



APLICACIÓN DEL MODELO DE PÉRDIDA DE ADN PARA EL DISEÑO DE CEBADORES EN *Potamotrygon magdalenae* (POTAMOTRYGONIDAE)

Application of the model of DNA loss for desing of primers in *Potamotrygon magdalenae* (Potamotrygonidae)

Iván Yesid LÓPEZ-ARDILA¹, Francisco José MARTÍNEZ-PÉREZ¹, Fernando RONDÓN-GONZÁLEZ¹*¹ Grupo de Investigación en Microbiología y Genética, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.* **For correspondence:** ferongon@uis.edu.coReceived: 18th May 2020. Returned for revision: 25th February 2021. Accepted: 13th May 2021.

Associate Editor: Caroline Turchetto

Citation/citar este artículo como: López-Ardila, I. Y., Martínez-Pérez, F. J., y 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>

RESUMEN

El diseño de cebadores es fundamental para amplificar regiones de genes debido a que la especificidad que mantienen cebador-secuencia de interés puede causar el éxito o fracaso en la reacción de PCR. En relación a *Potamotrygon magdalenae* (especie de interés de acuerdo al PAN Tiburones-Colombia), existe poca información disponible de aspectos relacionados con la genética poblacional de esta Raya. El objetivo del presente trabajo consistió en diseñar cebadores bajo los criterios del Modelo de Pérdida de ADN (DNA-LM), que permitan evaluar el estado genético de las poblaciones de *P. magdalenae*. Alineamos secuencias de la superfamilia Dayastoidea, disponibles en el NCBI, de los genes mitocondriales *Citocromo C Oxidasa 1* (MT-CO1) y *Citocromo b* (MT-CYB). Seguimos los parámetros *Gap open penalty* (5), *Gap extension penalti* (0,2) y *Terminal gap penalties* (0,1) y seleccionamos dos pares de cebadores de acuerdo con el DNA-LM. Estimamos el producto amplificado del gen MT-CO1 en 916 pb y del gen MT-CYB en 774 pb, en muestras de *P. magdalenae* procedentes de diferentes ciénagas del Magdalena medio. Discutimos los resultados desde la perspectiva de validar la especificidad de los cebadores diseñados, teniendo en cuenta la correspondencia e identidad de las secuencias de los genes considerados. Los cebadores aquí reportados pueden contribuir a ampliar el conocimiento de la genética poblacional, biogeografía y filogenética de la raya de agua dulce *P. magdalenae*.

Palabras Clave: Alineamiento de secuencias, elasmobranquios, genética de población, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ABSTRACT

The primer design is critical for amplifying gene regions because the specificity that primer-sequence maintain can cause success or failure in the PCR reaction. Concerning *Potamotrygon magdalenae* (a species of interest according to the PAN Tiburones-Colombia), there is little information available about aspects related to population genetics of this river stingray. This study aimed to design primers under DNA Loss Model (DNA-LM) criteria, which will allow assessing the genetics status of populations of *P. magdalenae*. We aligned sequences from the superfamily Dayastoidea, available in the NCBI, of the mitochondrial genes *Cytochrome C Oxidase 1* (MT-CO1) and *Cytochrome b* (MT-CYB). We followed the parameters *Gap open penalty* (5), *Gap extension penalty* (0.2) and *Terminal gap penalties* (0.1) and selected two pairs of primers according to the DNA-LM. We calculated the amplified product of the MT-CO1 gene in 916 pb and the MT-CYB gene in 774 pb in samples from different swamps of the middle Magdalena. We discussed the results from the perspective of validating the specificity of the primers designed, considering the correspondence and identity of gene sequences considered. The primers reported here will contribute to broadening the knowledge of population genetics, biogeography and phylogenetic of the river stingray *P. magdalenae*.

Keywords: Elasmobranchii, genetics, population, Polymerase Chain Reaction, sequence alignment.

INTRODUCCIÓN

Las tecnologías en Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés), permiten estudiar regiones genómicas en muestras de ADN de diversos organismos, muchas de las cuales, para lograr suficiente fuerza en la señal, requieren amplificar el segmento de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Andreson et al., 2015). Esta técnica utiliza cebadores, secuencias cortas de nucleótidos que deben cumplir ciertas condiciones que permitan la obtención de producto confiable en el procedimiento de PCR a partir de un extracto genómico (Palumbi et al., 2002; Degen et al., 2006; Andreson et al., 2008).

El principal objetivo en el diseño de los cebadores es la especificidad que guardan (Andreson et al., 2008). Según Palumbi et al. (2002), se pueden construir cebadores degenerados, es decir, aquellos que en cierta posición pueden presentar distintos nucleótidos como resultado de la variación de los genomas a medida que se aumenta en el nivel taxonómico (Hebert et al., 2003), estos mejoran la probabilidad de amplificación cuando se desconoce la secuencia molde y pueden afectar la especificidad al hibridar en sitios distintos al deseado. Lo anterior, incrementa la posibilidad de fallar o generar falsos positivos (Andreson et al., 2008; Köressaar et al., 2018) como consecuencia de la falta de fidelidad que presentan estas secuencias con respecto al ADN genómico de interés (Sambrook y Rusell, 2001). Esta situación se puede verificar mediante la utilidad de programas bioinformáticos (Andreson et al., 2015) como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990), el cual permite establecer el grado de similitud de una secuencia de nucleótidos con respecto al genoma, además de identificar sus potenciales sitios de enlace (Johnson et al., 2008; Ye et al., 2012).

Por otro lado, en el Plan Nacional de Acción para la Conservación de Tiburones, Rayas y Quimeras de Colombia (PAN Tiburones-Colombia), se cuenta con representantes de la familia Potamotrygonidae (Peces elasmobranchios restringidos a ambientes dulceacuícolas) (Caldas et al., 2010). Dentro de esta, *Potamotrygon magdalenae* (Duméril, 1865) está catalogada como de alta importancia; por tanto, es relevante estudiar diferentes aspectos de su biología (Caldas et al., 2010; Lasso et al., 2016), incluidos aquellos que permitan profundizar en la genética con fines de conservación de estos organismos. Aunque se han realizado algunos estudios de diferente índole (Ramos-Socha y Grijalba-Bendeck, 2011; Ramírez y Davenport, 2013; Lasso et al., 2016), son escasos aquellos que comprenden aspectos de la biología molecular de esta especie.

En el sentido expuesto Garcia et al. (2015) y Renza-Millán et al. (2019), reportaron la obtención de secuencias de los genes mitocondriales (ADNmt) Citocromo C Oxidasa subunidad 1 (MT-CO1) y Citocromo b (MT-CYB), en muestras de diferentes especies de la familia

Potamotrygonidae. En el primero de estos estudios, se presentaron reconstrucciones filéticas de representantes de la familia en tres países sudamericanos y evidenció la agrupación del clado *Potamotrygon*, entre los cuales se encuentran las especies *P. magdalenae* y *P. motoro* (Müller & Henle, 1841) (Garcia et al., 2015). Por su parte, el segundo estudio estuvo orientado al análisis de la estructura poblacional de *P. motoro* (Renza-Millán et al., 2019). Pese a lo anterior, estos estudios presentan información incongruente con respecto a la secuencia de los cebadores descritos, falta de homología con secuencias reportadas en GenBank, o la generación de distintos sitios de enlace potenciales dentro del genoma mitocondrial de *P. magdalenae* (datos no mostrados).

Debido a que poco se conoce sobre aspectos de la biología molecular de *P. magdalenae* y que puede resultar poco confiable la información de algunos cebadores descritos en la literatura que permitirían acceder al polimorfismo nucleotídico presente en el ADNmt, el principal objetivo del presente estudio fue amplificar regiones de genes mitocondriales en esta especie de Raya endémica de Colombia, a partir de cebadores diseñados bajo el Modelo de Pérdida de ADN (DNA-LM, por sus siglas en inglés) propuesto por Martínez-

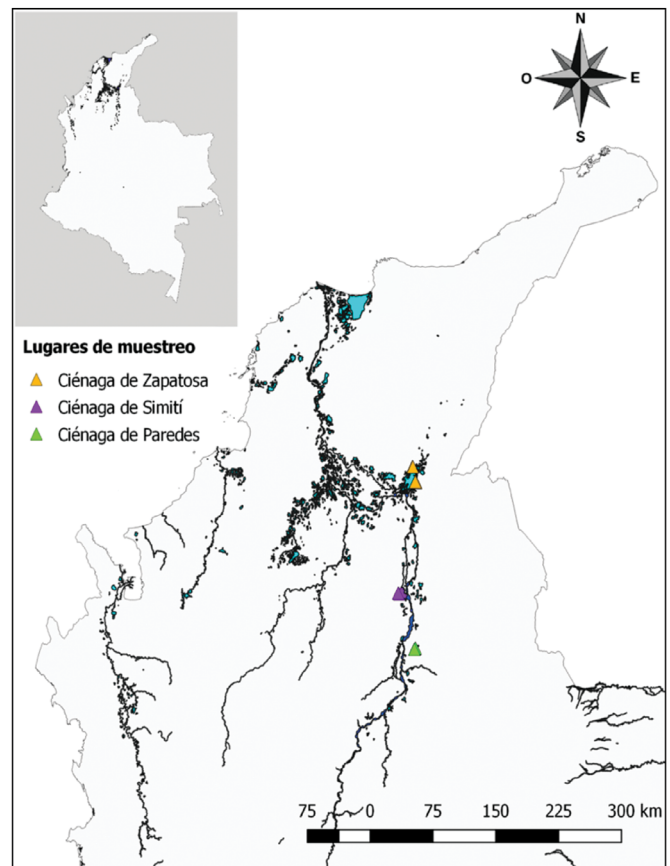


Figura 1. Ubicación geográfica de las Ciénagas muestreadas. Verde: Ciénaga de Paredes (72°26'41" N, 73°46'17" W); morado: Ciénaga de Simití (7°57'23" N, 73°56'46" O); y naranja: Ciénaga de Zapatosa (9°15'28" N, 73°48'48" W). Las coordenadas se reportan bajo el sistema de referencia WGS 84.

Tabla 1. Secuencias de cebadores propuestos para amplificar una región del gen MT-CO1 y MT-CYB de *P. magdalenae*.

Cebador*	Secuencia	Identidad (%)**	Posición DNAm***	%G/C	Tm °C	Th °C
FPmagCOI531	5'-GCAATCTCTCAATACCAAACACCAC-3'	96	6023	44	67,1	60,1
RPmagCOI1432	5'-CGTTTTGATGCAAATGCTTCTCAGAG-3'	96	6939	40	68,0	60,1
FPmagCytb182	5'-CATCAGCCTTCTCCTCMATCGCAC-3'	96	14584	54	69.3	58,0
RPmagCytb932	5'-CGGAAGGTGAGGCTTCGTTGTTGG -3'	92	15358	56	71.2	58,0

Tm: Temperatura de hibridación calculada con OligoAnalyzer Tool; Th: temperatura de hibridación. * En todos los casos la nomenclatura está dada como sigue: F o R, dirección de síntesis del cebador; Pmag, *Potamotrygon magdalenae*; COI o CYTB, gen mitocondrial; y los números se refieren al primer nucleótido del cebador en el sentido 5' que se sintetiza dentro del gen. ** Porcentaje de identidad de cada cebador obtenido con BLAST. *** Corresponde al primer nucleótido sintetizado en sentido 5' del genoma mitocondrial de *P. magdalenae*.

La estandarización de productos amplificados por PCR mostró diferencias en el valor de las concentraciones de MgCl₂, dNTPs, cebadores y Taq Polimerasa (Tabla 2), respecto a lo descrito por Degen et al. (2006). La reacción de PCR fue óptima a 94 °C por 5 minutos de denaturación inicial; 25 ciclos que incluyen denaturación a 94 °C, anhelando (60.1 °C para MT-CO1 y 58 °C para MT-CYB) y extensión a 72 °C, por 30 segundos cada paso; y la extensión final a 72 °C por 7 minutos. El producto amplificado del gen MT-CO1 de *P. magdalenae* se estimó en 916 pb y 774 pb del gen MT-CYB.

En promedio, el contenido nucleotídico de las secuencias MT-CO1 equivale a 26,2 % T, 26,8 % C, 28,5 % A y 15,5 % G, siendo más frecuente G (0,292), T (0,396) y C (0,444) en la primera, segunda y tercera posición de los codones, respectivamente. Para el caso de las secuencias MT-CYB, el contenido nucleotídico se estimó en 26,8 % T, 32,7 % C, 27,9 % A y 12,6 % G, siendo más frecuente C (0,281), T (0,423) y C (0,465) en la primera, segunda y tercera posición de los codones, respectivamente.

Los alineamientos en BLAST de las secuencias obtenidas a partir de los productos amplificados de los genes mitocondriales considerados, comparados con la secuencia del genoma mitocondrial completo KX151183 de *P. magdalenae*, evidenció identidad del 99 % (Fig. 3) para cada gen. Adicionalmente, dentro de la región de cobertura que presentan las secuencias obtenidas del gen MT-CO1, observamos entre dos y 22 sitios variantes, lo que posibilita el uso de este gen en futuros estudios genéticos poblacionales de la especie de raya *P. magdalenae*.

Tabla 2. Concentración de reactivos para amplificar por PCR fragmento de los genes MT-CO1 y MT-CYB de *P. magdalenae* a partir de los cebadores diseñados.

Reactivos	Degen et al., (2006)	Presente estudio
H ₂ O MilliQ	wv	wv
Buffer	1X	1X
MgCl ₂	1.5mM	2.25mM
dNTPs	0.2mM	0.8mM
Cebadores	0.2µM	1.25µM
Taq DNA Polymerase (Recombinant)	2U	1U

wv: volumen variable.

DISCUSIÓN

Las secuencias de cebadores diseñadas en este estudio para los genes MT-CO1 y MT-CYB aplicando DNA-LM, constituyen una herramienta que puede responder preguntas que exploren aspectos de la biología molecular de *P. magdalenae*. El modelo de pérdida de ADN permite comparar secuencias conservadas de genes presentes en diferentes taxa que guardan relación filética (Martínez et al., 2007), como ha sido demostrado en la evolución de neuropéptido de moluscos y otros metazoa (Jékely, 2013; De Oliveira et al., 2019). Este modelo fue propuesto y probado, inicialmente, en organismos invertebrados y plantea que la evolución de genes neuroendocrinos ocurrió a partir de la duplicación de un gen ancestral para un precursor neuropéptido con distinto número de copias. Además, del movimiento de intrones y la pérdida de codones generan nuevos genes en especies filogenéticamente cercanas (Martínez et al., 2007); esto implica considerar que, las sustituciones aminoacídicas se conservan (Illegard et al., 2009; Cocco et al., 2018; Contreras-Moreira, 2018) y, por tanto, la incertidumbre disminuye (Lassman et al., 2008; Köressaar et al., 2018). Bajo estos supuestos, la información de secuencias disponibles en bases de datos constituye un enfoque para el diseño de cebadores con sitios de enlace específicos que permitan incrementar la fidelidad de los resultados (Ye et al., 2012). Lo anterior fue demostrado con el diseño de sistemas de diagnóstico por RT-PCR en tiempo real para el virus de influenza A H1N1 (González-Barrios et al., 2017).

El alineamiento que realizamos con la estrategia MSA, permitió visualizar y establecer las posiciones variables y conservadas en secuencias que guardan identidad (Higgs y Attwood, 2005; Donkor et al., 2014). Lo anterior, posibilita un mejor entendimiento de la estructura, función y el cambio que tienen dichas secuencias en diferentes organismos, aspectos que se pueden aprovechar considerando diferentes enfoques bioinformáticos (Khodakov et al., 2016).

Precisamente, como parte de aprovechar los datos y las herramientas bioinformáticas disponibles, sumado a la aplicación de DNA-LM, planteamos una estrategia orientada al diseño de cebadores siguiendo las recomendaciones de rigor (Sambrook y Green, 2001; Degen

et al., 2006; Contreras-Moreira, 2018), que disminuyeron la probabilidad de generar múltiples sitios de enlace durante la PCR (Andreson et al., 2015), lo que redundó en la amplificación de las regiones deseadas y evitó la presencia de amplicones inespecíficos.

La eficiencia y especificidad de la reacción de PCR se debe en principio al diseño de los cebadores, que, en conjunto con otros aditivos y cosolventes, constituyen el éxito de la reacción (Sambrook y Green, 2001). Dado que todas las secuencias de cebadores difieren, las variables físicas y químicas asociadas a estos también lo hacen y, en consecuencia, las condiciones de amplificación. De hecho, todos los aditivos y cosolventes que se utilizan en la reacción de PCR constituyen agentes inhibidores de esta (Sambrook y Green, 2001). Como consecuencia de esta situación, establecer las condiciones mínimas para obtener productos amplificados es un buen punto de partida, cuyo ajuste mejorará la calidad de las bandas y la confiabilidad de los resultados (Khodakov et al., 2016), en especial si llegase a requerir el uso de secuencias para analizar sitios variantes.

La herramienta BLAST (Altschul et al., 1990) encuentra la relación más alta entre la secuencia de consulta y los registros disponibles en las bases de datos del GenBank (Selzer et al., 2018). El uso de esta herramienta arrojó un valor de identidad > 99 % para las secuencias de los genes amplificados con los cebadores que diseñamos para MT-CO1 y MT-CYB de *P. magdalenae*, con respecto a las secuencias de esos genes inmersas en la secuencia genómica KX151183. Lo anterior permite establecer una alta relación entre secuencias de esta especie de Raya, que posibilita la cercanía u homología en términos biológicos (Donkor et al., 2014; Selzer et al., 2018). De hecho, análisis adicionales siguiendo la estrategia UPGMA implementada en el software MEGA X (Kumar et al., 2018), sugieren que la secuencia genómica KX151183 presenta más similitud con *P. magdalenae* muestreada en las Ciénaga de Paredes y Cimití, que con muestras obtenidas en la Ciénaga de Zapotosa (datos no mostrados), lo que permite hipotetizar que dicha secuencia guarda estrecha relación filética con las halladas a partir de los cebadores diseñados.

Cuando analizamos con BLAST las secuencias de cebadores aquí diseñadas, identificamos regiones que permiten la obtención de un único producto amplificable por PCR en cada gen de interés (Fig. 3). En los estudios realizados por Garcia et al. (2015) y Renza-Millan et al. (2019) se reportó la obtención de secuencias en organismos pertenecientes a la familia Potamotrygonidae. No obstante, al analizar con BLAST las secuencias de cebadores descritos en esos trabajos, encontramos que se forman múltiples fragmentos de tamaño variable que no guardan correspondencia con la secuencia de cada gen considerado. Este hallazgo genera incertidumbre frente a los amplicones obtenidos en *P. magdalenae* con los cebadores descritos por Garcia et al. (2015) y Renza-Millan et al. (2019), más

Potamotrygon magdalenae mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [KX151183.1](#) Length: 17429 Number of Matches: 1

Range 1: 14634 to 15357 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1321 bits(715)	0.0	721/724(99%)	0/724(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGAGTAATCCGCAACATCCACGC	TAATGGCGCCTCCATATTTCT	GATCGACCTACCTA	60
Sbjct 14634	TGACTAATCCGCAACATCCACGC	TAATGGCGCCTCCATATTTCT	GATCGACCTACCTA	14693
Query 61	CATATGCTCGAGGACTGTACT	TGGCTCTACC	TAAACAAGAAACCTGAAAT	120
Sbjct 14694	CATATGCTCGAGGACTGTACT	TGGCTCTACC	TAAACAAGAAACCTGAAAT	14753
Query 121	GTCCATCATCTACTACTTATA	AATTACCGCATTCGTAGGCT	ACGCTCCCTCCGAGGA	180
Sbjct 14754	GTCCATCATCTACTACTTATA	AATTACCGCATTCGTAGGCT	ACGCTCCCTCCGAGGA	14813
Query 181	CAAAATATCATT	TGGGGGGCAACCGTTAT	TACCAACCTACTATCCGCT	240
Sbjct 14814	CAAAATATCATT	TGGGGGGCAACCGTTAT	TACCAACCTACTATCCGCT	14873
Query 241	GGAAACACACTTGTGCAAT	GAATCTGAGGCGGAT	TCTCAGTTGATACCAACATTAACC	300
Sbjct 14874	GGAAACACACTTGTGCAAT	GAATCTGAGGCGGAT	TCTCAGTTGATACCAACATTAACC	14933
Query 301	CGATTTCTCAGATTTCA	TTTTCTCTTCCCTTATAA	TTCAGCCCTGACTATAATTCAC	360
Sbjct 14934	CGATTTCTCAGATTTCA	TTTTCTCTTCCCTTATAA	TTCAGCCCTGACTATAATTCAC	14993
Query 361	CTTCTCTTCTTCATGAAG	CAGGATCAACATCAACCGGAT	TGGCATCAGATATGGAC	420
Sbjct 14994	CTTCTCTTCTTCATGAAG	CAGGATCAACATCAACCGGAT	TGGCATCAGATATGGAC	15053
Query 421	AAAATCCAATTCACCCCT	ACTACTGATACAAGGACT	AGTCGGATTTCTTCTCTCTA	480
Sbjct 15054	AAAATCCAATTCACCCCT	ACTACTGATACAAGGACT	AGTCGGATTTCTTCTCTCTA	15113
Query 481	CTCCTACTCACTACCTAG	CCCTCTTACACCAACCTACT	TAGGCGACACAGAAAATTT	540
Sbjct 15114	CTCCTACTCACTACCTAG	CCCTCTTACACCAACCTACT	TAGGCGACACAGAAAATTT	15173
Query 541	ATCCAGCCCAACCCCTCGT	CACACCACCCATATAA	ACAGAAATGATCTTCTTATTC	600
Sbjct 15174	ATCCAGCCCAACCCCTCGT	CACACCACCCATATAA	ACAGAAATGATCTTCTTATTC	15233
Query 601	GCCTACGCCATCCTACGCT	CCATCCCCAACAAC	TGGAGGCGTACTAGCCCTAATCTTC	660
Sbjct 15234	GCCTACGCCATCCTACGCT	CCATCCCCAACAAC	TGGAGGCGTACTAGCCCTAATCTTC	15293
Query 661	TCAATCTTAATCCTACTCT	TAGTGCCTATACACACCT	CCAACAGCGAGGCTCACC	720
Sbjct 15294	TCAATCTTAATCCTACTCT	TAGTGCCTATACACACCT	CCAACAGCGAGGCTCACC	15353
Query 721	TTCC	724		
Sbjct 15354	TTCC	15357		

Figura 3. Identidad de la secuencia del gen mitocondrial MT-CYB de *Potamotrygon magdalenae*. La secuencia fue obtenida a partir de productos amplificados por PCR con los cebadores diseñados en el presente estudio.

si se tiene en cuenta que el mejor predictor en los fallos y falsos positivos de la PCR, es el incremento en el número de potenciales sitios de enlace que genere un cebador (Andreson et al., 2008; Köressaar et al., 2018).

La identificación de diferentes sitios variables en secuencias del gen MT-CO1 en muestras de individuos de *P. magdalenae*, posibilita el uso de los cebadores aquí diseñados en posteriores estudios orientados a resolver preguntas de índole microevolutivo a nivel genético poblacional. Adicionalmente, destacamos que utilizamos cebadores heterólogos diseñados para amplificar el gen mitocondrial NADH deshidrogenasa 2 (ND2) de Aves (Hackett, 1996; Johnson y Sorenson, 1998), en experimentos cuyos resultados mostraron productos amplificados secuenciables o susceptibles de ser digeridos con endonucleasas de restricción en muestras de *P. magdalenae* (datos no mostrados). Lo anterior, se puede explicar ya que los cebadores diseñados para amplificar el gen ND2 incluyen secuencias de genes de tRNA (Metionina y Triptofano, respectivamente), estructuras altamente conservadas (López y Montoya, 2012) que deben reconocer los codones de los aminoácidos involucrados, por tanto, su secuencia de nucleótidos puede ser similar (Lang et al., 2012) entre distintos taxa.

CONCLUSIONES

Concluimos que siguiendo los preceptos de DNA-LM se diseñaron cebadores que generan productos amplificados de los genes mitocondriales *Citocromo C Oxidasa 1* y *Citocromo b* de *Potamotrygon magdalenae*. Lo anterior posibilita la aplicación de DNA-LM en el diseño de cebadores de genes mitocondriales presentes en otros vertebrados distintos a Elasmobranchios. Además, los cebadores diseñados permitirán responder preguntas relacionadas con aspectos genéticos, filogenéticos y biogeográficos en esta especie de Raya de agua dulce.

AGRADECIMIENTOS

Los autores extendemos nuestra gratitud a los pescadores de las diferentes ciénagas donde se ejecutaron las faenas de pesca que permitieron la captura de los especímenes de *P. magdalenae* a los que se les tomaron muestras. De igual manera agradecemos al personal de los laboratorios asociados al Grupo de Investigación en Microbiología y Genética de la Universidad Industrial de Santander.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andreson, R., Möls, T., y Remm, M. (2008). Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(11), e66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn290>
- Andreson, R., Kaplinski, L., y Remm, M. (2015). Fast masking of repeated primer binding sites in eukaryotic genomes. *Methods Molecular Biology*, 1275, 201-218. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn290>
- Caldas, J. P., Castro-González, E., Puentes, V., Rueda, M., Lasso, C., y Duarte, L. O., (2010). *Plan de Acción Nacional para la Conservación 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 de Investigaciones Marinas y Costeras, 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.
- Cocco, S., Feinauer, C., Figliuzzi, M., Monasson, R., y Weigt, M. (2018). Inverse statistical physics of protein sequences: a key issues review *Reports on Progress in Physics*, 81(3), 1-18. <https://doi.org/10.1088/1361-6633/aa9965>
- Contreras-Moreira, B. (2018). *Algoritmos en bioinformática estructural* (9ª ed). EEAD-CSIC.
- De Oliveira, A. L., Calcino, A., y Wanninger, A. (2019). Extensive conservation of the proneuropeptide and peptide prohormone complement in mollusks. *Scientific reports*, 9(1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40949-0>
- Degen, H. J., Deufel, A., Eisel, D., Grunewald-Janho, S., y Keeseey, J. (2006). *PCR applications manual* (3ª ed, pp. 41-123). Roche.
- Donkor, E. S., Dayie, N. T. K. D., y Adiku, T. K. (2014). Bioinformatics with basic local alignment search tool (BLAST) and fast alignment (FASTA). *Journal of Bioinformatics and sequence analysis*, 6(1), 1-6. <https://doi.org/10.5897/IJBC2013.0086>
- García, D. A., Lasso, C. A., Morales, M., y Caballero, S. J. (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 Part A*, 27(6), 4476-4491. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1101536>
- González-Barrios, J. A., Thompson-Bonilla, M. R., Martínez-Pérez, F., Barrios-Hernández, C. J., Bautista-Rozo, L. X., Rodríguez-Vázquez, R., y Martínez-Fong, D. (2017). *Oligonucleótidos y proceso para detectar el virus de influenza A H1N1*. Oficina Internacional de la Organización Mundial de Propiedad Intelectual (WIPO).
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed, pp. 749-1143). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hackett, S. J. (1996). Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(2), 368-382. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0032>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95-98.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., y Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*, 270, S96-99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Higgs, P. G., y Attwood, T. K. (2005). *Bioinformatics and Molecular Evolution* (pp. 12-158). Blackwell publishing. <https://doi.org/10.1002/9781118697078>
- Illegard, K., Ardell, D. H., y 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. <https://doi.org/10.1002/prot.22458>
- Jékely, G. (2013). Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences*, 110(21), 8702-8707. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221833110>
- Johnson, K. P., y Sorenson, M. D. (1998). Comparing molecular evolution in two mitochondrial genes (cytochrome b and ND2) in the dabbling ducks (Tribe: Anatinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10(1), 82-94. <https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0481>
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytseles, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., y Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Sppl 2), W5-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Khodakov, D., Wang, C., y Zhang, D. Y. (2016). Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105(Part A), 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.005>
- Kõressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., y Remm, M. (2018). Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11), 1937-1938. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty036>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lang, B. F., Lavrov, D., Beck, N., y Steinberg, S. V. (2012). Mitochondrial tRNA structure, identity, and evolution of the genetic code. En C. Bullerwell (Ed.). *Organelle Genetics* (pp. 431-474). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22380-8_17
- Lassmann, T., y Sonnhammer, E. L. (2005). Kalign – An accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics*, 6(1), 298-307. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-298>
- Lasso, C. A., Rosa, R. S., Morales-Betancourt, M. A., Garrone-Neto, D., y Carvalho, M. (2016). *Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina* (pp. 304-391). Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).
- López, M. J., y Montoya, J. (2012). *Sistema genético mitocondrial humano* (pp. 31-46). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza.
- Martínez-Pérez, F., Duran-Gutiérrez, D., Delaye, L., Becerra, A., Aguilar, G., y Zinker, S. (2007). Loss of DNA: A plausible molecular level explanation for crustacean neuropeptide gene evolution. *Peptides*, 28(1), 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.09.021>
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., y Grabawski, G. (2002). *The simple fool's guide to PCR, version 2.0* (pp. 46). University of Hawaii, Honolulu: Privately published.
- Ramírez, F., y Davenport, T. L. (2013). Elasmobranchs from marine and freshwater environments in Colombia: A review. G. Lavigne, y C. Cote (Eds.). *Colombia: Social, Economic and Environmental Issues* (pp.81-128). Nova Publishers Inc., N.Y.
- Ramos-Socha, H. B., y 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. <https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.781>
- Renza-Millán, M., Lasso, C. A., Morales-Betancourt, M. A., Villa, F., y 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*, 30(3), 466-473. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1546300>
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3ª ed, pp. 895-909). Cold Spring Harbor.
- Selzer, P. M., Marhöfer, R. J., y Rohwer, A. (2018). *Applied bioinformatics An introduction* (2ª ed, pp. 183). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68301-0>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134-144. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>