

# **Aplicación de los Genes Citocromo b (Cytb) y Citocromo c Oxidasa 1 (COI) como Marcadores Mitocondriales en la Identificación Forense de Rayas Dulceacuícolas: Un Caso de Incautación en el Aeropuerto Internacional El Dorado, Bogotá, Colombia.**

Lisbeth Dayanna Gelvez <sup>1</sup>, Ana María Cuellar Escobar<sup>1</sup>, María Paula Gómez Rodríguez<sup>1</sup>, Jorge Oliveros<sup>2</sup>, Paola Andrea Alméciga-Díaz<sup>3</sup>, Mireya Pinedo Castro<sup>4</sup> y John Nelson Infante<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Semillero de Investigación en Ciencias Animales y Seguridad Veterinaria, Fundación Universitaria Agraria de Colombia-UNIAGRARIA; <sup>2</sup>Universidad Militar Nueva Granada

<sup>3</sup>Universidade Federal Do Rio Grande FURG

<sup>4</sup>Semillero de Investigación Congéneres Pontificia Universidad Javeriana

<sup>5</sup>Facultad de Ciencias Agrarias-Uniagraria, Fundación Universitaria de Colombia-UNIAGRARIA

## **Resumen:**

Las rayas de la familia Potamotrygonidae destacan por su alto valor comercial como peces ornamentales en el mercado internacional, generando una creciente demanda e incrementando su relevancia económica. En Colombia, a pesar de contar con regulaciones legales destinadas a proteger tanto a estos animales como a sus hábitats, la efectividad de estas normativas no siempre está garantizada. Esto se debe, en parte, a que las regulaciones de exportación tienden a centrarse exclusivamente en criterios físicos para la identificación de las especies. Esto puede resultar poco preciso, por lo que se busca un método más exacto que se apoye en aspectos genéticos como el barcoding. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de los genes Cytb y COI como marcadores moleculares para la identificación de una especie de la familia Potamotrygonidae en Colombia mediante la técnica de barcoding. Para la metodología se extrajo ADN de muestras de sangre de diversas especies de rayas provenientes de la cuenca Puerto Inírida, utilizando la técnica de PCR para amplificar regiones específicas de los genes COI y Cytb, las cuales fueron secuenciadas mediante la técnica Sanger. Las secuencias se leyeron en Bioedit y limpiaron manualmente para posteriormente analizarlas en el programa BLAST y alinearlas en MEGA, donde se construyó un árbol neighbor joining por medio del modelo Kimura 2 parameter (K2P). Los resultados indicaron que no hubo identidad genética entre las secuencias obtenidas y la secuencia de la raya no identificada en

comparación con las depositadas en el GenBank, ni tampoco con las demás especies analizadas, tanto para COI como para Cytb. Al realizar el análisis filogenético el individuo incautado mostró cercanía genética con la especie *Potamotrygon motoro* (*P. motoro*). Adicionalmente, se identificó una estrecha relación genética entre *P. orbignyi* y *P. schroederi*, tanto en las muestras del estudio como en las secuencias en GenBank. En conclusión, el método filogenético mostraría que la raya incautada probablemente pertenezca a la especie *P. motoro*. Además, se puede concluir que el método barcoding por sí solo no constituye una herramienta idónea para la identificación de especies de la familia Potamotrygonidae.

**Palabras clave:** Barcoding, *Potamotrygon*, Genética Forense.

### **Abstract:**

Stingrays from the Potamotrygonidae family are renowned for their high commercial value as ornamental fish in the international market, leading to a growing demand and increasing economic significance. In Colombia, despite having legal regulations aimed at protecting both these animals and their habitats, the effectiveness of these norms is not always guaranteed. This is partly due to export regulations often focusing exclusively on physical criteria for species identification, which can be imprecise. Therefore, a more accurate method based on genetic aspects, such as barcoding, is sought. The aim of this study was to assess the potential of the Cytb and COI genes as molecular markers for the identification of one species from the Potamotrygonidae family in Colombia using the barcoding technique. For the methodology, DNA was extracted from blood samples of various stingray species from Puerto Inírida basin, using PCR to amplify specific regions of the COI and Cytb genes, which were then sequenced using the Sanger technique. Sequences were read in Bioedit, manually cleaned, and subsequently analyzed in the BLAST program and aligned in MEGA, where a neighbor joining tree was constructed using the Kimura 2 parameter (K2P) model. Results indicated no genetic identity between the obtained sequences and the unidentified stingray sequence compared to those deposited in GenBank, nor with other analyzed species, for both COI and Cytb. In the phylogenetic analysis, the confiscated individual showed genetic proximity to the *Potamotrygon motoro* (*P. motoro*) species. Additionally, a close genetic relationship between *P. orbignyi* and *P. schroederi* was identified, both in the study samples and GenBank sequences. In conclusion, the phylogenetic method would suggest that the confiscated stingray probably belongs to the *P. motoro* species. Furthermore, it can be concluded that the

barcoding method alone is not an ideal tool for the identification of species in the Potamotrygonidae family.

**Keywords:** Barcoding, *Potamotrygon*, Forensic Genetics.

## INTRODUCCIÓN

La familia Potamotrygonidae es un grupo de rayas que habita en América del Sur estrictamente, se localizan principalmente en la cuenca del Río Amazonas y otros ríos adyacentes. El género *Potamotrygon* es el más diverso con 36 especies (da Cruz et al., 2021; Garcia et al., 2016; Nachtigall et al., 2023; Ory et al., 2019; Torres et al., 2022), las más destacadas en Colombia son *Potamotrygon constellata*, *Potamotrygon magdalenae*, *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon schroederi*, *Potamotrygon scobina* y *Potamotrygon yepesi* (Teixeira et al., 2017). Estas especies desempeñan una función ecológica importante al regular las poblaciones de peces, crustáceos e insectos en sus hábitats acuáticos, manteniendo así el equilibrio de los ecosistemas donde se desarrollan (Flowers et al., 2021). En Latinoamérica, la exportación de estas especies se desarrolla como una actividad frecuente, impulsada por la creciente demanda en sectores como el ornamental, gastronómico, manufactura artesanal (tambores y lijas) y medicina alternativa. Por otro lado, en el ámbito comercial los fondos generados mediante la captura de estas rayas desempeñan un rol significativo en las comunidades locales que viven cerca de los ríos, al ofrecer un ingreso suplementario de valor durante varios meses del año (Lasso et.al, 2013).

Con el fin de preservar y proteger estas poblaciones animales, se han implementado algunas normativas y leyes destinadas a conservar su hábitat teniendo en cuenta que varias de ellas se encuentran en estado de conservación casi amenazada y vulnerable (Mojica et al., 2012). Medidas como la ley 2111 del 2021 y el decreto 281 de 2021, emitidos por el congreso y la presidencia de la República de Colombia, buscan garantizar su supervivencia y a la vez evitar la degradación de los ecosistemas acuáticos donde habitan estas poblaciones. La principal entidad encargada de ejercer la autoridad pesquera y acuícola en Colombia es la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP), adscrita al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, además se resalta el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Social como ente encargado de diseñar planes de acción relacionados con la conservación de la biodiversidad, y el Instituto

Colombiano Agropecuario (ICA) que supervisa las condiciones sanitarias, movilización de animales y garantizan el cumplimiento de normativas, así mismo realizan actividades de incautación de fauna en casos de tráfico ilegal (Minambiente, 2022; Secretaria de ambiente, 2022; ICA, 2009). A pesar del esfuerzo generado por las anteriores entidades, no siempre se asegura un seguimiento efectivo hacia las poblaciones de rayas debido a la limitada información que se tiene sobre su manipulación, taxonomía, incidencia humana (sobrepesca y pesca incidental) y la proyección sostenible del recurso pesquero ornamental (Pinedo, 2018; Mancera-Rodríguez & Álvarez-León, 2008; Márquez-Velásquez et al., 2019; Miguel & Martínez, 2017). Como ejemplo de ello, aún es permitido que los pescadores operen bajo un régimen de libre acceso, descuidando la importancia de educar sobre el estado de conservación de la especie y los beneficios de la pesca sustentable (Alexia & Santos, 2020). La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, CITES (por sus siglas en inglés) ha desempeñado un papel crucial al clasificar las especies del género *Potamotrygon* sujetas a una regulación más estricta en lo que respecta a su comercio internacional (Lasso et al., 2013). Dichas especies incluyen a *P. constellata*, *P. magdalenae*, *P. schroederi*, *P. motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina* y *P. yepezi*, todas ellas incluidas en el Apéndice III. A su vez, el Plan Nacional de Acción (PAN) establecido por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible para la Amazonía colombiana asigna un nivel de prioridad muy alto a la obtención de información acerca de las especies *P. motoro* y *P. orbignyi* (Alexia & Santos, 2020).

Restringir la exportación de especies es fundamental para mitigar el impacto negativo en las poblaciones acuícolas y sus ecosistemas. No obstante, durante la captura de individuos, resulta crucial la correcta identificación de las especies. Esto subraya la importancia de emplear métodos efectivos y comprensibles para los pescadores, quienes suelen distinguir las especies principalmente a través de aspectos físicos, como el número y disposición de las aletas, el tamaño del individuo y el patrón de color (Eheman et al., 2019). Sin embargo, depender exclusivamente de características morfológicas para la identificación puede dar lugar a errores significativos, lo que ha impulsado la consideración actual de factores moleculares.

Para evitar casos de exportación ilegal es necesario que las autoridades implementen un método de identificación más preciso que permita determinar la especie de manera genética,

como lo es el análisis de códigos de barra de ADN mitocondrial o barcoding, un método que ha ido creciendo entre la comunidad científica para tal fin, debido a que permite la identificación de especies y subespecies (Naz et al., 2023). En el ámbito de la genética forense, el barcoding se emplea para analizar polimorfismos en el ADN. Este método se ha aplicado con éxito en la conservación de la biodiversidad, permitiendo la identificación de especies en riesgo o presentes en áreas protegidas. Esta información contribuye de manera significativa a la toma de decisiones para la preservación de especies. Asimismo, el barcoding tiene aplicaciones en el comercio de productos biológicos, como el reconocimiento de especies en el mercado de alimentos, el control de especies invasoras o la detección de especies en productos de medicina tradicional (Naz et al., 2023). Además, ha sido empleado en la caracterización de especies en estudios de ecología y evolución, permitiendo investigar patrones de diversidad genética, relaciones filogenéticas y migración de especies. Adicionalmente, se ha empleado en la identificación de un sin fin de especies animales, desde insectos, incluyendo miembros del género *Spodoptera*, *Lepidoptera* y del orden Diptera, Psychodidae, Phlebotominae, Hemiptera, hasta aves y mamíferos en casos de investigación forense (de Souza Pinto et al., 2023; Gonçalves et al., 2015; Roccaro et al., 2021; Saldamando & Marquez, 2012; Wang et al., 2016). Uno de los marcadores moleculares más utilizados en este tipo de estudio es el ADN mitocondrial (ADNmt) debido a la alta cantidad de polimorfismos, falta de recombinación cromosómica, buena eficiencia en el aislamiento del material genético, incluso en pequeñas cantidades de tejido biológico, y alta resistencia a la degradación. Dado que estas secuencias genómicas provienen exclusivamente de la herencia materna, se utilizan principalmente para rastrear relaciones evolutivas entre organismos y proporcionar datos únicos sobre las poblaciones (Filip et al., 2023; Nachtigall et al., 2023).

El gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa 1 (COI) se usa de manera generalizada para el análisis del barcoding debido a su secuencia conservada, lo que facilita el diseño de cebadores universales aplicables a una variedad de organismos. Además, el COI demuestra ser efectivo para discriminar individuos entre especies (Filip et al., 2023). El complejo citocromo c oxidasa cataliza la transferencia final de electrones del citocromo c al oxígeno molecular y participa en la creación del gradiente electroquímico utilizado para la síntesis de ATP en el tercer sitio de fosforilación oxidativa. Resaltando el papel de una de sus subunidades, el gen COI también participa en el proceso de transporte de electrones por medio de dos moléculas: hemo A (hemo

a y hemo a3) y B de cobre (CuB). El hemo a3 y el CuB forman un centro binuclear donde el oxígeno molecular se reduce a agua (Hu et al., 2018).

El gen mitocondrial Citocromo b (Cytb) tiene la tarea de codificar la proteína citocromo bc1, que desempeña un papel esencial en la cadena de transporte de electrones, un proceso necesario para la generación de energía en las células. Investigaciones sugieren que cambios en el gen citocromo b podrían estar relacionados con la forma en que los organismos se adaptan a diferentes temperaturas ambientales (Li et al., 2013; Shad et al., 2022). Este gen se distingue por su capacidad para diferenciar especies cercanas, además de proporcionar una valiosa información filogenética (Roccaro et al., 2021).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de los genes Cytb y COI como marcadores moleculares para la identificación de una especie de la familia Potamotrygonidae en Colombia mediante la técnica de barcoding.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Historia de caso**

Los pescadores de la región del Guainía, Colombia, dedicados a la captura artesanal de peces ornamentales, recientemente comercializaron y enviaron un lote de peces, entre los cuales se incluían diversas especies de rayas dulceacuólicas, a una empresa especializada en acopio y exportación de peces ornamentales en Bogotá. Los animales, capturados en Puerto Inírida y pertenecientes a diferentes especies del género *Potamotrygon*, fueron sometidos a los protocolos de cuarentena establecidos por el ICA. Después de completar este periodo, un grupo de rayas fue seleccionado para la exportación a Vietnam, cumpliendo con los requisitos que incluyeron la obtención del permiso CITES aprobado por la AUNAP, el ICA y la Secretaría de Ambiente de Bogotá.

Durante la inspección visual de rutina a los peces destinados a la exportación, llevada a cabo por la Secretaría de Ambiente y la AUNAP en el Aeropuerto Internacional El Dorado de Bogotá, se identificó una notable disparidad visual en un ejemplar de raya, al no mostrar las

características taxonómicas distintivas de la especie *P. motoro* (color marrón-oliváceo a marrón o gris oscuro, con numerosos ocelos amarillos a anaranjado-rojizo (Mojica et al., 2012)) (Fig. 1). Ante esta observación, la entidad decidió restringir la exportación de dicho pez, argumentando la posibilidad de un tráfico ilegal. En respuesta a esta situación, la empresa involucrada optó por contactar a un laboratorio de genética con el propósito de realizar un muestreo y, potencialmente, identificar la especie del animal en cuestión.



**Figura 1.** Individuo decomisado en el aeropuerto El Dorado, Bogotá, Colombia, en el cual se evidencian zonas de la piel despigmentadas.

Se extrajeron muestras de sangre de seis ejemplares pertenecientes a las especies *P. motoro* (n=2), *P. orbignyi* (n=2) y *P. schroederi* (n=1), así como de un individuo no identificado taxonómicamente (n=1), el cual fue decomisado en el Aeropuerto Internacional El Dorado, Bogotá, Colombia. Estos individuos fueron adquiridos en el mismo centro de acopio de peces ornamentales en Bogotá, Colombia, donde previamente se incautó la raya. En este centro informaron que las rayas provienen de la cuenca de Puerto Inírida. Este dato resulta relevante para lograr una aproximación más precisa en el caso de no obtener resultados concluyentes mediante la realización del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en GenBank. Las muestras de sangre se obtuvieron sumergiendo a las rayas en una solución de 1L de agua y Eugenol a una concentración de 40 mg/L durante cinco minutos para su sedación, seguido de la extracción de una muestra de 3 a 5 ml de sangre de la vena caudal, ubicada bajo la cola. Estas muestras se transfirieron rápidamente a un tubo vacutainer de tapa color lila con EDTA para su posterior preservación y almacenamiento.

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo utilizando el kit comercial Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el extracto genético recolectado por medio de un nanodrop DeNovix® DS-11 FX+ (Denovix Inc. Wilmington, USA). Como preparación para realizar la PCR (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés), se realizó la dilución de los extractos de cada muestra de ADN, llevándolos a una concentración de 40 ng/μl, paso seguido se realizó una mezcla de los reactivos a implementar en tubos eppendorf, cada uno con 4.5 μl MgCl<sub>2</sub> (2.25mM), 4 μl dNTP's (0.8 mM), 0.62 μl cada primer (1.25 mM), 5 μl buffer, 1μl Tag (1U), 33.2 μl agua y 1μl de ADN; dando un volumen total de 50 μl por tubo.

Se utilizaron los cebadores FPmagCOI531 (5'-GCAATCTCTCAATACCAAACACCAC-3') y RPmagCOI1432 (5'-CGTTTTGATGCAAATGCTTCTCAGAG-3') diseñados por López y colaboradores (2019) para el gen COI, así como los cebadores FPmagCYTB182 (5'-CATCAGCCTTCTCCTCMATCGCAC-3') y RPmag932 (5'-CGGAAGGTGAGGCTTCGTTGTTTGG-3') para el gen Cytb. El protocolo de amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador T100® Thermal Cycler de BioRad (Bio-Rad Laboratories, California, USA) con las siguientes condiciones: una denaturación inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 25 ciclos que comprenden una denaturación a 94°C durante 30 segundos, una fase de anillado a 60.1°C (gen COI) o 58°C (gen Cytb) durante 30 segundos, una extensión a 72°C durante 30 segundos, y una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Las muestras resultantes se almacenaron a 4°C en nevera. Posteriormente, los amplicones fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con el marcador de peso molecular Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder y, una vez confirmada la amplificación, el ADN resultante fue enviado al laboratorio GenCore de la Universidad de los Andes en Bogotá, Colombia. Los productos purificados después de la amplificación de la PCR fueron secuenciados automáticamente en ambas direcciones (de 5'a 3' y de 3'a 5') utilizando el método de tagDye Deoxy Terminator Cycle-sequencing en un secuenciador 3730XL (Applied Biosystems).

Los electroferogramas generados fueron analizados mediante el programa Bioedit® v. 7.7.1 y el programa Peaktrace® v. 6.6 para la obtención de las secuencias de ADN. Estas secuencias fueron alineadas con el programa MEGA® v. 11. La determinación de las distancias genéticas intra e interespecíficas se calculó utilizando el método evolutivo de neighbor-joining (NJ) y el modelo de sustitución de Kimura 2-parámetros (K2P) (Kimura, 1980). El dendrograma



resultante se obtuvo en Mega v.6.0 mediante 1000 réplicas de bootstrap (Tamura et al., 2013). Para identificar las especies con las que mostraban mayor similitud y coincidencia en términos de porcentaje de identidad y longitud de alineamiento, se utilizó la herramienta BLAST de GenBank.

Para realizar los análisis filogenéticos con otras especies de rayas colombianas, incluyendo las obtenidas en este estudio, se tomaron las siguientes secuencias del GenBank: MW482070.1 (*P. schroederi* - Cytb), MW482065.1 (*P. orbignyi* - Cytb), MW481862 (*P. magdalenae*- Cytb), MW481840.1 (*P. hystrix*- Cytb), MW482068.1 (*P. motoro*- Cytb), MW482173.1 (*P. magdalenae*- COI) (Fontenelle et al., 2021), NC\_023116 (*P. motoro*- genoma completo) (Song et al., 2015), EF532673.1 (*P. schroederi*- COI), EF532666.1 (*P. orbignyi*- COI) (Toffoli et al., 2008) y MK520996.1 (*P. hystrix*- COI) (da Cruz et al., 2021), teniendo en cuenta que estas mostraron más similitud con las secuencias obtenidas de los individuos de Puerto Inírida (porcentaje de identidad), acoplamiento de las secuencias (cobertura) y ausencia de mutaciones puntuales en cuanto a los pares de bases en la secuencia genética (gaps).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación para los genes COI y Cytb para el género *Potamotrygon* fue exitosa con los cebadores diseñados originalmente para la especie *P. magdalenae* (Figura 2) (Lopes-Ardila et al., 2022). De este modo se realizó un filtrado visual de las secuencias mediante el uso de herramientas digitales (BioEdit® y MEGA®), dando los siguientes resultados: la longitud de las secuencias para el gen COI (*P. orbignyi* 1: 630 pb; *P. orbignyi* 2: 652 pb; *P. motoro* 1: 668 pb; *P. motoro* 2: 614 pb; *P. schroederi*: 612 pb; raya de especie desconocida: 689 pb), y secuencias del gen cytb (*P. orbignyi* 1: 713 pb; *P. orbignyi* 2: 728 pb; *P. motoro* 1: 648 pb; *P. motoro* 2: 652 pb, *P. schroederi*: 620 pb; raya de especie desconocida: 658 pb) . A partir de estas se encontraron 34 variaciones en la secuencia genética del gen COI y 50 en la del gen Cytb, en la primera se observó una semejanza entre *P. orbignyi* y *P. schroederi*, así como entre *P. motoro* y la raya de especie desconocida, en ambos casos las secuencias presentan una notable similitud debido a que comparten un mayor número de bases nitrogenadas entre las especies (Tabla 1); sin embargo, para el gen Cytb se hallaron 3 posiciones (2 transiciones y 1 transversion) que presentaron cambios entre las secuencias de las especies *P. orbignyi* y *P. schroederi*, adicionalmente la secuencia de la raya de especie desconocida mostró variación

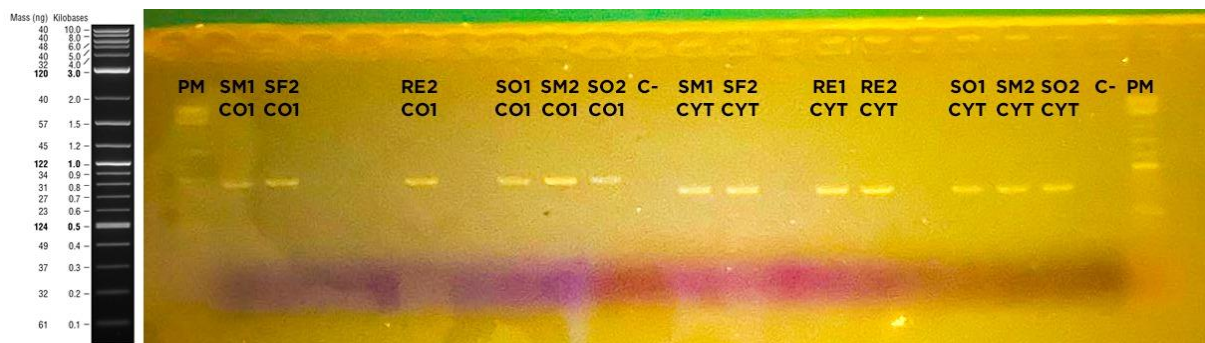
en 5 transversiones con respecto a las secuencias de *P. motoro*; finalmente se identificó que las secuencias pertenecientes a *P. orbigny* mostraron 2 transiciones y 1 transversión con respecto a las demás especies, estas se encontraron de la posición 594 a la 596, sugiriendo que este cambio puede ser significativo en la diferenciación de esta especie con respecto a las demás estudiadas de esta familia (Tabla 2).

Tabla 1. Posiciones variables (pb) en las secuencias genéticas obtenidas a partir de los individuos del género *Potamotrygon* y la raya de especie desconocida en el gen COI.

	COI																																	
Posición (pb)	191	194	215	239	242	251	260	305	311	323	353	371	377	386	410	413	419	422	425	431	434	452	470	482	488	506	509	563	566	579	581	584	599	605
<i>P. orbigny 2</i>	C	C	C	A	C	A	T	C	C	C	C	C	T	T	G	T	G	T	C	C	C	G	C	C	T	T	T	C	T	T	A	A	C	C
<i>P. orbigny 1</i>	C	C	C	A	C	A	T	C	C	C	C	C	T	T	G	T	G	T	C	C	C	G	C	C	T	T	T	C	T	T	A	A	C	C
<i>P. motoro 2</i>	T	T	T	C	T	G	C	C	T	T	T	T	C	C	A	C	A	C	A	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	C	G	C	T	T
<i>P. motoro 1</i>	T	T	T	C	T	G	C	C	T	T	T	T	C	C	A	C	A	C	A	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	C	G	C	T	T
<i>P. schroederi</i>	C	C	C	A	C	A	T	C	C	C	C	C	T	T	G	T	G	T	C	C	C	G	C	C	T	T	T	C	T	T	A	A	C	C
Sp. desconocida	T	T	T	C	T	G	C	C	T	T	T	T	C	C	A	C	A	C	A	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	C	G	C	T	T

Tabla 2. Posiciones variables (pb) en las secuencias genéticas obtenidas a partir de los individuos del género *Potamotrygon* y la raya de especie desconocida en el gen Cytb.

	CYTB																																																	
Posición (pb)	94	110	115	128	136	142	171	181	193	199	202	223	243	257	263	265	271	276	322	325	334	352	394	405	451	454	484	502	511	514	517	533	542	545	551	556	561	565	575	592	594	595	596	601	609	610	625	652	661	673
<i>P. orbigny 2</i>	C	C	C	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	T	A	C	C	G	T	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	A	G	G	C	C	T	G	T	C	A	T	C	C	C	T	C	T	C	
<i>P. orbigny 1</i>	C	C	C	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	T	A	C	C	G	T	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	A	G	G	C	C	T	G	T	C	A	T	C	C	C	T	C	T	C	
<i>P. motoro 2</i>	C	T	T	C	C	T	C	C	T	C	T	T	C	A	C	C	G	A	T	A	C	T	C	T	A	C	C	A	C	C	C	G	A	A	A	T	C	A	C	T	C	C	T	T	T	C	T	C	T	
<i>P. motoro 1</i>	C	T	T	C	C	T	C	C	T	C	T	T	C	A	C	C	G	A	T	A	C	T	C	T	A	C	C	A	C	C	C	G	A	A	A	T	C	A	C	T	C	C	T	T	T	C	T	C	T	
<i>P. schroederi</i>	C	C	C	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	T	A	C	C	G	T	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	A	G	G	C	C	T	G	T	T	C	C	C	C	C	T	C	T	C	
Sp. desconocida	T	T	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	G	C	C	A	A	C	A	C	T	C	T	A	T	C	A	C	C	C	G	A	A	A	T	C	A	C	T	C	T	C	T	T	T	C	T	C	T



**Figura 2.** Gel de electroforesis. Resultados de la amplificación por PCR para los genes COI y Cytb revelados en gel de agarosa con el marcador de peso molecular Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder. SM1 y SM2 corresponden a los individuos pertenecientes a *P. motoro*, SF2 corresponde al individuo perteneciente a *P. schroederi*, SO1 Y SO2 corresponden los individuos pertenecientes a *P. orbigny*, RE1 y RE2 corresponde al individuo de sin identificar y PM corresponde al marcador de peso molecular.

## Análisis BLAST para el gen COI

Según los resultados obtenidos mediante la herramienta BLAST al analizar las secuencias del gen COI en la base de datos de GenBank, se evidencia una marcada similitud genética de la raya no identificada con las especies *P. falkneri* (98.55%) y *P. motoro* (98.40%), evaluando el porcentaje de identidad. Aunque *P. falkneri* presenta un mayor porcentaje de identidad, se carece de registros de su presencia en la cuenca de Puerto Inírida, el lugar de obtención de las rayas (Lasso et al., 2013). Por lo tanto, se infiere que la raya sin identificar probablemente pertenezca a la especie *P. motoro*.

Para los otros individuos analizados con la herramienta BLAST en este estudio, donde se identificaron las especies, se encontró que la muestra perteneciente a la raya *P. schroederi* muestra una mayor similitud genética, con un 99.76% de porcentaje de identidad con *P. schroederi* y un 94.9% con *P. magdalenae*, con coberturas del 68% y 100%, respectivamente.

En relación con una de las muestras de la especie *P. orbigny*, se identificaron porcentajes de identidad del 94.29% con *P. magdalenae*, 91.90% con *P. motoro* y 91.75% con *P. orbigny*, cada uno con una cobertura del 100%. Para la segunda muestra de *P. orbigny* analizada, se observó una similitud con las mismas especies identificadas en la muestra anterior, con porcentajes de identidad de 94.45%, 92.21% y 92.06%, respectivamente, y una cobertura del 99%, 99% y 98%.

En cuanto a las dos muestras analizadas para la especie *P. motoro*, ambas concuerdan con la identificación propia de la especie según los resultados obtenidos mediante la herramienta BLAST del GenBank. No obstante, es relevante destacar que el BLAST revela una notable similitud genética con la especie *P. falkneri*. En una de estas muestras, se registra un porcentaje de identidad del 98.20% y una cobertura del 100% tanto para *P. motoro* como para *P. falkneri*. En la segunda muestra, se observa un porcentaje de identidad del 98.52% con una cobertura del 99% respecto a *P. falkneri*, mientras que con *P. motoro* presenta un porcentaje de identidad del 98.05% con una cobertura del 100%. La alta similitud genética entre las especies *P. falkneri* y *P. motoro*, reportada por Cruz y colaboradores (2015), incluyó la documentación de casos de hibridación, atribuyendo este fenómeno a la proximidad ecológica, la relación genética y el mismo número de cromosomas. Además, Sanches y colaboradores (2021) señalan eventos de hibridación entre otras especies de *Potamotrygon* (*P. motoro*, *P. Orbigny*, *P. scobina* y *P. leopoldi*) en la cuenca del río Xingu, Brasil. Por lo cual, se sugiere llevar a cabo una

investigación más exhaustiva para determinar si *P. falkneri* constituye una especie independiente o si, por el contrario, es una subespecie de *P. motoro*.

### **Análisis BLAST para el gen Cytb**

En el análisis genético del BLAST realizado para determinar la especie de la raya en cuestión, se observaron resultados contradictorios. En el caso del gen Cytb, el primer resultado indicó *P. orbigny* con un porcentaje de identidad del 98.78%, mientras que el segundo resultado fue *P. motoro* con un 97.56%. En contraste, en el gen COI, el principal resultado fue *P. falkneri*, seguido de *P. motoro*. Aunque ambos análisis convergen en la identificación de *P. motoro*, la discordancia entre las especies señaladas en los primeros lugares para cada gen complica la tarea de determinar con precisión la especie de la raya.

Al analizar a los demás individuos, se observó una coincidencia significativa en la secuencia genética del individuo de *P. schroederi* con una secuencia de GenBank correspondiente a *P. schroederi* y otra correspondientes a *P. orbigny*, compartiendo una cobertura del 79% y un porcentaje de identidad del 100% con ambas, no obstante se obtuvo un porcentaje de identidad del 93.23%, 93.06% y 92.58% con las especies *P. magdalanae*, *P. histrix* y *P. yepezi* respectivamente y con una cobertura del 100% para estas tres, al encontrar un elevado porcentaje de identidad pero una baja cobertura los datos no son concluyentes para esta muestra, de la misma manera se destaca el alto porcentaje de identidad revelado con varias especies del género, lo que dificulta la clasificación correcta del animal dentro de una de estas. Respecto a los dos individuos analizados de *P. orbigny*, se evidencia una coincidencia con las secuencias de GenBank correspondientes a *P. orbigny*, revelando un porcentaje de identidad del 99.66% con una cobertura de 81% para el primer ejemplar y un porcentaje de identidad de 100% y cobertura del 80% para el segundo, lo que se traduce en resultados concluyentes que revelan alta coincidencia de la muestra con las secuencias de GenBank para esta especie, similar al caso de los individuos de *P. motoro*, para los cuales se encontró coincidencias con secuencias de esta misma especie con un porcentaje de identidad de 100% y una cobertura del 79%.

### **Sobre el uso del barcoding en rayas dulceacuícolas colombianas**

Los hallazgos del presente estudio revelan una concordancia con las observaciones de Toffoli y colaboradores (2008), donde la aplicación del barcoding no arrojó resultados concluyentes. Durante el análisis BLAST, el porcentaje de identidad de las muestras coincidía con diversas especies de *Potamotrygon*, sugiriendo la posibilidad de que este género conserve un alto grado de homogeneidad genética, complicando la identificación precisa de sus especies mediante el barcoding. Además, señalan que las secuencias de ADNmt no son útiles para establecer con precisión los límites entre especies, especialmente en aquellas recientemente evolucionadas.

Contrario a estas conclusiones, Cerutti y colaboradores (2012) manifiestan que este método sí tiene una gran utilidad en rayas y tiburones. Así mismo Pereira y colaboradores (2013) apoyan esta postura al demostrar la eficacia del barcoding para identificar fauna megadiversa de reciente evolución, discriminando el 99,2% de las especies analizadas en su estudio.

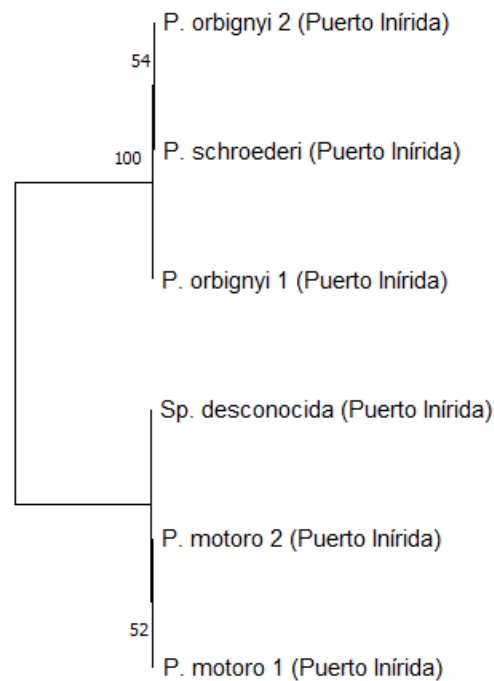
En concordancia con la problemática identificada anteriormente por Toffoli y colaboradores (2008) y Li y su equipo (2018) proponen el Barcoding como una estrategia para detectar posibles datos incorrectos en GenBank, utilizando el gen *Cytb*.

Por otra parte, se ha establecido internacionalmente un código de barras específico de especie para los peces, compuesto por fragmentos de ADN de 600-650 pares de bases, sin embargo, aseguran que tan solo hacen falta 100 pares de bases en una secuencia de ADN para poder identificar y distinguir adecuadamente las especies (Holmes et al., 2009; Loh et al., 2014). En el presente estudio, las secuencias obtenidas van desde los 500 pb a los 900 pb, siendo, en teoría, un tamaño adecuado para la identificación de especies, sin embargo no se obtuvieron los resultados deseados, puesto que al realizar el BLAST no todas las muestras coincidieron con su respectiva especie, o en algunos casos coincidieron con más de una según el porcentaje de identidad, lo que sugiere que se necesita de secuencias con un número mayor de pares de bases o el estudio de más genes que permitan identificar de manera eficaz las especies del género *Potamotrygon*.

### **Análisis filogenéticos para el gen COI**

Los análisis filogenéticos del gen COI muestran una marcada similitud genética entre los individuos de las rayas estudiadas pertenecientes a las especies *P. orbignyi* y *P. schroederi*, agrupándolas conjuntamente en un mismo clado. La robustez de esta agrupación se subraya por

el valor de bootstrap, que alcanza el máximo de 100, indicando una alta certeza en la formación de dicho clado. Este resultado refleja una significativa similitud genética entre los tres individuos, respaldando la estrecha relación evolutiva entre las especies examinadas. Por otro lado, se destaca una marcada relación genética entre los individuos de las rayas de la especie *P. motoro* y la raya desconocida, evidenciándose al agruparse en un mismo clado (Fig. 3).

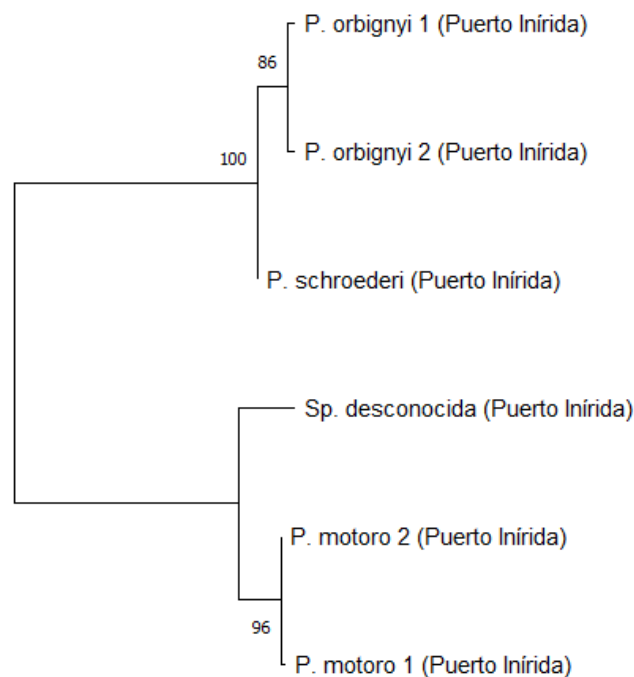


**Figura 3.** Árbol neighbor-joining resultante para el análisis del gen CO1 con los individuos provenientes de Puerto Inírida, usando el modelo K2P.

El análisis del gen *Cytb* exhibe una mayor asociación e idoneidad para la identificación filogenética en comparación con el gen *COI*. Esto se debe a que, aunque las variaciones genéticas en estos genes no sean muy numerosas, el *Cytb* presenta una mayor cantidad, por lo tanto, resulta más eficiente para la identificación de estas especies. Sin embargo, la concatenación resultante entre ambos genes mostró más confiabilidad al analizar las variaciones genéticas presentes en el gen *COI* y el gen *Cytb*, agrupando los clados de manera más acertada para las especies estudiadas.

## Análisis filogenéticos para el gen Cytb

Los análisis filogenéticos del gen Cytb muestran la cercanía genética entre las especies *P. orbigny* y *P. schroederi*, asociándolos en un mismo clado. Esta observación se respalda con los resultados del árbol filogenético del gen COI, donde se aprecia una asociación entre los dos individuos. Además, se identifican similitudes en los hallazgos entre la raya del caso y *P. motoro*, corroborando lo observado en el estudio filogenético del gen COI (Fig 4).



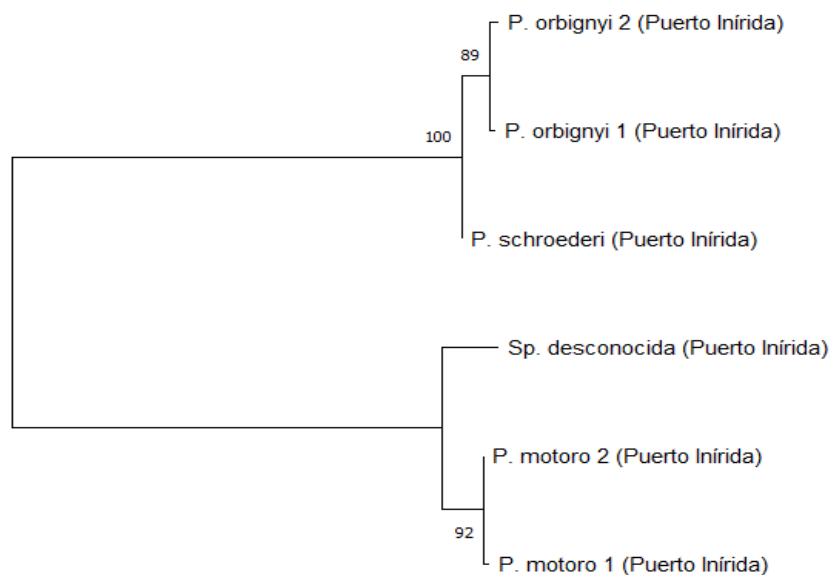
**Figura 4.** Árbol neighbor-joining resultante para el análisis del gen Cytb con los individuos provenientes de Puerto Inírida, usando el modelo K2P.

## Análisis filogenético para los genes COI y Cytb concatenados

La concatenación de los genes COI y Cytb confirma lo observado en los árboles para cada gen, se respalda la relación entre la raya de especie desconocida y la especie *P. motoro*, sugiriendo la posibilidad de que esta pertenezca a esta especie. Por otro lado, el árbol muestra que *P. orbigny* y *P. schroederi* se unen en un mismo clado indicando una estrecha relación evolutiva

entre ambas especies (Fig. 5). Con respecto a la filogenia de *Potamotrygon*, Lovejoy (1998) sugiere que las rayas neotropicales de agua dulce comparten un ancestro común que invadió estos ecosistemas durante una invasión en el Mioceno. La diversificación de la familia Potamotrygonidae se atribuye a una radiación evolutiva endémica en Sudamérica, vinculada a eventos geológicos que formaron las cuencas del Amazonas y del Orinoco. Dicha investigación justifica la baja diversificación de la familia debido a la radiación evolutiva endémica, estableciendo barreras físicas y una variación intraespecífica (diferencia fenotípica dentro de una misma especie).

Es importante considerar que las relaciones filogenéticas no solo se ven modeladas por el factor tiempo, sino también por la biogeografía y los patrones de distribución de los grupos de rayas de agua dulce (Fontenelle et al., 2021). Como resultado, el árbol filogenético no solo arroja luz sobre la historia evolutiva de especies con un ancestro común, sino que también revela la progresión temporal de sus trayectorias evolutivas (Kirchhoff et al., 2017). Este fenómeno se manifiesta claramente en las asociaciones observadas en los árboles neighbor joining, donde es posible identificar la agrupación de más de una especie en un mismo clado.



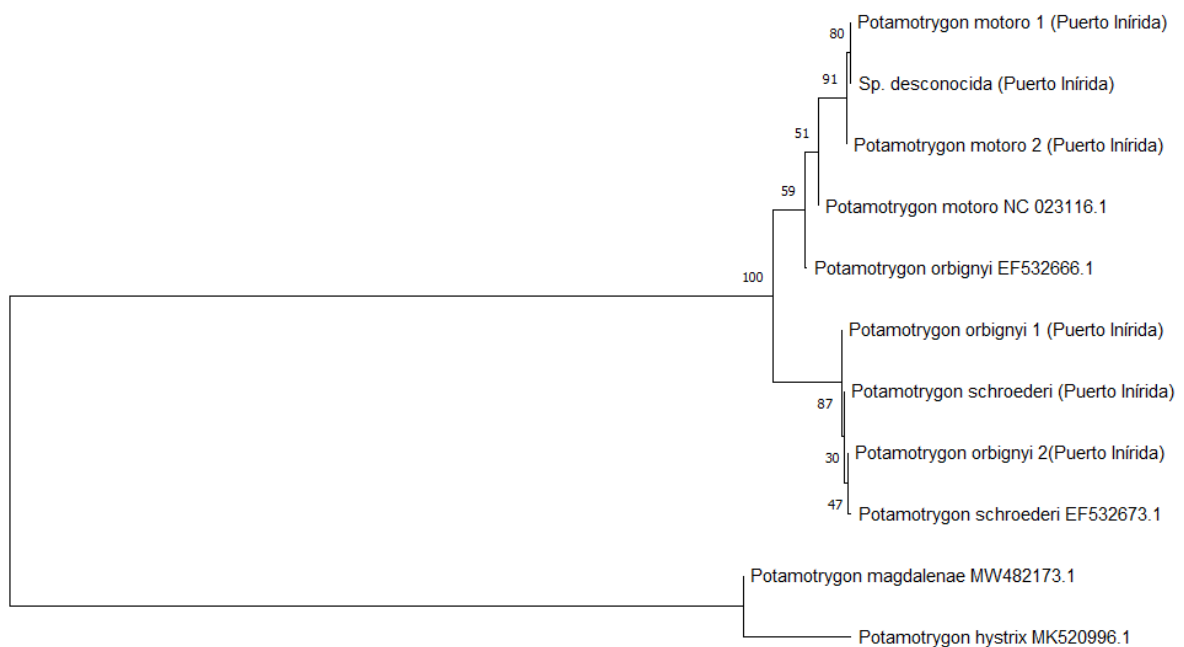
**Figura 5.** Árbol neighbor-joining resultante de la concatenación de los genes COI y Cytb para los individuos provenientes de Puerto Inírida, usando el modelo K2P.



## Análisis filogenéticos con secuencias descargadas del GenBank para el gen COI

En relación con el análisis entre los resultados obtenidos mediante BLAST y los árboles filogenéticos para el gen COI, la secuencia tomada de GenBank de la especie *P. motoro*, muestra una alta cercanía con las secuencias resultantes en este estudio, lo que se refleja en la asociación taxonómica por medio del árbol neighbor joining, en este mismo se destaca la relación con la secuencia de referencia tomada para la especie *P. schroederi*, que se vincula tanto con la secuencia correspondiente a la especie en este estudio como con las muestras de *P. orbigny*; por otro lado se encuentra que la secuencia tomada de referencia para *P. orbigny* presentó una mayor compatibilidad con las secuencias de *P. motoro*; motivo por el cual se destaca la importancia de analizar factores como la cobertura de la secuencia, origen y geoposición de las muestras analizadas y mutaciones dentro de las misma, entre otros que permitan conocer la afinidad de las secuencias estudiadas.

Por otro lado *P. magdalenae* y *P. hystrix* quedaron ubicadas en clados aparte mostrando una distancia genética mayor entre estas y las demás especies estudiadas (Fig. 6).

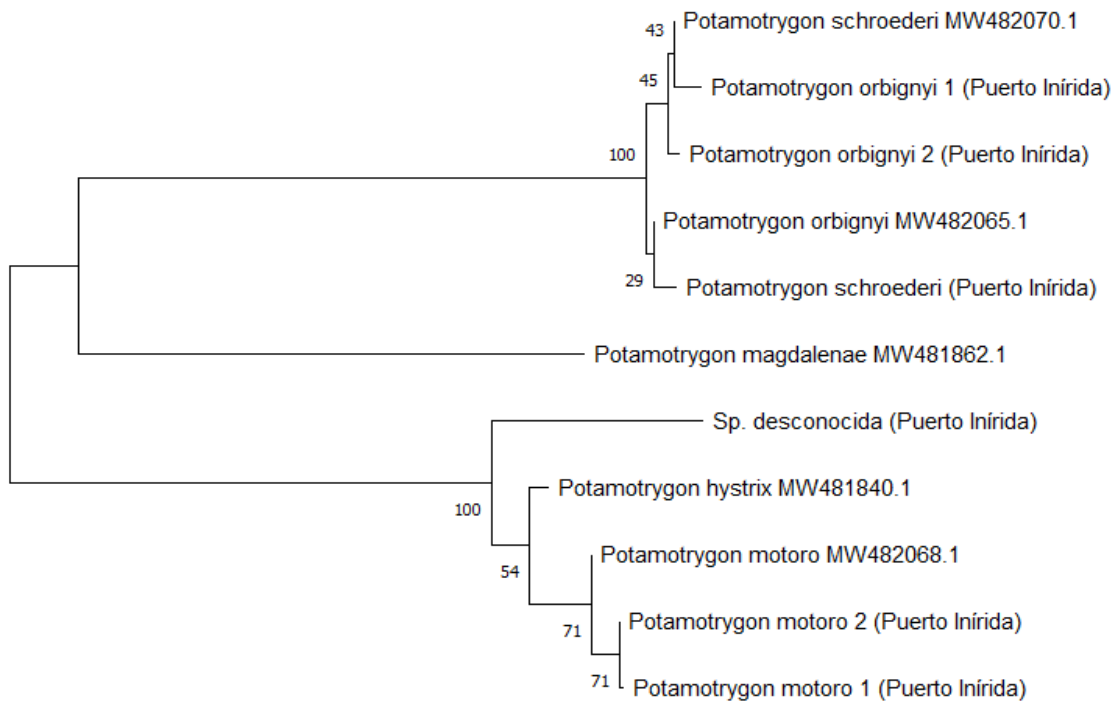


**Figura 6.** Relación filogenética entre las secuencias de GenBank y los individuos del presente estudio provenientes de Puerto Inírida para el gen COI, a partir de un árbol neighbor-joining usando el modelo K2P.

## **Análisis filogenéticos con secuencias obtenidas de GenBank para el gen Cytb**

Con base en el análisis de los resultados obtenidos a través de los árboles filogenéticos para el gen Cytb, se observó que la asociación de *P. schroederi* y *P. orbigny* en un mismo clado. Asimismo, se destacó la asociación entre los individuos de *P. motoro* (Fig. 7). Sin embargo, a diferencia del árbol del gen COI, se evidenció un acercamiento de *P. hystrix* a las secuencias de *P. motoro* y la raya desconocida de Puerto Inírida, mientras que *P. magdalena* se ubicó en un clado aparte. Este hallazgo cobra especial importancia al revelar asociación entre la especie desconocida y *P. motoro* en el árbol filogenético del gen Cytb, subrayando que estas también han coincidido en los análisis anteriores.

En este estudio se observó que posiblemente exista una mayor conservación de las secuencias en el gen COI, lo que puede dificultar la tarea de clasificación entre especies, asimismo, el gen Cytb mostró más afinidad con esta labor al tener mutaciones diferenciadas entre las especies, motivo por el cual se destaca que presentó mayor facilidad para la clasificación por especies y resultados más exactos en los métodos de análisis (BLAST y filogenia). Adicionalmente se encontró una marcada cercanía entre las secuencias genéticas del género *Potamotrygon* para los dos genes estudiados; por lo cual se sugiere el uso de una mayor cantidad de genes facilitando así la clasificación por especies y se apoya los resultados expuestos por Toffoli y colaboradores (2008).



**Figura 7.** Relación filogenética entre las secuencias de Genbank y los individuos analizados en el presente estudio para el gen Cytb, a partir de un árbol neighbor-joining usando el modelo K2P.

### **Sobre la coloración de la especie incautada**

Referente a la raya sin identificarse plantea la posibilidad de incidencia de algunos procesos patológicos que fundamenten los cambios en el fenotipo del individuo estudiado, el cual presenta zonas de la piel despigmentadas (Fig. 2). Entre las posibles patologías se encuentra la infección por *Flexibacter columnaris*, causada por un grupo de bacterias pertenecientes a las Mixobacterias que se manifiesta como una enfermedad oportunista, particularmente en situaciones de estrés o condiciones de baja calidad del agua. Estas bacterias son comunes en el entorno acuático, colonizando las branquias y la piel de los peces. Las lesiones a menudo se manifiestan como pequeños puntos blancos en la aleta caudal que avanzan hacia la cabeza. Las aletas caudales y anales pueden verse gravemente afectadas, mostrando erosiones. En etapas más avanzadas de la enfermedad, la piel de los peces puede presentar numerosas úlceras blancas o grisáceas, con un posible compromiso de las branquias (de Los Monteros & Rodríguez, 2005).

Adicionalmente, este hallazgo es compatible con una posible infección por *Mycobacterium*, pues se manifiesta en la superficie del pez con signos clínicos que incluyen emaciación,

inflamación de la piel con pérdida de color, deformación vertebral, lesiones abiertas y úlceras (de Los Monteros & Rodríguez, 2005.). Del mismo modo, la infección por *Aeromonas* genera la presencia de formaciones ulcerativas hemorrágicas en piel, generalmente en la zona periocular, edema en diferentes partes del cuerpo, descamación y algunos casos de despigmentación (Grajales-Hahn et al., 2018). La deficiencia de nutrientes podría relacionarse posiblemente con la aparición de manchas en la piel, por ejemplo: el ácido linoleico y el ácido linolénico, no pueden ser sintetizados por el pez y su deficiencia puede dar lugar a la despigmentación, erosión de las aletas e infiltración grasa del hígado (Maisterrena,2005).

De la misma manera, es relevante destacar que la coloración tegumentaria en los peces es el resultado de la interacción de varios tipos de cromatóforos. Una posible patología genética que pudiera padecer el individuo podría ser leucismo, que se atribuye a la mutación de genes recesivos en el desarrollo embrionario, lo que inhibe la migración de melanoblastos, las células productoras de pigmento, lo cual desencadena la ausencia total o parcial de pigmentación en la piel, mientras que las retinas mantienen una pigmentación normal. Sin embargo, la etiología de estas aberraciones cromáticas puede ser multifactorial e incluir mutaciones genéticas no patológicas, aislamiento poblacional, estrés ambiental y la exposición a metales pesados (Anaguano Yancha, 2018).

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren limitaciones en la eficacia de los genes *Cytb* y *COI* como marcadores moleculares para la identificación de especies de la familia *Potamotrygonidae*. De acuerdo con el análisis realizado mediante la herramienta BLAST del GenBank y las relaciones filogenéticas establecidas por la metodología Neighbor Joining, se sugiere que la raya en cuestión probablemente pertenezca a la especie *Potamotrygon motoro*, por lo cual su comercio era legal y no incurre en tráfico ilegal de especies silvestres. En adición, el análisis del gen *Cytb*, al presentar una mayor variabilidad genética, muestra una mayor asociación e idoneidad para la identificación filogenética en comparación con el gen *COI*; se resalta además que al concatenar ambos genes se obtienen resultados más confiables. Es importante destacar que el barcoding no es la técnica ideal por sí sola para identificar especies en el género *Potamotrygon*, es necesario contar con la integración de otras

disciplinas como la ecología y la biogeografía, así como el conocimiento de características morfológicas y comportamentales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Alexia, A., & Santos, A. (2020). *Taxonomía, biología reproductiva y usos de rayas de agua dulce (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) en el río Amazonas colombiano*.
- Anaguano Yancha, F. (2018). Nuevos casos de leucismo en peces andinos del género *Astroblepus*. *ACI Avances En Ciencias e Ingenierías*, 10(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v10i1.952>
- Cerutti-Pereyra, F., Meekan, M. G., Wei, N. W. V., O'Shea, O., Bradshaw, C. J. A., & Austin, C. M. (2012). Identification of rays through DNA barcoding: An application for ecologists. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036479>
- Cruz, V. P., Vera, M., Mendonça, F. F., Pardo, B. G., Martinez, P., Oliveira, C., & Foresti, F. (2015). First identification of interspecies hybridization in the freshwater stingrays *Potamotrygon motoro* and *P. falkneri* (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). *Conservation Genetics*, 16(1), 241–245. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0642-8>
- da Cruz, V. P., Nobile, M. L. O., Paim, F. G., Adachi, A. M. C. de L., Ribeiro, G. da S., Ferreira, D. C., Pansonato-Alves, J. C., Charvet, P., Oliveira, C., & Foresti, F. (2021). Cytogenetic and molecular characteristics of *potamotrygon motoro* and *potamotrygon* sp. (chondrichthyes, myliobatiformes, potamotrygonidae) from the amazon basin: Implications for the taxonomy of the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 44(2). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2020-0083>
- DECRETO 281 DE 2021. El presidente de la República de Colombia. "Por el cual se adiciona el Decreto 1076 de 2015, con una nueva sección en lo relacionado con el establecimiento de medidas para la protección y conservación de Tiburones, Rayas Marinas y Quimeras de Colombia". Marzo/18/2021. <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=160550>
- de Los Monteros, E., & Rodríguez, P. (2005). *Histología y patología de los peces Parte 11: Infecciones víricas, bacterianas y micóticas Víricas*.

- de Souza Pinto, I., Rodrigues, B. L., de Araujo-Pereira, T., Shimabukuro, P. H. F., de Pita-Pereira, D., Britto, C., & Brazil, R. P. (2023). DNA barcoding of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from the western Brazilian Amazon. *PLOS ONE*, *18*(2), e0281289. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0281289>
- Ehemann, N. R., González-González, L. D. V., Tagliafico, A., & Weigmann, S. (2019). Updated taxonomic list and conservation status of chondrichthyans from the exclusive economic zone of Venezuela, with first generic and specific records. *Journal of Fish Biology*, *95*(3), 753–771. <https://doi.org/10.1111/jfb.14061>
- Facultad de Ciencias e Ingeniería Escuela Profesional de Ecología Presentado por : Bach . Lucero Raquel Pinedo Tenazoa. (2018).*
- Filip, E., Strzała, T., Stępień, E., & Cembrowska-Lech, D. (2023). Universal mtDNA fragment for Cervidae barcoding species identification using phylogeny and preliminary analysis of machine learning approach. *Scientific Reports*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35637-z>
- Flowers, K. I., Heithaus, M. R., & Papastamatiou, Y. P. (2021). Buried in the sand: Uncovering the ecological roles and importance of rays. *Fish and Fisheries*, *22*(1), 105–127. <https://doi.org/10.1111/faf.12508>
- Fontenelle, J. P., Portella Luna Marques, F., Kolmann, M. A., & Lovejoy, N. R. (2021). Biogeography of the neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveals effects of continent-scale paleogeographic change and drainage evolution. *Journal of Biogeography*, *48*(6), 1406–1419. <https://doi.org/10.1111/jbi.14086>
- Garcia, D. A., Lasso, C. A., Morales, M., & Caballero, S. J. (2016). 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 Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, *27*(6), 4479–4491. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1101536>

- Gonçalves, P. F. M., Oliveira-Marques, A. R., Matsumoto, T. E., & Miyaki, C. Y. (2015). DNA Barcoding Identifies Illegal Parrot Trade. *Journal of Heredity*, 106(S1), 560–564. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv035>
- Grajales-Hahn, S., Hahn-von-Hessberg, C. M., & Quintero, A. G. (2018). Case report of *Aeromonas salmonicida* in nilotic tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Caldas, Colombia. *Boletín Científico Del Centro de Museos*, 22(1), 76–85. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.6>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.FISHRES.2008.09.036>
- Hu, J., Zhang, X., Jiang, Z., Zhang, F., Liu, Y., Li, Z., & Zhang, Z. (2018). New putative cryptic species detection and genetic network analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in China based on mitochondrial COI sequences. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(3), 474–484. <https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1307974>
- ICA. Colombia incursiona en el cultivo de cobia. (2009). Portal Corporativo ICA. <https://www.ica.gov.co/noticias/pesca-y-acuicultura/2009/colombia-incursiona-en-el-cultivo-de-cobia>
- Kirchhoff, K. N., Hauffe, T., Stelbrink, B., Albrecht, C., & Wilke, T. (2017). Evolutionary bottlenecks in brackish water habitats drive the colonization of fresh water by stingrays. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(8), 1576–1591. <https://doi.org/10.1111/jeb.13128>
- Lasso, C. A. (Carlos A., Rosa, R. S. (Ricardo de S., Morales-Betancourt, M. A., Garrone-Neto, D., R. de Carvalho, M., & Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. (n.d.). *Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica : parte II : Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina*. 432.
- LEY 2111 DE 2021. "Por medio del cual se sustituye el título xi "de los delitos contra los recursos naturales y el medio ambiente" de la ley 599 de 2000, se modifica la ley 906 de 2004 y se dictan otras disposiciones". El Congreso de Colombia. Julio/29/2021. <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=167988>

- Li, B., Malyarchuk, B., He, X., & Derenko, M. (2013). Molecular evolution and adaptation of the mitochondrial cytochrome b gene in the subgenus *Martes*. *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 3944–3954. <https://doi.org/10.4238/2013.September.23.13>
- Loh, W. K. W., Bond, P., Ashton, K. J., Roberts, D. T., & Tibbetts, I. R. (2014). DNA barcoding of freshwater fishes and the development of a quantitative qPCR assay for the species-specific detection and quantification of fish larvae from plankton samples. *Journal of Fish Biology*, 85(2), 307–328. <https://doi.org/10.1111/jfb.12422>
- López Ardila, i. y., Martínez Pérez, f. j., Rondón-González, f., López Ardila, i. y., Martínez Pérez, f. j., & Rondón-González, f. (2022). Aplicación del modelo de pérdida de ADN para el diseño de cebadores en *Potamotrygon magdalenae* (Potamotrygonidae). *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 97–103. <https://doi.org/10.15446/ABC.V27N1.87401>
- Lovejoy. (1998.) Marine incursion into South America. *Nature*. Vol 396. 3 Diciembre 1998
- Maisterrena, V. D. (2005). *ENFERMEDADES DE LOS PECES*.
- Mancera-Rodríguez, N. J., & Álvarez-León, R. (2008). Comercio de peces ornamentales en Colombia. *Acta Biologica Colombiana*, 13(1), 23–52.
- Márquez-Velásquez, V., Rosa, R. S., Galindo, E., & Navia, A. F. (2019). Feeding habits and ecological role of the freshwater stingray *Potamotrygon magdalenae* (Duméril 1865) (Myliobatiformes: Potamotrygonidae), combining gut-content and stable isotope analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 102(8), 1119–1136. <https://doi.org/10.1007/S10641-019-00897-0/METRICS>
- Miguel, L., & Martínez, R. (2017). Facultad de estudios ambientales y rurales maestría en conservación y uso de biodiversidad Ana Milena Piñeros Quiceno dirigido por Juan David Amaya espinel codirigido por conservación de las especies amenazadas a escalas global y.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible- Planes y Programas de Conservación. (2022, 31 enero). Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. <https://www.minambiente.gov.co/direccion-de-bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistemicos/planes-y-programas-de-conservacion-2>.



- Mojica, J. I.; J. S. U. R., & (Eds), Á.-L. y C. A. L. (2012). *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012*. (I. de Instituto de Investigación de Recursos Bioló[1]gicos Alexander von Humboldt, C. N. de la U. Nacional, W. C. y U. de de Colombia, & Manizales, Eds.).
- Nachtigall, P. G., Loboda, T. S., & Pinhal, D. (2023). Signatures of positive selection in the mitochondrial genome of neotropical freshwater stingrays provide clues about the transition from saltwater to freshwater environment. *Molecular Genetics and Genomics*, 298(1), 229–241. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01977-0>
- Naz, S., Chatha, A. M. M., & Khan, R. U. (2023). Pragmatic applications of DNA barcoding markers in identification of fish species - A review. *Annals of Animal Science*, 23(2), 363–389. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0073>
- Ory, D., Cuenot, Y., Vigouroux, R., Covain, R., Brosse, S., & Murienne, J. (2019). Complete mitochondrial genome of the river stingray *Potamotrygon orbignyi* (Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 4(2), 3153–3154. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1666683>
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20/FIGURES/4>
- Roccaro, M., Bini, C., Fais, P., Meriardi, G., Pelotti, S., & Peli, A. (2021). Who killed my dog? Use of forensic genetics to investigate an enigmatic case. *International Journal of Legal Medicine*, 135(2), 387–392. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02388-9>
- Saldamando, C. I., & Marquez, E. J. (2012). Aproximación a la filogenia de Spodoptera (Lepidoptera: Noctuidae) con el uso de un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI). In *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN (Vol. 60, Issue 3)*.
- Sanches, D., Martins, T., Lutz, Í., Veneza, I., Da Silva, R., Araújo, F., Muriel-Cunha, J., Sampaio, I., Garcia, M., Sousa, L., & Evangelista-Gomes, G. (2021). Mitochondrial DNA suggests hybridization in freshwater stingrays *potamotrygon* (Potamotrygonidae: Myliobatiformes) from the Xingu River, amazonia and reveals speciation in *paratrygon*

aireba. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 93(3). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191325>

Shad, M., Usman, M., & Gardner, Q. A. (2022). Structural-Functional Characterization of Cytochrome b in bc1 and b6 f Complexes along with Polymorphic Analysis. *Pakistan Journal of Zoology*, 55(2), 975–986. <https://doi.org/10.17582/JOURNAL.PJZ/20220428110433>

Secretaría Distrital de Ambiente- Noticias de Ambiente. (2022). Secretaría Distrital de Ambiente. [https://www.ambientebogota.gov.co/noticias-de-ambiente1/-/asset\\_publisher/CWsNLtoGa4f6/content/secretaria-de-ambiente-incauto-encomienda-de-peces-que-iban-hacia-asia](https://www.ambientebogota.gov.co/noticias-de-ambiente1/-/asset_publisher/CWsNLtoGa4f6/content/secretaria-de-ambiente-incauto-encomienda-de-peces-que-iban-hacia-asia).

Song, H. M., Mu, X. D., Wei, M. X., Wang, X. J., Luo, J. R., & Hu, Y. C. (2015). Complete mitochondrial genome of the ocellate river stingray (*Potamotrygon motoro*). *Mitochondrial DNA*, 26(6), 857–858. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.861429>

Teixeira de Mello, F., Zeballos Fernández, A., Córdova, L., Carvajal-Vallejos, F. M., Navia, A. F., Gómez-Martínez, D., ... & Mandelburger, D. (2017). XV. Rayas de agua dulce (*Potamotrygonidae*) de Suramérica. Parte II. Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Toffoli, D., Hrbek, T., Góes De Araújo, M. L., Pinto De Almeida, M., Charvet-Almeida, P., Farias, I. P., Rico, R., Piedras, S., & Juan, R. (2008). *A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus Potamotrygon (Potamotrygonidae, Myliobatiformes)*. [www.sbg.org.br](http://www.sbg.org.br)

Torres, Y., Faria, V. V., & Charvet, P. (2022). Current status and future perspectives of Neotropical freshwater stingrays (*Potamotrygoninae*, *Myliobatiformes*) genetics. *Environmental Biology of Fishes*, 105(8), 1111–1127. <https://doi.org/10.1007/S10641-022-01320-X/METRICS>

Wang, X. B., Zhang, J. T., Deng, J., Zhou, Q. S., Zhang, Y. Z., & Wu, S. A. (2016). DNA Barcoding of Mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) From Mainland China.

*Annals of the Entomological Society of America*, 109(3), 438–446.  
<https://doi.org/10.1093/AESA/SAW009>