

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RAYAS SIMPÁTRICAS DE LOS GÉNEROS *Dipturus* Y *Zearaja* EN EL MAR ARGENTINO POR *DNA BARCODE**

SILVINA IZZO¹, GABRIELA ANDREOLI¹, DANIEL E. FIGUEROA² y MARCELA COSTAGLIOLA¹

¹Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP),
Paseo Victoria Ocampo N° 1, Escollera Norte, B7602HSA - Mar del Plata, Argentina
correo electrónico: sizzo@inidep.edu.ar

²Departamento de Ciencias Marinas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Funes 3350, B7602A - Mar del Plata, Argentina

RESUMEN. Las rayas de los géneros *Dipturus* y *Zearaja* han sido objeto de una intensa explotación pesquera en los últimos años, lo que conlleva a prestar especial interés en la aplicación de medidas de manejo y conservación. En el Mar Argentino están representadas por las rayas *D. leptocauda*, *D. trachyderma*, *D. argentinensis* y *Z. chilensis*. Las tres últimas son especies simpátricas ya que se superponen tanto en su disposición geográfica como en profundidad. Los hábitos de comportamiento y la similitud morfológica, sobre todo en los estadios juveniles, hacen difícil la identificación de estas especies. La utilización de la secuencia del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) como un *DNA Barcode* (código de barras genético), es una herramienta útil que ayuda a identificar especies morfológicamente similares. En el presente trabajo se utilizó el *DNA Barcode* para identificar ejemplares de *Z. chilensis*, que presentaban un patrón de espinulación dorso-caudal distinto al descrito para la especie, y a su vez, realizar una comparación de los *DNA barcodes* con otras especies de rayas de distribución simpátrica, para obtener una caracterización molecular de las especies de *Dipturus* y *Zearaja* del Mar Argentino. Se obtuvo el *DNA Barcode* de 23 ejemplares, recolectados a lo largo de la plataforma argentina, clasificados como *D. argentinensis*, *Z. chilensis* y *Z. chilensis* con patrón de espinulación diferente (denominados ZSP). Los mismos se identificaron a nivel de especie por comparación con secuencias de referencia tomadas de Barcode of Life Data System (BOLD), correspondientes a ejemplares capturados en el Océano Pacífico y Atlántico, y a partir del cálculo de las distancias genéticas de Kimura 2-parámetros (K2P) intra e interespecíficas. Los ejemplares ZSP fueron identificados como *Z. chilensis* con más de un 99% de similitud y mostraron una distancia K2P de 0,24% con las secuencias de referencia de especímenes del Mar Argentino. Se calculó la distancia K2P entre *D. argentinensis* y *Z. chilensis*, y se determinó que divergen en un 3,1%; lo que sugiere que estas especies diferentes pertenecen al mismo Género *Zearaja*. En este trabajo se encontró que ejemplares identificados como *Z. chilensis* del Pacífico, cuyas secuencias se tomaron de BOLD, presentan una alta divergencia (3,46%) con *Z. chilensis* del Mar Argentino, indicando dos especies diferentes; por lo que se sugiere, denominar *Z. flavirostris* (Philippi, 1892) a la forma argentina. A partir de este trabajo se concluye que el *DNA Barcode* es un marcador molecular útil y eficiente para la identificación de especies de rayas. Los datos de distancias genéticas aportados contribuyen a la caracterización de estas especies simpátricas del Mar Argentino y sirven como parámetro de referencia en la diferenciación de las mismas.

Palabras clave: *Dipturus argentinensis*, *Zearaja chilensis*, Mar Argentino, Citocromo Oxidasa C, *DNA Barcode*.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SYMPATRIC SKATES OF THE *Dipturus* AND *Zearaja* GENERA OF THE ARGENTINE SEA WITH DNA BARCODE

SUMMARY. Skates of the genera *Dipturus* and *Zearaja* present a particular challenge for fishery management and conservation, since they have been subject to intense exploitation in the last years. In the Argentine Sea, these genera are represented by *D. leptocauda*, *D. trachyderma*, *D. argentinensis* and *Z. chilensis*. These last three are sympatric species since they overlap in depth and geographic distribution. Their behavioral habits and the morphological similarity make these species, especially in juvenile stages, difficult to identify. The use of the mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase I (COI) as a DNA Barcode (genetic barcode), is a useful molecular tool to identify morphologically similar species. In this work, we used the DNA Barcode to identify specimens of *Z. chilensis* that presented a different thorny pattern in their dorsal side and tail instead of the common pattern found in that species. Also, we compared the DNA Barcode with other sympatric skates' species to obtain a molecular characterization of the *Dipturus* and *Zearaja* species from the Argentine Sea. The DNA Barcode was obtained from 23 individuals collected along the Argentine continental shelf. The specimens were classified as *D. argentinensis*, *Z. chilensis* and *Z. chilensis* with a distinct different spinal pattern (specimens ZSP). The specimens were identified at species level by comparing their barcodes with reference sequences of specimens from the Pacific and Atlantic ocean in Barcode of Life Data System (BOLD), and also by the intra and interspecific Kimura two-parameter (K2P) distance. The ZSP individuals were identified as *Z. chilensis* with more than 99% of similarity, and they had a K2P distance of 0.24% with the reference sequences collected in the Argentine Sea. The K2P distance between *D. argentinensis* and *Z. chilensis* was 3.1%, this value could suggest that both species are the same Genus *Zearaja*. We found that the specimens' reference sequences of *Z. chilensis* from the Pacific had a high divergence (3.46%) from the *Z. chilensis* of the Argentine Sea, which would indicate two different species, suggesting that the Argentine form should be called *Z. flavirostris* (Philippi, 1892). From this work, we conclude that the DNA Barcode is a useful and efficient molecular marker to identify skates' species. The obtained genetic distance data contributes to the characterization of these sympatric species from the Argentine Sea and is a useful tool as a reference parameter for the differentiation of the species.

Key words: *Dipturus argentinensis*, *Zearaja chilensis*, Argentine Sea, Cytochrome C Oxidase, DNA Barcode.

INTRODUCCIÓN

Las rayas de los géneros *Dipturus* y *Zearaja* son batoideos que presentan un gran hocico correspondiente a 1/5 o más de su longitud total. Estas rayas presentan un interés especial en cuanto a medidas de manejo (Stevens *et al.*, 2000) y conservación (Roberts y Hawkins, 1999; Dulvy y Reynolds, 2002) debido a que sus características biológicas de maduración tardía y baja fecundidad, dan como resultado un bajo potencial reproductivo y una lenta capacidad de recuperación poblacional cuando se enfrentan a una presión pesquera de magnitud (Hoenig y Gruber, 1990). Es importante profundizar en el conocimiento biológico y ecológico de estas rayas, tanto desde el punto de vista morfológico, taxonómico y molecular (Perez Comesaña *et al.*, 2011), ya que es uno de los taxones más importante dentro de los batoideos (Compagno, 1999; Ebert y Com-

pagno, 2007; Séret y Last, 2008) y han sido objeto de una intensa explotación pesquera en los últimos años particularmente en el Atlántico Norte y Suroccidental, Mar Mediterráneo, Pacífico Suroccidental e Indopacífico (Sánchez *et al.*, 2011; Dulvy *et al.*, 2017; Vargas-Caro *et al.*, 2017).

En el Mar Argentino estas rayas se encuentran representadas por las siguientes especies (Figueroa, en prensa): la raya de cola corta *D. leptocauda* (Naylor *et al.*, 2012 a); la raya espinosa, *D. trachyderma* (Kreff y Stehmann, 1975); la raya argentina, *D. argentinensis* (Díaz de Astarloa *et al.*, 2008); y la raya hocicuda o picuda, *Z. chilensis* (Guichenot, 1848). Las últimas tres, son especies simpátricas sobre la plataforma continental ya que se superponen en su distribución geográfica y profundidad (Díaz de Astarloa *et al.*, 2008). *D. trachyderma* ha sido encontrada en la plataforma patagónica en la Argentina (Kreff y Stehmann 1975; Menni y Gosztonyi, 1977) y en el sudeste del Pacífico (Leible y Stehmann, 1987). *D. argentinensis*, ha sido capturada en el sur de la Patago-

nia argentina y no hay reportes de haber sido hallada más al norte de los 45° S (Díaz de Astarloa *et al.*, 2008). *Z. chilensis*, la especie más abundante de estas tres rayas (Hozbor *et al.*, 2011), ha sido capturada desde el sur de Brasil (Gomes y Picado, 2001) hasta el sur de la Argentina (Menni y Stehmann, 2000) en el Atlántico; y desde el centro al sur de Chile, en el Pacífico (Leible, 1987; Leible *et al.*, 1990). Por su distribución, estas tres especies de rayas serían propias de la “Provincia Biogeográfica Magallánica”, incluyendo el sector chileno (Balech y Ehrlich, 2008). Algunas de estas especies en sus estadios juveniles suelen habitar la plataforma continental y luego de adultas, migran hacia el talud. Estos hábitos, sumados a la similitud en la morfología de los juveniles y a la superposición en su distribución, hacen difícil una correcta identificación de las capturas.

La raya hocicuda o picuda fue descrita por primera vez en 1848 como *Raia chilensis* (Guichenot, 1848) y desde entonces, la identidad de la especie ha causado confusión. En el 2007, Ebert y Compagno listan 31 especies nominales para el Género *Dipturus*, entre ellas *D. chilensis*. Last y Gledhill (2007), sobre la base de las características morfológicas externas y la anatomía interna del clasper, reasignaron a *D. chilensis* dentro del Género *Zearaja*. Como consecuencia, basado en lo que propone el Principio de Prioridad del International Code of Zoological Nomenclature –Artículo 23 (ICZN, 1964), el nombre *Zearaja chilensis* es el utilizado para designar a la raya hocicuda. Sin embargo, debido a las controversias existentes en cuanto al nombre de la especie, en la Argentina es común que aún hoy se la nombre como *D. chilensis*.

Hasta hace dos décadas, estas especies eran objeto de captura incidental y sin interés comercial. En la actualidad, la explotación se ha incrementado fundamentalmente por la apertura de mercados internacionales, como el asiático, con preferencia por la raya hocicuda, donde se comercializa entera; y el europeo incluyendo otras especies, al que se exportan las aletas (Massa *et al.*, 2004). Dentro del conjunto de rayas desembarca-

das, la especie de mayor valor económico es *Z. chilensis* (Massa *et al.*, 2004), por la calidad de su carne, por su porte y por tener pocas espinas. La intensificación de la explotación pesquera, combinada con el tipo de estrategia biológica de selección *K*, pueden conducir a su declinación poblacional. Como consecuencia, *Z. chilensis* se encuentra declarada como especie vulnerable en la Red List del IUCN (Kyne *et al.*, 2007). Debido a esta condición y dadas las controversias en cuanto al *status* taxonómico de esta especie, es necesaria una correcta determinación específica para evaluar pautas de manejo, conservación y explotación del recurso.

Los métodos de clasificación tradicionales se han basado principalmente en características morfológicas, y hasta el presente siguen siendo fundamentales en los estudios taxonómicos. Una característica importante para diferenciar estas especies de rayas es el patrón de espinulación (Figuroa, 2011). *D. trachyderma*, la especie más fácilmente diferenciable entre las tres por su gigantismo, presenta dorso y vientre cubiertos completamente por espinas, carece de espina nugal, posee espinas oculares y alrededor del espiráculo, además de tres filas irregulares de espinas en la cola (Vargas-Caro *et al.*, 2015). La especie *D. argentinensis* se caracteriza por una línea media de espinas caudales, la superficie del disco lisa y una espina nugal presente o ausente (Díaz de Astarloa *et al.*, 2008); mientras que *Z. chilensis*, posee 3 a 5 hileras de espinas laterales en la cola, una espina nugal marcada y espinulas sobre el extremo del hocico (Lamilla y Bustamante, 2005). Sin embargo, en la especie *Z. chilensis*, existen problemas para clasificar algunos ejemplares, ya que suelen mostrar dos patrones de espinulación distintos al descripto; uno con varias espinas dispuestas en forma aleatoria sobre la parte dorsal posterior del disco, y otro que presenta dos hileras de espinas que llegan hasta la mitad del disco a ambos lados de la línea media. Estas variaciones en el patrón de espinulación de *Z. chilensis* suelen ocasionar confusiones en la identificación de esta especie.

El uso de técnicas moleculares para complementar a la taxonomía clásica basada en la morfología ha sido de gran utilidad en la resolución de problemas de este tipo. Hace algunas décadas se propuso utilizar una fracción del gen mitocondrial que codifica la subunidad I de la Citocromo Oxidasa C (COI), como un *DNA Barcode* (código de barras genético) especie específico que permitiera establecer un sistema global para la bioidentificación de organismos (Hebert *et al.*, 2003). La utilidad del COI para la identificación de especies ha sido demostrada y validada en un amplio grupo de animales (Waugh, 2007), tanto de invertebrados (Hogg y Hebert, 2004; Hebert *et al.*, 2004) como en vertebrados (Johns y Avise, 1998; Spies *et al.*, 2006; Clare *et al.*, 2007; Ward, 2009). A partir de la medida de la distancia genética de Kimura 2-parámetros -K2P, (Kimura, 1980) intra e interespecífico de esos grupos se encontró una fuerte correlación entre la taxonomía morfológica y la divergencia molecular en coincidencia con otros estudios de códigos de barras, lo que ha llevado a que se estableciera un “umbral molecular” de divergencias que permite usarse como referencia para la delimitación de especies (Hebert *et al.*, 2004; Lefébure *et al.*, 2006; Ward, 2009; Zemlak *et al.*, 2009).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue usar el *DNA Barcode* para confirmar que los ejemplares con patrón de espinulación variado pertenecen a la especie *Z. chilensis* y, a su vez, realizar una comparación con otras especies afines de rayas simpátricas, para obtener una caracterización a nivel molecular de las especies simpátricas de *Dipturus* y *Zearaja* en el Mar Argentino.

Con estos aportes, se pretende facilitar la determinación de las especies por observación morfológica y eliminar dudas a la hora de llevar a cabo una identificación rápida de estas rayas. Asimismo, se considera que estos resultados pueden brindar un importante aporte a la caracterización de las especies de *Dipturus* y *Zearaja* del Mar Argentino, con directas implicancias en la evaluación de pautas de manejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 23 rayas en 16 lances de pesca llevados a cabo en la plataforma argentina y Zona Común de Pesca Argentino-Uruguayana (ZCPAU), a bordo del buque de investigación “Dr. Eduardo L. Holmberg” durante 2009 a 2013 en las siguientes campañas del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP): EH-03/2009, EH-01/2011, EH-03/2012, EH-06/2012, EH-01/2013, EH-04/2013 y EH-06/2013 (Figura 1; Tabla 1). Las rayas capturadas se clasificaron en tres grupos según su identificación por morfología y patrón de espinulación dorso-caudal. El grupo DARG, formado por dos ejemplares con características distintivas de *D. argentinensis* (una única fila media caudal de espinas); el segundo grupo denominado ZCHIL, con cuatro ejemplares determinados por su patrón de espinulación típico de *Z. chilensis* (espinas nucas y 3 a 5 hileras de espinas caudales); y por último, el tercer grupo nombrado ZSP, con 17 ejemplares que presentaban varias espinas dispuestas en forma aleatoria sobre la parte posterior del disco (7 ejemplares) o 2 hileras de espinas a los lados de la línea media hasta la mitad del disco (10 ejemplares) (Figura 2).

A partir de una porción de músculo de cada ejemplar se realizó la extracción de ADN, con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, siguiendo el protocolo informado por Andreoli y Trucco (2012). Aproximadamente 600 pb del gen COI se amplificaron por PCR usando los cebadores universales FishF2 (5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC 3') y FishR1 (5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3') (Ward *et al.*, 2005). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía: buffer PCR 1X (1,5 mM MgCl₂), dNTPs (0,2 mM), cebadores (0,5 µM), 0,625 U de Taq polimerasa (GoTaq ADN polimerase, Promega) y 2 µl de templado. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador BioerLife Express TC-96/G/H con

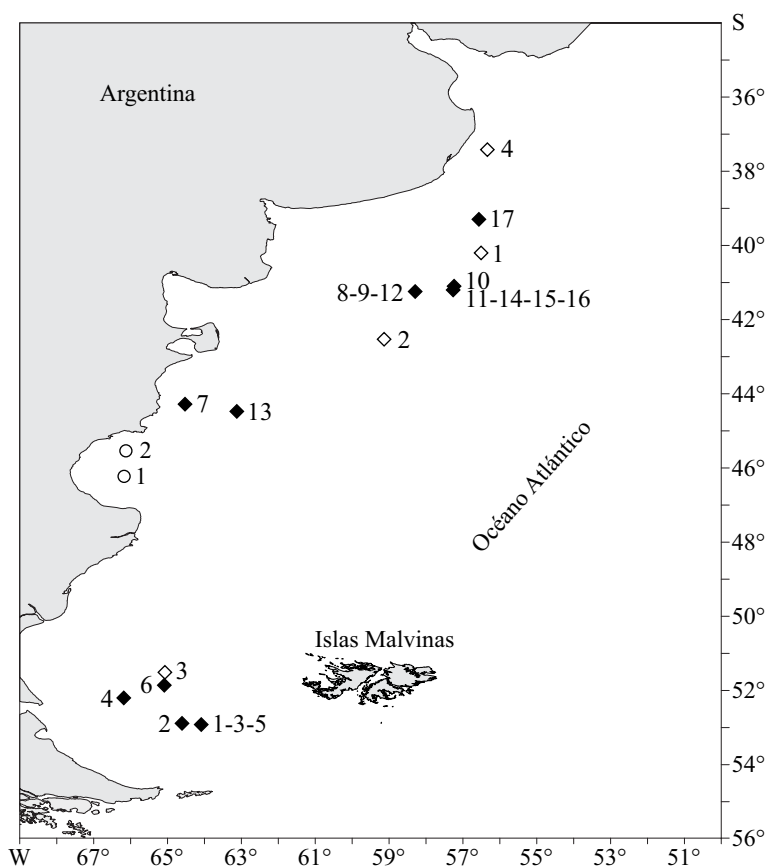


Figura 1. Posición de los lances de pesca donde se obtuvieron las muestras. Los símbolos indican los ejemplares de los distintos grupos: ZSP (◆), ZCHIL (◇) y DARG (○). Los números corresponden al nombre de cada muestra que figura en la Tabla 1.
 Figure 1. Position of the fishing trawls where the samples were obtained. The symbols indicate the specimens of the different groups: ZSP (◆), ZCHIL (◇) y DARG (○). The numbers correspond to the names of each sample shown in Table 1.

las siguientes condiciones: 2 min. iniciales de desnaturalización a 95 °C; 34 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min a 54 °C y 2 min a 72 °C; y una extensión final de 15 min a 72 °C. La calidad de los productos de amplificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y se visualizó con bromuro de etidio 0,01%. Los productos purificados se secuenciaron bidireccionalmente con el método de Sanger por electroforesis capilar, usando los servicios de la Unidad Genómica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), sede Castelar, Argentina.

La edición de los cromatogramas y el ensamblaje de ambas hebras se realizaron manualmente

con el software Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Cada secuencia, se identificó usando el sistema de identificación de Barcode of Life Data System –BOLD (Ratnasingham y Hebert, 2007) utilizando la opción Species Level Barcode Records que permite comparar las secuencias a identificar con todos los *DNA Barcodes* identificados a nivel de especie y que poseen un largo mínimo de 500 pb. Las secuencias junto con sus correspondientes cromatogramas se depositaron en GenBank bajo los números de acceso KY356816-KY356838.

Con el objetivo de comparar a través de un alineamiento múltiple las secuencias de los tres gru-

Tabla 1. Identificación de los ejemplares capturados en campañas de investigación del INIDEP utilizando la base de datos BOLD. El grupo DARG está formado por ejemplares con las características distintivas de *Dipturus argentinensis*, el grupo ZCHIL por ejemplares con el patrón de espinulación típico de *Zearaja chilensis* y el grupo ZSP por individuos con patrón de espinulación distinto al anterior. Se muestran los porcentajes de similitud con las mejores coincidencias de referencia.

Table 1. Identification of the specimens caught in INIDEP research cruises using the BOLD database. The DARG group is formed by specimens with the distinctive characteristics of *Dipturus argentinensis*, the ZCHIL group by individuals with the thorny pattern typical of *Zearaja chilensis* and the ZSP group by specimens with a thorny pattern different from the preceding one. The percentages of similarity with the best reference coincidence are shown.

Grupo	Nombre del ejemplar*	Mejor coincidencia	Nº de acceso de la secuencia de referencia	Porcentaje de similitud
DARG (○)	1-EH0113-L9	<i>Dipturus argentinensis</i>	EU074408.1	100
	2-EH0113-L13	<i>Dipturus argentinensis</i>	EU074405.1	99
ZCHIL (◇)	1-EH0111-222	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074400.1	100
	2-EH0111-227	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	3-EH0309-104	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	99
	4-EH0613-16	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074400.1	100
ZSP (◆)	1-EH0312-1	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074402.1	100
	2-EH0312-2	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	99
	3-EH0312-3	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074402.1	100
	4-EH0312-4	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	5-EH0312-5	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	99
	6-EH0312-6	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	99
	7-EH0413-1	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	99
	8-EH0413-2	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	9-EH0413-3	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	10-EH0413-4	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	11-EH0413-5	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	12-EH0413-6	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	13-EH0413-7	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074401.1	100
	14-EH0413-8	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	15-EH0413-9	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	100
	16-EH0413-10	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074400.1	100
	17-EH0612	<i>Zearaja chilensis</i>	EU074404.1	99

*El nombre de cada ejemplar indica la campaña en que fue capturado.

pos con secuencias de referencia, se tomaron de la base de datos de BOLD todas las secuencias COI correspondientes a las especies *D. argentinensis* y *Z. chilensis*, obteniéndose un total de 28 secuencias de referencia (Tabla 2). Todavía algu-

nos ejemplares de la base de datos figuran como *D. chilensis*; en este trabajo se conservaron los nombres tal cual como se obtuvieron de la misma y tomamos a *D. chilensis* como sinónimo de *Z. chilensis*.



Figura 2. Imagen dorsal de un ejemplar perteneciente al grupo ZSP con patrón de espinulación distinto al descrito para *Zearaja chilensis*. Corresponde a una hembra con dos hileras de espinas a ambos lados de la línea media caudal hasta la mitad del disco. Solo se muestra imagen de ese patrón ya que no se poseen registros fotográficos de los ejemplares con espinas dispuestas en forma aleatoria sobre la parte posterior del disco.

Figure 2. Dorsal image of a ZSP specimen with a different thorny pattern than the one described for *Zearaja chilensis*. It corresponds to a female with two rows of thorns on both sides of the median line from the tail to the middle of the disk. Only the image of that pattern is shown as there are no photographic records of the specimens with thorns randomly scattered on the back of the disk.

El alineamiento múltiple se llevó a cabo con el programa ClustalW 2.0 (Larkin *et al.*, 2007), se determinaron los haplotipos, la diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) usando Dnasp 5.1 (Librado y Rozas, 2009) y los sitios conservados, variables e informativos, por medio de MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). Se elaboró una red de haplotipos por Median-Joining utilizando el software Network 4.6.1.3. Se calcularon las distancias genéticas intra e interespecíficas usando el modelo de distancias K2P (Kimura, 1980), se generó una matriz de distancias de a pares con todas las secuencias obtenidas y las extraídas de las bases de datos, y se realizó una representación gráfica mediante Neighbour-Joining (NJ) con 5.000 réplicas de *bootstrap* para evaluar la topología, aplicando el software MEGA 5.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema de identificación de BOLD permitió identificar los ejemplares a nivel de especie con porcentajes de similitud mayores a 99% con su mejor coincidencia en todos los casos (Tabla 1). Las secuencias correspondientes a los ejemplares del grupo DARG coincidieron con la especie *D. argentinensis*, y tanto los ejemplares del grupo ZCHIL como los de ZSP, obtuvieron sus mayores porcentajes de similitud con secuencias de referencia de la especie *Z. chilensis* correspondientes a ejemplares capturados en el Mar Argentino (Tablas 1 y 2).

El alineamiento múltiple, conformado por 51

Tabla 2. Distribución geográfica de los ejemplares correspondientes a las secuencias de referencia tomadas de la base de datos BOLD.
 Table 2. Geographic distribution of specimens corresponding to the reference sequences taken from the BOLD database.

Secuencia de referencia	Coordenada de captura	Referencia geográfica	Referencia
FARG127-06/D. <i>argentinensis</i> EU074411	50.15° S-63.35° W	Patagonia argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG019-06/D. <i>argentinensis</i> EU074405	46.038° S-66.462° W	Patagonia argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG318-07/D. <i>argentinensis</i> EU074408	45.54° S-66.1° W	Patagonia central argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG319-07/D. <i>argentinensis</i> EU074407	45.54° S-66.1° W	Patagonia central argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG320-07/D. <i>argentinensis</i> EU074406	45.54° S-66.1° W	Patagonia central argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG021-06/D. <i>argentinensis</i> EU074410	45.387° S-64.087° W	Patagonia central argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG020-06/D. <i>argentinensis</i> EU074409	45.468° S-64.473° W	Patagonia central argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG567-09/Z. <i>chilensis</i>	Sin datos	Costa bonaerense, Mar Argentino	No publicado
FARG568-09/Z. <i>chilensis</i>	Sin datos	Costa bonaerense, Mar Argentino	No publicado
FARG569-09/Z. <i>chilensis</i>	Sin datos	Costa bonaerense, Norte de la Patagonia, Mar Argentino	No publicado
FARG016-06/D. <i>chilensis</i> EU074400.1	46.471° S-66.369° W	Patagonia argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG014-06/D. <i>chilensis</i> EU074404.1	46.471° S-66.369° W	Patagonia argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG015-06/D. <i>chilensis</i> EU074402.1	46.471° S-66.369° W	Patagonia argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG018-06/D. <i>chilensis</i> EU074403.1	46.31° S-66.592° W	Patagonia argentina	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
FARG338-07/D. <i>chilensis</i> EU074401.1	34.57° S-52.26° W	Uruguay, Atlántico	Mabragaña <i>et al.</i> (2011)
Z. <i>chilensis</i> NC 023944	Sin datos	Sin datos	Jeong y Lee (2014)
FCHIL131-06/Z. <i>chilensis</i>	54.05° S-72.11° W	Canal Bárbara, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL134-06/Z. <i>chilensis</i>	54.05° S-72.11° W	Canal Bárbara, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL136-06/Z. <i>chilensis</i>	54.03° S-71.23° W	Canal Lyell, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL135-06/Z. <i>chilensis</i>	54.03° S-71.23° W	Canal Lyell, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL139-06/Z. <i>chilensis</i>	54.03° S-71.23° W	Canal Lyell, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL133-06/Z. <i>chilensis</i>	54.03° S-71.23° W	Canal Lyell, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL128-06/Z. <i>chilensis</i>	54.03° S-71.23° W	Canal Lyell, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL127-06/Z. <i>chilensis</i>	52.05° S-74.08° W	Canal Molinas, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL126-06/Z. <i>chilensis</i>	52.05° S-74.08° W	Canal Molinas, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL130-06/Z. <i>chilensis</i>	52.05° S-74.08° W	Canal Molinas, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
FCHIL129-06/Z. <i>chilensis</i>	52.05° S-74.08° W	Canal Molinas, Estrecho de Magallanes, Chile	No publicado
Z. <i>chilensis</i> KJ913073	33.58° S-71.63° W	San Antonio, Chile	Vargas-Caro <i>et al.</i> (2014)

secuencias, entre las obtenidas para nuestros ejemplares y las de *D. argentinensis* y *Z. chilensis* tomadas de la base de datos, resultó en un total de 659 sitios. Luego de descartar los *gaps* y los sitios sin información se obtuvieron un total de 455 pb, donde se pudieron discriminar 429 sitios conservados y 26 sitios variables (25 sitios parsimoniosamente informativos y un sitio de variación simple, es decir con una sola secuencia que difiere en esa posición). La Tabla 3 muestra una porción del alineamiento con los sitios variables y los haplotipos obtenidos. Para las secuencias del grupo DARG se hallaron dos haplotipos, uno de ellos identificado en este trabajo (HA1), y el otro (HA2) que coincidió con el de las secuencias de *D. argentinensis* extraídas de BOLD. En las cuatro secuencias del grupo ZCHIL, se encontraron tres haplotipos (HC1 a HC3), todos reportados previamente (Tabla 3). Con respecto al grupo ZSP, con 17 secuencias, se encontraron siete haplotipos, dos nuevos (HC5 y HC6), y los cinco restantes (HC1, HC2, HC3, HC4 y HC7) coincidieron con haplotipos de *Z. chilensis* también ya reportados. Además, el alineamiento permitió identificar sitios informativos específicos para ZSP, ZCHIL y *Z. chilensis* (posiciones 139, 160, 313, 370, 397, 413, 508, 542 y 558) que confirmaron los resultados de identificación de ZSP como *Z. chilensis*, considerando las secuencias del sector Atlántico. Por otro lado, el haplotipo HC8, compuesto por las secuencias de referencia de *Z. chilensis* (KJ913073, FCHIL126-06, FCHIL 127-06, FCHIL 128-06, FCHIL 129-06, FCHIL 130-06, FCHIL 133-06, FCHIL 135-06, FCHIL 136-06, FCHIL 139-06) correspondientes a especímenes capturados en el Estrecho de Magallanes y centro de Chile (Tabla 2), presenta sitios informativos particulares (283, 289, 316, 400, 481 y 526); y a su vez, este haplotipo no es compartido con ningún ejemplar de ZSP, ZCHIL o *Z. chilensis* del Atlántico. Este resultado evidencia que los ejemplares pertenecientes al haplotipo HC8 muestran una diferenciación genética marcada con respecto a los demás. En cambio dos secuencias de referen-

cia chilenas (FCHIL 131-06 y FCHIL 134-06), coincidieron con el haplotipo HC5, compuesto por secuencias muestreadas del lado argentino.

Para estudiar la relación entre los distintos haplotipos y la distribución geográfica, se realizó una red de haplotipos por el método de Median-Joining (Figura 3). Este tipo de redes consiste en una serie de esferas conectadas donde cada una representa un haplotipo. El diámetro de las esferas es proporcional a la frecuencia del mismo, es decir a la cantidad de individuos de la muestra que llevan ese haplotipo, y las líneas que conectan a los haplotipos muestran los pasos mutacionales que existen entre los mismos, además de su cercanía genética. A partir de este análisis se puede observar que los ocho haplotipos de *Z. chilensis* se agrupan en dos linajes principales (nombrados como I y II) y *D. argentinensis* en otro clado único (nombrado como III). El linaje I está conformado por los haplotipos HC1 a HC7 correspondientes a los ejemplares de los grupos ZCHIL, ZSP y *Z. chilensis* de referencia de distribución en el Mar Argentino y ZCPAU (Tabla 2; Figura 3), a excepción del haplotipo HC5 que fue compartido por dos ejemplares de distribución chilena. Este linaje presenta la mayor diversidad genética según los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica ($H_d = 0,813$; $\pi = 0,003$) y muestra dos haplotipos muy frecuentes, el HC1 y el HC2, representados por las esferas de mayor diámetro dentro de este clado. Con respecto al haplotipo HC2, se puede ver que del mismo irradian el resto de los haplotipos, por lo tanto se podría suponer que este es un haplotipo ancestral. Se observó que ese haplotipo está compuesto en su mayoría por ejemplares del grupo ZSP con mayor espínulación en el disco. El linaje I mostró que los haplotipos correspondientes a ejemplares de distribución argentina, están relacionados genéticamente de forma muy cercana. El linaje II ($H_d = 0,53$; $\pi = 0,0008$), está formado exclusivamente por secuencias pertenecientes a ejemplares de distribución chilena y está representado por el haplotipo único HC8. La alta cantidad de posicio-

Tabla 3. Continuación.
Table 3. Continued.

		1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		3	6	8	2	6	8	8	0	1	1	4	4	7	9	0	1	6	8	0	0	0	2	3	4	5	8
Haplotipo		9	0	1	6	5	3	9	1	3	6	0	4	0	7	0	3	6	1	2	5	8	6	0	2	8	2
<i>Z. chilensis</i> FCHIL134-06	HC4	A	C	A	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
<i>Z. chilensis</i> FCHIL131-06		A	C	A	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
<i>D. chilensis</i> EU074402.1		A	C	A	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
<i>D. chilensis</i> EU074403.1		A	C	A	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
EH0312-1 (ZSP)		A	C	A	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
EH0312-3 (ZSP)		A	C	A	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
EH0413-1 (ZSP)	HC5	A	.	A	A	.	.	.	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
EH0312-2 (ZSP)		A	.	A	A	.	.	.	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
EH0312-6 (ZSP)	HC6	A	.	A	.	G	.	.	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	A	G	.	C	A	G	T		
<i>D. chilensis</i> EU074401.1	HC7	A	.	A	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	T	.	G	.	C	A	G	T	
EH0413-7 (ZSP)		A	.	A	A	.	.	T	A	C	.	A	.	.	T	.	G	.	C	A	G	T	
<i>Z. chilensis</i> KJ913073	HC8	T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL126-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL127-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL128-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL129-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL130-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL133-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL135-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL136-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	
<i>Z. chilensis</i> FCHIL139-06		T	A	.	.	T	.	T	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	C	.	T	

nes mutadas entre éste y el linaje I muestra una distancia genética considerable que no responde a lo esperado para una misma especie. Por último, el linaje III está representado por los haplotipos de *D. argentinensis* (HA1 y HA2) que pertenecen a ejemplares de distribución argentina. La menor diversidad genética encontrada en este linaje ($Hd = 0,58$; $\pi = 0,001$) podría deberse al bajo número de ejemplares analizados.

En la representación gráfica de distancias K2P,

realizada por NJ (Figura 4) se observa que las especies de *D. argentinensis* y *Z. chilensis* formaron dos clados, soportados por valores de 90% de bootstraps. Por un lado con 100% de bootstraps, las secuencias de ZCHIL y ZSP forman un clado junto con las secuencias de referencia de *Z. chilensis* (*Z. chilensis* FARG 568-09, *Z. chilensis* FARG 567-09, *D. chilensis* FARG 016-06, *Z. chilensis* FARG 569-09, *D. chilensis* FARG 014-06, *Z. chilensis* NC 023944, *D. chilensis* FARG 015-

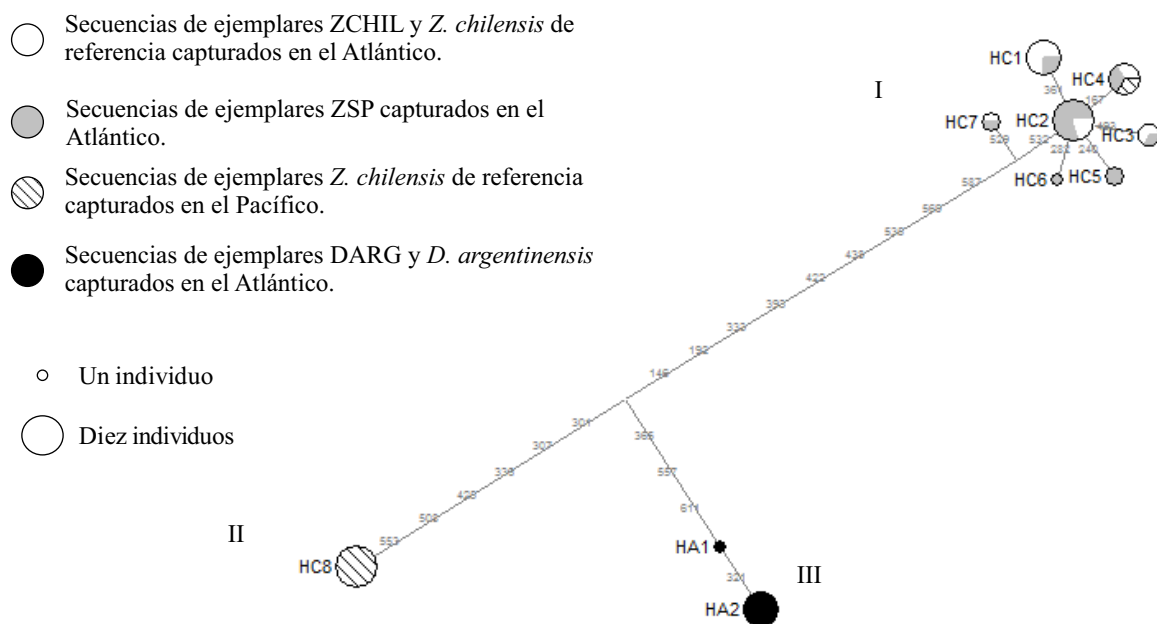


Figura 3. Red Median-Joining de haplotipos. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los conectores entre haplotipos muestran los pasos mutacionales que los relacionan. Los haplotipos HC1-HC8 y HA1-HA2 corresponden a las secuencias de *Zearaja chilensis* y *Dipturus argentinensis*, respectivamente. Los nombres de los haplotipos coinciden con los de la Tabla 3.

Figure 3. Median-Joining network of haplotypes. The size of circles is proportional to the haplotype frequency. The connectors among haplotypes show the mutational steps that relate them. The HC1-HC8 and HA1-HA2 haplotypes correspond to the *Zearaja chilensis* and *Dipturus argentinensis* sequences, respectively. Haplotypes names are as in Table 3.

06, *D. chilensis* FARG 018-06, *Z. chilensis* FCHIL 131-06, *Z. chilensis* FCHIL 134-06, *D. chilensis* FARG 338-07) que tienen distribución en el Océano Atlántico, en forma conjunta con las secuencias de *Z. chilensis* de referencia (FCHIL 131-06 y FCHIL 134-06) que corresponden a ejemplares capturados en el Canal Bárbara; en la región austral de Chile. El otro clado (98% *bootstraps*), está formado por dos grupos monofiléticos, uno correspondiente a todos los *D. argentinensis* (98% *bootstraps*) y el otro formado por las secuencias de *Z. chilensis* (96% *bootstraps*), que corresponden al haplotipo HC8 en la red de haplotipos (Figura 3; Tabla 3), y son ejemplares capturados en el Estrecho de Magallanes y en el centro de Chile. El árbol generado coincide con los resultados obtenidos en la red Median-Joining, donde los haplotipos de ZCHIL y ZSP se comparten con los haplotipos de *Z. chilensis* de

distribución argentina, más dos del Pacífico, separados de *D. argentinensis* y de las secuencias del haplotipo HC8, compuesto en su totalidad por muestras del sector pacífico. Estos resultados revelan que, dentro de la denominación de *Z. chilensis*, habría dos especies diferenciadas entre el lado pacífico y atlántico, con un solapamiento en el extremo sur del continente.

El análisis de divergencias genéticas se llevó a cabo a partir del cálculo de distancias K2P intra e interespecífica (Tabla 4). Debido a los resultados obtenidos en la red de haplotipos y el árbol NJ, las distancias K2P intraespecíficas se calcularon para dos grupos (Tabla 4 A), uno compuesto por todas las secuencias de *Z. chilensis*, ZSP y ZCHIL que componen el linaje I en la red de haplotipos (incluidas las dos secuencias chilenas), y el otro grupo por las secuencias de *D. argentinensis* (linaje III en la red Median-Joi-

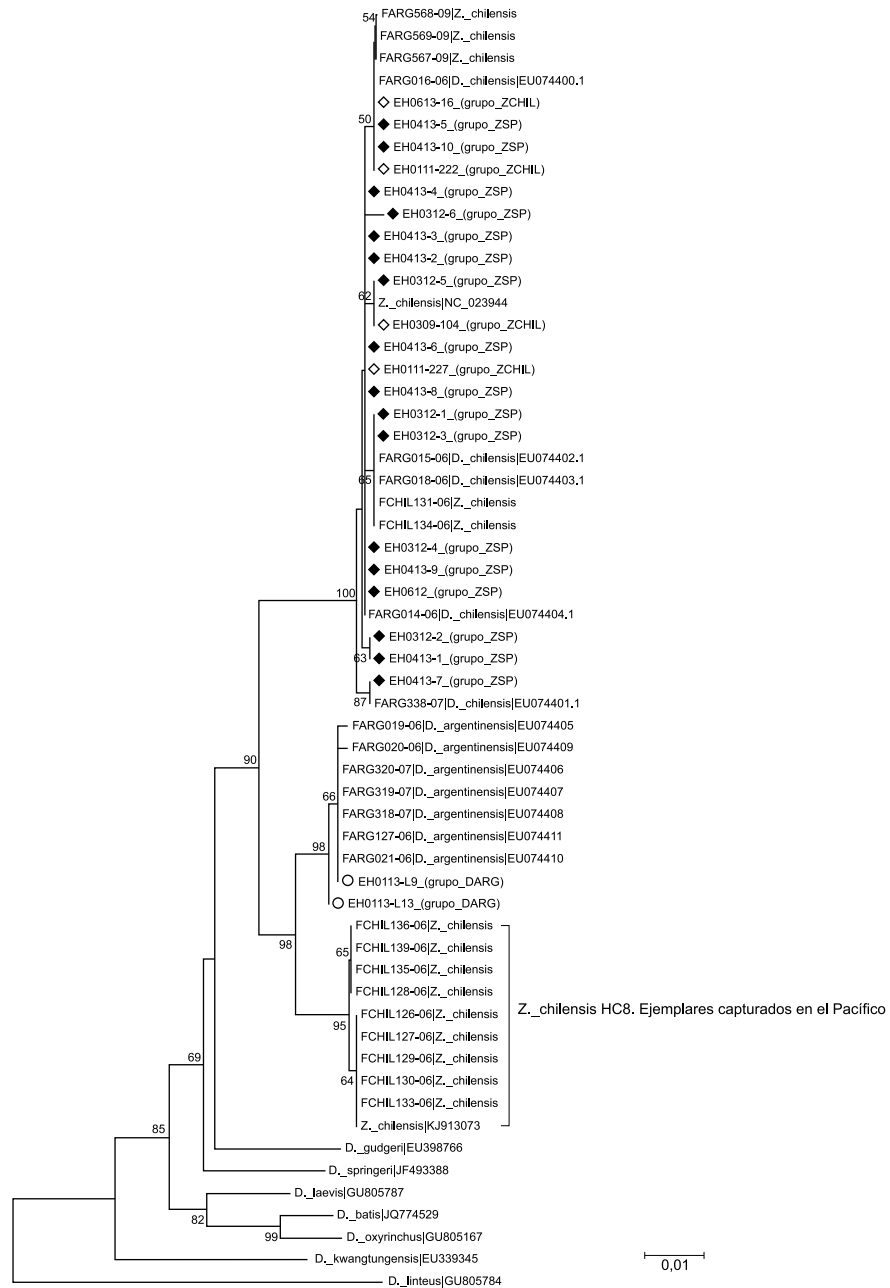


Figura 4. Representación gráfica de las distancias K2P por Neighbour-Joining (5.000 réplicas de *bootstrap*) para las secuencias COI de los ejemplares ZSP (◆), ZCHIL (◇) y DARG (○) y las secuencias de *Dipturus* y *Zearaja chilensis* extraídas de la base de datos BOLD. Las secuencias de referencia se muestran con el código de acceso correspondiente al ejemplar tal como figura en la base de datos BOLD.

Figure 4. Graphic representation of K2P distance values by Neighbour-Joining (5,000 *bootstrap*) for COI sequences of ZSP specimens (◆), ZCHIL (◇) and DARG (○) and sequences of *Dipturus* and *Zearaja chilensis* taken from the BOLD database. The reference sequences are with the access code corresponding to the specimen as shown in the BOLD data base.

Tabla 4. Media de las distancias K2P (porcentajes). A) Intraespecífica. La distancia para *Zeraja chilensis* se calculó a partir de las secuencias correspondientes al linaje I en la red de haplotipos Median-Joining. La distancia para *Dipturus argentinensis* se calculó a partir de las secuencias de referencia tomadas de la base de datos BOLD y las del grupo DARG. B) Interespecífica.

Table 4. Mean of the K2P distances (percentages). A) Intraspecific. The distance for *Zeraja chilensis* was calculated from the sequences corresponding to lineage I in the Median-Joining haplotypes network. The distance for *Dipturus argentinensis* was calculated based on the reference sequences taken from the BOLD database and those of the DARG group. B) Interspecific.

A						
	<i>Zeraja chilensis</i>		<i>Dipturus argentinensis</i>			
	0,22		0,1			

B						
Secuencias	1	2	3	4	5	6
1 ZCHIL						
2 ZSP	0,19					
3 <i>Zeraja chilensis</i>	0,22	0,24				
4 <i>Zeraja chilensis</i> HC8	3,38	3,34	3,46			
5 DARG	3,02	2,98	3,1	1,54		
6 <i>Dipturus argentinensis</i>	3,19	3,16	3,24	1,68	0,12	

ning). En cuanto a las distancias interespecíficas, con el objetivo de obtener información de la divergencia existente entre las secuencias de nuestros ejemplares y las de referencia, se calcularon las distancias tomando 6 grupos de manera separada (Tabla 4B). Tres grupos con las secuencias de referencia extraídas de BOLD; *D. argentinensis*, *Z. chilensis* y *Z. chilensis* HC8, este último corresponde a las secuencias del haplotipo HC8 que tienen distribución en el Pacífico; y los tres grupos restantes con las secuencias de DARG, ZCHIL y ZSP.

Las distancias intraespecíficas (Tabla 4 A) fueron de 0,22% para la especie *Z. chilensis*, calculada a partir de 32 secuencias, y 0,1% para *D. argentinensis*, calculada a partir de nueve secuencias. El cálculo de distancias interespecíficas (Tabla 4 B) permitió confirmar los resultados de identificación para cada grupo, obtenidos a partir

del Sistema de Identificación de BOLD (Tabla 1). La distancia génica entre el grupo DARG y las secuencias *D. argentinensis* fue baja, del 0,12%. Las distancias entre los grupos ZCHIL y ZSP con las secuencias de referencia *Z. chilensis*, también fueron bajas, 0,22 y 0,24%, respectivamente. Asimismo se pudo determinar que las especies simpátricas *D. argentinensis* y *Z. chilensis* divergen en promedio en un 3,1%. Este grado de divergencia interespecífica coincide con lo reportado por Díaz de Astarloa *et al.* (2008) quienes caracterizaron a *D. argentinensis* como una nueva especie de raya del Mar Argentino. En el mencionado estudio, se incluyó, además de la primera descripción morfológica de la raya argentina, una comparación de los *DNA barcodes* de siete ejemplares de *D. argentinensis* con los de *Z. chilensis* y obtuvieron una divergencia genética de 3,15% entre ambas especies. Por otro lado, como era de espe-

rar y en concordancia con los resultados obtenidos en la red de haplotipos y la filogenia NJ, la distancia entre *Z. chilensis* HC8 y las secuencias de *Z. chilensis* de referencia del lado argentino fue alta (3,46%), mientras que entre *Z. chilensis* HC8 y *D. argentinensis*, la distancia genética fue menor (1,68%).

En un estudio realizado a partir de los *DNA barcodes* de 1.088 especies de peces, Ward (2009) planteó que las distancias genéticas pueden ser una herramienta útil en la identificación taxonómica de los ejemplares. Según este trabajo, Ward encontró que si una muestra de un espécimen no identificado muestra una distancia K2P $\leq 0,5\%$ con otro ejemplar, entonces existe una probabilidad mayor al 95% de que esos especímenes sean de la misma especie. Esta probabilidad disminuye a medida que aumenta la distancia. Para una distancia 0,5-1%, la probabilidad de que sean de la misma especie disminuye al 70% y para K2P 1-1,5%, cae al 40%. Sin embargo, se determinó que solo el 2,1-2,5% de las especies analizadas no pueden ser distinguidas por *DNA Barcode*, pero representaron casos especiales de especies crípticas o mal identificadas. Por otro lado, si el espécimen desconocido diverge más del 2% con respecto a otras especies identificadas, es muy probable ($> 95\%$ de probabilidad) que sean especies diferentes. Por lo tanto, los resultados en las distancias interespecíficas menores a 0,5% confirman la identificación de los ejemplares de ZSP como *Z. chilensis* sobre la base de las secuencias de referencia del lado argentino (divergencia de 0,24%); y los valores de divergencia $> 2\%$, sugieren que las secuencias de referencia de *Z. chilensis* HC8 del lado pacífico, no corresponden a la misma especie que los ejemplares de *Z. chilensis* del lado atlántico, ya que presentan una divergencia interespecífica de 3,46%.

La descripción original de la raya que denominamos *Z. chilensis* (en su momento *Raia chilensis*) se basa en una breve reseña que hace Guichenot (1848), de un ejemplar macho juvenil

capturado en la costa de la Quinta Región chilena. Phillippi (1892) describe a la raya *Z. flavirostris* (en su momento *Raja flavirostris*) analizando dos ejemplares hembras en la misma región. Norman (1937) hace una exhaustiva redescrición de *Z. flavirostris* basándose en 15 ejemplares capturados en la plataforma patagónica argentina. Last y Gledhill (2007) reasignan a estas especies al Género *Zearaja*, y sinonimizan *Z. flavirostris* con *chilensis*, al igual que Vargas-Caro *et al.* (2015). Sin embargo, Naylor *et al.* (2012 a, b), sobre la base de un análisis filogenético con NADH2, reconoce taxativamente que *Z. flavirostris* (con tres ejemplares colectados en las Islas Malvinas) es una especie diferente de *Z. chilensis*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que dentro de la denominación de *Z. chilensis* se encontrarían representadas dos especies diferentes, y concuerdan con los estudios realizados por Naylor *et al.* (2012 a, b) con otro marcador molecular. Por lo tanto, se sugiere adoptar la nomenclatura seguida por estos últimos investigadores, en la designación de las rayas correspondientes al Atlántico sudoccidental como *Z. flavirostris*. De hecho varios autores, tanto argentinos como extranjeros, han considerado esta raya bajo esta denominación y así se encuentra citada en la literatura (Menni y Stehmann, 2000; Bovcon y Cochia, 2007; Menni *et al.*, 2010; Weigmann, 2016).

Por otro lado, en el presente trabajo se consideró a *D. argentinensis* y *Z. chilensis* como especies pertenecientes a géneros diferentes. Según el cálculo de distancias *D. argentinensis* difieren en un 3,24% de *Z. chilensis*, considerando los ejemplares del Atlántico, y en un 1,68% de los *Z. chilensis* del Pacífico (Tabla 4 B). Estos valores de K2P caen en el rango de 1,5-7%, establecido por Ward (2009) para peces de distintas especies del mismo género. A su vez, teniendo en cuenta el agrupamiento monofilético de estas dos especies (Figura 4), *Dipturus argentinensis* debería ser denominada *Zearaja argentinensis*, en coincidencia con otros autores (Weigmann, 2016; Last *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, concluimos que el COI (*DNA Barcode*) es una herramienta útil y eficiente para la identificación de especies de rayas de los géneros *Dipturus* y *Zearaja*.

En este trabajo se logró confirmar la identidad de los ejemplares con patrón de espinulación diferente al descrito para la raya hocicuda, demostrando de esta forma que los mismos se asocian con las *Z. chilensis* muestreadas en el Mar Argentino, por lo que se trataría de una especie que presenta al menos tres morfotipos distintos en cuanto al patrón de espinulación. De las secuencias de referencia que se tomaron de la base de datos de BOLD, se encontró que los ejemplares de distribución en el Océano Pacífico presentan una diferenciación genética marcada con las secuencias de referencia tomadas del lado atlántico, en conjunto con las muestras analizadas en el presente trabajo, más dos secuencias de referencia chilenas correspondientes al Estrecho de Magallanes. Esto permite deducir que estamos identificando como *Z. chilensis* a dos especies diferentes, que se solapan en el extremo sur del continente. Ante estas claras evidencias, respecto a la presencia de dos especies dentro de la denominación *Z. chilensis*, se aconsejaría adoptar el nombre *Z. flavirostris* para la forma atlántica, tomando como referencia los trabajos de Naylor *et al.* (2012 a, b).

En base a las distancias genéticas K2P y a la asociación de las secuencias de *Dipturus argentinensis* con las especies de *Zearaja* en el análisis filogenético, se permitiría concluir que las especies analizadas corresponderían a este último género. Por lo tanto, *D. argentinensis* debería ser considerada como *Zearaja argentinensis* de acuerdo con Last *et al.* (2016). En este punto sería necesario un estudio pormenorizado de la morfología del clasper para complementar los resultados genéticos.

Los datos aportados por el presente estudio facilitan la identificación de especies de *Zearaja* y *Dipturus*. La información que se brinda en este trabajo es un importante aporte al conocimiento del recurso "rayas", contribuye a la conservación de la biodiversidad de estas especies, constituye un complemento de las descripciones morfológicas y concuerda con el nuevo paradigma, de incluir los *barcodes* como parte de la descripción de especies.

No obstante, es necesario profundizar las investigaciones en la morfología de estos peces e incluir el estudio genético con otros marcadores, para de este modo, mejorar la comprensión del status taxonómico y sistemático de estas especies y establecer las relaciones evolutivas entre ellas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Jorge Colonello por facilitarnos muestras y datos de muestreo. A las Dras. María Inés Trucco y Montserrat Pérez Rodríguez, por sus correcciones y colaboración en la revisión del trabajo. A la Dra. Elena Okada por su colaboración en las traducciones y la Lic. Paula Moriondo Danovaro en la confección de los mapas.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDREOLI, G. & TRUCCO, M.I. 2012. Evaluación de diferentes protocolos de extracción de ADN en muestras de músculo de espina dorsal en *Mustelus schmitti*. Inf. Invest. INIDEP N° 07/2012, 8 pp.
- BALECH, E. & EHRLICH, M.D. 2008. Esquema biogeográfico del Mar Argentino. Rev. Invest. Desarr. Pesq., 19: 45-75.
- BOVCON, N. & COCHIA, P. 2007. Guía para el reconocimiento de peces capturados por buques pesqueros monitoreados con observa-

- dores a bordo. Secretaría de Pesca de la Provincia del Chubut, Rawson, 44 pp.
- CLARE, E.L., LIM, B.K., ENGSTROM, M.D., EGER, J.L. & HEBERT, P.D. 2007. DNA barcoding of neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Mol. Ecol. Notes*, 7: 184-190.
- COMPAGNO, L.J.V. 1999. Checklist of living elasmobranchs. En: HAMLETT, W.C. (Ed.). *Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes*. Johns Hopkins University Press, Baltimore: 471-498.
- DÍAZ DE ASTARLOA, J.M., MABRAGAÑA, E., HANNER, R. & FIGUEROA, D.E. 2008. Morphological and molecular evidence for a new species of longnose skate (Rajiformes: Rajidae: *Dipturus*) from Argentinean waters based on DNA barcoding. *Zootaxa*, 1924: 35-46.
- DULVY, N.K. & REYNOLDS, J.D. 2002. Predicting extinction vulnerability in skates. *Conserv. Biol.*, 16: 440-450.
- DULVY, N.K., SIMPFENDORFER, C.A., DAVIDSON, L., FORDHAM, S.V., BRAUTIGAM, A., SANT, G. & WELCH, D.J. 2017. Challenges and priorities in shark and ray conservation. *Curr. Biol.*, 27, 565-572.
- EBERT, D.A. & COMPAGNO, L.J.V. 2007. Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environ. Biol. Fis.*, 80: 111-124.
- FIGUEROA, D.E. 2011. Clave ilustrada de agnatos y peces cartilagosos de Argentina y Uruguay. En: WÖHLER, O.C., CEDROLA, P. & COUSSEAU, M.B. (Eds.). *Contribuciones sobre biología, pesca y comercialización de tiburones en la Argentina*. Aportes para la elaboración del Plan de Acción Nacional. Consejo Federal Pesquero, Buenos Aires: 25-74.
- FIGUEROA, D.E. (en prensa). Clave de peces marinos del Atlántico Sudoccidental, entre los 33° S y 56° S. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata.
- GOMES, U.L. & PICADO, S.S. 2001. Distribution of the species of *Dipturus* Rafinesque (Rajidae, Rajinae, Rajini) off Brazil and first record of the Caribbean skate *D. teevani* (Bigelow & Schroeder), in the Western South Atlantic. *Rev. Brasil. Zool.*, 18: 171:185.
- GUICHENOT, A. 1848. Fauna Chilena, Peces. En: GAY, C. (Ed.). *Historia física y política de Chile II*. Museo de Historia Natural de Chile, Santiago: 137-370.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- HEBERT, P.D., CYWINSKA, A., BALL, A. & DE WAARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcode. *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci.*, 270: 313-322.
- HEBERT, P.D., STOECKLE, M.Y., ZEMLAK, T.S. & FRANCIS, C.M. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PloS Biology*, 2: 1657-1663.
- HOENIG, J.M. & GRUBER, S.H. 1990. Life-history patterns in the elasmobranchs: implications for fisheries management. En: PRATT JR., H., GRUBER, S.H. & TANIUCHI, T. (Eds.). *Elasmobranchs as living Resources: Advances in the Biology, Ecology, Systematics and the Status of the Fisheries*. NOAA Tech. Rep. NMFS, 90: 1-16.
- HOGG, I.D. & HEBERT, P.D. 2004. Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can. J. Zool.*, 82: 749-754.
- HOZBOR, N.M., COLONELLO, J.H. & MASSA, A.M. 2011. Composición específica y distribución de los peces cartilagosos en el sector del Atlántico Sudoccidental comprendido entre 34° S-55° S. Período 2003-2005. En: WÖHLER, O.C., CEDROLA, P. & COUSSEAU, M.B. (Eds.). *Contribuciones sobre biología, pesca y comercialización de tiburones en la Argentina*. Aportes para la elaboración del Plan de Acción Nacional. Consejo Federal Pesquero, Buenos Aires: 89-100.

- ICZN. 1964. International Code of Zoological Nomenclature. The International Trust for Zoological Nomenclature, London.
- JEONG, D. & LEE, Y.H. 2014. Complete mitochondrial genome of the Yellownose skate: *Zearaja chilensis* (Rajiformes, Rajidae). Mitochondrial DNA Part A, 27: 293-294.
- JOHNS, G. & AVISE, J. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. Mol. Biol. Evol., 15: 1881-1490.
- KIMURA, M. 1980. A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16: 111-120.
- KREFFT, G. & STEHMANN, M. 1975. Ergebnisse der Forschungsreisen des FFS "Walther Herwig" nach Südamerika. XXXVI. Zwei weitere neue Rochenarten aus dem Südwestatlantik: *Raja (Dipturus) leptocauda* und *Raja (Dipturus) trachyderma* spec. nov. (Chondrichthyes, Rajoidei, Rajidae). Archiv für Fischereiwissenschaft, 25: 77-97.
- KYNE, P.M., LAMILLA, J., LICANDEO, R.R., SAN MARTÍN, M., STEHMANN, M.F.W. & MCCORMACK, C. 2007. *Zearaja chilensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2015.1. <www.iucnredlist.org>.
- LAMILLA, J. & BUSTAMANTE, C. 2005. Guía para el reconocimiento de tiburones, rayas y quimeras de Chile. Oceana, 17: 1-80.
- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H. & HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23: 2947-2948.
- LAST, P.R. & GLEDHILL, D. 2007. The Maugean skate, *Zearaja maugeana* sp. nov. (Rajiformes: Rajidae) a micro endemic Gondwanan relict from Tasmanian estuaries. Zootaxa, 1494: 45-65.
- LAST, P.R., WHITE, W., DE CARVALHO, M., SÉRET, B., STEHMANN, M. & NAYLOR, G.J.P. 2016. Rays of the World. CSIRO Publishing, 790 pp.
- LEFÉBURE, T., DOUADY, C.J., GOUY, M. & GIBERT, J. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. Mol. Phylogenet. Evol., 40: 435-447.
- LEIBLE, M.D. 1987. Descripción taxonómica de juveniles y adultos de *Raja (Dipturus) flavirostris* Philippi 1892 (Rajiformes, Rajidae), capturados frente a la costa de Chile central. Gayana, 51: 131-176.
- LEIBLE, M.D. & STEHMANN, M. 1987. First records of *Raja (Dipturus) trachyderma* Krefft and Stehmann, 1975 from the southeastern Pacific off Chile, with first descriptions of its clasper characters and additional skeletal and morphological details (Pisces, Rajiformes, Rajidae). Stud. Neotrop. Fauna E., 22: 169-188.
- LEIBLE, M., CARVAJAL, J. & FUENTEALBA, M. 1990. Polimorfismo en *Raja (Dipturus) flavirostris* Philippi 1892: Análisis morfológico y parasitario. Bol. Soc. Biol. Concepción, 61: 93-102.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25: 1451-1452.
- MABRAGAÑA, E., DÍAZ DE ASTARLOA, J.M., HANNER, R., ZHANG, J. & GONZÁLEZ-CASTRO, M. 2011. DNA barcoding identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. PloS One 6:e28655. doi:10.1371/journal.pone.0028655.
- MASSA, A.M., LUCÍFORA, L.O. & HOZBOR, N. 2004. Condrictios de las regiones costeras bonaerense y uruguayana. En: SÁNCHEZ, R. & BEZZI, S.I. (Eds.). El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 4. Biología y evaluación del estado de explotación. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata: 85-99.
- MENNI, R.C. & GOSZTONYI, A.E. 1977. Nuevas localidades para *Raja trachyderma* y *Lamna nasus* (Chondrichthyes, Rajidae y Lamnidae). Neotropica, 26: 65-68.

- MENNI, R.C. & STEHMANN, M.F.W. 2000. Distribution, environment and biology of batoid fishes off Argentina, Uruguay and Brazil. A review. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.*, n.s., 2: 69-109.
- MENNI, R.C., JAUREGUIZAR, A.J., STEHMANN, M.F. & LUCIFORA, L.O. 2010. Marine biodiversity at the community level: zoogeography of sharks, skates, rays and chimaeras in the southwestern Atlantic. *Biodivers. Conserv.*, 19: 775-796.
- NAYLOR, G.J.P., CAIRA, J.N., JENSEN, K., ROSANA, K.A.M., WHITE, W.T. & LAST, P.R. 2012 a. A DNA sequence-based approach to the identification of sharks and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist. N. Y.*, 367: 1-262.
- NAYLOR, G.J.P., CAIRA, J.N., JENSEN, K., ROSANA, K.A.M., WHITE, W.T., STRAUBE, N. & LAKNER, C. 2012 b. Elasmobranch Phylogeny: A mitochondrial estimate based on 595 species. En: CARRIER, J.A. & HEITHAUS, M.R. (Eds.). *Biology of sharks and their relatives*. CRC Press, Boca Ratón: 31-56.
- NORMAN, J.R. 1937. Coast fishes Part II: The Patagonian region. *Discovery reports*, 16: 1-150.
- PEREZ COMESAÑA, J.E., PERRIER, M.R., DI GIÁCOMO, E., COLLER, N.M., AVERSA, M., GARCÍA, N.A., GARCÍA, M., LÓPEZ CASORLA, A., MANSUR, L., SAN MARTÍN, M.J., COUSSEAU, M.B., CHAVEZ, L. & FIGUEROA, D. 2011. ¿Cuánto sabemos sobre la biología de los condriictios del Mar Argentino? Reseña de las actividades realizadas por el grupo biología. En: WÖHLER, O.C., CEDROLA, P. & COUSSEAU, M.B. (Eds.). *Contribuciones sobre biología, pesca y comercialización de tiburones en la Argentina*. Aportes para la elaboración del Plan de Acción Nacional. Consejo Federal Pesquero, Buenos Aires: 9-24.
- PHILLIPPI, R.A. 1892. Algunos peces de Chile: Las rayas, *Callorhynchus* i *Orthogoriscus* chilenos. *Anales del Museo Nacional de Chile*, 3: 1-16.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes*, 7: 355-364.
- ROBERTS, C.M. & HAWKINS, J.P. 1999. Extinction risk in the sea. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 241-246.
- SÁNCHEZ, R.P., NAVARRO, G., CALVO, E. & DEL CASTILLO, F. 2011. La pesca y comercialización de condriictios en la Argentina. En: WÖHLER, O.C., CEDROLA, P. & COUSSEAU, M.B. (Eds.). 2011. *Contribuciones sobre biología, pesca y comercialización de tiburones en la Argentina*. Aportes de la Dirección Nacional de Planificación Pesquera para la elaboración del Plan Nacional. Consejo Federal Pesquero, Buenos Aires: 151-184.
- SÉRET, B. & LAST, P.R. 2008. A new Australian skate of the genus *Dipturus* (Rajoidei: Rajidae). En: LAST, P.R., WHITE, W.T., POGONOSKI, J.J. & GLEDHILL D.C. (Eds.). *Descriptions of New Australian Skates (Batoidea: Rajoidei)*. CSIRO Marine & Atmospheric Research Paper, Hobart: 99-108.
- SPIES, I.B., GAICHAS, S., STEVENSON, D.E., ORR, J.W. & CANINO, M.F. 2006. DNA based identification of Alaska skates (*Amblyraja*, *Bathyraja* and *Raja*: Rajidae) using cytochrome c oxidase subunit I (COI) variation. *J. Fish Biol.*, 69 (B): 283-292.
- STEVENS, J.D., BONFIL, R., DULVY, N.K. & WALKER, P.A. 2000. The effects of fishing on shark, rays, and chimaeras (Chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES J. Mar. Sci.*, 57: 476-494.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739.
- VARGAS-CARO, C., BUSTAMANTE, C., BENNETT, M.B. & OVENDEN, J. 2014. The complete validated mitochondrial genome of the yel-

- lownose skate *Zearaja chilensis* (Guichenot 1848) (Rajiformes, Rajidae). Mitochondrial DNA Part A., 27: 1227-1228.
- VARGAS-CARO, C., BUSTAMANTE, C., BENNETT, M.B. & OVENDEN, J.R. 2017. Towards sustainable fishery management for skates in South America: The genetic population structure of *Zearaja chilensis* and *Dipturus trachyderma* (Chondrichthyes, Rajiformes) in the south-east Pacific Ocean. PLoS ONE, 12:2. e0172255. doi:10.1371/journal.pone.0172255.
- VARGAS-CARO, C., BUSTAMANTE, C., LAMILLA, J. & BENNETT, M.B. 2015. A review of longnose skates *Zearaja chilensis* and *Dipturus trachyderma* (Rajiformes: Rajidae). Univ. Sci., 20: 321-359.
- WARD, R.D. 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. Molec. Ecol. Res., 9: 1077-1085.
- WARD, R.D., ZEMLAK, T.S., INNES, B.H., LAST, P.R. & HEBERT, P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci., 360: 1847-1857.
- WAUGH, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. BioEssays, 29: 188-197.
- WEIGMANN, S. 2016. Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. J. Fish Biol., 88: 837-1037.
- ZEMLAK, T.S., WARD, R.D. ALLAN, D., CONNELL, A.D., HOLMES, B.H. & HEBERT, P.D. 2009. Barcoding Vertebrates. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. Molec. Ecol. Res., 9 (1): 237-242.

Recibido: 06-03-2017

Aceptado: 18-12-2017