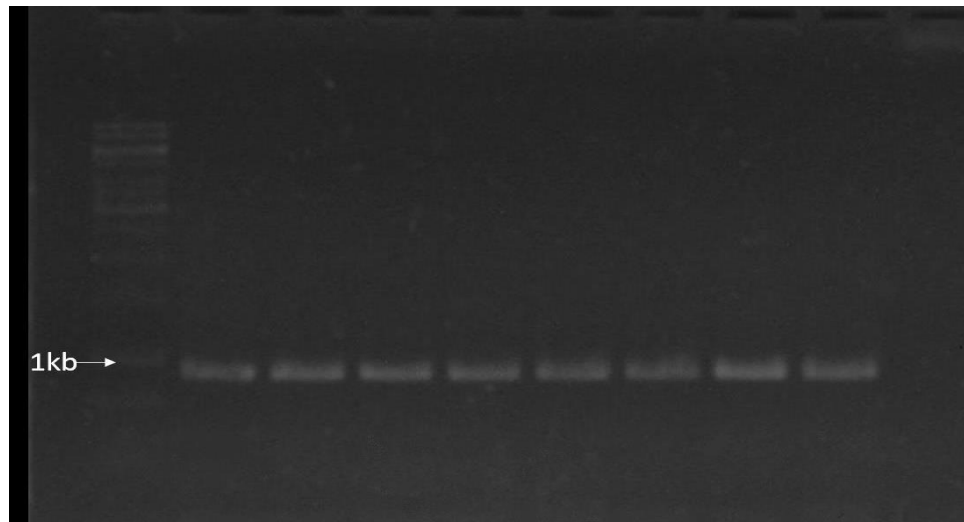
**Tabla 6.**

*Concentración de reactivos requeridos para amplificar fragmentos de los genes COI y Cyt b a partir de los cebadores diseñados.*

	Deegen et al., (2006)	Presente estudio
H <sub>2</sub> O MilliQ	V <sub>v</sub>	V <sub>v</sub>
Buffer	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	2.25mM
dNTPs	0.2mM	0.8mM
Cebadores	0.2μM	1.25μM
Taq Polimerasa	2U	1U
Número de ciclos	25	25

Nota: \*vv: volumen variable.

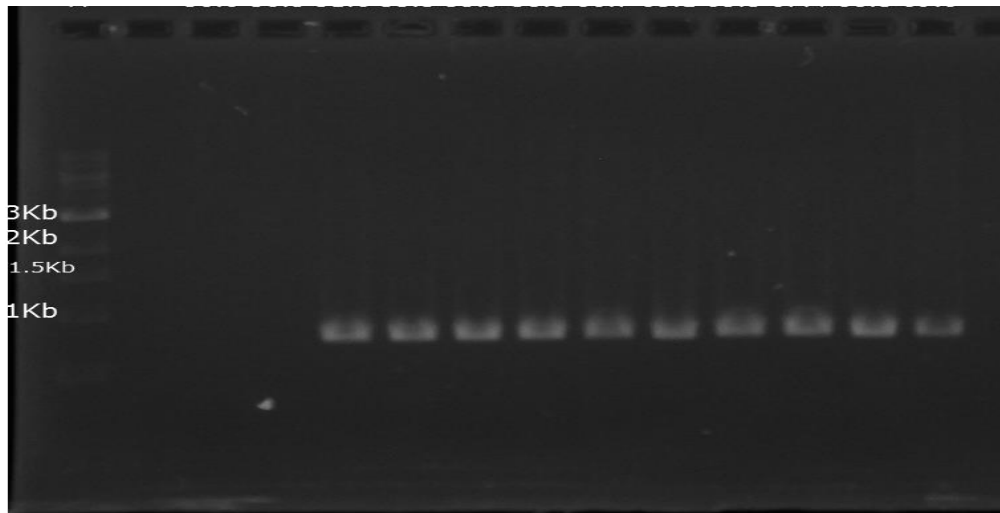
El procedimiento para amplificar fragmentos mediante PCR para el gen COI con los cebadores diseñados y las condiciones indicadas anteriormente fue óptimo con la pareja fwRyWFECOI531-75 y R3RyWFECOI1432-56, dado que se observó un fragmento cercano a 1Kb cuando la temperatura de hibridación de estos cebadores fue 60.1°C (**Figura 2**).



**Figura 2.** Fragmento del gen COI de *P. magdalenae* amplificado con la pareja de cebadores fwRyWFECOI531-75 y R3RyWFECOI1432-56.

Nota: \*De izquierda a derecha se observa MPM seguido de ocho muestras distintas de la especie de estudio.

Con respecto al gen *Cyt b*, se evidenció producto amplificado cuando se utilizaron los cebadores f1RyWFECytb182-205 y RwRyWFECytb932-54. A partir de estos se generó un fragmento cercano a 750pb en distintas muestras de *P. magdalanae* (datos no mostrados), en un amplio rango de temperatura de hibridación comprendido entre 50.0 y 69.0°C (**Figura 3**).



**Figura 3.** Fragmento del gen *Cyt b* de *P. magdalanae* amplificado con la pareja de cebadores f1RyWFECytb182-205 y RwRyWFECytb932-54.

Nota: \* De izquierda a derecha se observa el MPM seguido de una muestra sin ADN y muestras amplificadas a 50.0°C, 50.5°C, 51.6°C, 53.5°C, 55.9°C, 60.7°C, 63.1°C, 65.5°C, 67.4°C, 68.5°C, 69.0°C, respectivamente.

La secuenciación de productos amplificados de los genes para los cuales se diseñaron los cebadores, permitió, por medio de análisis de homología BLAST, establecer que corresponden a los genes en cuestión con 99% de similitud. Producto del alineamiento se constató que a partir del fragmento generado por PCR del gen COI se obtuvo una secuencia de 534pb después de edición a ojo, comprendidos entre las posiciones 6341 y 6874 del genoma mitocondrial de *P. magdalanae*. Para el caso del gen *Cyt b*, la secuencia generada después de edición a ojo correspondió a 724pb comprendidas entre las posiciones 14634 y 15357 del genoma mitocondrial de *P. magdalanae* (**Figura 4**). Para los dos genes el alineamiento y la edición se realizó comparando con secuencias reportadas en el GenBank del genoma mitocondrial de *P. magdalanae* con número de acceso KX151183.

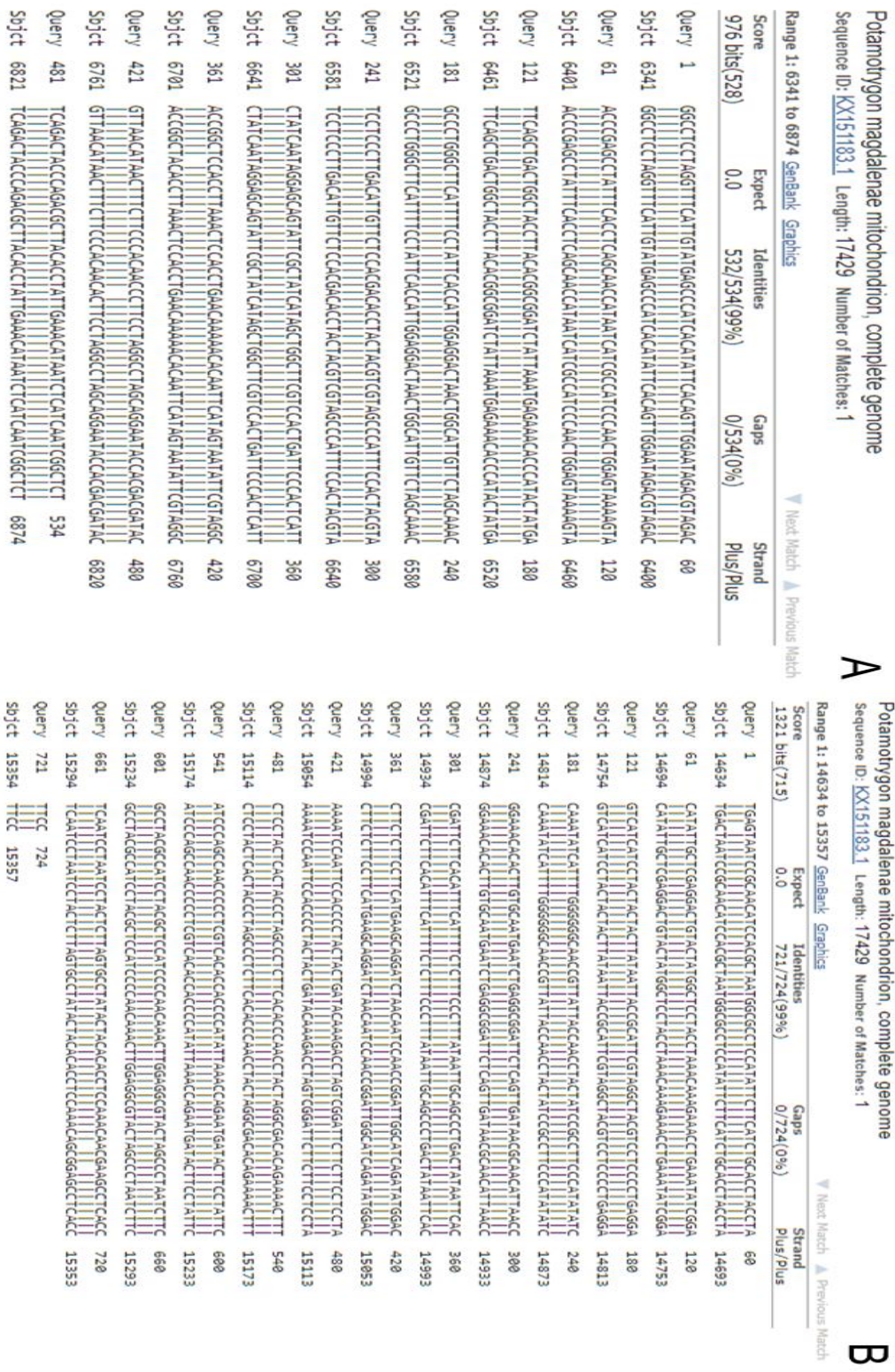


Figura 4. Homología en la secuencia de *Potamotrygon magdalenae* obtenidas a partir de secuencias amplificadas con cebadores diseñados en el presente estudio. A. Secuencia del gen COI y B. Secuencia del gen Cyt b.

## 5. Discusión

El presente trabajo resalta la puesta a prueba del modelo de pérdida de ADN al momento de diseñar cebadores funcionales en peces. Este modelo es utilizado para explicar la generación de nuevos genes de neuropéptidos en invertebrados que muestran marcos de lectura abiertos virtuales (*vORF*, por sus siglas en inglés) con aparente funcionalidad proteica (Martínez-Pérez et al., 2002, 2007), fue probado por Archila (2014) cuando diseñó cebadores que amplifican la región control del ADNmt en especies de aves pertenecientes a la familia Thraupidae, mostrando además de la eficacia por la obtención de productos amplificados y posteriormente secuencias, que el modelo puede ser evaluado en otros vertebrados distintos a aves.

El diseño de cebadores en las regiones ubicadas dentro de los genes COI y *Cyt b* se hizo teniendo en cuenta la relación de homología a través de MSA sobre los genes involucrados en el estudio y la disponibilidad de sus secuencias para los grupos trabajados (Lassmann & Sonnhammer, 2005; Cocco et al., 2018), que, junto con análisis realizados a cada uno de las secuencias consenso obtenidas, permitieron identificar segmentos altamente conservados a nivel de Superfamilia, al igual, que regiones con alta variación que comprende la porción genómica que fue amplificada con los cebadores diseñados bajo el modelo de pérdida de ADN (**Tabla 5**). Adicionalmente, las regiones comprendidas entre cebadores contienen mayor variación según el patrón observado (Martínez-Pérez et al., 2007).

Martínez-Pérez et al., (2007) en su propuesta de modelo de pérdida de ADN, estableció que hay ciertas regiones filogenéticamente conservadas que mantienen la secuencia de codones, donde la mayor variación se genera por sustituciones sinónimas en el tercer codón de los aminoácidos; estos cambios podrían no ser completamente aleatorios y conservar la función biológica de una proteína, siendo aceptados por la selección natural (Cocco et al., 2018). Con base en lo anterior, el análisis permite la identificación de regiones que sirven como cebadores

para la amplificación de segmentos en los genes implicados dentro del estudio siguiendo los parámetros propuestos para el diseño de los mismos (Sambrook & Russell, 2001; Degen et al., 2006; Andreson et al., 2008; Contreras-Moreira, 2018), los cuales por medio de análisis de relación BLAST pueden establecer que la selección de cebadores presenta homología en referencia al gen y al organismo de interés (Ye et al., 2012), lo que es representativo al momento de sintetizar los mismos ya que no se utilizaron cebadores degenerados.

El análisis de las dos regiones de ADNmt se hizo por separado pese al hecho que los principios generales para la obtención de amplificadas por PCR en muestras de ADN son los mismos (Degen et al., 2006). Dado que cada región genómica tiene sus propias características dentro de toda la información genética que pueda contener un individuo, se asume que estas mantienen patrones a través de los diferentes taxa, presentando ciertas variaciones que mantienen su función biológica (Illegård et al., 2009; Read et al., 2017).

En el caso del producto amplificado del gen COI, este representa el 58% de la extensión total del gen (1554pb), teniendo como factor crítico durante la estandarización, el valor de temperatura de hibridación, aspecto concordante con lo descrito por Degen et al., (2006). La visualización de bandas inespecíficas cuando la temperatura de Melting ( $T_m$ ) fue inferior a 60.1°C, permitió establecer que hay regiones dentro del segmento amplificado que presentaron algún grado de complementariedad con los cebadores utilizados (**Tabla 5**), lo cual concuerda con lo referido por Andreson et al., (2008) quienes plantearon que la causa que más produce errores en la PCR es un excesivo número en los sitios donde se hibridan los cebadores.

Situación contraria a lo sucedido con el gen *Cyt b*, del cual se obtuvo un producto amplificado cercano al 66% de su longitud total (1143pb). En este caso, en condiciones similares de amplificación (**Tabla 6**) mostró producto cuando la reacción de PCR se realizó con distintos valores de temperatura de hibridación (**Figura 3**). Todas las temperaturas de hibridación usadas para establecer la  $T_m$  mostraron calidad de banda similar; por lo cual, se

estableció que para este gen del ADNmt de *P. magdalenae* se presenta un solo sitio de enlace en relación con los cebadores utilizados, siendo coherente con lo descrito por Kõressaar et al., (2018).

En relación a la temperatura de hibridación, parámetro que mostró datos interesantes en el caso del gen *Cyt b*, esta corresponde al valor de temperatura en la cual la mitad de nucleótidos dentro del cebador se encuentran realizando interacciones con sus correspondientes parejas en el material genético de la muestra de interés (Sambrook & Russell, 2001). La misma se puede estimar teóricamente por medio de diferentes ecuaciones, que quizás debido a las distintas variaciones que suelen ocurrir en el trabajo práctico, no concuerde con lo estimado teóricamente (**Anexo E**). Todos los iniciadores diseñados presentan temperatura estimada de hibridación  $>67^{\circ}\text{C}$ , lo cual difiere de la temperatura de hibridación cuando se estandarizaron las condiciones para amplificar el fragmento del gen COI ( $60.1^{\circ}\text{C}$ ), pero es cercana en el caso del gen *Cyt b*. Con base en lo expuesto, se siguió lo sugerido por Sambrook & Russell (2001) quienes indican que el mejor método para optimizar las condiciones de hibridación de cebadores es la organización de series de tratamientos variando la temperatura por debajo del  $T_m$  calculado. En todos los casos se determinó que la temperatura de hibridación fue el valor en el que no se evidenciaron productos inespecíficos por debajo del producto amplificado esperado (**Figura 2** y **Figura 3**).

Al analizar la secuencia de cebadores reportadas por Garcia et al., (2015), se observaron inconsistencias teóricas en las parejas de cebadores propuestas por esos autores para amplificar los genes *Cyt b* y COI. En su trabajo García et al., (2015) seleccionaron fragmentos conservados filogenéticamente a través de diversos taxones, a objeto de obtener amplificadas y secuencias con las que establecen relaciones filéticas entre los géneros de la familia Potamotrygonidae distribuidos en Colombia y Venezuela; el trabajo reporta los cebadores CB2 y GLUDG para amplificar el gen *Cyt b*, los cuales corresponden a la misma secuencia de

nucleótidos; para el caso del gen COI, los cebadores difieren en 17pb en el tamaño entre las secuencia forward (COIf.1) y reverse (COIr.3). Según Contreras-Moreira, (2018) la diferencia en longitud entre cebadores requeridos en una reacción de PCR no debe superar tres nucleótidos, hecho que tiene implicación directa en la  $T_m$  o temperatura de hibridación de cada cebador; la cual debe mantenerse similar entre la pareja de cebadores utilizados para el proceso de amplificación.

Teniendo en cuenta que los cebadores diseñados se utilizaron para amplificar regiones del ADNmt en especímenes de *P. magdalenae*, se realizaron diferentes búsquedas tipo BLAST, como lo propone Johnson et al., (2008) con objeto de establecer homología entre los cebadores utilizados en la especie referida y las secuencias disponibles en el NCBI. Cuando se realizó dicho procedimiento con los cebadores descritos por Garcia et al., (2015), se evidenció un bajo a nulo nivel de homología con respecto a la familia Potamotrygonidae. De hecho, las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank identificadas como *Potamotrygon magdalenae* y presentadas por estos autores se encuentran precedidas por la palabra “UNVERIFIED”, excluyéndolas de la búsqueda que se realiza con la herramienta BLAST, indicando que las revisiones que realiza el NCBI no pueden esclarecer el origen de estas secuencias debido a inconsistencias encontradas por sus evaluadores y que a la fecha no han sido resueltas (Benson et al., 2012). Las inconsistencias presentadas posiblemente conllevan a la obtención de resultados erróneos o nulos, máxime si se desea ahondar en aspectos relacionados con la biología molecular de estas rayas de agua dulce, ya que estas herramientas podrían ampliar conceptos en los cuales se presentan vacíos de información (Can, 2014).

La situación descrita anteriormente fue similar cuando se realizó un análisis de homología con la herramienta BLAST a los cebadores Fish cox1 F1 y Fish cox1 R1 (propuestos para amplificar el gen COI de *P. motoro*) y Glu-L14724 y Cb2h15175 (requeridos para amplificar el gen *Cyt b* de *P. motoro*), todos ellos descritos en el trabajo publicado por Renzo-Millán et

al., (2019). El análisis mostró un elevado número de sitios de enlace (70) entre los cebadores dirigidos a amplificar el gen COI y el genoma mitocondrial de la especie en cuestión, situación que según Andreson et al., (2008), es la causa que más produce errores en la PCR. Adicionalmente, los cebadores descritos por Renzo-Millán et al., (2019) para amplificar el gen *Cyt b*, no presentan homología con las posiciones en las que se encuentra dicho gen dentro del genoma mitocondrial de *P. motoro*.

Además de los cebadores obtenidos en el presente trabajo de grado, el uso de los cebadores diseñados para amplificar el gen NADH Deshidrogenasa (ND2) en aves (L5215 y H6313 diseñados por Hackett, (1996) y Johnson & Sorenson, (1998), respectivamente), pueden constituir herramientas que potencialmente permitan profundizar en el estudio de aspectos relacionados con la genética molecular de *P. magdalenae*, como lo pueden ser su genética poblacional, aspectos filogeográficos, entre otros. Lo anterior se plantea a partir del hecho que se obtuvieron productos amplificados y secuencias ND2 a partir de muestras de ADN de *P. magdalenae*, cuando se utilizaron los cebadores L5215 y H6313 en LGB-UIS (datos no mostrados).

## 6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo de grado modalidad pasantía de investigación, se concluye que:

- Se diseñaron cebadores que permiten amplificar segmentos de los genes mitocondriales COI y *Cyt b* de *Potamotrygon magdalenae* a partir de la aplicación del modelo de pérdida de ADN (fundamentado en la evaluación de sitios conservados en secuencias de neuropéptidos de organismos invertebrados), el cual,

para este caso, permitió evaluar la selección de segmentos conservados en grupos de la superfamilia Dayastoidea dentro de la subclase Elosmobranchii.

- Los cebadores diseñados que generan producto amplificado del gen COI de *P. magdalenae* son fwRyWFECOI531-75 y R3RyWFECOI1432-56; mientras que los cebadores diseñados que generan producto amplificado del gen *Cyt b* en esta especie son f1RyWFECytb182-205 y RwRyWFECytb932-54. Todos estos cebadores producen resultados óptimos utilizando las mismas concentraciones de reactivos de PCR, diferenciándose en la temperatura de hibridación de la reacción.
- Las secuencias obtenidas a partir de productos de PCR amplificados con los cebadores diseñados, presentan similitud >99% con respecto a las secuencias de referencia para los genes COI y *Cyt b* disponible en el GenBank para *P. magdalenae*.

## 7. Recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se sugiere el uso de los cebadores que originan fragmentos de PCR para realizar estudios que involucren el análisis de genes mitocondriales, como herramientas útiles al momento de dilucidar ya sea, las relaciones filogenéticas, evolutivas o de diferenciación genética poblacional en la especie *P. magdalenae*.

### Referencias Bibliográficas

- Almeida, M. P., Lins, P. M. O., Charvet-Almeida, P., & Barthem, R. B. (2010). Diet of the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) on Marajó Island (Pará, Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 70(1), 155–162. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842010000100022>.
- Andreson, R., Möls, T., & Remm, M. (2008). Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic acids research*, 36(11), e66-e66.
- Archila, J.(2014). Estudio De La Diversidad Genetica De Ramphocelus (Aves: Thraupidae) Presente En El Departamento De Santander, Implementado Cebadores Diseñados Para El Analisis De La Region De Control Del Adn Mitocondrial (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic acids research*, 41(D1), D36-D42.
- Boore, J. L., Macey, J. R., & Medina, M. (2005). Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Methods in Enzymology*, 395, 311–348. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95019-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95019-2).
- Caldas, J. A., Castro-González, E., Puentes, V., Rueda, M., Lasso, C., Duarte, L. O., Grijalba-Bendeck, M., Gómez, F., Navia, A.F., Mejía-Falla, P.A., Bessudo, S., Diazgranados, M.C., & Zapata, L. A. (2010). Plan De Accion Conservacion Y Manejo De Tiburones , Rayas Y Quimeras De Colombia (PAN-Tiburones Colombia). *Instituto Colombiano Agropecuario, Secretaria Agricultura y Pesca San Andrés Isla, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Instituto Alexander Von Humboldt, Universidad del Magdalena, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Pontificia Universidad Javeriana, Fundación SQUALUS, Fundación Malpelo y otros Ecosistemas Marinos, Conservación Internacional, WWF Colombia*. Editorial Produmedios, Bogotá.
- Can, T. (2014). Introduction to bioinformatics. In *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis* (pp. 51-71). Humana Press, Totowa, NJ.
- Cocco, S., Feinauer, C., Figliuzzi, M., Monasson, R., & Weigt, M. (2018). Inverse statistical physics of protein sequences: a key issues review. *Reports on Progress in Physics*, 81(3), 032601.
- Contreras-Moreira, B. (2018). Algoritmos en bioinformática estructural. <http://hdl.handle.net/10261/21892>.
- Degen, H. J., Deufel, A., Eisel, D., Grunewald-Janho, S., & Keesey, J. (2006). PCR applications manual. *Roche, Mannheim, Germany*.

- Frederico, R. G., Farias, I. P., de Araújo, M. L. G., Charvet-Almeida, P., & Alves-Gomes, J. A. (2012). Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, 10(1), 71–80. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252012000100007>
- Garcia, D., Lasso, C., Morales, M., & Caballero, S. (2015). Molecular systematics of the freshwater stingrays (myliobatiformes: potamotrygonidae) of the Amazon, Orinoco, Magdalena, Esequibo, Caribbean, and Maracaibo basins (Colombia – Venezuela): evidence from three mitochondrial genes. *Mitochondrial DNA*, 1736(April 2016), 1–13. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1101536>.
- Gemaque, R., Leonardo, I., Monteiro, P., Gomes, F., Sodr , D., Sampaio, I., Rodrigues, S. (2017). Why implement measures to conserve the diversity of Elasmobranchs? The case of the northern coast of Brazil Conservation of Elasmobranchs off the northern coast of Brazil. *Revista Da Biologia*, 17(445), 1–7. <https://doi.org/10.7594/revbio.17.02.01>.
- Hackett, S. J. (1996). Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus*(Aves). *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 368–382.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167-172.
- Harrison, R. G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4(1), 6-11. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90006-2).
- Holmes, B. H., Steinke, D., & Ward, R. D. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 95(2-3), 280-288.
- Illerg rd, K., Ardell, D. H., & Elofsson, A. (2009). Structure is three to ten times more conserved than sequence—a study of structural response in protein cores. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(3), 499-508.
- Johnson, K. P., Sorenson, M. D. (1998). Comparing molecular evolution in two mitochondrial genes (cytochrome b and ND2) in the dabbling ducks (Tribe: Anatinae). *Mol Phylogenet Evol* 10: 82–94.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, 36(suppl\_2), W5-W9.
- K ressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M. (2018). Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11), 1937-1938.

- Lassmann, T., and E. L. L. Sonnhammer. (2005). Kalign—an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics*. 6:298.
- Lasso, C. a, Rosa, R. S., Morales-Betancourt, M., Garrone-Neto, D., & Carvalho, M. (2016). XV. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de sudamérica. *Parte II. Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Bogotá, D. C.: Instituto de investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.*
- Maldonado-Ocampo J. A, R. P. Vari & J. S . Usma. (2008). Checklist of the Freshwater Fishes of Colombia. *Biota Colombiana*, 9 (2), 143–237.
- Martínez-Pérez, F., Becerra, A., Valdés, J., Zinker, S., & Aréchiga, H. (2002). A possible molecular ancestor for mollusk APGWamide, insect adipokinetic hormone, and crustacean red pigment concentrating hormone. *Journal of molecular evolution*, 54(6), 703-714.
- Martínez-Pérez, F., Duran-Gutiérrez, D., Delaye, L., Becerra, A., Aguilar, G., & Zinker, S. (2007). Loss of DNA: A plausible molecular level explanation for crustacean neuropeptide gene evolution. *peptides*, 28(1), 76-82.
- Mojica, J. I., Usma, J., Álvarez-León, R., Lasso, C. (2012). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales.
- Pedrerros-Sierra, T., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2014). Morphology of the reproductive tract and acquisition of sexual maturity in males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Journal of Morphology*, 0, 1–17. <https://doi.org/10.1002/jmor.20337>.
- Pedrerros-Sierra, T., Arrieta-Prieto, D. M., & Mejía-Falla, P. A. (2016). Reproductive system of females of the Magdalena river endemic stingray *Potamotrygon magdalenae*: Anatomical and functional aspects. *Journal of Morphology*, 277(5), 680–697. <https://doi.org/10.1002/jmor.20527>.
- Ramírez, F., & Davenport, T. L. (2013). Elasmobranchs from marine and freshwater environments in Colombia: A review. *Revista de Ciencia Política*, 6(4), 483–529.
- Ramos-Socha, H. B., & Grijalba-Bendeck, M. (2011). Bioecología de la raya de agua dulce *Potamotrygon magdalenae* (Duméril, 1865) (Myliobatiformes) en la ciénaga de Sabayo, Guaimaral, Colombia. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14, 109–118.
- Read, C. Y. (2017). Primer in Genetics and Genomics, Article 3—Explaining Human Diversity: The Role of DNA. *Biological research for nursing*, 19(3), 350-356.

- Renza-Millán, M., Lasso, C. A., Morales-Betancourt, M. A., Villa, F., & Caballero, S. (2019). Mitochondrial DNA diversity and population structure of the ocellate freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841)(Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the Colombian Amazon and Orinoco Basins. *Mitochondrial DNA Part A*, 1-8.
- Ruiz, J., & Flores, M. (2016). Calidad del agua en el manejo post captura de *Potamotrygon motoro* “*raya motoro*” (*pisces: potamotrygonidae*) en el acuario comercial “amazon tropicals aquarium” de la ciudad de Iquitos, Perú. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- Sambrook, J., & Green, M. R. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual (4th ed). *Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sambrook, J., Russell, D. W., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). *Immunol*, 49, 895-909.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 134.

## Anexos

### Anexo A. Individualización de muestras de *P. magdalенаe*.



Cada muestra se rotuló como quedó indicado en materiales y métodos. Las muestras 102, 202 y 402 corresponden al segundo individuo de las ciénagas de: Paredes, Zapatosa y Cimití, respectivamente.

### Anexo B. Números de acceso de las secuencias utilizadas para el diseño de cebadores.

COI			
Especie	Número de acceso	Especie	Número de acceso
<i>Potamotrygon motoro</i>	NC_023116	<i>Potamotrygon schroederi</i>	EF532676
<i>Potamotrygon motoro</i>	KF709642	<i>Potamotrygon schroederi</i>	EF532675
<i>Potamotrygon motoro</i>	JN020037	<i>Potamotrygon schroederi</i>	EF532674
<i>Potamotrygon motoro</i>	JN020036	<i>Potamotrygon schroederi</i>	EF532673
<i>Potamotrygon motoro</i>	JN020035	<i>Potamotrygon sp.</i>	EF532652
<i>Potamotrygon motoro</i>	JN020034	<i>Potamotrygon sp.</i>	EF532651
<i>Potamotrygon motoro</i>	JN020033	<i>Potamotrygon sp.</i>	EF532650
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532672	<i>Potamotrygon sp.</i>	EF532649
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532671	<i>Potamotrygon sp.</i>	EF532648
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532670	<i>Plesiotrygon iwamae</i>	EF532668
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532669	<i>Himantura gerrardi</i>	NC_026208
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532664	<i>Himantura gerrardi</i>	KP091437
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532662	<i>Himantura uarnak</i>	NC_028325
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532661	<i>Himantura uarnak</i>	KR019776
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532660	<i>Himantura hortlei</i>	NC_027497

COI			
Especie	Número de acceso	Especie	Número de acceso
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532659	<i>Himantura hortlei</i>	KP727646
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532658	<i>Himantura granulata</i>	NC_023525
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532657	<i>Himantura granulata</i>	KF751650
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532656	<i>Himantura dalyensis</i>	NC_027649
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532655	<i>Himantura dalyensis</i>	KM244769
<i>Potamotrygon motoro</i>	EF532653	<i>Himantura jenkinsii</i>	NC_030271
<i>Potamotrygon scobina</i>	EF532683	<i>Himantura jenkinsii</i>	KU873081
<i>Potamotrygon scobina</i>	EF532654	<i>Himantura pacifica</i>	EF532645
<i>Potamotrygon hystrix</i>	JN184071	<i>Urogymnus asperrimus</i>	JN184084
<i>Potamotrygon henlei</i>	EF532665	<i>Taeniura grabata</i>	KX688096
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	EF532682	<i>Taeniura lymma</i>	NC_026210
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	KX688094	<i>Taeniura lymma</i>	KM881715
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	EF532667	<i>Taeniura lymma</i>	JN184079
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	EF532666	<i>Taeniura lymma</i>	KY849556
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	EF532663	<i>Taeniura lymma</i>	KX219582
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	EF532647	<i>Taeniura meyeri</i>	NC_019641
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	EF532646	<i>Taeniura meyeri</i>	JX827260
<i>Potamotrygon falkneri</i>	EF532681	<i>Taeniura meyeri</i>	KF899829
<i>Potamotrygon falkneri</i>	EF532680	<i>Taeniura meyeri</i>	KF899828
<i>Potamotrygon falkneri</i>	EF532679	<i>Taeniura meyeri</i>	KF899827
<i>Potamotrygon leopoldi</i>	EF532678	<i>Taeniura meyeri</i>	KF899826
<i>Potamotrygon leopoldi</i>	EF532677	<i>Taeniura meyeri</i>	KF899825
CYTB			
Especie	Número de acceso	Especie	Número de acceso
<i>Potamotrygon motoro</i>	NC_023116	<i>Dasyatis bennetti</i>	KC633222
<i>Potamotrygon motoro</i>	KF709642	<i>Dasyatis bennetti</i>	KC196067
<i>Potamotrygon hystrix</i>	JN184071	<i>Dasyatis zugei</i>	NC_019643
<i>Taeniura lymma</i>	NC_026210	<i>Dasyatis zugei</i>	JX524174
<i>Taeniura lymma</i>	KM881715	<i>Dasyatis brevis</i>	JN184058
<i>Taeniura lymma</i>	JN184079	<i>Himantura gerrardi</i>	NC_026208
<i>Taeniura meyeri</i>	NC_019641	<i>Himantura gerrardi</i>	KP091437
<i>Taeniura meyeri</i>	JX827260	<i>Himantura uarnak voucher</i>	NC_028325
<i>Pastinachus atrus</i>	NC_023808	<i>Himantura uarnak voucher</i>	KR019776
<i>Pastinachus atrus</i>	HG942172	<i>Himantura hortlei</i>	NC_027497
<i>Pastinachus solocirostris</i>	JN184066	<i>Himantura hortlei</i>	KP727646
<i>Neotrygon kuhlii voucher</i>	KR019777	<i>Himantura microphthalmalma</i>	NC_026285
<i>Neotrygon kuhlii</i>	NC_021767	<i>Himantura microphthalmalma</i>	KF840390
<i>Neotrygon kuhlii</i>	KC992792	<i>Himantura granulata</i>	NC_023525
<i>Neotrygon kuhlii</i>	JN184065	<i>Himantura granulata</i>	KF751650
<i>Pteroplatytrygon violacea</i>	NC_024570	<i>Himantura dalyensis</i>	NC_027649
<i>Pteroplatytrygon violacea</i>	KJ641617	<i>Himantura dalyensis</i>	KM244769

COI			
Especie	Número de acceso	Especie	Número de acceso
<i>Dasyatis akajei</i>	NC_021132	<i>Himantura schmardae</i>	JN184062
<i>Dasyatis akajei</i>	KC526959	<i>Himantura jenkinsii</i>	NC_030271
<i>Dasyatis bennetti</i>	NC_020352	<i>Himantura jenkinsii</i>	KU873081
		<i>Urogymnus asperrimus</i>	JN184084

Los números de acceso de cada gen corresponden a lo reportado en el NCBI.

### **Anexo C.** Parámetros sugeridos para el diseño de cebadores.

No contener estructura secundaria interna
Tener un contenido de G/C entre 40% y 60%
Presentar una distribución balanceada en la riqueza de dominios G/C y A/T
No presentar complementariedad entre el mismo cebador
Reconocimiento específico de la secuencia target
Temperaturas de alineamiento cercanas entre la pareja de cebadores
Tener una extensión comprendida entre 18pb a 30pb

Estos parámetros son los reportados en los trabajos de (Degen et al., 2006; Untergasser et al., 2012; Contreras-Moreira, 2018)

## Anexo D. Análisis de alineamientos realizados para obtención de secuencias consenso.

## A

```

          970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
>CoNspPMo7COI  GCCATCCCAACCGGAGTAAAAGTATT CAGCTGATTAGCCAC_CYTACACGGAGGATCTATTAAAGT GAGAAACACC TATAAC
>CoNesPMo16COI  GCYATCCCAACCGGAGTAAAAGTATT CAGCTGRITTAGCCAC_CTTACACGGAGGRTCTATYAAATGRGAAACACC YATRC
>CoNesPMo21COI  GCYATCCCAACCGGAGTAAAAGTATT CAGCTGRITTAGCCAC_CYTACACGGAGGRTCTATYAAATGRGAAACACC YATRC
>CoNgePot45COI  GCYATCCCAACCGGAGTAAAAGTATT CAGCTGRITRGCYACACYTRCAYGGVGGRTCYATYAAATGRGAAACACC YATRC
>CoNfmPot46COI  GCYATCCCAACCGGAGTAAAAGTATT CAGCTGRITRGCYACACYTRCAYGGVGGRTCYATYAAATGRGAAACACC HATRC
>CoNaD_s61COI  GCYATYCCAACNNGRGTAAAAGTMTTYAGYTRGRYTRGCYAC_HMYTRCAYGGNGGVTCYATYAAATGRGAAACACC_HMTNC
>CoNaD_s_M71COI GCYATYCCAACNNGDGTAAAAGTMTTYAGYTRGRYTRGCYAC_HMYTRCAYGGNGGVTCYATYAAATGRGAAACACC_HMTNC

          1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
>CoNspPMo7COI  _TCTGAGCCCTAGGCTTYAATTTTCCTATTTACCATCGGAGGACTAACTGGCATCGTACT_AGC AAACTCCTCCCTTGACA
>CoNesPMo16COI  _TCTGAGCCCTAGGCTTYAATTTTCCTATTTACCATCGGAGGACTAACTGGCATCGTACT_AGC AAACTCCTCCCTTGACA
>CoNesPMo21COI  _TCTGAGCCCTAGGCTTYAATTTTCCTATTTACCATCGGAGGACTAACTGGCATCGTACT_AGC AAACTCCTCCCTTGACA
>CoNgePot45COI  _TCTGAGCCCTAGGCTTYATYTTYTATTYACYATYGGAGGACTACTGGCATYGTWCT_AGC AAACTCCTCCCTYGACA
>CoNfmPot46COI  _TCTGAGCCCTAGGCTTYATYTTYTATTYACYATYGGAGGACTACTGGCATYGTWCT_AGC AAACTCCTCCCTYGACA
>CoNaD_s61COI  TTYTGAGCYCTDGGHTTYATYTTYTATTYACYRINGGDGGHCTRACTGGYATYGTHTY_AGCHAACTCHTCMYTHGAYR
>CoNaD_s_M71COI TTYTGAGCYCTDGGHTTYATYTTYTATTYACYRINGGDGGHCTRACTGGYATYGTHTYTAGCHAACTCHTCMYTHGAYR

          1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
>CoNspPMo7COI  TTGTA_YTCCACGACACTTACTACGTTGTAGCCACTT_CCACTACGTACTTCCATAGGAGCAGTATTGCTATTAT
>CoNesPMo16COI  TTGTA_CTTCCACGACACTTACTACGTTGTAGC_MCACTT_CCACTACGTACTTCCATAGGAGCAGTATTGCTATTAT
>CoNesPMo21COI  TTGTA_CTTCCACGACACTTACTACGTTGTAGC_MCACTT_CCACTACGTACTTCCATAGGAGCAGTATTGCTATTAT
>CoNgePot45COI  TTGTA_CTTCCACGACACTTACTACGTTGTAGC_HCAVTT_CCACTACGTACTTCCATAGGAGCAGTATTYGCTATYAT
>CoNfmPot46COI  TTGTA_CTTCCACGACACTTACTACGTTGTAGC_HCAVTTTACCACGTACTTCCATAGGAGCAGTATTYGCTATYAT
>CoNaD_s61COI  TTGTHGTCTYCAYGAYACTAYTAYGTTGTAGCHCAVTTAYCAYTAYGNTYTRCHATRGGAGCHGTATTYGCTATYAT
>CoNaD_s_M71COI THGTH_CTHCAYGAYACTAYTAYGTHGTAGCHCAVTTAYCAYTAYGNTYTRCHATRGGAGCHGTATTYGCTATYAT

```

## B

```

>conespmocvtb CAATGAATCTGAGGYGGRTTTCAGT CGACAAYGCAACACTAACTC GATTCTTCACAITCCATTTCTCTTTCCCTTTTATA
>congepotcvtb CAATGAATCTGAGGBGGRTTTCAGT YGACAAYGCAACACTAACYC GATTCTTCACAITCCATTTCTCTTTCCCTTTTATA
>congepotcvtban CARTGAATCTGAGGBGGRTTTCART YGAYAAAYGCAACAYTAACYC GRITTCACAITTYCATTTTCTMTTCCCTTTTATA
>confmpotadcytban CAATGAATCTGAGGNNGRTTTCAGT YGAYARYGCAACACTAACYC GATTCTTCACAITTYCATTTCTCTTTCCCTTTTATA
>confmpotcvtban CAATGAATCTGAGGNNGVTTCCART YGAYARYGCAACAYTAACYC GATTCTTCACAITTYCATTTCTCTTTCCCTTTTATA

>conespmocvtb ATTGCCGCACTGACTATAATT CACCTTCTCTTCCTT CATGAAGCAGGATCTAACAAATCCAAACAGGYCTGACWTCR GATATR
>congepotcvtb ATTGCCGCACTGACTATAATT CACCTTCTCTTCCTT CATGAAGCAGGATCTAACAAATCCAAACNGGYCTGACATCR GATATR
>congepotcvtban ATTGCCGCACTGACTATAATT CACCTTCTCTTCCTT CATGAAGCAGGATCTAACAAATCCAAACNGGYMTGACWTCR GATATR
>confmpotadcytban ATTGCCGCACTGACTATAATT CACCTTCTCTTCCTT CATGAAGCAGGATCTAACAAATCCAAACNGGYCTRACATCVGATATR
>confmpotcvtban ATTGYMGWCTRACTATAATT CACCTTCTCTTCCTT CATGAARCAGGWTCWAAYAAAYCCMACHGGHCTNWCNTCVRAYAYR

>conespmocvtb GACAAAATCCAAATTTCCACCCCTACTACTGATACAAAAGACCTAGTHGGCTTCTCTTCTCTCTACTCTACTCTGCTATTCTA
>congepotcvtb GACAAAATCCAAATTYCACCCCTACTACTGATACAAAAGACCTAGTHGGCTTCTCTTCTCTCTACTCTACTCTGCTATTCTA
>congepotcvtban GACAAAATYCAAATTYCACCCCTACTACTGATAYAAAGACCTAGTHGGCTTCTCTTCTCTCTACTCTACTCTGCTATTCTA
>confmpotadcytban GACAAAATYCAAATTYCACCCCTAYTACTGATACAAAAGACCTARTHGGCTTCTCTTCTCTCTACTCTACTCTGCTATTCTA
>confmpotcvtban GACAAAATCCMRITTYCAYYCTAYTWWSATAYAAAAYYTWRTTHGGCTTCTCTTCTCTCTACTCTACTCTGCTATTCTA

>conespmocvtb GCCCTATTAYACCCAACTA YTAAGCGACACAGAAAACCTT CATCCAGCTAACCCCTTgtcacaccacccacatcaaa
>congepotcvtb RCCCTATTAYACCCAACTA YTAARGHGACACAGAAAACCTT YATCCAGCYAAYMCYCTWrttyacmmcacccayatyaaa
>congepotcvtban GCCCTATTAYACCCAACTA YTAARGYGACACAGAAAACCTT YATCCAGCYAAYMCYCTTrttyacmmcacccayatyaaa
>confmpotadcytban GCCCTATTAYACCCAACTA YTAARGHGAYACAGAAAACCTT YATCCAGCYAAYMCYCTWrttyacmmcacccayatyaaa
>confmpotcvtban GCCYTYTYRYACCCAACTVYVYARRRHGAYRCAGAAAACCTT YATCCAGCYAAYCCYTHrttyacrcwccmccayatyaaa

```

Se muestra evidencia del alineamiento de secuencias realizado para obtener las secuencias consenso a partir de información disponible en el GenBank. A: para el gen COI; B: para el gen *Cyt b*.

**Anexo E.** Parámetros definidos para cada cebador diseñado.

Nombre	Gen	Inicio	Fin	Tamaño	%G-C	Tm	Ta	Secuencia	Producto PCR
fwRyWFECOI531-75	coi	531	555	25	44	67.1°C	61.2°C	GCA ATC TCT CAA TAC CAA ACA CCA C	Una Banda
R1RyWFECOI143-2-56	coi	1432	1456	25	44	68.9°C	-	CGT TTT GAT GCG AAT GCT TCT CAG A	No Banda
R2RyWFECOI143-2-56	coi	1432	1456	25	48	69.9°C	-	CGT TTT GAT GCG AAT GCC TCT CAG A	No Banda
R3RyWFECOI143-2-56	coi	1432	1456	25	40	68°C	61.2°C	CGT TTT GAT GCA AAT GCT TCT CAG A	Una Banda
R4RyWFECOI143-2-56	coi	1432	1456	25	44	69°C	-	CGT TTT GAT GCA AAT GCC TCT CAG A	No Banda
f1RyWFECytb182-205	cyt b	182	205	24	54	69.3°C	50.0 a 69.0°C	CAT CAG CCT TCT CCT CAA TCG CAC	Una Banda
f2RyWFECytb182-205	cyt b	182	205	24	58	70.4°C	-	CAT CAG CCT TCT CCT CCA TCG CAC	No Banda
fwRyWFECytb581-604	cyt b	581	604	24	37	62.2°C	-	CTA TAA TTC ACC TTC TCT TCC TTC	No Banda
RwRyWFECytb932-54	cyt b	932	954	25	56	71.2°C	50.0 a 69.0°C	CGG AAG GTG AGG CTT CGT TGT TTG G	Una Banda

Inicio: posición del ADNmt en el que el primer nucleótido del cebador hibrida en sentido 5' – 3'; Fin: posición del ADNmt en el que el último nucleótido del cebador hibrida en sentido 5' – 3'; Tm: temperatura de hibridación calculada con OligoAnalyzer Tool; Ta: temperatura de alineamiento.