

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y DE RECURSOS NATURALES**

**CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

**CÓDIGO DE BARRAS DE ADN DE *SQUALUS ACANTHIAS* LINNÉ, 1758  
(CHONDRICHTHYES, SQUALIDAE) DEL SUR DE CHILE**

**TESIS**

**FRANCISCA ROJAS MORALES**

**2014**

**FRANCISCA ROJAS MORALES**

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos para obtener el título profesional de Biólogo Marino

**COMISIÓN DE TÍTULO:**

Francisco Concha Toro  
**Codirector**  
Universidad de Valparaíso

Dr. Humberto Díaz O  
**Codirector**  
Universidad de Valparaíso

Carlos Calderón A  
**Miembro de la Comisión**  
BioTecnos

2014

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	14
HIPÓTESIS	15
MATERIALES Y METODOS	16
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	44
LITERATURA CITADA	46
ANEXO 1	59
ANEXO 2	61
ANEXO 3	63
ANEXO 4	65
ANEXO 5	69
ANEXO 6	72

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer de todo corazón a cada uno de los profesores de este trabajo de tesis, en especial a Francisco Concha que, como director de tesis, ha orientado, apoyado y corregido mi labor científica con un interés y dedicación que han sobrepasado las expectativas que, como alumna, deposité en su persona y han sido fundamentales para mi formación como investigadora.

A todo el personal de Biotecnos por su simpatía y buena acogida, en especial a Ivonne Quintanilla por su paciencia y dedicación durante todo el trabajo en laboratorio.

A toda la gran familia de Montemar, funcionarios y profesores, que hacen que cada día sea un placer venir hasta esta facultad.

A mi familia, por su apoyo constante e incondicional, sobre todo a mi madre, porque gracias a ella hoy soy lo que soy, y sin ella no hubiera sido capaz de llevar esto a cabo.

Y finalmente, pero no menos importante, a cada uno de mis amigos que, sin esperar nada a cambio, compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas, y acompañaron en cada uno de mis logros y fracasos, y a todas aquellas personas que durante estos siete años de carrera de alguna u otra forma estuvieron apoyándome y aportaron con su granito de arena para que este sueño se haga realidad.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Mapa geográfico de la estaciones de donde se extrajeron las muestras de *Squalus acanthias*, estación 1 (▲), estación 2 (■), estación 3 (●), estación 4(▼).....17
- FIGURA 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR desde la muestra 16 a la 34 con el Coctel de cebadores E: escalera de peso molecular,B:blanco.....24
- FIGURA 3.** Porcentaje de la abundancia de las bases nitrogenadas de los haplotipos obtenidos.....26
- FIGURA 4.** Historia evolutiva entre los haplotipos a través del método *Neighbor-Joining* con 1000 repeticiones. Se analizaron 33 haplotipos con un total de 460 pares de bases nitrogenadas. Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles replicados en que los taxa asociados permanecen agrupados. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de p-distance. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA5.....29
- FIGURA 5.** Historia evolutiva entre 12 especies de la familia Squalidae a través del método *Neighbor-Joining* con 1000 repeticiones. Las secuencias poseen una longitud de 480 pares de bases nitrogenadas. Todos los gaps y datos perdidos fueron eliminados. Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles replicados en que los taxones asociados permanecen agrupados. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el modelo p-distance en el software MEGA5.....30

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Cóctel de cebadores utilizados para amplificar secuencia COI de <i>S. acanthias</i> .....	18
<b>TABLA 2.</b> Códigos de las secuencias COI obtenidas desde GenBank y utilizadas para diseñar los cebadores en este estudio .....	18
<b>TABLA 3.</b> Condiciones de PCR para las muestras con el cóctel de cebadores.....	20
<b>TABLA 4.</b> Condiciones de PCR para las muestras con los cebadores SA.....	20
<b>TABLA 5.</b> Estimación de la divergencia evolutiva entre las secuencias. Se analizaron 33 haplotipos con un total de 460 bases nitrogenadas. Bajo la diagonal, se muestra el número de diferencias de bases nitrogenadas entre cada una de las secuencias. Por encima de la diagonal se muestra la estimación del error estándar a partir de 1000 repeticiones. Análisis evolutivo se llevó a cabo con el modelo Kimura 2-parameter en el software MEGA5.....	28
<b>ANEXO 1.</b> Muestras recolectadas de Cochamó, en el Seno de Reloncaví (Estación 1, 41°44'S;72°59'O), de aguas interiores de Chiloé (Estación 2, 41°39'S; 72°21'O, y 3, 42°57'S;72°53'O), y de cercanías de la Isla Ipún, Región de Aysén (Estación 4, 44°37'S; 74°46'O). M: macho, H: hembra.....	59
<b>ANEXO 4.</b> Detalle del cebador utilizado, la concentración (ng/ul), número de pares de bases, la secuencia del cebador, y la concentración del cebador (pmol/ul) en cada muestra.....	65

**ANEXO 5.** Secuencias del gen mitocondrial COI de *Squalus acanthias* obtenidas en GenBank NCBI.....69

**ANEXO 6.** Secuencias del gen mitocondrial COI de *Cirrhigaleus barbifer*, *Cirrhigaleus australis*, *Cirrhigaleus asper*, *Squalus mitsukuri*, *Squalus albifrons*, *Squalus suckleyi*, *Squalus megalops*, *Squalus japonicus*, *Squalus edmundsi*, *Squalus brevirostris*, *Squalus blainville* obtenidas desde GenBank NCBI.....72

## RESUMEN

Uno de los aspectos más importantes para el manejo y conservación de especies es su correcta identificación taxonómica. El código de barras de ADN es una herramienta de identificación que utiliza como principal marcador molecular al gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), y se ha propuesto como sistema global de bioidentificación. *Squalus acanthias*, es una especie cosmopolita que durante los últimos años ha estado sujeta a controversia debido al descubrimiento de nuevas especies y especies crípticas. El objetivo de este estudio es identificar individuos afines a *S. acanthias*, de aguas interiores del sur de Chile, mediante el código de barras de ADN y determinar su identidad taxonómica con respecto a ejemplares de la misma especie de otros lugares del mundo. El código de barras de ADN permitió identificar exitosamente a los ejemplares en estudio como *S. acanthias*. Este método resultó ser rápido, preciso y rentable para la identificación de muestras. No obstante, para determinar la afinidad taxonómica de los ejemplares del sur de Chile con respecto a ejemplares de otros lugares del mundo, es necesario utilizar otros marcadores moleculares además del gen mitocondrial COI. La implementación de este tipo de técnicas es esencial para el adecuado manejo pesquero y conservación de tiburones y rayas.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Biología molecular

La correcta identificación taxonómica en peces es un requisito fundamental para el manejo de pesquerías (Pequeño 2000), ecología (Naylor 2012b), parasitología, biogeografía (Pickering 2012) y conservación (Pequeño 2000, Monaghan *et al.* 2005). El método tradicional de la taxonomía clásica era agrupar a los individuos, encontrados en una localidad dada, por su similitud. Este procedimiento fue legítimo durante el periodo en que el estatus de una especie era determinado únicamente por el grado de las diferencias morfológicas. Sin embargo, las diferencias en el fenotipo pueden reflejar diferencias de especie o simplemente una variación intraespecífica, ya que muchas poblaciones poseen diferencias morfológicas producto de dimorfismo sexual, variaciones en la edad, variaciones estacionales, polimorfismos, entre otros (Mayr & Ashlock 1991). A principios de los años sesenta, algunos investigadores empezaron a utilizar la información derivada del análisis cromosómico (citogenética), de proteínas (inmunología y enzimas) y posteriormente, del ADN para resolver problemas taxonómicos, evolutivos y biogeográficos, entre otros (Carraza 2002). Desde entonces, las técnicas moleculares han tenido un gran desarrollo y han sido utilizadas para la identificación de especies a través del estudio de pequeños segmentos del genoma, gracias a la diversidad que existe en las secuencias de ADN (Hebert *et al.* 2003). Estas técnicas han sido de gran utilidad en aquellos

casos en que la identificación a través de la morfología ya no es lo suficientemente precisa (Hajibabaei *et al.* 2007, Elias *et al.* 2007), como en los casos de ejemplares juveniles o cuando se cuenta sólo con fragmentos del cuerpo (Ivanova *et al.* 2007). Además, sirven para calificar los caracteres genéticos, que entregan información sobre el flujo de genes y variaciones genéticas en las poblaciones (Heist 1999).

En biosistemática se han utilizado regiones de genes tanto de origen nuclear como mitocondrial (Heist 2004). Los genes de origen nuclear son más largos y complejos ya que el ADN se encuentra empaquetado en cromosomas. Así también, una gran proporción del ADN nuclear es de tipo no codificante y por lo tanto no tiene una función clara (Avice & Walker 1999). Además, la mayoría de éstos segmentos evolucionan lentamente, por lo que exhiben pequeñas variaciones intra e interespecíficas (Heist 2004). Los marcadores nucleares más utilizados son los microsatélites debido a su naturaleza polimórfica. Estos fragmentos de ADN están compuestos por secuencias nucleotídicas cortas repetidas en tándem. Sin embargo, tienden a subestimar las divergencias genéticas entre las poblaciones debido a la gran cantidad de variaciones que poseen y a la alta tasa de homoplasia (Heist 2004). Otros marcadores nucleares utilizados son los minisatélites, que difieren de los anteriores en que la secuencia básica es más larga y pueden repetirse a lo largo de todo el cromosoma, y los espaciadores internos transcritos del ribosoma (ITS) (Carraza 2002). Por otra parte, el ADN mitocondrial posee un tamaño más compacto y tiende a evolucionar

más rápido que el ADN nuclear, por lo que es más fácil inferir relaciones filogenéticas a nivel de especie e incluso a nivel de población (Heist 2004). Se hereda de forma uniparental a través de la línea materna, por lo que las diferencias encontradas entre los individuos se deben exclusivamente a fenómenos de mutación y no de recombinación (Hudson & Turelli 2003). Además, en una célula existen múltiples genomas mitocondriales, permitiendo obtener ADN a partir de cantidades muy pequeñas de tejido, incluso en muestras conservadas en alcohol durante años (Carraza 2002).

## **1.2. Código de barras (DNA Barcoding)**

El código de barras de ADN, es el método mediante el cual se utiliza una región estandarizada del ADN para identificar especies (Hebert *et al.* 2003), por medio de la presencia o ausencia de sustituciones discretas de nucleótidos dentro de la secuencia de ADN. Es así como, a través de métodos de agrupamiento y evaluación de las distancias genéticas dentro y entre especies (Rach *et al.* 2008), es posible discriminar entre una especie y otra, bajo la suposición de que la divergencia genética intraespecífica es más baja que la interespecífica (Hajibabaei *et al.* 2007). Su uso es rápido y confiable para clasificar correctamente a las especies (Hebert *et al.* 2004b; Ward *et al.* 2005), identificar especies crípticas (Hebert *et al.* 2004a, Alvarado Bremer *et al.* 2005, Smith *et al.* 2006) y

para completar los sistemas de identificación taxonómica (Hajibabaei *et al.* 2007, Rach *et al.* 2008).

Hebert *et al.* (2003) plantearon que la secuencia de un gen es suficiente para diferenciar entre grupos taxonómicos, o entre la gran mayoría de especies animales. Para esto propusieron el uso del gen mitocondrial de la Citocromo c Oxidasa I (COI) como un sistema global de bioidentificación de animales. La COI es una enzima terminal de la cadena respiratoria de la mitocondria que cataliza la transferencia de electrones (De Robertis *et al.* 2005). Posee bajas tasas de mutaciones no sinónimas, lo que refleja una fuerte selección purificadora en la conservación de los residuos de aminoácidos y en el mantenimiento de la función de las proteínas (Ward & Holmes 2007). En vertebrados, el gen de la enzima COI posee una longitud de 1.545 pares de bases, no obstante, con sólo 500 pares de bases puede ser denominado como “código de barras” (Frezal & Leblois 2008). En ocasiones la longitud del código de barras puede variar dependiendo de la secuencia del cebador que se usó para amplificar (Ward & Holmes 2007). El gen COI ya ha sido utilizado en la identificación de peces (Ward *et al.* 2005) y para la determinación de especies crípticas, es decir, especies difíciles o imposibles de distinguir morfológicamente por lo que han sido clasificadas incorrectamente como una sola especie (Hebert *et al.* 2004a, Alvarado Bremer *et al.* 2005, Smith *et al.* 2006), entre otros.

Además, para que una secuencia sea considerada como código de barras de ADN, ésta debe estar incluida en la base de datos de BOLD (*The Barcode of Life Data Systems*) (Ratnasingham & Hebert 2007), para lo cual debe pasar estrictos análisis bioinformáticos que valoran su idoneidad. Esta base de datos es una herramienta bioinformática que tiene como fin adquirir, almacenar, analizar y publicar los registros relacionados con los códigos de barras de ADN. Forma parte del proyecto “*Barcoding of Life*”, la mayor iniciativa de biodiversidad genómica, que pretende crear un sistema de identificación digital a partir de las secuencias del gen COI, como herramienta para identificar especies conocidas.

Para evaluar la delimitación de las especies a partir de las secuencias de ADN se han descrito varios tipos de análisis, los que pueden dividirse en dos grupos, aquellos basados en matrices de distancias y aquellos basados en caracteres (Carraza 2002). Los métodos de distancia utilizan una matriz de distancia calculada a partir de una matriz de datos, utilizando un modelo evolutivo previamente determinado para inferir las relaciones filogenéticas. En cambio, los métodos basados en caracteres calculan árboles filogenéticos que optimizan los patrones de distribución de cada uno de los caracteres en base a un criterio determinado y consideran cada sitio de un nucleótido directamente (Page & Holmes 1998; De Salle *et al.* 2005). No obstante, se han desarrollado otras metodologías más complejas tanto para el análisis de datos y como para pruebas estadísticas para la asignación de las especies (Nielsen & Matz 2006, Abdo & Golding 2007).

El código de barras de ADN no ha estado exento de polémica (Ward *et al.* 2009). Existe preocupación en relación al uso de un gen mitocondrial para la identificación de especies, debido a su naturaleza uniparental, por su dudosa capacidad para discriminar entre especies recientemente diferenciadas, y para descubrir nuevas especies (Moritz & Cicero, 2004, De Salle *et al.* 2005, Elias *et al.* 2009). Es cierto que existen problemas con algunos grupos específicos. Por ejemplo, COI evoluciona muy lentamente en ciertos grupos de Cnidarios bentónicos, por lo que no entrega la resolución a nivel de especie (France & Hoover 2002). En plantas el gen COI no es apropiado debido a que posee una tasa de evolución mucho más lenta que en animales (Kress *et al.* 2005). Meier *et al.* (2006) encontraron que las secuencias COI generan sólo 70% de éxito en la identificación a nivel de especie para Diptera usando secuencias de *GenBank*. Ciertamente habrá algunos grupos taxonómicos para los cuales el código de barras no podrá proporcionar una resolución a nivel de especie, aunque se espera que estos casos sean poco comunes (Ward *et al.* 2009).

### **1.3. Biología Molecular en Condrictios**

Las técnicas moleculares han sido muy utilizadas en peces, en parte, por su gran importancia comercial, y por las dificultades para observarlos en su ambiente natural (Heist 1999). Aunque se han realizado varios estudios con técnicas moleculares en peces, pocos involucran condrictios. Algunos autores han realizado investigaciones sobre genética poblacional (ver Heist *et al.* 1995, Heist

*et al.* 1996, Heist 1999, Verissimo *et al.* 2010, Pickering 2012); especies crípticas (Quattro *et al.* 2006; Last *et al.* 2007; Griffiths *et al.* 2010; Pinhal *et al.* 2012); identificación de peces cartilagosos (Ward *et al.* 2005, Ward *et al.* 2007, Holmes *et al.* 2009, Wong *et al.* 2009 y Marouani *et al.* 2012); y filogenia (Doudy *et al.* 2003, Naylor *et al.* 2005 y Naylor *et al.* 2012a,b). En las últimas décadas el interés en la biodiversidad y taxonomía de este grupo ha ido en aumento. Esto debido a que las poblaciones de tiburones y rayas están disminuyendo en muchos océanos del mundo (Simpfendorfer *et al.* 2011), producto de la gran cantidad de amenazas a las cuales se ven enfrentadas. Las más notables son las pesquerías (Bonfil 1994), ya sea como especie objetivo o como fauna acompañante (Pequeño 2000), pero los elasmobranchios también se ven afectados por la degradación de los hábitats (Jennings *et al.* 2008), la contaminación y el cambio climático (Chin *et al.* 2010). Esto es agravado en gran medida por su historia de vida, es decir baja tasa de crecimiento, madurez tardía, y baja fecundidad. Otro hecho por el cual los elasmobranchios han captado tanto interés es por el gran número de nuevas especies que han sido descritas en los últimos 30 años, por lo que hay una gran necesidad de esclarecer la taxonomía, a nivel de especie, en los peces cartilagosos (Naylor *et al.* 2012b).

Producto de la necesidad de una herramienta de identificación completa y fiable, y debido al éxito que tuvo el código de barras de ADN en teleósteos, se creó el proyecto del código de barras de la vida aplicado a peces (*Fish Barcode of Life* o *FishBOL*) el cual es una iniciativa de colaboración internacional, cuyo

principal objetivo es coleccionar los códigos de barras de todos los peces del mundo (Ward *et al.* 2009). *FishBOL* pretende constituir una herramienta útil para responder a problemas taxonómicos, contribuir a la conservación y manejo de los recursos pesqueros mediante la identificación certera del recurso en cuestión y aportar información para la discusión de relaciones filogenéticas e historias de vida de los peces. Por otra parte, esta base de datos está ayudando a llegar a un acuerdo en las diferencias entre los nombres científicos, los de mercado y los nombres comunes a través de las naciones (Hanner *et al.* 2011). En muchas regiones del mundo tiburones y rayas son objeto de consumo masivo, especialmente en países asiáticos, lo que ha traído como consecuencia la captura ilegal de especies para consumo, muchas de ellas no identificadas taxonómicamente y que muchas veces se encuentran protegidas (Ward *et al.* 2008).

Asimismo, estudios sobre la variación genética entre especies marinas cosmopolitas han revelado evidencias de una división genética, lo que sugiere una especiación críptica dentro de varios taxa (Quattro *et al.* 2006). Estudios recientes han descubierto esta tendencia también en elasmobranchios, tales como *Mustelus* sp. (Gardner & Ward 2002), en juveniles de raya *Leucoraja* sp. (Alvarado-Bremer *et al.* 2005), tiburón martillo, *Sphyrna* sp. (Quattro *et al.* 2006) y *Orectolobus* sp. (Corrigan *et al.* 2008). No obstante, siguen habiendo muchos casos de especies de tiburones cosmopolitas en que falta determinar la extensión de la especiación críptica (Quattro *et al.* 2006). Por lo que el descubrimiento de



éste tipo de especies no sólo ayuda a aumentar las estimaciones de biodiversidad, sino que también es útil para la conservación y manejo de las especies (Griffiths *et al.* 2010).

#### **1.4. *Squalus acanthias***

Los escualiformes son un grupo de tiburones, en general, de pequeño a mediano tamaño, principalmente asociados a aguas frías, muy activos y con alta capacidad de dispersión (Musick *et al.* 2004). Se caracterizan por tener dos aletas dorsales las cuales son precedidas por una espina, con algunas excepciones. No poseen aleta anal, ni membrana nictitante, y cuentan con cinco pares de aberturas branquiales ubicadas delante de las aletas pectorales (Ebert & Winton 2010). La familia Squalidae es uno de los grupos de tiburones más problemáticos, taxonómicamente hablando (Ebert *et al.* 2010), e incluye dos géneros, *Cirrhigaleus* y *Squalus*, destacándose este último por la gran dificultad en la identificación de sus especies (Last *et al.* 2007). Este género incluye 8 especies válidas (Compagno *et al.* 2005) y en Chile se ha reportado a *Squalus fernandinus* Molina, 1782, *Squalus blainvillei* Risso, 1826, *Squalus acanthias* Linnaeus, 1758 (Pequeño 1989) y *Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903, aunque la presencia de ésta última es dudosa (Concha *comp pers*).

El tollo de cachos, *Squalus acanthias*, es una especie cosmopolita, con distribución anti tropical, que habita en aguas templadas, inclusive en el Mar

Mediterráneo y Mar Negro (Bigelow & Schroeder 1953, Compagno *et al.* 2005, Veríssimo *et al.* 2010), y que realiza migraciones transoceánicas (Templeman 1976). Se distribuye sobre la plataforma continental, principalmente entre los 100 y 900 m de profundidad (Ketchen 1986). Es una especie vivípara que forma agrupaciones segregadas por tamaño y sexo (Hanchet 1988). Hay registros de hasta 160 cm de longitud total, con talla de nacimiento entre los 18 y 33 cm. La madurez sexual es alcanzada a los 60 cm en machos y a 72 cm en hembras (Avsar 2001). Se alimenta de moluscos, crustáceos y peces (Alonso *et al.* 2002). Además, es utilizado comúnmente en estudios filogenéticos como ejemplar “modelo” en representación de todo el grupo de los elasmobranquios (Naylor *et al.* 2005). Por otra parte, debido a que es uno de los tiburones más abundantes del mundo y por su tendencia a segregarse en base a edad y sexo, es quizás la especie de elasmobranquio más explotada a escala global (Hauser *et al.* 2007, Wong *et al.* 2009). No obstante, producto de su lenta historia de vida, incluyendo largo tiempo de gestación, se espera que sean vulnerables a la sobre pesca y con una baja tasa de recuperación de la población (Hauser *et al.* 2007) por lo que ha sido declarada como especie en sobreexplotación (Fordham 2004) y considerada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, IUCN en inglés) en estado vulnerable (IUCN 2014). Asimismo, Rago *et al.* (1998) determinaron que una gran proporción de su biomasa reproductora se ha agotado. La población del tollo de cachos de la costa Atlántica de Estados Unidos fue declarada en sobreexplotación en 1998, y en el Pacífico Noreste, algunos

stocks se encuentran en niveles críticos (Hauser *et al.* 2007). Se cree que el tollo de cachos del Pacífico puede ser aún más susceptible a la pesca que el del Atlántico, debido a que crecen a una tasa menor, maduran más tarde y son más longevos (White & Last 2012).

En Chile se distribuye desde Arica al Cabo de Hornos y se ha capturado hasta los 1.460 m de profundidad. Forma parte del descarte en las pesquerías de palangre principalmente entre la Región del Bio Bio y la Región de Los Lagos (Lamilla *et al.* 2005). Las capturas de *Squalus acanthias* son registradas como “tollo de cachos” en donde sólo hay registros de los desembarques desde el año 2010 con 99 toneladas de desembarque, 2011 con 108 y 2012 disminuye drásticamente a 14 toneladas (Sernapesca 2012). Cabe destacar que, desde el año 2011, la Ley General de Pesca y Acuicultura N°20.657, Artículo 5° bis, declara que se prohíbe la mutilación de las aletas de cualquier especie de tiburón, acción denominada aleteo o *finning*, a bordo de naves o embarcaciones de pesca o su transbordo, y que será obligatorio realizar el desembarque de las especies antes señaladas con sus aletas total o parcialmente adheridas a su cuerpo en forma natural.

## 1.5. Planteamiento del problema

Durante los últimos años *S. acanthias* ha sido sujeto de controversia debido al descubrimiento de nuevas especies y especies crípticas (Ward *et al.* 2005; Ward *et al.* 2007). Trabajos recientes en genética de poblaciones en esta especie han revelado una estructura geográfica a nivel global intrigante (Hauser *et al.* 2007; Ward *et al.* 2007; Verissimo *et al.* 2010; Pickering 2012). Ward *et al.* (2007), en una investigación del código de barras de ADN con ejemplares del género *Squalus*, encontraron dos grupos distintos dentro de *S. acanthias* muestreados en todo el mundo. Además, a pesar de la similitud morfológica las especies de *Squalus* en el Pacífico sur muestran 4% de divergencia en las secuencias (Ward *et al.* 2005). Ebert *et al.* (2010) resurgieron a *Squalus suckleyi* (Girard 1854) como un miembro válido de este género, que se encuentra limitado al Océano Pacífico Norte. Además el estudio de esta especie es incentivado producto que es un elemento importante de las pesquerías comerciales en todo el mundo. Por lo que si consideramos todo lo antes mencionado, junto a las características biológicas típicas de los condriictios, es urgente un manejo prudente de la pesquería de estos ejemplares, especialmente si se trata de especies crípticas. Es por esto que en este estudio se evaluará la utilidad de la técnica molecular del código de barras de ADN para la identificación de *Squalus acanthias* de aguas interiores del sur de Chile y determinar su identidad taxonómica con respecto a aquellos ejemplares que se considera son de la misma especie, pero de otros océanos y latitudes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Identificar ejemplares, morfológicamente afines a *Squalus acanthias*, de aguas interiores del sur de Chile, mediante el uso de la técnica molecular del código de barras de ADN con el gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa I (COI) y determinar su identidad taxonómica con respecto a aquellos, también secuenciados con el gen mitocondrial COI, encontrados en el Pacífico Nororiental, Mar Mediterráneo, Pacífico Sudoccidental y Atlántico Sudoccidental.

### **2.2. Objetivos específicos**

**2.2.1** Diseñar un cebador específico para *S. acanthias* que permita amplificar total o parcialmente la secuencia del gen mitocondrial COI.

**2.2.2** Amplificar y secuenciar el segmento de COI correspondiente a *S. acanthias*.

**2.2.3** Comparar, mediante herramientas bioinformáticas, las secuencias del gen COI de *S. acanthias* de aguas interiores del sur de Chile con las encontradas en la base de datos de GenBank para ejemplares del Pacífico Nororiental, Mar Mediterráneo, Pacífico Sudoccidental y Atlántico Sudoccidental.

### 3. HIPOTESIS

Si las muestras analizadas en este estudio corresponden a *Squalus acanthias* entonces, mediante su identificación con el código de barras de ADN, se espera que las secuencias analizadas posean un porcentaje de divergencia genética no mayor a un 4% con respecto a las encontradas en el Pacífico Nororiental, Mar Mediterráneo, Pacífico Sudoccidental y Atlántico Sudoccidental.

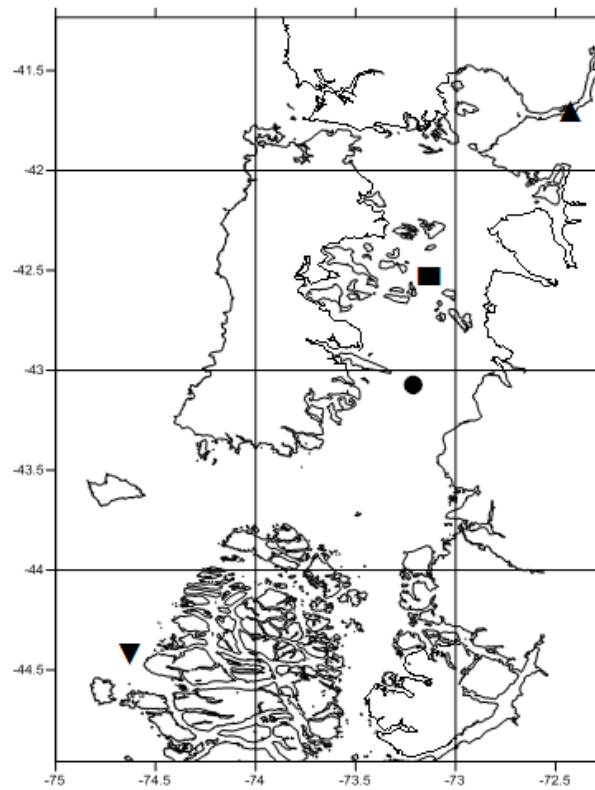
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Obtención de muestras

Los ejemplares de *Squalus acanthias* fueron recolectados mediante pesca con espinel a una profundidad entre 100 y 300 m (Anexo 1). Se extrajo una muestra de tejido muscular de aproximadamente 2 cm. Se analizaron 5 muestras de Cochamó, en el Seno de Reloncaví (Estación 1, 41°44'S;72°59'O), 41 de aguas interiores de Chiloé (Estación 2, 41°39'S; 72°21'O, y 3, 42°57'S;72°53'O), y 10 de las cercanías de la Isla Ipún, Región de Aysén (Estación 4, 44°37'S; 74°46'O) (Fig. 1). Éstas fueron preservadas en 95% etanol y almacenadas a 4°C.

### 4.2. Extracción ADN genómico

El material genético se extrajo a partir de una submuestra de aproximadamente 25 mg de cada individuo. Para la extracción del ADN se utilizó el DNeasy Tissue Kit (QIAGEN Inc.) según protocolo (Anexo 2). Se determinó la concentración del ADN obtenido, con un espectrofotómetro UV/Vis (Optizen POTBIO) a una longitud de onda de 260nm. Para medir el grado de pureza (relación 260nm/280nm) la muestra fue depositada en una celda de cuarzo, utilizando como blanco 450 µL de agua bidestilada. Finalmente cada muestra se almacenó a -20 °C.



**Figura 1.** Mapa geográfico de la estaciones de donde se extrajeron las muestras de *Squalus acanthias*, estación 1 (▲), estación 2 (■), estación 3 (●), estación 4 (▼).

### 4.3. Diseño de cebadores

Se utilizaron dos clases de cebadores. El primero fue un cóctel creado por Ivanova *et al.* (2007), diseñado específicamente para el uso de código de barras de ADN en peces (Tabla 1). El otro fue diseñado en este estudio específicamente para *S. acanthias* a partir de secuencias del gen COI de la especie, obtenidas desde *GenBank* (Tabla 2). Estas secuencias fueron editadas utilizando el software



Bioedit 7.2.0, junto con un software simulador de cebadores *PrimerQuest* en la página web [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com).

Los cebadores fueron sintetizados por IDT-Technologies Chile. Una vez obtenidos los cebadores estos se disolvieron a 100  $\mu$ M, y se prepararon alícuotas de 10  $\mu$ M cada una.

**Tabla 1.** Cóctel de cebadores utilizados para amplificar secuencia COI de *S. acanthias*.

Nombre	Secuencia cebador 5'- 3'	Referencias	Tm (°C) C+G	
VF2	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Ward <i>et al.</i> 2005	60,2	46%
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	Ward <i>et al.</i> 2005	54,5	38%
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	Ward <i>et al.</i> 2005	59,6	46%
FR1	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	Ivanova <i>et al.</i> 2007	61,0	42%

**Tabla 2.** Códigos de las secuencias COI obtenidas desde GenBank y utilizadas para diseñar los cebadores en este estudio.

Código	Secuencia	Referencia
KC015930		McCusker <i>et al.</i> 2013
KC015929		McCusker <i>et al.</i> 2013
KC015928		McCusker <i>et al.</i> 2013
FJ519593		Wong <i>et al.</i> 2009
FJ519589		Wong <i>et al.</i> 2009
FJ519590		Wong <i>et al.</i> 2009
EF539291		Ward <i>et al.</i> 2007
EF539290		Ward <i>et al.</i> 2007
EF539289		Ward <i>et al.</i> 2007

#### **4.4. Amplificación del marcador molecular**

Se amplificó la secuencia del gen COI de todas las muestras a través de PCR con las dos clases de cebadores con un volumen final de 50  $\mu$ L, siguiendo el protocolo del Kit *Taq* DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen) (Anexo 2). Para cada muestra se utilizó un tubo de microcentrifuga de 0,5 mL.

Las condiciones de PCR fueron establecidas en el termociclador *Axygen Maxigene*, para las muestras con el cóctel de cebadores (Tabla 3) y para las muestras con los cebadores SA (Tabla 4). Una vez finalizado el PCR se guardaron las muestras a 4(°C). Cabe destacar que en cada PCR se agregó una muestra control, a la cual en lugar de agregar ADN se colocó agua, para verificar si existe ADN contaminante en los reactivos que conforman el mix de PCR.

Para verificar el tamaño correspondiente a los productos de PCR se preparó un gel de agarosa (1,5%). Para la elaboración de éste se vierte 1.5 g de Sucralosa en 150 mL de Buffer TBE (0,5X), en el porta gel junto con el peine. Una vez gelificado se coloca dentro de la cámara de electroforesis horizontal, sobre una solución Buffer TBE. En cada bolsillo del gel se cargaron 5  $\mu$ L del producto de PCR junto con 2  $\mu$ L de Buffer de carga, previamente homogeneizados. En los bolsillos de los extremos se cargaron 6  $\mu$ L de solución marcadora (compuesta por 1  $\mu$ L de Loading Buffer 6x, 1  $\mu$ L 1 Kb DNA Ladder y 4  $\mu$ L Agua Desionizada). La cámara de electroforesis se conecta a una fuente de poder programada a 100 Volt durante 90 minutos. Se visualiza con Gel Red

(Invitrogen®) en un transiluminador (Vilber Lourmat ECX-F20-M) y fotografiado con un equipo de fotodocumentación Doc-iT (UVP).

**Tabla 3.** Condiciones de PCR para las muestras con el cóctel de cebadores.

	Etapa 1 (1 ciclo)		Etapa 2 (35 ciclos)		Etapa 3 (1 ciclo)	Etapa 4 (∞)
Temperatura (°C)	94,0	94,0	56,0	72,0	72,0	4
Tiempo	3 min	45 seg	30 seg	51 seg	10 min	∞

**Tabla 4.** Condiciones de PCR para las muestras con los primers SA.

	Etapa 1 (1 ciclo)		Etapa 2 (35 ciclos)		Etapa 3 (1 ciclo)	Etapa 4 (∞)
Temperatura (°C)	94,0	94,0	54,5	72,0	72,0	4
Tiempo	3 min	45 seg	30 seg	45 seg	10 min	∞

Una vez revelado el Gel, de cada muestra analizada, se eligieron los cebadores adecuados, entre el cóctel de cebadores y el cebador SA.

#### 4.5. Purificación de las secuencias

Se purificaron aquellas secuencias que amplificaron más nítidamente con el kit de purificación de productos de PCR (EZNA® Cycle-Pure Kit N° D6493-01), siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 3).

#### **4.6. Secuenciación de los marcadores**

Las muestras purificadas fueron secuenciadas en MacroGen® en Corea (Anexo 4). Una vez secuenciadas, se analizaron a través del programa Bioedit V5.0.6, el cual permitió editar y manipular las secuencias nucleotídicas. Se eliminaron los extremos de todas las secuencias, descartando los GAPs presentes, y se identificaron las bases que podían corresponder a un error de síntesis de la enzima TaqPolimerasa, de aquellas que efectivamente representaban un polimorfismo entre las secuencias.

#### **4.7. Edición y análisis de las secuencias**

Se descargaron todas las secuencias existentes en la base de datos de GenBank NCBI, del gen COI de *Squalus acanthias* (Anexo 5), junto con secuencias de especies hermanas como *Cirrhigaleus barbifer*, *Cirrhigaleus australis*, *Cirrhigaleus asper*, *Squalus mitsukuri*, *Squalus albifrons*, *Squalus suckleyi*, *Squalus megalops*, *Squalus japonicus*, *Squalus edmundsi*, *Squalus brevirostris*, *Squalus blainvillei* (Anexo 6). Éstas, junto con la secuencia obtenida en este estudio fueron editadas manualmente en Bioedit v7.0.9 (Hall 1999) y alineados en ClustalW (Larkin *et al.* 2007).

La comparación entre la secuencia obtenida en este estudio y las obtenidas en *GenBank* se realizó en términos de la variabilidad haplotípica, divergencias en

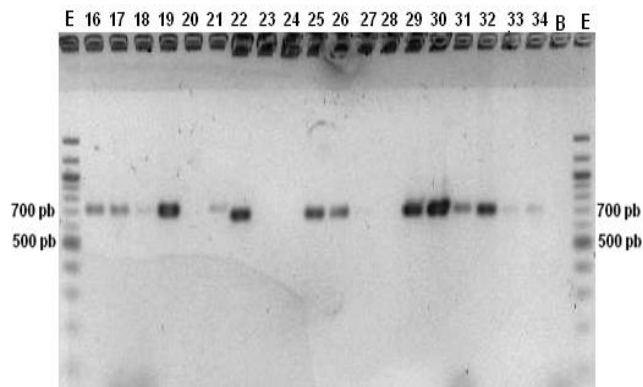
las distancias genéticas correspondientes y sustituciones entre las secuencias utilizando el software DNA sequence polymorphism (DNAsp 5) (Librado & Rozas 2009). Con cada uno de los haplotipos encontrados se calculó la composición nucleotídica promedio, el dendrograma de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), para representar las distancias genéticas, y las distancias métricas usando el modelo biparamétrico de Kimura (K2P) (Nei & Kumar 2000) mediante el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5 (MEGA5) (Tamura *et al.* 2011), teniendo en cuenta una prueba de bootstrap (1000 réplicas) para soportar las agrupaciones inferidas y el modelo p-distance (Nei & Kumar, 2000), el cual se basa en la cantidad de diferencias de bases por sitio. Con el objetivo de probar la eficiencia del método para diferenciar entre especies se realizó un dendrograma bajo las mismas condiciones pero con secuencias del gen COI de especies de la familia Squalidae.

## 5. RESULTADOS

Al cebador específico para *Squalus acanthias*, diseñado en este estudio, se le denominó SA (Tabla 5). Las bandas de amplificación obtenidas en geles de agarosa mediante el cebador SA y el cóctel de cebadores corrieron a un mismo nivel, entre los 600 y 700 pares de bases (Fig. 2). No obstante, no todas las muestras amplificaron exitosamente con ambos cebadores. Hubo algunas que amplificaron con un solo cebador y muestras que no amplificaron con ninguno de ellos. Por lo que sólo 32 muestras, de un total de 56, fueron enviadas a secuenciar, 15 (47%) utilizando el cóctel de cebadores y 17 (53%) con el cebador SA (Anexo 4).

**Tabla 5.** Cebador SA utilizado para amplificar secuencia COI de *S. acanthias*.

Nombre	Secuencia cebador 5'- 3'	Tm (°C) C+G	
SAF	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	58,7	50%
SAR	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	60,2	50%



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR desde la muestra 16 a la 34 con el Coctel de cebadores. E: escalera de peso molecular, B: blanco.

Aquellas muestras secuenciadas con el cóctel de cebadores, alcanzaron una longitud promedio de 664 pares de bases, excepto la muestra número 5 que no secuenció completamente con ninguno de los cebadores del cóctel. De las 15 muestras secuenciadas con el cebador VF2, 10 no secuenciaron completamente. Con respecto a las muestras secuenciadas con los cebadores SA, las 17 muestras fueron secuenciadas completamente, con una longitud promedio de 621 pares de bases.

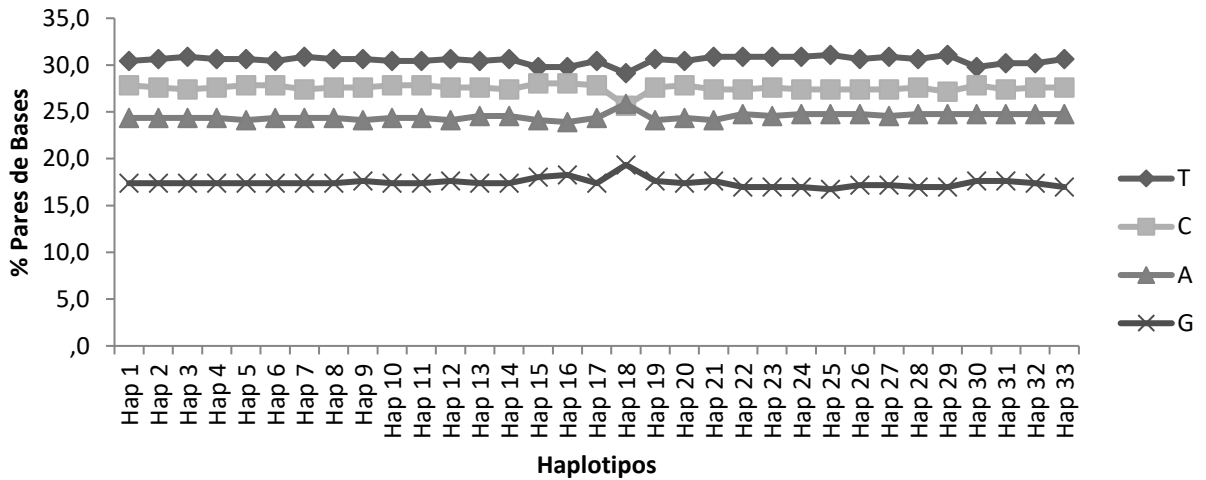
Tras la edición de las secuencias se encontró un único haplotipo con una longitud de 553 pares de bases, ubicado entre la posición 5528 y 6081 del genoma mitocondrial completo de *S. acanthias*. La secuencia mostró un alto contenido de A+T (58,04%) en relación con el contenido G+C (41,96%). El

porcentaje de la cantidad individual de nucleótidos fue: A = 25,7%, G = 15,1%, C = 25,9%, T = 33,3%.

Al alinear la secuencia obtenida en este estudio con las obtenidas de *Genbank*, se encontró que existían 33 haplotipos distintos. En donde la secuencia obtenida en este estudio, se encuentra dentro del haplotipo 22. Se observó que la composición nucleotídica entre ellos es muy similar, excepto en el haplotipo 18, el cual sufre un aumento de guanina y adenina, y una disminución de timina y citosina. La relación entre A+T en los 33 haplotipos es mayor a C+G (Fig 3).

Las distancias genéticas (K2P) calculadas para los haplotipos de *S. acanthias* por localidades fueron variables (Tabla 6). En la matriz se pueden observar claramente dos subgrupos. El primero, desde el haplotipo 1 al 21, los cuales poseen una distancia genética entre 0 y  $2\% \pm 0,01$ , a excepción del haplotipo 18 que posee diferencias entre 29 y  $30\% \pm 0,03$ , y los haplotipos 15 y 16 que poseen de  $9\% \pm 0,01$  a  $10\% \pm 0,02$ , con los haplotipos del mismo subgrupo. Por otro lado, en el segundo subgrupo, los haplotipos desde el 22 al 33, poseen una distancia genética entre 0 y  $1\% \pm 0,01$ , a excepción de los haplotipos 30-31-32, que poseen  $9\% \pm 0,02$  de diferencia con los haplotipos del mismo subgrupo. En cambio, entre los haplotipos de ambos subgrupos se observan diferencias desde un  $31\% \pm 0,03$  a  $56\% \pm 0,05$ .





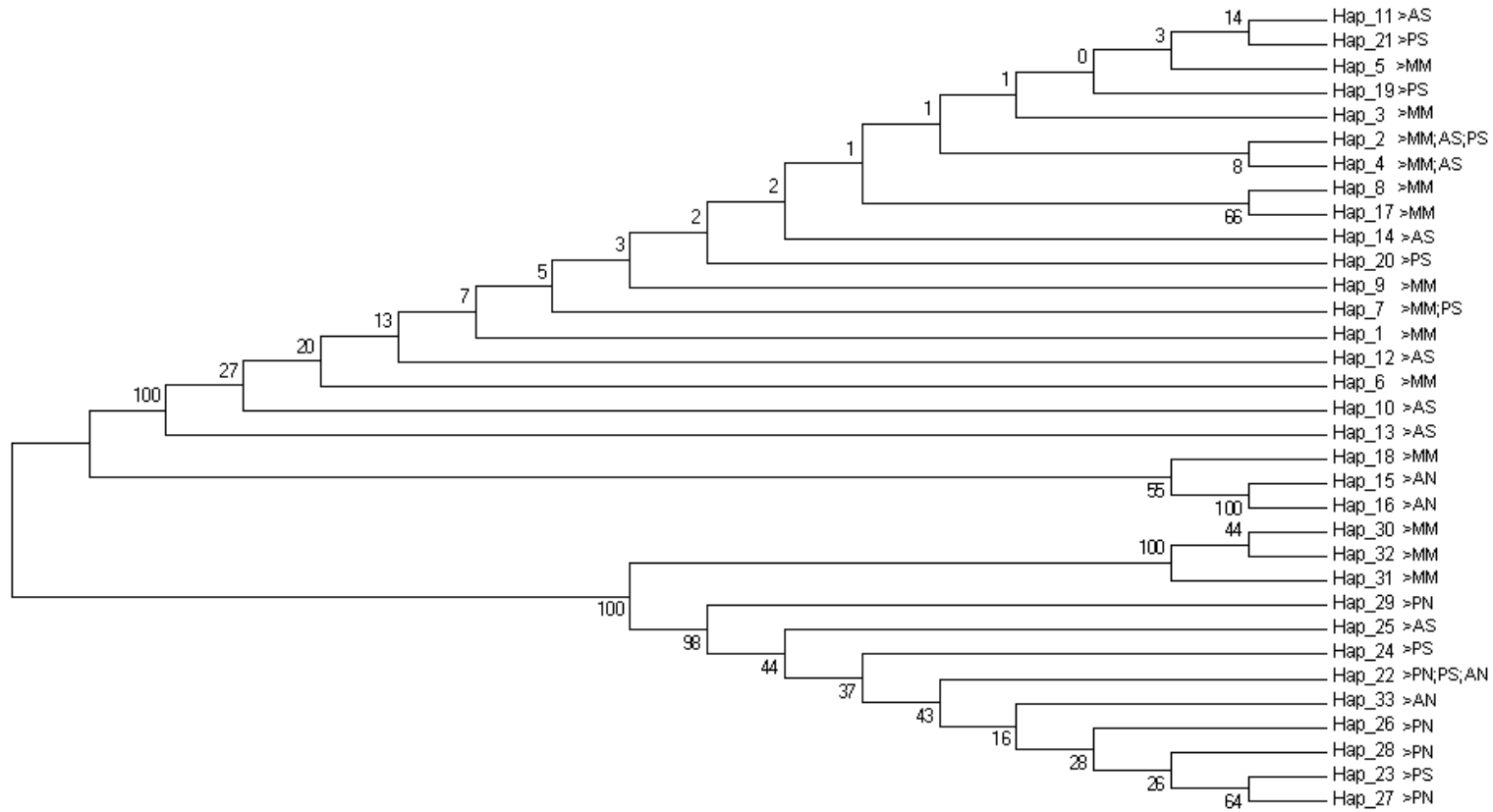
**Figura 3.** Porcentaje de la abundancia de las bases nitrogenadas de los haplotipos obtenidos.

La historia evolutiva entre los 33 haplotipos, inferida a través del método *Neighbor-Joining* (Fig 4), permitió agrupar y diferenciar los haplotipos de *S. acanthias* de distintas partes del mundo. Posee una suma de la longitud de las ramas de 1,175. En él, se puede observar que la secuencia obtenida en este estudio (haplotipo 22) se encuentra agrupada con secuencias provenientes de Australia, Atlántico Norte y Pacífico Norte. Sin embargo, secuencias provenientes de estos mismos lugares se agruparon dentro de otros haplotipos, es decir, secuencias provenientes de un mismo lugar resultaron agruparse en más de un haplotipo. No obstante, se logran observar dos clados distintos, uno con haplotipos del Pacífico Sur, Mar Mediterráneo y Atlántico y el otro con haplotipos del Pacífico Norte, Pacífico Sur, Atlántico y Mar Mediterráneo. Es en éste último

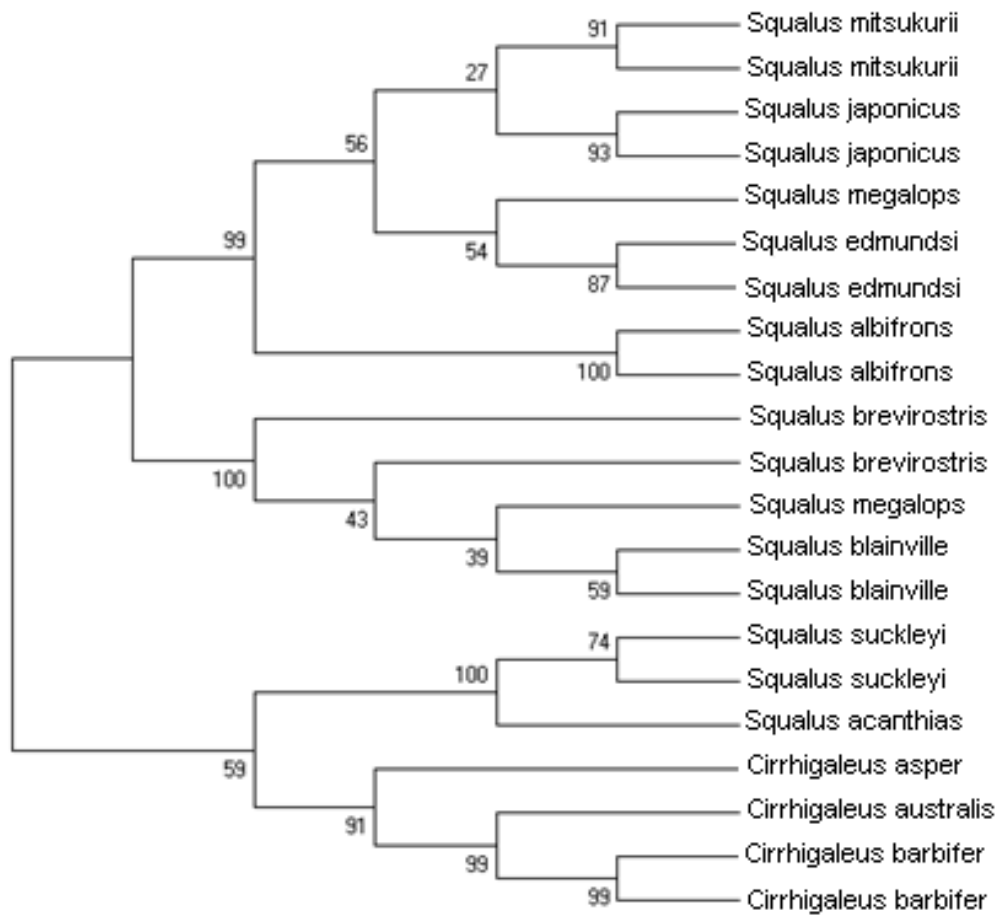
clado en donde se posicionó el haplotipo obtenido en este estudio. Por otra parte, en el dendrograma de la figura 5, cada especie de la familia *Squalidae* se agrupó dentro de un mismo clado.

**Tabla 6.** Estimación de la divergencia evolutiva entre las secuencias con el modelo Kimura 2-parameter. Bajo la diagonal, se muestra el número de diferencias de bases nitrogenadas entre cada una de las secuencias. Por encima de la diagonal se muestra la estimación del error estándar a partir de 1000 repeticiones. Se analizaron 33 haplotipos con un total de 460 bases nitrogenadas. Análisis evolutivo se llevó a cabo en el software MEGA5.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33		
H1		0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	
H2	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H3	0,01	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H4	0,01	0,00	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H5	0,01	0,00	0,00	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H6	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H7	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H8	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H9	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H10	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H11	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H12	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H13	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01		0,01	0,02	0,02	0,00	0,03	0,01	0,00	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H14	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
H15	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10		0,00	0,02	0,03	0,02	0,01	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04
H16	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,00		0,02	0,03	0,02	0,01	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04
H17	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,10	0,10		0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	
H18	0,30	0,29	0,29	0,30	0,29	0,29	0,30	0,29	0,29	0,30	0,29	0,29	0,30	0,29	0,29	0,29	0,29		0,03	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
H19	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,10	0,10	0,00		0,29		0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	
H20	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,09	0,09	0,00	0,29			0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	
H21	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,10	0,10	0,01	0,30	0,01	0,01		0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	
H22	0,32	0,31	0,31	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,41	0,41	0,31	0,56	0,31	0,31	0,32		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	
H23	0,32	0,31	0,32	0,32	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,32	0,42	0,42	0,32	0,56	0,32	0,32	0,32	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	
H24	0,32	0,31	0,31	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,41	0,41	0,31	0,56	0,31	0,31	0,32	0,00	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	
H25	0,32	0,31	0,31	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,41	0,41	0,31	0,55	0,31	0,31	0,32	0,00	0,01	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	
H26	0,32	0,31	0,32	0,32	0,32	0,31	0,31	0,32	0,32	0,32	0,31	0,31	0,31	0,32	0,42	0,42	0,32	0,55	0,32	0,32	0,32	0,00	0,00	0,01	0,01		0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	
H27	0,32	0,31	0,32	0,32	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32	0,32	0,31	0,31	0,31	0,32	0,42	0,42	0,32	0,56	0,32	0,32	0,32	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00		0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
H28	0,32	0,31	0,32	0,32	0,32	0,31	0,31	0,32	0,32	0,32	0,31	0,31	0,31	0,32	0,42	0,42	0,32	0,55	0,32	0,32	0,32	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00		0,00	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	
H29	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,30	0,30	0,31	0,31	0,31	0,31	0,30	0,31	0,31	0,41	0,41	0,31	0,55	0,31	0,31	0,31	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00		0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	
H30	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,37	0,37	0,38	0,38	0,37	0,38	0,37	0,37	0,38	0,31	0,31	0,38	0,54	0,38	0,38	0,38	0,09	0,09	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09		0,00	0,00	0,02	0,00	
H31	0,38	0,37	0,38	0,38	0,38	0,37	0,37	0,38	0,38	0,37	0,37	0,37	0,36	0,38	0,32	0,32	0,38	0,54	0,38	0,37	0,38	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09		0,00	0,01	0,00	
H32	0,38	0,37	0,38	0,38	0,38	0,37	0,37	0,38	0,38	0,37	0,37	0,37	0,36	0,38	0,32	0,32	0,38	0,54	0,38	0,37	0,38	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,00	0,00	
H33	0,32	0,31	0,31	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,41	0,41	0,31	0,56	0,31	0,31	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	



**Figura 4.** Historia evolutiva entre los haplotipos a través del método *Neighbor-Joining* con 1000 repeticiones. Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles replicados en que los taxa asociados permanecen agrupados. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de p-distance. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA5. MM: Mar Mediterraneo; AS: Atlántico Sur; PS: Pacífico Sur; PN: Pacífico Norte; AN: Atlántico Norte.



**Figura 5.** Historia evolutiva entre 12 especies de la familia Squalidae a través del método *Neighbor-Joining* con 1000 repeticiones. Todos los gaps y datos perdidos fueron eliminados. Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles replicados en que los taxones asociados permanecen agrupados. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el modelo p-distance en el software MEGA5.

## 6. DISCUSIÓN

La identificación de especies se establece como una de las principales etapas para cualquier estudio sobre biodiversidad, en especial frente a los actuales cambios globales y sus repercusiones (Monaghan *et al.* 2005). Para esto se requiere un amplio conocimiento taxonómico en los diferentes grupos de organismos (Bickford *et al.* 2006). Existen distintos métodos por los cuales es posible identificar a las especies. En condrictios los métodos más utilizados son la morfología externa (Lamilla & Sáez 2003), y la morfología de los claspers (McEachran 1982). Hoy en día, existe el código de barras de ADN, una herramienta rápida y eficiente, para identificar especies a través del uso de una región estandarizada de ADN mitocondrial (Hajibabaei *et al.* 2007). Esta técnica ha sido descrita como una importante alternativa y complemento a los estudios morfológicos tradicionales (Holmes *et al.* 2009).

### 6.1. Secuenciación

Las muestras analizadas resultaron tener una longitud final de 553 pb. A pesar de que Hebert *et al.* 2003, indicaron que una secuencia debe tener un largo de 650 pb para llamarse código de barra, Frezal & Leblois (2008) mencionan que uno de los criterios básicos del código de barras de ADN es que la secuencia debe tener una longitud mínima de 500 pb. Sin embargo, se habla de una longitud mínima de tal modo que se asegure una lectura fiable de la secuencia en las plataformas de secuenciación convencionales. Holmes *et al.*

(2009) señalan que una secuencia de menor longitud, de igual forma servirá para diferenciar especies, debido a que en secuencias conservativas, como es el caso del gen COI, cualquier cambio es significativo, ya sea de un par de mutaciones o a partir de polimorfismos. Así también, Hajibabaei *et al.* (2007) cortaron una región de 650 pb del código de barras en secuencias cortas (109 y 218 pb) y compararon la habilidad de cada segmento para identificar a especímenes, concluyendo que estos mini códigos tienen suficiente variación y divergencia en la secuencia para dar la misma información que una secuencia completa. Por lo que no se puede predecir la longitud de la secuencia que debe ser analizada para asegurar el diagnóstico de la especie, ya que las tasas de evolución molecular varían entre diferentes segmentos del genoma y a través de los taxa (Hebert *et al.* 2003).

## **6.2. Análisis de las secuencias**

Los resultados obtenidos indican que el gen mitocondrial COI permitió discriminar exitosamente las secuencias de *S. acanthias* del sur de Chile. Además, las 32 muestras secuenciadas resultaron pertenecer a un único haplotipo. Asimismo, al confeccionar el dendrograma con ejemplares de la familia Squalidae, este método diferenció correctamente entre una especie y otra.

En la visualización de las distancias genéticas entre el haplotipo obtenido en este estudio y los disponibles desde *GenBank* (Tabla 6), se observan dos subgrupos, con diferencias entre  $31\% \pm 0,03$  a  $56\% \pm 0,05$  entre los haplotipos de

un subgrupo y otro, y de 0 a 2%±0,01 entre los haplotipos del mismo subgrupo. Exceptuando los haplotipos 15, 16, 18, 30, 31 y 32, que poseen entre 9 y 30% de diferencia con los haplotipos del mismo subgrupo. No obstante, cada uno de estos haplotipos está conformado por una sola secuencia (Anexo 5), por lo que puede corresponder a un error de la base de datos de *GenBank* producto de especímenes mal identificados (White & Last 2012). La gran diferencia entre los haplotipos analizados podría ser producto de una subespecie de *S. acanthias*, sin embargo, se requiere la obtención de mayor información a través de un análisis con múltiples marcadores genéticos para poder corroborarlo. En estudios previos, las estimaciones de divergencia en poblaciones de tiburones van desde 0,03 - 0,12% en *Rhizoprionodon terraenovae* (Heist *et al.* 1996), 0,21% en *Carcharhinus limbatus* (Keeney *et al.* 2005), y a 4% en *Carcharodon carcharias* (Pardini *et al.* 2001). La divergencia en especies crípticas se extiende desde 5,6 hasta 7,5% y 7,8 a 24,3% en las especies conocidas de tiburón martillo (*Sphyrna* sp.) (Quattro *et al.* 2006; Pinhal *et al.* 2012). En cuanto a la divergencia genética encontrada dentro del género *Squalus*, Ebert *et al.* (2010) obtuvieron un 17,6% en *S. acanthias* y de 10,9% en *S. suckleyi*, y Ward *et al.* (2005) encontraron que, a pesar de la similitud morfológica, las especies de *Squalus* en el Pacífico sur muestran 4% de divergencia.

En el dendrograma de *Neighbor-Joining* (vecinos más cercanos) (Fig. 5), al comparar el haplotipo obtenido junto con secuencias provenientes de otros lugares del mundo, se logra observar dos clados distintos (Fig. 5). El primero compuesto por haplotipos del Pacífico Norte, Pacífico Sur, Mar Mediterráneo y



Atlántico y un segundo sólo con haplotipos de las últimas 3 localidades. No se evidenció estructura geográfica dentro de los dos clados del árbol, ni tampoco se registraron haplotipos únicos por localidad, lo que puede indicar que los haplotipos poseen una baja segregación entre sí. Algo similar fue observado por Hauser *et al.* (2007) quienes lograron observar dos clados distintivos, uno del Pacífico Norte y otro del Pacífico Sur y el Atlántico. La separación de estos dos clados puede ser producto de las marcadas diferencias de la historia de vida entre los ejemplares del Pacífico Norte con los ejemplares de Pacífico Sur y Atlántico y, por lo tanto, sugieren una división genética de *S. acanthias*. Sin embargo, no se puede asegurar que si este nivel de diferenciación justifica el estatus de especies distintas de los dos clados (Hauser *et al.* 2007).

Ebert *et al.* (2010) demuestran que la razón de las diferencias en la historia de vida, entre las poblaciones de *S. acanthias* del Pacífico Norte con las poblaciones occidentales del Océano Atlántico, es que están involucradas dos especies diferentes. Por lo que merecen el estatus de segmentos distintos para su manejo pesquero, ya que independientemente de las diferencias genéticas, las diferencias en la historia de vida, constituyen una base sólida para separar las unidades de manejo (White & Last 2012).

Los resultados en este estudio son consistentes con las recientes propuestas de la taxonomía en las especies de *Squalus* (Hauser *et al.* 2007; Ward *et al.* 2007; Verissimo *et al.* 2010; Ebert *et al.* 2010; Naylor *et al.* 2012a; Pickering 2012). Los ejemplares del sur de Chile representan una población de *Squalus acanthias*, ya

que las muestras analizadas se agruparon junto con otros ejemplares de *S. acanthias* de otras localidades. La gran similitud que hay entre las secuencias de distintas localidades, sugiere que el flujo de genes entre los individuos de estas regiones continúa ocurriendo, o al menos ocurrió, recientemente (Pickering 2012). Verissimo *et al.* (2010), establecen que los niveles de diferenciación genética intraespecífica en elasmobranquios parecen estar altamente correlacionados con la habilidad de dispersión, es decir, entre mayor sea la habilidad de dispersión, menor es la diferenciación genética.

### **6.3. Código de barras de ADN**

El código de barras de ADN ha sido fuertemente criticado desde una perspectiva teórica y práctica. Una de las mayores críticas, es que sólo utiliza la secuencia de un gen como principal elemento para identificar especies (Moritz & Cicero 2004). Así también, la hibridación y la introgresión de especies puede representar un problema para los estudios de este tipo, pues al ser de origen uniparental hace que cualquier pez híbrido sea erróneamente diagnosticado (Ward *et al.* 2009, White & Last 2012). Los estudios de códigos de barras más tempranos recibieron críticas debido a su limitada amplitud taxonómica y geográfica. Sin embargo, estudios más recientes han abordado estas cuestiones incluyendo especies estrechamente relacionadas y el análisis exhaustivo de todas las especies en un conjunto taxonómico (Hajibabaei *et al.* 2007).

Una de las ventajas del uso del gen COI para el código de barras de ADN es que es un gen altamente conservativo (Moritz & Cicero 2004). Además, la alta tasa de evolución a nivel de secuencias de nucleótidos, su prácticamente nula recombinación y gran variación intraespecífica, convierten al ADN mitocondrial en una molécula particularmente ventajosa para análisis filogeográficos a nivel intrapoblacional (Carraza 2002). Además, hay evidencia de que en tiburones, los genes mitocondriales evolucionan más lento que en mamíferos, lo que significa que poseen menos variaciones intra e interespecíficas. Es por esto que la mayoría de los estudios de genética de poblaciones y sistemática en elasmobranquios han utilizado datos de ADN mitocondrial (Heist 2004).

Otro gen mitocondrial altamente utilizado en elasmobranquios es el NADH<sub>2</sub>. Un gen más grande (650 vs 1.044pb) y que evoluciona ligeramente más rápido que el gen COI (White & Last 2012). Naylor *et al.* (2012a) estudiaron más de 4.000 secuencias de dicho gen, en donde reveló nuevas especies crípticas y nuevos casos de especies taxonómicamente complejas. Si bien los resultados NADH<sub>2</sub> eran generalmente consistentes con los resultados COI, el gen NADH<sub>2</sub> proporcionó cierta discriminación entre grupos que el gen COI no logró discriminar. Así, Naylor *et al.* (2012a) determinaron que los datos de NADH<sub>2</sub> serán generalmente más capaces de distinguir especies hermanas de elasmobranquios recientemente evolucionados que el gen COI. Sin embargo, este fragmento fue seleccionado debido a su utilidad en una amplia gama de eucariotas, en lugar de un grupo en particular, y al ser el marcador molecular utilizado en BOLD, ha permitido la expansión del uso del gen COI como marcador genético para la

identificación de especies (Hebert *et al.* 2003). Esto ha permitido además tener acceso a una gran base de datos con secuencias de distintas partes del mundo (Becker *et al.* 2011).

El proyecto código de código de barras de ADN no tiene la ambición de construir el árbol de la vida, sino más bien busca producir una herramienta de diagnóstico simple basado en un sólido conocimiento taxonómico recopilado en la biblioteca de referencia de BOLD (Frezal & Leblois 2008). Las secuencias cortas de ADN no tienen suficiente información para construir filogenias moleculares fiables o definir nuevas especies, pero pueden proporcionar etiquetas de secuencias para la resolución taxonómica en muestras desconocidas y proporcionar una visión anticipada de los patrones de diversidad genómica dentro de una especie. El hecho de que los códigos de barras se dirigen a un gran número de especies, lo hace una poderosa herramienta para facilitar los estudios comparativos de la diversidad genética en las diferentes especies o entornos ecológicos. Por lo tanto, pueden contribuir a investigaciones taxonómicas, genética de poblaciones y filogenia. En taxonomía, los códigos de barras de ADN pueden utilizarse para la identificación rutinaria de muestras; y destacar especímenes atípicos para una futura investigación taxonómica. En estudios filogenéticos puede ser un punto de partida para la selección óptima de los taxa, y las secuencias pueden ser añadidas a la base de datos para futuros análisis filogenéticos. En investigaciones de genética poblacional pueden proporcionar una primera señal de la magnitud y la naturaleza de las divergencias en la población (Hajibabaei *et*

*al.2007*). Es por esto que se recomienda que el código de barras de ADN sea complementado con genes nucleares (*Elias et al. 2007*). El problema del ADN nuclear es que la mayoría de los loci evolucionan muy lento para que sean útiles para distinguir entre especies estrechamente relacionadas o tienen abundantes intrones. Por lo que el desafío es encontrar una región de ADN nuclear de unos 600-1000 pb, sin intrones y con una tasa de evolución lo suficientemente rápida para distinguir especies cercanas (*Desmahapatra & Mallet 2009*). Los marcadores nucleares que han sido utilizados en estudios de elasmobranchios son los espaciadores internos transcritos del ribosoma (ITS), microsatélites, y genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (*Keeney et al. 2005*).

Por lo tanto, para determinar la pertinencia de este método, se deben determinar primero las condiciones límites (*Elias et al. 2007*). Estos análisis necesitan ser taxonómicamente amplios y deben extenderse más allá de una región geográfica, para así garantizar que los potenciales taxa hermanos sean evaluados y puedan ser discriminados. *Johnson & Cicero (2004)* demostraron que al incluir especies hermanas, los resultados contrastan fuertemente con aquellos estudios que no las incluyeron. Además, una correcta diagnosis depende de que las variaciones intraespecíficas sean menores que aquellas entre especies y, de esta forma, una secuencia corta de ADN permitirá la asignación precisa de un individuo a un taxón descrito. Estudios en filogeografía con ADN mitocondrial indican que esta condición a menudo se mantiene, pero hay excepciones, por lo que dichas identificaciones deben acompañarse de datos de confianza, como

apoyo en análisis filogenéticos, además de advertencias de cómo fueron tomados los datos (Moritz & Cicero 2004). El uso de la genética debe ser un componente activo en las investigaciones taxonómicas. Sin embargo, no debe ser la única fuente de información (De Salle *et al.* 2005, Simpfendorfer *et al.* 2011). La taxonomía clásica y las herramientas moleculares deben trabajar en conjunto para asegurar la viabilidad a largo plazo de estos métodos y para que en el futuro se reduzca la incorporación de errores en los datos. Por lo que estos métodos deben ser considerados sólo como parte de un conjunto de herramientas necesarias para investigar la biodiversidad (Naylor *et al.* 2012a).

En ocasiones, se han incluido muestras de secuencias mal identificadas en resultados publicados de *GenBank*, los cuales pueden haber sido utilizados en publicaciones sin una aclaración adecuada de su identidad (Meyer & Paulay 2005). La base de datos Fish-BOL se ha expandido rápidamente en los últimos años, y aún así incluye un control de calidad en la identificación taxonómica de una especie en particular o de grupo de especies (Becker *et al.* 2011). Además, han promovido fuertemente el uso de especímenes de comprobación, y el siguiente paso debe ser la introducción de los niveles de confianza de identificación para que los usuarios puedan evaluar la calidad de las identificaciones de las secuencias utilizadas (White & Last 2012).

Es así como la tasa de éxito del código de barras de ADN puede variar entre especies. En algunos taxa y ecosistemas es más probable que sean objeto de

dificultad, particularmente en aquellos grupos en que la tasa de especiación reciente es alta (Elias *et al.* 2007).

#### **6.4. Sobre la metodología**

El cebador SA, diseñado en este estudio, logró secuenciar parcialmente el gen COI con una longitud promedio de 621 pb. Además, resultó tener similar efectividad (53 vs 47%) comparado con el coctel creado por Ivanova *et al.* (2007). Es más, de las 15 muestras secuenciadas con el cebador VF2 del coctel, 10 no secuenciaron completamente, lo que puede ser debido a que dicho cebador era poco específico para las muestras de este estudio. Por lo que en futuros estudios, la decisión de utilizar el coctel de cebadores dependerá del objetivo de los mismos, ya que, para especies desconocidas, el cóctel diseñado por Ivanova *et al.* (2007) identifica más de una especie en particular. En cambio, sabiendo que se estudiará a *Squalus acanthias* se puede usar el cebador creado en este estudio, que permitió amplificar exitosamente el 53% de las secuencias del gen mitocondrial COI.

Cabe destacar que una parte importante de la metodología es procurar no crear falsos positivos. Esto se logra considerando más de dos ejemplares por especie, y tomando en cuenta que el área geográfica de muestreo no sea restringida (Meyer & Paulay 2005, Desmahapatra & Mallet 2009). Este estudio cumplió con ambos requisitos para que la técnica sea considerada precisa, pues

se consideró un total de 32 ejemplares, y se consideraron secuencias provenientes de distintas partes del mundo.

Estudios previos sugieren que los métodos de distancia no sean utilizados en los códigos de barras de ADN, ya que es una medida fenotípica que es incompatible con las técnicas de diagnóstico basadas en caracteres (De Salle *et al.* 2005). Pocos estudios de códigos de barras se centran en un enfoque de diagnóstico basado en caracteres, demostrando una resistencia a la adopción de nuevas metodologías por la comunidad de código de barras (Taylor & Harris 2012).

x

## **6.5. El papel de las técnicas moleculares en la conservación de condriactios**

Ha sido difícil, para científicos enfocados en el manejo y conservación de pesquerías de tiburones, la identificación taxonómica de los desembarques (Wong *et al.* 2009). Algunos grupos taxonómicos difíciles de identificar, independientemente de la experiencia del observador científico. En este sentido, los análisis moleculares desempeñan un papel importante en identificación de especies (Tillett *et al.* 2012). Dayrat (2005) expresa que la identificación taxonómica de las especies es crucial para el descubrimiento de la biodiversidad, ya que determina si los diferentes organismos son miembros de la misma entidad o no. El importante papel que posee la taxonomía en condriactios para la gestión de la conservación se ha destacado con nuevas descripciones de especies y por



la resolución taxonómica de un gran número de especies amenazadas (Frezal & Leblois 2008).

Los métodos moleculares se han convertido, y seguirán siendo, herramientas muy importantes en la taxonomía (Ward *et al.* 2009). La capacidad del código de barras de ADN para asignar especies, ya sean ejemplares enteros o una porción de ellos, tiene implicancias importantes en el comercio de pescados, en el manejo de las pesquerías, en la conservación de peces, y la investigación pesquera y acuática en general (Ward *et al.* 2009). Estos métodos moleculares han proporcionado una herramienta útil para los taxónomos y han demostrado ser de gran ayuda también en la identificación de especies complejas y especies crípticas (White & Last 2012).

Tener colecciones de especímenes, como es el caso de *Fish BOLD*, permite la determinación precisa de dónde se encontró alguna vez cierta especie en comparación con nuevos registros. Dado el actual estado de amenaza en las especies de condriictios, las colecciones de ejemplares seguirán siendo importantes para la comprensión y la validación de las distribuciones históricas de especies (Last *et al.* 2011, White & Last 2012).

La conciencia cada vez mayor del papel de los condriictios como depredadores tope en los ecosistemas marinos y la concientización de que se encuentran entre los organismos marinos más vulnerables, han jugado un papel importante para su protección (White & Last 2012). Investigaciones han proporcionado fuertes evidencias de que muchas especies de peces

cartilagosos se encuentran en alto riesgo de extinción (Baum *et al.* 2003) y una gran proporción de estas especies fueron enlistadas por la IUCN como “datos deficientes” debido a la falta de conocimientos científicos de las especies. La pérdida de las poblaciones de tiburones puede dar lugar a cambios sustanciales en los ecosistemas, afectando así a otros organismos, a las industrias y las comunidades humanas que dependen de ellas (Doukakis *et al.* 2011; Simpfendorfer *et al.* 2011).

## 7. CONCLUSIONES

7.1. Se logró identificar exitosamente a ejemplares de *Squalus acanthias* del sur de Chile a través del código de barras de ADN, utilizando como marcador molecular el gen COI.

7.2. A partir del cebador SA, diseñado en este estudio, se logró secuenciar parcialmente el gen COI de *S. acanthias* con una longitud promedio de 621 pb.

7.3. No se acepta la hipótesis de este estudio pues, en ciertos casos, las divergencias genéticas, entre las muestras analizadas y otras de *GenBank*, fueron mayores a un 4%.

7.4. Para confirmar si los dos clados obtenidos en este estudio corresponden a una subespecie de *S. acanthias* se requiere la obtención de mayor información de la historia evolutiva de las secuencias a través de un análisis con múltiples marcadores genéticos.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abdo Z & B Golding. 2007.** A Step Toward Barcoding Life: A Model-Based, Decision-Theoretic Method to Assign Genes to Preexisting Species Groups. *Systematic Biology* 56(1):44-56.
- Alonso M, E Crespo, N García, S Pedraza, P Mariotti & N Mora. 2002.** Fishery and ontogenetic driven changes in the diet of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*, in Patagonian waters, Argentina. *Environmental Biology of Fishes* 63: 193-202.
- Alvarado Bremer J, M Frisk, T Miller, J Turner, J Viñas & K Kwil. 2005.** Genetic identification of cryptic juveniles of little skate and winter skate. *Journal of Fish Biology* 66:1177-1182.
- Avise J & D Walker. 1999.** Species realities and numbers in sexual vertebrates: Perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 992–995.
- Avsar D. 2001.** Age, growth, reproduction and feeding of the spurdog (*Squalus acanthias* Linnaeus, 1758) in the South-eastern Black sea. *Stuarine, coastal and shelf Science* 52: 269-278.
- Barbuto M, A Galimberti, E Ferri, M Labra, R Malandra, P Galli & M Casiraghi. 2010.** DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International* 43:376–381.

- Baum J, R Myers, D Kehler, B Worm, S Harley & P Doherty. 2003.** Collapse and Conservation of Shark Populations in the Northwest Atlantic Science 299: 389-391
- Becker S, R Hanner & D Steinke. 2011.** Five years of FISH-BOL: Brief status report. Mitochondrial DNA 22(S1): 3–9.
- Bickford D, D Lohman, N Sodhi, P Ng, R Meier, K Winker, K Ingram & I Das. 2006.** Cryptic species as a window on diversity and conservation. Ecology and Evolution 22(3): 148-155.
- Bigelow H & W Schroeder. 1953.** Fishes of the Gulf of Maine. U.S. Fish Wildlife Service, Fish Bulletin 53: 577.
- Bonfil R. 1994.** Overview of world elasmobranch fisheries. FAO Fisheries Technical Paper 341: 1–119.
- Carraza S. 2002.** Métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los anfibios y reptiles ibéricos. En: Pleguezuelos J, Márquez R & Lizana M. Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España. pp. 551- 580. Dirección General de conservación de la naturaleza-Asociación Herpetológica Española. Madrid.
- Chin A, P Kyne, T Walker & R McAuley. 2010.** An integrated risk assessment for climate change: analysing the vulnerability of sharks and rays on Australia's Great Barrier Reef. Global Change Biology 16: 1936–1953.
- Compagno L, M Dando & S Fowler. 2005.** Sharks of the world. pp. 368. Princeton University Press, New Jersey.

- Corrigan S, C Huveneers, T Schwartz, R Harcourt & L Beheregaray. 2008.** Genetic and reproductive evidence for two species of ornate wobbegong shark *Orectolobus* spp. on the Australian east coast. *Journal of Fish Biology* 73:1662–1675.
- Dasmahapatra K & J Mallet. 2006.** DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* 97: 254–255.
- Dayrat B. 2005.** Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.
- De Robertis E, D De Robertis, J Hib & R Ponzio. 2005.** *Biología Celular y Molecular*. pp.469. El Ateneo. Buenos Aires.
- De Salle R, M Egan & M Siddall. 2005.** The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1905-1916.
- Doudy C, M Dosay, M Shivji & M Stanhope. 2003.** Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of batoidea (rays and skates) as derived sharks. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 215-221.
- Doukakis P, R Hanner, M Shivji, C Bartholome, D Chapman, E Wong & G Amato. 2011.** Applying genetic techniques to study remote shark fisheries in northeastern Madagascar. *Mitochondrial DNA* 22(S1): 15–20.
- Ebert D & M Winton. 2010.** Chondrichthyans of high latitude seas. En: J Carrier, J Musick, M Heithaus (Eds) *The biology of sharks and their relatives* CRC Press LLC.

- Ebert D, W White, K Goldman, L Compagno, T Daly-Engel & R Ward. 2010.** Resurrection and redescription of *Squalus suckleyi* (Girard, 1854) from the North Pacific, with comments on the *Squalus acanthias* subgroup (Squaliformes: Squalidae). *Zootaxa* 2612: 22–40.
- Elias M, R Hill, K Willmontt, K Dasmahapatra, A Brower, J Mallet & C Jiggins. 2007.** Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B* 274:2881-2889.
- Fordham S. 2004.** Conservation and management status of spiny dogfish (*Squalus acanthias*). IUCN shark specialist group.
- France S & I Hoover. 2002.** DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiology* 471, 149–155.
- Frézal L & R Leblois. 2008.** Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 5: 727–736.
- Gardner M & Ward R. 2002.** Taxonomic affinities within Australian and New Zealand *Mustelus* sharks (Chondrichthyes: Triakidae) inferred from allozymes, mitochondrial DNA and precaudal vertebrae counts. *Copeia* 2: 356–363.
- Griffiths A, D Sims, S Cotterell, A Nagar, J Ellis, A Lynghammar, M McHugh, F Neat, N Pade, N Queiroz, B Serra-Pereira, T Rapp, V Wearmouth & M Genner. 2010.** Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*) *Proceedings of the Royal Society B* 277: 1497-1503.

- Hajibabaei M, G Singer, P Hebert & D Hickey. 2007.** DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23:167-172.
- Hall T. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hanchet S. 1988.** Reproductive biology of *Squalus acanthias* from the east coast, South Island, New Zealand. *New Journal of Marine and Freshwater Research*, 22: 537-549.
- Hauser L, J Franks, N Vega & V Gallucci. 2007.** Potential for sustainable expansion of the dogfish (*Squalus acanthias*) fishery in the northeast Pacific. pp.37. Final Report to NOAA.
- Hebert P, A Cywinska, S Ball & J Waard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313-322.
- Hebert P, E Penton, J Burns, D Janzen & W Hallwachs. 2004a.** Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 812-817.
- Hebert P, M Stoeckle, T Zemplak & C Francis. 2004b.** Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biology* 2: 1657-1663.
- Heist E, J Graves & J Musick. 1995.** Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) in the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia* 3: 555-562.



- Heist E, J Musick & J Graves. 1996.** Mitochondrial DNA diversity and divergence among sharpnose sharks, *Rhizoprionodon terraenovae*, from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Fishery Bulletin* 94: 664-668.
- Heist E. 1999.** A review of population genetics in shark. *American Fisheries Society Symposium* 23: 161-168.
- Heist E. 2004.** Genetics of sharks, skates and rays. In: Carrier J, J Musick & M Heithaus. *Biology of Sharks and their relatives*. CRC Press.
- Holmes B, D Steinke & R Ward. 2009.** Identification of sharks and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research* 95: 280-288.
- Hudson R & M Turelli. 2003.** Stochasticity overrules the “three-times rule”: genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. *Evolution* 57(1): 182–190.
- IUCN 2014.** IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. Downloaded on 22 June 2014.
- Ivanova N, T Zemlak, R Hanner & P Hebert. 2007.** Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 6: 998-1002.
- Jennings D, S Gruber, B Franks, S Kessel & A Robertson. 2008.** Effects of large-scale anthropogenic development on juvenile lemon shark (*Negaprion brevirostris*) populations of Bimini, Bahamas. *Environmental Biology of Fishes* 83: 369–377.
- Johnson N & C Cicero. 2004.** New mitochondrial dna data affirm the importance of Pleistocene Speciation in north american birds. *Evolution* 58(5): 1122–1130.

- Keeney D, M Heupel, R Hueter & E Heist. 2005.** Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology* 14:1911-1923.
- Ketchen K. 1986.** The Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*) in the Northeast Pacific and a History of its Utilization. 78 pp. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 88.
- Kress W, K Wurdack, E Zimmer, L Weigt & D Janzen. 2005.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(23):8369-8374.
- Lamilla J & S Sáez. 2003.** Clave taxonómica para el reconocimiento de especies de rayas chilenas (Chondrichthyes, Batoidei). *Revista de Investigaciones Marinas* 31(2):3-16.
- Lamilla J, E Acuña, M Araya, M Oliva, I Kong, J Villarroel, S Hernández, F Concha, R Vogler, C Bustamante & E Mutschcke. 2005.** Lineamientos básicos para desarrollar el Plan de Acción Nacional de Tiburones. Reporte Final Proyecto Investigación Pesquera N 2004-18.
- Lanteri A. 2007.** Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 66 (3-4): 15-25.
- Larkin M, G Blackshields, N Brown, R Chenna, P McGettigan, H McWilliam, F Valentin, I Wallace, A Wilm, R Lopez, J Thompson, T Gibson & D Higgins.**

**2007.** Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics applications note 23(21):2947-2948

**Last P, W White, J Pogonoski, D Gledhill, G Yearsley & R Ward. 2007.**

Application of a rapid taxonomic approach to the genus *Squalus*. In: Descriptions of new dogfishes of the genus *Squalus* (Squaloidea: Squalidae). pp. 117-130. Eds Last PR, White WT, Pogonoski JJ CSIRO, Hobart.

**Last P, W White, D Gledhill, A Hobday, R Brown, G Edgar & G Pecl. 2011.**

Long-term shifts in abundance and distribution of a temperate fish fauna: a response to climate change and fishing practices. *Global Ecology and Biogeography* 20: 58–72.

**Librado P & J Rozas. 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of

DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

**Mabragaña E J Díaz de Astarloa, R Hanner, J Zhang & M González Castro.**

**2011.** DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLOS ONE* 6(12): e28655.

**Marouani S, R Chaaba, H Kadri, B Saidi, A Bouain, F Maltagliati, P Last, B**

**Seret & M Bradai. 2012.** Taxonomic research on *Squalus megaloptd* (Macleay, 1881) and *Squalus blainvillei* (Risso, 1827) (Chondrichthyes: Squalidae) in Tunisian waters (central Mediterranean Sea). *Scientia Marina* 76(1): 97-109.

**McCusker M, D Denti, L Van Guelpen, E Kenchington & P Bentzen. 2013.**

Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes. *Molecular Ecology Resources* 13: 177–188.

- McEachran J. 1982.** Revision of the south American skate genus *Sympterygia* (Elasmobranchii: Rajiformes). *Copeia* 4: 867-890.
- Meier R, K Shiyang, G Vaidya & P Ng. 2006.** DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55: 715-728.
- Meyer C & G Paulay. 2005.** DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLOS Biology* 3(12): e422.
- Moftah M, S Aziz, S Elramah & A Favereaux. 2011.** Classification of Sharks in the Egyptian Mediterranean Waters Using Morphological and DNA Barcoding Approaches. *PLoS ONE* 6(11): e27001
- Monaghan M, M Balke, R Gregory & A Vogler. 2005.** DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1925–1933
- Moritz C & C Cicero. 2004.** DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLOS Biology* 2:1529-1531.
- Musick J, M Harbin & L Compagno. 2004.** Historical zoogeography of selachii. pp. 33 -78. En: Carrier J, J Musick, M Heithaus (eds). *Biology of Sharks and their relatives*. CRC Press, New York.
- Naylor G, J Ryburn, O Fedrigo & A López. 2005.** Phylogenetic relationships among the major lineages of sharks and rays deduced from multiple genes. En: W. Hamlett & B. Jamieson *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyans (Sharks, skates, stingrays and chimaeras)*. Eds. Univ. Queensland Press.

- Naylor G, J Caira, K Jensen, K Rosana, W White & P Last. 2012a.** A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 367:1-260.
- Naylor G, J Caira, K Jensen, K Rosana, N Straube & C Lakner. 2012b.** Elasmobranch Phylogeny: A mitochondrial estimate based on 595 species. En: Carrier J, J Musick & M Heithaus. *The Biology of Sharks and Their Relatives*. p. 31-56. CRC Press. New York.
- Nei M & S Kumar. 2000.** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nielsen R & M Matz. 2006.** Statistical Approaches for DNA Barcoding. *Systematic Biology* 55(1):162-169.
- Page R & E Holmes. 1998.** *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. pp.346. Blackwell Publishing Ltd. London.
- Pardini A, C Jones, L Noble. 2001.** Sex-biased dispersal of great white sharks – In some respects, these sharks behave more like whales and dolphins than other fish. *Nature* 412:139-140.
- Pequeño G. 1989.** Peces de Chile. Lista Sistemática revisada y comentada. *Revista Biología Marina* 21(2): 1-32.
- Pequeño G. 2000.** Delimitaciones y relaciones biogeográficas de los peces del Pacífico Suroriental. *Estudios Oceanológicos* 19: 53-76.

- Pickering M. 2012.** Species boundaries and temporal patterns in the tapeworm fauna of sharks in the genus *Squalus*. Tesis Doctoral Universidad de Connecticut.
- Pinhal D, M Shivji, M Vallinoto, D Chapman, O Gadig & C Martins. 2012.** Cryptic hammerhead shark lineage occurrence in the western South Atlantic revealed by DNA analysis. *Marine Biology* 159:829-836.
- Quattro J, D Stoner, W Driggers, C Anderson, K Priede, E Hoppmann, N Campbell, K Duncan & J Grady. 2006.** Genetic evidence of cryptic speciation within hammerhead sharks (Genus *Sphyrna*). *Marine Biology* 148: 1143-1155.
- Rach J, R De Salle, I Sarkar, B Schierwater & H Hadrys. 2008.** Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society B* 275: 237–247.
- Rago P, K Sosebee, J Brodziak, S. Murawski & E Anderson. 1998.** Implications of recent increases in catches on the dynamics of northwest Atlantic spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Fisheries Research* 39: 165-181.
- Ratnasingham S & P Hebert. 2007.** BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 7:355–364
- Saitou N & M Nei. 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Seco Pon J & P Gandini. 2007.** Bycatch of the piked dogfish *Squalus acanthias* Linne, 1758 (Chondrichthyes, Squalidae) in semi-pelagic longline fisheries at the Patagonian shelf. *Investigaciones Marinas* 35(1):85-88

- Shivji M, S Clarke, M Pank, L Natanson, N Kohler & M Stanhopes. 2001.** Genetics identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology* 16(4): 1036-1047.
- Smith M, N Woodley, D Janzen, W Hallwachs & P Hebert. 2006.** DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (10): 3657-62.
- Simpfendorfer C, M Heupel, W White, & N Dulvy. 2011.** The importance of research and public opinion to conservation management of sharks and rays: a synthesis. *Marine and Freshwater Research*, 62: 518–527.
- Tamura K, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei & S Kumar. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Templeman W. 1976.** Transatlantic migrations of spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33(11): 2605-2609.
- Taylor H & W Harris. 2012.** An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 12: 377–388.
- Tillett B, I Field, C Bradshaw, G Johnson, R Buckworth, M Meekan & J Oviden. 2012.** Accuracy of species identification by fisheries observers in a north Australian shark fishery. *Fisheries Research* 127-128:109-115.

- Verissimo A, McDowell J & Graves J. 2010.** Global population structure of the spiny dogfish *Squalus acanthias*, a temperate shark with an antitropical distribution. *Molecular Ecology* 19: 1651-1662.
- Ward R, T Zemplak, B Innes, P Last & P Hebert. 2005.** DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 360: 1847-1857.
- Ward R & B Holmes. 2007.** An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (*cox1*) in fishes. *Molecular Ecology Notes* 7: 899-907.
- Ward R, B Holmes, T Zemplak & P Smith. 2007.** DNA barcoding discriminates spurdogs of the genus *Squalus*. In: *Descriptions of new dogfishes of the genus Squalus (Squaloidea: Squalidae)*. pp. 117–130. Last PR, White WT, Pogonoski JJ. CSIRO, Hobart.
- Ward R, B Holmes, W White & P Last. 2008.** DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine & Freshwater Research* 59: 57-71.
- Ward R, R Hanner & P Hebert. 2009.** The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* 74: 329-356.
- White W & P Last. 2012.** A review of the taxonomy of chondrichthyan fishes: a modern perspective. *Journal of Fish Biology* 80: 901–917.
- Wong E, M Shivji & R Hanner. 2009.** Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach. *Molecular Ecology Resources* 9: 243-256.





**ANEXO 1.** Muestras recolectadas de Cochamó, en el Seno de Reloncaví (Estación 1, 41°44'S;72°59'O), de aguas interiores de Chiloé (Estación 2, 41°39'S; 72°21'O, y 3, 42°57'S;72°53'O), y de cercanías de la Isla Ipún, Región de Aysén (Estación 4, 44°37'S; 74°46'O). M: macho, H: hembra.

N° muestra	Estación	Profundidad (m)	Sexo	LT (cm)
1	1	150	M	70
2	1	150	M	75
3	1	150	M	65
4	1	150	M	76
5	1	150	M	69
6	3	200	H	92
7	4	150	M	70
8	4	150	H	77
9	4	150	M	68
10	4	150	M	70,5
11	4	150	M	72,7
12	4	150	M	72,5
13	4	150	H	91
14	4	150	M	60
15	4	150	H	64
16	4	150	M	69,5
17	3	100	H	56
18	2	200	M	62,9
19	2	200	H	48
20	2	200	M	58,1
21	3	100	H	55,5
22	2	200	M	70
23	2	200	M	59,4
24	2	200	M	63,2
25	3	20	H	64,5
26	3	100	H	63
27	3	20	M	58,5
28	3	200	M	57
29	3	200	H	86,8
30	3	200	M	47
31	3	100	H	67,3
32	2	200	H	45,5
33	2	200	M	50,3
N° muestra	Estación	Profundidad (m)	Sexo	LT (cm)
34	2	200	H	56,1

35	3	200	H	64,4
36	2	20	M	51,5
37	3	100	M	62,5
38	3	100	H	62,4
39	3	200	H	61,6
40	3	200	H	63,6
41	3	200	H	80,2
42	3	200	H	88
43	3	200	H	68,1
44	3	200	H	102,6
45	3	200	H	88
46	3	200	M	72,7
47	3	200	H	67
48	3	200	H	55,5
49	2	100	M	47,5
50	2	100	M	51
51	2	100	M	41
52	2	200	H	48,2
53	2	200	M	76,2
54	2	200	H	82,1
55	2	200	H	79,8
56	3	200	M	59,5

---

**ANEXO 2.** Protocolo para extracción de ADN de tejido animal del DNeasy Tissue Kit (QIAGEN Inc.)

1. Cada muestra se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, al cual se le agregó 1 ml de agua esterilizada, se dejó remojar durante 24 horas, con el fin de extraer el etanol presente en la muestra.
2. Pasado este tiempo, se botó el agua, se agregó 180  $\mu$ l de Buffer ATL y 20  $\mu$ L de proteinasa K, se colocó en Vortex durante un minuto, para asegurar la homogeneidad de la solución.
3. Se dejó encubando en un baño a 56 °C durante 12 hrs, hasta que el tejido se encontró completamente lisado.
4. Luego cada muestra se pasó por Vortex durante 15 segundos y se agregó 200  $\mu$ l de Buffer AL y 200  $\mu$ L de etanol al 97%, y se volvió a pasar por Vortex durante 15 segundos.
5. Con una micropipeta se vació la muestra en una columna de centrifugación DNeasy Mini, que se encontraba dentro de un tubo de recogida de 2 mL. Se centrifugó durante un minuto a 10.000 rpm descartando el remanente.
6. Se agregan 500  $\mu$ L de Buffer AW1 y se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm durante un minuto, descartando el remanente.
7. Se agregó 500  $\mu$ L de Buffer AW2 y se centrifugó a 14.000 rpm durante 3 minutos, se botó el remanente.

8. Finalmente, la columna de centrifugado se colocó sobre un tubo de microcentrífuga de 1,5  $\mu$ L, se agregó 200  $\mu$ L de Buffer AE, se dejó reposar durante un minuto a temperatura ambiente, y se centrifugó durante un minuto a 8.000 rpm, obteniendo en el flujo residual el ADN de la muestra, el cual fue almacenado a -20 °C.

### **ANEXO 3.** Protocolo purificación EZNA® Cycle-Pure Kit N° D6493-01

1. Se consideró el volumen de DNA genómico obtenido por amplificación de PCR para estimar el volumen de Buffer CP que se utilizará (cada 100 µL de ADN, 600 µL de Buffer CP). Siendo que la muestra de ADN es de 45 µL, se utilizaron 200 µL de Buffer CP.
2. Esto se dispuso en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Se agitó durante 30 segundos en Vortex para homogeneizar la muestra.
3. Cada mezcla se dispuso en la columna HiBind DNA Mini Column , la cual se encontraba dentro de un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto, a temperatura ambiente. Se descartó el remanente.
4. Se colocó nuevamente la columna HiBind DNA Mini en el tubo colector. Se agregó 700 µL de DNA Wash Buffer y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto, descartando el remanente.
5. Se colocó la columna HiBind DNA Mini en el tubo colector. Se agregó 500 µL de DNA Wash Buffer y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto, descartando el remanente.
6. Se colocó la columna HiBind DNA Mini en el tubo colector. Para lograr un mejor resultado se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos la columna HiBind DNA Mini.
7. Finalmente se reemplazó la columna colectora por un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, al cual se adicionar 40 µL de Buffer de Elución (10 mM Tris, pH 8,5) directamente en el centro de la columna. Luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto para eluir el ADN. El volumen final obtenido puede variar

levemente por la cantidad de Buffer de Elución adicionado, con un 80-90% de representatividad.

**ANEXO 4.** Detalle del cebador utilizado, la concentración (ng/ul), número de pares de bases, la secuencia del cebador, y la concentración del cebador (pmol/ul) en cada muestra.

Nº Muestra	Cebador	Concentración (ng/ul)	pb	Secuencia del cebador	Concentración Cebador (pmol/ul)
5.1	VF2	75	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
22.1	VF2	75	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
26.1	VF2	60	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
30.1	VF2	80	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
32.1	VF2	65	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
35.1	VF2	75	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
39.1	VF2	90	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
40.1	VF2	35	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
41.1	VF2	40	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
42.1	VF2	90	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
43.1	VF2	40	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
44.1	VF2	70	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
45.1	VF2	70	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
52	VF2	100	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
56	VF2	60	704	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	10
5.1	FishF2	75	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
22.1	FishF2	75	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
26.1	FishF2	60	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
30.1	FishF2	80	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
32.1	FishF2	65	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
35.1	FishF2	75	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
39.1	FishF2	90	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
40.1	FishF2	35	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
41.1	FishF2	40	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
42.1	FishF2	90	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
43.1	FishF2	40	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
44.1	FishF2	70	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
45.1	FishF2	70	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
52	FishF2	100	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
56	FishF2	60	704	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	10
5.1	FR1	75	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
22.1	FR1	75	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
Nº Muestra	Cebador	Concentración (ng/ul)	pb	Secuencia del cebador	Concentración Cebador



					(pmol/ul)
26.1	FR1	60	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
30.1	FR1	80	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
32.1	FR1	65	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
35.1	FR1	75	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
39.1	FR1	90	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
40.1	FR1	35	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
41.1	FR1	40	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
42.1	FR1	90	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
43.1	FR1	40	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
44.1	FR1	70	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
45.1	FR1	70	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
52	FR1	100	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
56	FR1	60	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
5.1	FishR2	75	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
22.1	FishR2	75	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
26.1	FishR2	60	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
30.1	FishR2	80	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
32.1	FishR2	65	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
35.1	FishR2	75	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
39.1	FishR2	90	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
40.1	FishR2	35	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
41.1	FishR2	40	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
42.1	FishR2	90	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
43.1	FishR2	40	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
44.1	FishR2	70	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
45.1	FishR2	70	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
52	FishR2	100	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
56	FishR2	60	704	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
7	SAF	55	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
12.2	SAF	100	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
14.2	SAF	100	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
15.2	SAF	35	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
16.2	SAF	85	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
17.2	SAF	85	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
18.2	SAF	80	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
21.2	SAF	40	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
25.2	SAF	95	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10

Nº Muestra	Cebador	Concentración (ng/ul)	pb	Secuencia del cebador	Concentración Cebador (pmol/ul)
------------	---------	-----------------------	----	-----------------------	---------------------------------

31.2	SAF	95	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
33.2	SAF	125	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
34.2	SAF	105	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
36.2	SAF	85	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
37.2	SAF	75	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
47.2	SAF	80	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
49	SAF	85	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
54	SAF	60	652	GGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTAC	10
7	SAR	55	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
12.2	SAR	100	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
14.2	SAR	100	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
15.2	SAR	35	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
16.2	SAR	85	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
17.2	SAR	85	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
18.2	SAR	80	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
21.2	SAR	40	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
25.2	SAR	95	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
31.2	SAR	95	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
33.2	SAR	125	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
34.2	SAR	105	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
36.2	SAR	85	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
37.2	SAR	75	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
47.2	SAR	80	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
49	SAR	85	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
54	SAR	60	652	TGGTAAAGAATTGGGTCTCCCCCTC	10
32.1	FR1	65	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
35.1	FR1	75	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
39.1	FR1	90	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
40.1	FR1	35	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
41.1	FR1	40	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
42.1	FR1	90	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
43.1	FR1	40	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
44.1	FR1	70	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
45.1	FR1	70	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10

Nº Muestra	Cebador	Concentración (ng/ul)	pb	Secuencia del cebador	Concentración Cebador (pmol/ul)
52	FR1	100	704	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10

56	FR1	60	704 ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	10
5.1	FishR2	75	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
22.1	FishR2	75	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
26.1	FishR2	60	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
30.1	FishR2	80	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
32.1	FishR2	65	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
35.1	FishR2	75	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
39.1	FishR2	90	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
40.1	FishR2	35	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
41.1	FishR2	40	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
42.1	FishR2	90	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
43.1	FishR2	40	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
44.1	FishR2	70	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
45.1	FishR2	70	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
52	FishR2	100	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10
56	FishR2	60	704 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	10

---

**ANEXO 5.** Secuencias del gen mitocondrial COI de *Squalus acanthias* obtenidas en GenBank NCBI.

Secuencia	Haplotipo	Origen	Referencia
GI:251821436	1	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821402	1	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:145315911	2	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315909	2	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315905	2	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:154761311	2	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:154761309	2	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:154761307	2	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:154761305	2	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:251821480	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821466	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821440	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821434	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821430	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821424	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821420	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821414	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821408	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821404	2	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821406	3	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:154761319	4	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:251821410	4	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821412	5	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821416	6	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:145315915	7	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:251821426	7	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010

GI:251821422	7	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821428	8	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821474	9	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821454	9	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:154761317	10	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:154761315	11	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:154761313	12	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:154761303	13	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:154761301	14	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:325556693	15	Atlántico Norte	Zambounis <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:325556691	15	Atlántico Norte	Zambounis <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:325556685	15	Atlántico Norte	Zambounis <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:325556683	15	Atlántico Norte	Zambounis <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:325556681	15	Atlántico Norte	Zambounis <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:325556689	16	Atlántico Norte	Zambounis <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:325556687	16	Atlántico Norte	Zambounis <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:251821482	17	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:251821476	18	Mar Mediterraneo (Italia)	Barbuto <i>et al</i> 2010
GI:145315913	19	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315907	20	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315903	21	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:429141169	22	Pacífico Norte (Canadá)	McCusker <i>et al</i> 2013
GI:429141163	22	Pacífico Norte (Canadá)	McCusker <i>et al</i> 2013
GI:429141161	22	Pacífico Norte (Canadá)	McCusker <i>et al</i> 2013
GI:328487614	22	Pacífico Norte (Canadá)	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:328487612	22	Pacífico Norte (Canadá)	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:328487610	22	Pacífico Norte (Canadá)	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)
Secuencia	Haplotipo	Origen	Referencia
GI:328487608	22	Pacífico Norte (Canadá)	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)
GI:328487606	22	Pacífico Norte (Canadá)	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)

GI:261875155	22	Atlántico Norte (EE.UU.)	Wong <i>et al.</i> 2009
GI:261875147	22	Atlántico Norte (EE.UU.)	Wong <i>et al.</i> 2009
GI:145315901	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315899	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315897	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315893	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315891	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:145315889	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:70724058	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2005
GI:70724056	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2005
GI:70724054	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2005
GI:70724052	22	Australia	Ward <i>et al.</i> 2005
GI:145315895	23	Australia	Ward <i>et al.</i> 2007
GI:70724028	24	Australia	Ward <i>et al.</i> 2005
GI:154761321	25	Atlántico Sur (Argentina)	Mabragana <i>et al.</i> 2011
GI:429141167	26	Pacífico Norte (Canadá)	McCusker <i>et al.</i> 2013
GI:429141165	27	Pacífico Norte (Canadá)	McCusker <i>et al.</i> 2013
GI:429141159	28	Pacífico Norte (Canadá)	McCusker <i>et al.</i> 2013
GI:429141157	29	Pacífico Norte (Canadá)	McCusker <i>et al.</i> 2013
GI:359817556	30	Mar Med(Egipto)	Moftah <i>et al.</i> 2011
GI:359817550	30	Mar Med(Egipto)	Moftah <i>et al.</i> 2011
GI:359817548	30	Mar Med(Egipto)	Moftah <i>et al.</i> 2011
GI:359817554	31	Mar Med(Egipto)	Moftah <i>et al.</i> 2011
GI:359817552	32	Mar Med(Egipto)	Moftah <i>et al.</i> 2011
GI:261875149	33	Atlántico Norte (EE.UU.)	Wong <i>et al.</i> 2009

---

**ANEXO 6.** Secuencias del gen mitocondrial COI de *Cirrhigaleus barbifer*, *Cirrhigaleus australis*, *Cirrhigaleus asper*, *Squalus mitsukuri*, *Squalus albifrons*, *Squalus suckleyi*, *Squalus megalops*, *Squalus japonicus*, *Squalus edmundsi*, *Squalus brevirostris*, *Squalus blainville* obtenidas desde GenBank NCBI.

Código	Especie	Referencia
166837101	<i>Cirrhigaleus barbifer</i>	Ward <i>et al.</i> 2008
469469068	<i>Cirrhigaleus barbifer</i>	Human y Egeberg (Sin Publicar)
70723934	<i>Cirrhigaleus australis</i>	Ward <i>et al.</i> 2005
328484848	<i>Cirrhigaleus asper</i>	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)
328487634	<i>Squalus mitsukuri</i>	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)
154761325	<i>Squalus mitsukuri</i>	Mabragaña <i>et al.</i> 2011
70724008	<i>Squalus albifrons</i>	Ward <i>et al.</i> 2005
145315917	<i>Squalus albifrons</i>	Ward <i>et al.</i> 2007
261875157	<i>Squalus suckleyi</i>	Wong <i>et al.</i> 2009
382935804	<i>Squalus suckleyi</i>	Elz,A <i>et al.</i> (Sin publicar)
166837725	<i>Squalus megalops</i>	Ward <i>et al.</i> 2008
300677092	<i>Squalus megalops</i>	Straube <i>et al.</i> 2010
145315967	<i>Squalus japonicus</i>	Ward <i>et al.</i> 2007
145315961	<i>Squalus japonicus</i>	Ward <i>et al.</i> 2007
70724026	<i>Squalus edmundsi</i>	Ward <i>et al.</i> 2005
145315945	<i>Squalus edmundsi</i>	Ward <i>et al.</i> 2007
328487622	<i>Squalus brevirostris</i>	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)
145315933	<i>Squalus brevirostris</i>	Ward <i>et al.</i> 2007
328487616	<i>Squalus blainville</i>	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)
328487620	<i>Squalus blainville</i>	Steinke <i>et al.</i> (Sin publicar)