

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**



**Identificación molecular de nueve principales  
especies ícticas marinas de interés pesquero –  
industrial, basado en el análisis por PCR-RFLP  
de los genes mitocondriales *16S rDNA* y  
*Citocromo Oxidasa I (COI)***

**Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor**

**Tesista** : Bach. Sissy Emperatriz Barrón Pérez

**Asesora** : Blga. Eliana Victoria Zelada Mázmela Dr.

**Co-Asesor** : Blgo. Percy Niver Pinedo Bernal

**Nuevo Chimbote – Perú**

**2021**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**

Identificación molecular de nueve principales especies ícticas marinas de interés  
pesquero – industrial, basado en el análisis por PCR-RFLP de los genes  
mitocondriales *16S rDNA* y *Citocromo Oxidasa I (COI)*

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE**  
**BIÓLOGO ACUICULTOR**

Revisado y Firmado por el Asesor y Co-Asesor

---

**Blga. Eliana Victoria Zelada Mázmela Dr.**

---

**Blgo. Percy Niver Pinedo Bernal**

Nuevo Chimbote, Noviembre del 2021

**Nuevo Chimbote – Perú**

## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS (VIRTUAL)

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en reunión virtual vía ZOOM, siendo las 18:00 horas del día 25 de noviembre del 2021, dando cumplimiento a la Resolución N° 283 – 2021-UNS- FC-Virtual, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. Walter Reyes Avalos, teniendo como miembros a Blga. Carmen Gabriela Yzásiga Barrera (secretario) (a), y Dra. Eliana Zelada Mázmela (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Biólogo Acuicultor, realizado por la tesista Sissy Emperatriz Barrón Pérez quien sustentó la tesis intitulada: **“Identificación molecular de las nueve principales especies ícticas marinas de interés pesquero-industrial basado en el análisis por PCR-RFLP de los genes mitocondriales 16S y citocromo oxidasa I (COI)”**

Terminada la sustentación, la tesista respondió a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **Muy Bueno** asignándole un calificativo de **18 puntos**. (Art. 24° inc. a, b, c, d, e, f – Directiva N° 003-2020-UNS-VRAC: ADECUACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE GRADOS ACADÉMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES MEDIANTE TRABAJO NO PRESENCIAL VIRTUAL EN LA UNS).

Siendo las 17:30 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

  
.....  
Nombre: Dr. Walter Reyes Avalos  
Presidente

  
.....  
Nombre: Blga. Carmen Yzasiga Barrera  
Secretaria

  
.....  
Nombre: M.Sc. Eliana Zelada Mázmela  
Integrante

**Distribución:** Integrantes JE ( ), tesistas ( ) y archivo (02).



## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Sissy Emperatriz Barrón Pérez  
Título del ejercicio: TESIS  
Título de la entrega: Identificación molecular de nueve principales especies íctica...  
Nombre del archivo: Tesis\_Lista.pdf  
Tamaño del archivo: 4.74M  
Total páginas: 91  
Total de palabras: 20,505  
Total de caracteres: 133,045  
Fecha de entrega: 16-may.-2022 11:58a. m. (UTC-0500)  
Identificador de la entre... 1837698827

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Identificación molecular de nueve principales  
especies ícticas marinas de interés pesquero –  
industrial, basado en el análisis por PCR-RFLP  
de los genes mitocondriales 16S rDNA y  
Citocromo Oxidasa I (COI)**

Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor

**Tesista** : Bach. Sissy Emperatriz Barrón Pérez

**Asesora** : Blga. Eliana Victoria Zelada Mázmeza Dr.

**Co-Asesor** : Blgo. Percy Niver Pinedo Bernal

Nuevo Chimbote – Perú

2021

## **Dedicatoria**

*Dedico este trabajo a mis Padres, quienes me motivaron y esforzaron a culminar esta carrera, y me apoyaron incondicionalmente.*

*A mis abuelos quienes me enseñaron el valor de la responsabilidad, me inculcaron la importancia de los estudios, y fueron de gran apoyo para culminar esta carrera.*

*A mi amado esposo, quien es mi complemento en todo, mi apoyo y fuerza, y quien me reta a superar mis miedos, y con quien de la mano de Dios hemos superado cada obstáculo que se ha podido presentar y salir victoriosos.*

*A mis hermanos Kevin, Aron, Namie y Nicolás, a quienes amo con todo mi corazón y para quienes deseo ser un ejemplo a seguir.*

## **Agradecimiento**

Muchas son las personas que han contribuido en el proceso y conclusión de este trabajo. En primer lugar, agradezco de manera especial a la Bióloga Eliana Zelada Mázmela Dr., quien me enseñó que uno nunca deja de aprender, y que se debe estudiar para la vida, agradezco cada una de las correcciones e instrucciones dadas para ser una mejor profesional, gracias por la paciencia y por ser como una madre educadora. Por todo su apoyo, esfuerzo y confianza, mi eterna gratitud.

A la Blga. Carmen Yzásiga Barrera quien, con su paciencia, ánimo y alegría me apoyó en cada momento que pudo, así mismo muchas gracias porque aún en las situaciones difíciles, siempre mostró una sonrisa y una palabra de optimismo, gracias por ayudarnos a ver la vida siempre de la mejor manera. Muchas gracias.

Al Biólogo Percy Niver Pinedo Bernal, quien desde que inicié mis primeros pasos en el Laboratorio de Molecular me enseñó cada técnica con mucha paciencia y disposición, gracias por animarme cuando fallaba, gracias por ser un amigo, por escucharme y estar dispuesto a darme consejos cuando no sabía cómo actuar, muchas gracias por todo su esfuerzo invertido en mí y sobre todo siempre diré gracias por toda esa paciencia.

Al Biólogo Eduardo Reyes, por todo el apoyo, paciencia y disposición para poder culminar esta tesis, gracias por sus correcciones y por su enseñanza para hacer las cosas como deben ser, gracias por toda esa alegría y amistad, gracias por enseñarnos de sus experiencias y mostrarnos como es la vida de un Biólogo.

Agradezco a Julissa Sánchez y Karen Rodríguez, por la amistad brindada en todo este tiempo y porque siempre me permitieron contar con ellas para cualquier situación, gracias por las risas, por los momentos de confiarnos las cosas y por todo lo que me han enseñado de sus bellas experiencias tanto en lo estudiantil como en lo profesional.

Así mismo, agradezco a cada uno de los miembros del Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción, quienes han sido una maravillosa familia académica con quienes he compartido y aprendido.

De igual modo agradezco al Laboratorio de Genética del Instituto del Mar del Perú en la persona de la Dra. Giovanna Sotil, por el apoyo brindado en la obtención de las secuencias de las especies que se emplearon para este trabajo.

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Dedicatoria</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>Agradecimiento</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>Índice</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Índice de Figuras</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>Índice de Tablas</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>Resumen</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>Abstract</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>I. Introducción</b> .....   | <b>12</b> |
| Enunciado del Problema.....  | 16        |
| Hipótesis .....  | 16        |
| Objetivos .....  | 16        |
| Objetivo general .....   | 16        |
| Objetivos específicos.....   | 16        |
| <b>II. Marco Teórico</b> .....   | <b>17</b> |
| 2.1. Especies de interés comercial.....                                  | 17        |
| 2.1.1. <i>Engraulis ringens</i> .....                                    | 17        |
| 2.1.2. <i>Scomber japonicus</i> .....                                    | 17        |
| 2.1.3. <i>Sarda Chiliensis</i> .....                                     | 18        |
| 2.1.4. <i>Trachurus picturatus</i> .....                                 | 19        |
| 2.1.5. <i>Merluccius gayi peruanus</i> .....                             | 20        |
| 2.1.6. <i>Paralanchurus peruanus</i> .....                               | 20        |
| 2.1.7. <i>Paralichthys adspersus</i> .....                               | 21        |
| 2.1.8. <i>Odontesthes regia</i> .....                                    | 22        |
| 2.1.9. <i>Sciaena deliciosa</i> .....                                    | 23        |
| 2.2. El ADN en la identificación de especies .....                       | 23        |
| 2.3. Marcadores mitocondriales .....                                     | 24        |
| 2.4. Técnicas basadas en el ADN para la identificación de especies ..... | 25        |
| 2.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....                    | 25        |
| 2.4.2. Amplificación Aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs).....           | 26        |
| 2.4.3. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP).....   | 26        |
| 2.4.4. Código de barras (Barcoding) .....                                | 27        |
| 2.4.5. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)..... | 27        |
| 2.5. Enzimas de restricción.....   | 28        |
| <b>III. Materiales y Métodos</b> .....                                   | <b>30</b> |
| 3.1. Materiales .....  | 30        |
| 3.1.1. Área de estudio.....  | 30        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.2. Muestra biológica y colecta de la muestra .....   | 30        |
| 3.2. Metodología de laboratorio para la identificación de los ejemplares. ....   | 31        |
| 3.2.1. Extracción de ADN .....   | 31        |
| 3.2.2. Evaluación de la concentración y calidad del ADN .....  | 31        |
| 3.2.3. Evaluación de la calidad del ADN .....  | 31        |
| 3.2.4. Amplificación de PCR del marcador molecular <i>Citocromo oxidasa I (COI)</i> . ..   | 31        |
| 3.2.5. Amplificación de PCR del marcador molecular <i>16S rDNA</i> .....   | 32        |
| 3.2.6. PCR-RFLP .....  | 32        |
| 3.3. Desarrollo de la metodología para la predicción <i>in silico</i> de las secuencias propias y las obtenidas del NCBI.....  | 33        |
| 3.4. Desarrollo de la metodología para la identificación de las especies.....  | 33        |
| 3.5. Análisis Filogenético (FINS).....   | 33        |
| <b>IV. Resultados .....</b>  | <b>34</b> |
| 4.1. Amplificación de los productos de PCR del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> y <i>16S rDNA</i> ... ..   | 34        |
| 4.2. Comparación de los cortes formados <i>in silico</i> por las enzimas de restricción usando las secuencias propias y las obtenidas del NCBI del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> .....    | 36        |
| 4.3. Comparación de los cortes formados <i>in silico</i> por las enzimas de restricción usando las secuencias propias y las obtenidas del NCBI del gen <i>16S rDNA</i> .....               | 36        |
| 4.4. Identificación de las especies usando la técnica PCR-RFLP empleando el gen mitocondrial <i>Citocromo oxidasa I</i> .....  | 39        |
| 4.4.1. <i>Hind</i> III .....   | 39        |
| 4.4.2. <i>Hinc</i> II .....  | 40        |
| 4.4.3. <i>Apa</i> I .....  | 41        |
| 4.4.4. Identificación de las especies usando la técnica PCR-RFLP empleando el gen mitocondrial <i>16S rDNA</i> .....   | 42        |
| 4.4.5. <i>Hinc</i> II .....  | 42        |
| 4.4.6. <i>EcoR</i> I.....  | 43        |
| 4.5. Metodología FINS haciendo uso de las secuencias del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> .....  | 44        |
| 4.6. Metodología FINS haciendo uso de las secuencias del gen <i>16S rDNA</i> .....   | 46        |
| <b>V. Discusión .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>VI. Conclusiones .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>VII. Recomendaciones.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>VIII. Referencias Bibliográficas .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>IX. Anexos .....</b>  | <b>73</b> |
| Anexo 1: Secuencias obtenidas del NCBI de los genes <i>Citocromo oxidasa I</i> y <i>16S rDNA</i> de las especies en estudio y sitio de corte donde escindió la enzima de restricción ..... | 73        |
| Anexo 2: Secuencias propias de los genes <i>Citocromo oxidasa I</i> y <i>16S rDNA</i> de las especies en estudio y sitio de corte donde escindió la enzima de restricción.....             | 78        |
| Anexo 3: PCR RFLP de las especies en estudio en las cuales no se halló sitio de escinción. ....  | 84        |

Anexo 4: Registro fotográfico de las 9 especies en estudio. .... 88

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Análisis de polimorfismos por medio de PCR-RFLP.....  | 28 |
| Figura 2. Posición del conjunto de cebadores utilizados y producto de amplificación del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> en gel de agarosa al 1% .....  | 34 |
| Figura 3. Producto de amplificación del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> en gel de agarosa al 1%.....   | 35 |
| Figura 4: Posición del conjunto de cebadores utilizados y producto de amplificación del gen 16S <i>rDNA</i> en gel de agarosa al 1% .....   | 35 |
| Figura 5. Perfil de restricción formado por la enzima <i>Hind III</i> en la región mitocondrial <i>Citocromo oxidasa I</i> .....  | 40 |
| Figura 6. Perfil de restricción formado por la enzima <i>Hind III</i> en la región mitocondrial <i>Citocromo oxidasa I</i> .....  | 40 |
| Figura 7. Perfil de restricción formado por la enzima <i>Hinc II</i> en la región mitocondrial <i>Citocromo oxidasa I</i> .....   | 41 |
| Figura 8. Perfil de restricción formado por la enzima <i>Apa I</i> en la región mitocondrial <i>Citocromo oxidasa I</i> .....   | 42 |
| Figura 9. Perfil de restricción formado por la enzima <i>Hinc II</i> en la región mitocondrial 16S <i>rDNA</i> .....  | 43 |
| Figura 10. Perfil de restricción formado por la enzima <i>Hinc II</i> en la región mitocondrial 16S <i>rDNA</i> .....   | 43 |
| Figura 11. Perfil de restricción formado por la enzima <i>EcoR I</i> en la región mitocondrial 16S <i>rDNA</i> .....  | 44 |
| Figura 12. Árbol filogenético molecular de las especies <i>E. ringens</i> , <i>S. chiliensis</i> , <i>P. adspersus</i> , <i>S. japonicus</i> , <i>S. deliciosa</i> , <i>M. gayi peruanus</i> , <i>O. regia regia</i> , <i>T. picturatus</i> , <i>P. peruanus</i> (para esta especie se usó la secuencia descargada del NCBI). Basado en un análisis Neighbor-Joining de las secuencias del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> ..... | 45 |
| Figura 13. Árbol filogenético molecular de las especies <i>T. picturatus</i> , <i>P. adspersus</i> , <i>S. japonicus</i> , <i>S. chiliensis</i> , <i>S. deliciosa</i> , <i>P. peruanus</i> , <i>O. regia regia</i> <i>M. gayi peruanus</i> , <i>E. ringens</i> . Basado en un análisis Neighbor-Joining de las secuencias del gen 16S <i>rDNA</i> . ....  | 47 |
| Figura 14: Perfil de restricción formado por la enzima <i>EcoR I</i> y el gen <i>Citocromo oxidasa I</i> ..   | 84 |
| Figura 15: Perfil de restricción formado por la enzima <i>Not I</i> y el gen <i>Citocromo oxidasa I</i> .....   | 84 |
| Figura 16: Perfil de restricción formado por la enzima <i>BamH I</i> y el gen <i>Citocromo oxidasa I</i> ..   | 85 |
| Figura 17: Perfil de restricción formado por la enzima <i>Apa I</i> y el gen 16S <i>rDNA</i> .....  | 85 |
| Figura 18: Perfil de restricción formado por la enzima <i>Not I</i> y el gen 16S <i>rDNA</i> .....  | 86 |
| Figura 19: Perfil de restricción formado por la enzima <i>BamH I</i> y el gen 16S <i>rDNA</i> . .....   | 86 |
| Figura 20: Perfil de restricción formado por la enzima <i>Hind III</i> y el gen 16S <i>rDNA</i> . .....   | 87 |
| Figura 21: Perfil de restricción formado por la enzima <i>Hind III</i> y el gen 16S <i>rDNA</i> .....   | 87 |
| Figura 22: <i>Odonthestes regia regia</i> .....   | 88 |
| Figura 23: <i>Sarda chiliensis</i> .....  | 88 |
| Figura 24: <i>Paralonchurus peruanus</i> .....  | 88 |
| Figura 25: <i>Sciaena deliciosa</i> .....   | 89 |
| Figura 26: <i>Merluccius gayi peruanus</i> .....  | 89 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 27: <i>Trachurus picturatus</i> .....   | 89 |
| Figura 28: <i>Paralichthys adspersus</i> ..... | 89 |
| Figura 29: <i>Scomber japonicus</i> .....      | 90 |
| Figura 30: <i>Engraulis Ringens</i> .....      | 90 |

## Índice de Tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Ubicación taxonómica de las nueve especies de peces estudiadas .....   | 30 |
| Tabla 2. Cebadores para la amplificación de los genes <i>Citocromo oxidasa I</i> y <i>16S rDNA</i> .....  | 31 |
| Tabla 3. Comparación de los números de corte y de los perfiles de restricción formados <i>in silico</i> en las secuencias propias y obtenidas del NCBI del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> . ..... | 37 |
| Tabla 4. Comparación de los números de corte y de los perfiles de restricción formados <i>in silico</i> en las secuencias propias y obtenidas del NCBI del gen <i>16S rDNA</i> .....              | 38 |
| Tabla 5: Especies, Secuencias del NCBI del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> .....   | 73 |
| Tabla 6: Especies, Secuencias del NCBI del gen <i>16S rDNA</i> . .....  | 76 |
| Tabla 7: Especies, Secuencias propias del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> .....  | 78 |
| Tabla 8: Especies, Secuencias propias del gen <i>16S rDNA</i> .....   | 81 |

## Resumen

Para analizar a las nueve principales especies marinas de interés pesquero - industrial: *Paralichthys adspersus*, *Engraulis ringens*, *Scomber japonicus*, *Trachurus picturatus*, *Sarda chiliensis*, *Merluccius gayi peruanus*, *Odonthestes regia regia*, *Paralanchurus peruanus*, *Sciaena deliciosa*, se empleó la técnica PCR-RFLP de los genes mitocondriales *Citocromo Oxidasa I (COI)* y *16S rDNA*, con el objetivo de establecer molecularmente la identidad de estas nueve especies, de modo tal que, al ser vendidas en sus diferentes presentaciones se eviten fraudes comerciales por etiquetados equívocos. Para la digestión de las secuencias de ADN de las especies en estudio, se emplearon las enzimas de restricción: *Hinc II*, *Hind III*, *Apa I*, *Not I*, *EcoR I*, *BamH I*, logrando identificar a las especies *Scomber japonicus*, *Sarda chiliensis* y *Merluccius gayi peruanus* con el gen *COI* y la enzima *Hind III*, mientras que, con la enzima *Apa I* se discriminó a *Paralanchurus peruanus*. Asimismo, empleando al gen *16S rDNA* y la enzima *Hinc II* se identificó a *Engraulis ringens*, y con la enzima *EcoR I* se identificó a *Paralanchurus peruanus*.

**Palabras Clave:** *gen mitocondrial, citocromo oxidasa I, 16S rDNA, PCR-RFLP.*

## Abstract

To analyze the nine main marine species of fishing - industrial interest: *Paralichthys adspersus*, *Engraulis ringens*, *Scomber japonicus*, *Trachurus picturatus*, *Sarda chiliensis*, *Merluccius gayi peruanus*, *Odonthestes regia regia*, *Paralanchurus peruanus*, *Sciaena deliciosa*, the PCR-RFL technique was used. of the mitochondrial genes *Cytochrome Oxidase I (COI)* and *16S rDNA*, with the aim of molecularly establishing the identity of these nine species, in such a way that, by being sold in their different presentations, commercial frauds due to mislabeling are avoided. For the digestion in the sequences of the species under study, the restriction enzymes were used: *Hinc II*, *Hind III*, *Apa I*, *Not I*, *EcoR I*, *BamH I*, managing to identify the species *Scomber japonicus*, *Sarda chiliensis* and *Merluccius gayi peruanus* with the *COI* gene and the enzyme *Hind III*, while *Paralanchurus peruanus* was discriminated with the *Apa I* enzyme. Likewise, using the *16S rDNA* gene and the *Hinc II* enzyme, *Engraulis ringens* was identified, and *Paralanchurus peruanus* was identified with the *EcoR I* enzyme.

**Keywords:** mitochondrial gene, *cytochrome oxidase I*, *16S rDNA*, *PCR-RFLP*.

## I. Introducción

Desde la antigüedad, los recursos pesqueros y acuícolas, constituyen una de las mayores fuentes de proteína animal del mundo. La pesca es fundamental para la seguridad alimentaria y de la nutrición, asimismo, ofrece vías de desarrollo para contribuir a un mundo más próspero, pacífico y equitativo (FAO 2019). Con el transcurso de los años ha tenido un incremento significativo en su demanda, debido a que los productos pesqueros son una fuente esencial de proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas que generan protección contra enfermedades metabólicas y sus trastornos (FAO, 2009; Mozaffarian *et al.*, 2011; Roos *et al.*, 2007; Gogus y Smith 2010; FAO 2016; Merkle *et al.*, 2017).

La tasa de crecimiento desde el período de 1961 hasta 2017, del consumo total de pescado para humanos pasó de 9,0 kg a 20,3 kg en 2017, esta expansión se debe no solo al consumo humano y aumentos en su producción, sino también a desarrollos tecnológicos para el procesamiento, cadena de frío, envío y distribución; asimismo los crecientes ingresos en todo el mundo, que se correlacionan fuertemente con aumento de la demanda de pescado y productos pesqueros (FAO, 2020).

La anchoveta (*Engraulis ringens*), es una especie que presenta altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) principalmente omega-3 un ácido graso esencial para el adecuado desarrollo y funcionamiento del cerebro y sistema nervioso, siendo usado en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (Castro-Gonzales, 2002). La anchoveta es utilizada principalmente para producir harina de pescado, en la elaboración de alimento balanceado para otras especies, y en menor cantidad, para el consumo humano (Esparza, 2015), aunque con políticas orientadas a incrementar su consumo de manera directa.

La caballa (*Scomber japonicus*) y el jurel (*Trachurus picturatus*), ocupan la mayor parte de las aguas jurisdiccionales del Perú (Zuzunaga, 2013). IMARPE (2019) reporta que, entre los meses de enero y agosto del 2019 hubo una captura total de 102 783 t de jurel, registrándose en febrero la mayor captura de los últimos 10 años con 50 114 t, por otra parte, la caballa que tuvo una captura máxima de 150 000 t en el año 2016, para el 2019 su captura total fue de 28 103 t entre enero hasta octubre. Estas especies son catalogadas de gran importancia pesquera y son utilizadas para el procesamiento de conservas, así

como: la anchoveta, atún, barrilete, bonito, sardinas, machete (PRODUCE, 2012; PRODUCE, 2013).

Aunque los organismos marinos descritos son las principales especies de importancia económica, IMARPE (2014), reporta otras especies utilizadas para el consumo humano directo, destacando *Sarda chiliensis*, bonito; *Paralanchurus peruanus*, coco; *Merluccius gayi peruanus*, merluza; *Sciaena deliciosa*, lorna; *Odontesthes regia regia*, pejerrey y *Paralichthys adspersus*, lenguado, que son vendidas como pescado fresco, curados, congelados y conservas; distribuidos a nivel nacional e internacional (Prom PERÚ, 2015).

Sin embargo, junto con el aumento del consumo de pescado, pueden presentarse enfermedades originados por casos de adulteración y sustitución de especies, debido a componentes que no son declarados en el etiquetado de los envases y que pueden causar problemas de salud en algunos individuos (Mackie, 1999; Asensio *et al.*, 2008; Nilson y Gram, 2002; Comi *et al.*, 2005; Espiñeira *et al.*, 2009; Nebola *et al.*, 2010), por la presencia de alérgenos, que pueden producir urticaria, angioedema, dolor abdominal, náuseas, vómitos, y en casos graves anafilaxia y riesgo de muerte (Zubeldia *et al.*, 2012). Ello genera preocupación mundial en la trazabilidad de estos productos, ya que el mal rotulado contribuye además a una mayor erosión de las pesquerías, causando que no se puedan tomar decisiones respecto a la conservación, socavando además las regulaciones de importación/exportación de productos pesqueros (Jacquet y Pauly, 2008), generando muchos problemas a nivel mundial sobre temas ambientales, seguridad alimentaria y sobre explotación de los recursos pesqueros (Huss, 1994; Pramod *et al.*, 2014).

De igual modo, el mal rotulado de los productos pesqueros contribuye también a una mayor erosión de las pesquerías, causando que los consumidores no puedan tomar decisiones respecto a la conservación, socavando además las regulaciones de importación/exportación de productos pesqueros (Jacquet y Pauly, 2008). Es de este modo que, la pesca ilícita no declarada y no reglamentada, ha generado muchos problemas a nivel mundial sobre temas ambientales, seguridad alimentaria y sobre explotación de los recursos pesqueros, habiendo eludido además las leyes para la gestión de pesquerías (Huss, 1994; Pramod *et al.*, 2014).

Debido a estos casos de adulteración que se presentan en las industrias pesqueras, es que en algunos países se propusieron diversas leyes en contra del etiquetado incorrecto o fraudulento de los productos pesqueros (Chen, 2014). Así, por ejemplo, el Consejo de la

Unión Europea en la Norma N°104/2000, solicita para los productos de pesca y acuicultura, que en la información que se otorga a los consumidores, se indique mediante una lista: la denominación comercial del pescado y el nombre científico de la especie a comercializar. Por otro lado, la norma N°178/2002 establece que, entre los requisitos de seguridad alimentaria, la información que se presenta en el etiquetado de productos, como conservas, envasados o embotellados, deben presentar la información del recurso que se vende, y sus valores nutritivos, datos que deben ser verídicos.

En el Perú, la Norma Técnica Peruana con código 209.038 (INDECOPI, 2009), detalla que los alimentos envasados no deberán describirse ni presentarse con una etiqueta o etiquetado en los que se empleen palabras, ilustraciones u otras representaciones gráficas que no corresponda al producto que se encuentra envasado. Todo ello ha motivado que, desde la década de los 70, se desarrolla el programa “The Species Identification and Data Program” (SIDP), con el fin de mejorar los datos sobre la pesca por especies, siendo necesaria la identificación de las muestras de peces en campo. En este contexto, la identificación de especies ha sido de mucha ayuda en la creación de un nuevo marco para integrar la información de biodiversidad, introducción de especies y protección de especies en peligro de extinción (Lleonart *et al.*, 2006).

Para la identificación de las especies de peces, son casi siempre suficientes, las características morfológicas de los peces en los productos frescos y no elaborados. Sin embargo, los productos que pasan por un proceso de remoción, no conservan suficientes características para su correcta identificación (Bossier, 1999; Sánchez, 2012; Garrett y Dooley, 2001; Asma *et al.*, 2016; Hsieh *et al.*, 2010; Shuangya *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2000; Dooley *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta esta situación, es que se buscan nuevas técnicas que se puedan aplicar para una correcta identificación de las especies, que pueden estar basadas en proteínas o en el ADN, además, puedan ser replicables, confiables, rápidas y económicas. Entre las técnicas que están basadas en proteínas se encuentran los ensayos inmunológicos, electroforéticos, cromatografía (Mafra *et al.*, 2008; Asensio *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 1999).

Para escoger la técnica con que se va a trabajar, se debe de tomar en cuenta el tipo de muestra, por lo que de tratarse de una muestra que ha pasado por procesos térmicos o de cocción, lo mejor es trabajar con una técnica que esté basada en el ADN, debido a que es una molécula más estable y que no se degrada al pasar por procesos térmicos como sucede

con las proteínas. En cuanto a las técnicas basadas en ADN, se encuentran principalmente FINS (forensically informative length polymorphism), RFLP (Restriction fragment length polymorphism), SSCP (Single stranded conformational polymorphism), RAPD (Random amplified polymorphism DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), y Barcoding (código de barras) (Bossier, 1999; Ward *et al.*, 2005).

La técnica PCR – RFLP permite la correcta identificación de las especies comerciales a un bajo costo y de modo rápido, asimismo, refuerza el cumplimiento de las normas legales en la correcta identificación de los productos pesqueros. En tal sentido, se reportan casos en el análisis de muestras utilizando la técnica PCR RFLP, como es el caso de Pappalardo *et al.* (2015) quienes realizaron el análisis de 50 muestras de productos procesados y ocho etiquetados con el nombre de *Engraulis encrasicolus* (anchoveta europea), hallando que el 14% de las muestras no era la especie reportada. También se ha empleado esta técnica para la identificación de algunas especies como *Epinephelus* viz; *E. areolatus*; *E. bleekeri*; *E. faveatus*; *E. longispinis* y *E. undulosus* permitiendo la correcta identificación de las mismas (Sumathi *et al.*, 2014). Así mismo se utilizó esta técnica para la diferenciación de 4 especies de calamares *L. vulgaris*, *L. forbesi*, *A. media* y *A. subulata*, permitiendo su correcta identificación (McKeon *et al.*, 2015).

La técnica PCR-RFLP también es utilizada en la identificación de productos procesados de 24 muestras de Cyprinidae (Chen *et al.*, 2013), indicándose que no existía fraude en esos productos. Ello demuestra que este método es seguro, rápido y eficiente, aplicable para la identificación de especies, y la identificación de productos ya transformados. Cocolin *et al.* (2000) comprobaron a través de la técnica PCR, la adulteración de productos que se vendían como filetes de *D. labrax* y *S. aurata*, los cuales eran sustituidos por filetes de *U. cirrosa* y *D. dentex*, especies de menor valor económico.

### **Enunciado del Problema**

¿El análisis basado en la técnica PCR-RFLP de los genes mitocondriales *16S rDNA* y *COI* permite la identificación molecular de las nueve principales especies ícticas-marinas de interés pesquero-industrial?

### **Hipótesis**

El análisis basado en la técnica PCR-RFLP de los genes mitocondriales *16S rDNA* y *COI* permite la identificación molecular de las nueve principales especies ícticas-marinas de interés pesquero-industrial

### **Objetivos**

#### **Objetivo general**

Establecer molecularmente la identidad de nueve principales especies ícticas marinas de interés pesquero – industrial a través de la técnica PCR – RFLP usando segmentos de los genes mitocondriales *Citocromo oxidasa I* y *16S rDNA*.

#### **Objetivos específicos**

- Comparar las predicciones *in silico* de las secuencias propias y las obtenidas del NCBI de los genes mitocondriales *Citocromo oxidasa I* y *16S rDNA* de nueve principales especies ícticas marinas de interés pesquero – industrial.
- Identificar las especies a través de la técnica PCR-RFLP en segmentos de los genes mitocondriales *Citocromo oxidasa I* y *16S rDNA* de nueve principales especies ícticas marinas de interés pesquero – industrial.
- Comparar el árbol filogenético de las secuencias de los genes *Citocromo oxidasa I* y *16S rDNA* y el perfil de restricción obtenido de nueve principales especies ícticas marinas de interés pesquero – industrial.

## II. Marco Teórico

### 2.1. Especies de interés comercial

#### 2.1.1. *Engraulis ringens* (Jenyns, 1842)

La anchoveta peruana, conocida como “anchoveta negra” o “peladilla” (Chirichigno *et al.*, 1982), pertenece a la clase Actinopterygii, orden Clupeiformes, que incluyen especies típicamente marinas, bien conocidas como arenques, sardinas y anchovetas, que sustentan grandes pesquerías a nivel mundial, siendo el Perú, uno de principales productores de captura de anchoveta del mundo (Froese y Pauly, 2004; Gutierrez-Estrada *et al.*, 2007; FAO, 2020), constituyéndose en la segunda fuente de exportaciones después de la minería (Flores y Zafra, 2019).

#### Descripción morfológica

*E. ringens* presenta un cuerpo un poco alargado y comprimido, cabeza larga, el labio superior se prolonga en un hocico y sus ojos son muy grandes. Su color varía de azul oscuro a verdoso en la parte dorsal y es plateada en el vientre. Longevidad alrededor de tres años de edad, alcanzando hasta 20 cm de longitud total y un peso promedio de 27.3 g; a los seis meses mide alrededor de ocho cm de largo, y al año logra alcanzar 10.5 cm y 12 cm a los 18 meses. Esta especie forma grandes cardúmenes de varios millones de individuos (Chavez *et al.*, 2003).

#### Distribución y hábitat

*E. ringens* se distribuye en aguas costeras desde Perú (4°S) hasta el sur de Chile (42°S) en el sureste del océano Pacífico. Esta especie sostiene una de las pesquerías más grandes del mundo (Nixon y Thomas 2001), mostrando importantes fluctuaciones a escala multidecadal, asociadas con cambios a gran escala en las temperaturas del océano (Chavez *et al.*, 2003).

#### 2.1.2. *Scomber japonicus* (Linnaeus, 1758)

*Scomber japonicus* también conocida como “caballa”, “verle” o “*makerel*”; pertenece a la clase Actinopterygii, orden Perciformes, sub orden Scombriformes, familia Scombridae, que incluye peces comúnmente denominados atunes, caballas y bonitos. Dentro de esta familia hay 15 géneros y 53 especies presentes en los océanos Atlántico, Pacífico e Índico que mayormente habitan en ambientes tropicales y templados (Collette *et al.*, 2001). La caballa, los bonitos y los atunes forman la base de importantes pesquerías

comerciales y recreativas en las aguas tropicales y templadas del mundo (Collette *et al.*, 2001).

### **Descripción morfológica**

*S. japonicus* tiene un cuerpo alargado y redondeado, un hocico puntiagudo. Todo su cuerpo está cubierto de escamas bastante pequeñas; escamas detrás de la cabeza y alrededor de las aletas pectorales más grandes y conspicuas que cubren el resto del cuerpo; dos aletas dorsales muy separadas, la primera con 8 a 13 espinas y la segunda aleta dorsal y anal con 12 radios; columna anal bastante rígida y fuerte; 5 aletas dorsales y 5 anales; proceso interpélvico pequeño y único; aleta pectoral corta, con 18 a 21 radios (FAO, 1983). Su coloración en el dorso es verde-botella y está ornamentado con muchas líneas gruesas, onduladas y verticales formando dibujos, cada lóbulo de la cola tiene en su base una mancha circular oscura (IMARPE, 2019).

### **Distribución y hábitat**

*S. japonicus*, es una especie pelágica nerítica, vive en ambientes relativamente cálidos, con rangos de temperatura del agua que oscilan entre 14 ° y 23 °C. La salinidad puede variar entre 34,80 y 35,25 unidades prácticas de salinidad (UPS), pero prefiere temperaturas de 15 ° a 19 °C y oxígeno de 2,0 a 6,0 mL/L. La caballa tiene hábitos gregarios formando cardúmenes (IMARPE, 2019).

#### **2.1.3. *Sarda Chiliensis* (Cuvier, 1831)**

*Sarda Chiliensis*, también conocido con el nombre de “bonito”, “cerrajón”, “chauchilla”, “aguadito”, “bonito del Pacífico”. Pertenece a la clase Actinopterygii, orden Perciformes, familia Scombridae, género *Sarda*, dentro del cual se encuentran 4 especies: *Sarda australis*, *S. chiliensis*, *S. orientalis* y *S. sarda*.

El bonito o *S. chiliensis chiliensis*, es uno de los recursos más importantes para el consumo humano, y es uno de los recursos pelágicos con mayores desembarques en el Perú, después de la anchoveta *E. ringens*, jurel *Trachurus murphyi* y caballa *Scomber japonicus*. Su pesca es destinada principalmente al consumo humano directo (Galvez y Castillo 2015; Collette *et al.*, 2011), formando la base de importantes pesquerías comerciales y recreativas en las aguas tropicales y templadas del mundo (Collete *et al.*, 2001).

### **Descripción morfológica**

*S. Chiliensis* tiene un cuerpo alargado, moderadamente robusto, cabeza grande puntiaguda, tronco cubierto por escamas diminutas con quilla lateral (ventral pectoral) (Sánchez, 2020). Aletas dorsales por lo general 8; aletas anales generalmente 6 o 7, vértebras en total de 42 a 46, generalmente 44 o 45 y franjas dorsales ligeramente oblicuas. (FAO, 1983). Puede alcanzar hasta 70 cm de longitud total.

### **Distribución y hábitat**

*S. Chiliensis* es una especie epipelágica y nerítica, con un rango geográfico que incluye una subespecie del norte y una del sur separadas por una población tropical *S. orientalis*. La subespecie del sur *S. chiliensis* se distribuye desde Puerto Pizarro (03°30'S) en Perú hasta Talcahuano en Chile (36°43'S) (FAO 1983; IMARPE, 2019). Alcanza la madurez sexual alrededor de los 2 años de edad, ocurriendo el desove en el hemisferio sur en aguas cercanas a la costa entre septiembre y diciembre, mientras que en el hemisferio norte, el desove comienza a principios de marzo (poblaciones del sur) progresando hacia el norte en los meses siguientes en función del aumento de la temperatura (Collette y Nauen, 1983).

#### **2.1.4. *Trachurus picturatus* (Nichols, 1920).**

*Trachurus picturatus*, también conocido con el nombre de “jurel”, “jurel del Pacífico sur”, “horse mackerel”, “jack mackerel”, “southern jack mackerel” (Chirichigno y Cornejo, 2001). Perteneció al orden Perciformes, familia Carangidae, género *Trachurus*. Esta especie es uno de los recursos más abundantes en el mar peruano, su comercialización es de forma fresca, congelada y también es destinada en gran parte para la elaboración de harina y aceite de pescado (Porturas y Juyo, 2009).

### **Descripción morfológica**

*T. picturatus* es una especie pelágica, de forma hidrodinámica: pedúnculo caudal muy fino y la cola bifurcada con una quilla lateral formada por las escamas engrosadas que constituyen el término de la línea lateral, la que está cubierta de escamas transformadas en escudos y tiene una curva característica. Presenta una coloración azul grisácea en el dorso, los lados y el vientre son plateados (IMARPE, 2007).

## **Distribución y hábitat**

*T. picturatus* se encuentra en el Pacífico Sudoriental y se distribuye desde el Ecuador por el norte, hasta los 52° S y desde la costa de América del Sur por el este, hasta aguas costeras de Nueva Zelanda e isla Tasmania (Australia) por el oeste (Chirichigno y Cornejo, 2001).

### **2.1.5. *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954)**

*Merluccius gayi peruanus* pertenece a la clase Actinopterygii, orden Gadiformes, familia Merlucciidae, género *Merluccius*. También llamada “merluza peruana”, “South pacific hake” o “merluza del sur”. Ginsburg (1954) dividió a *Merluccius gayi* en dos subespecies: *M. gayi gayi* y *M. gayi peruanus*, que habitan aguas de Chile y de Perú (Lloris *et al.*, 2003). La especie *M. gayi peruanus* es la especie de fondo más abundante y representativa del ecosistema demersal en la zona norte del Perú (Llapapasca, 2017). Esta especie se comercializa preferentemente congelada, aunque también ha sido utilizada, en casos esporádicos de captura en pesquerías pelágicas, para la producción de harinas de pescado (Lloris *et al.*, 2003).

## **Descripción morfológica**

*M. gayi* tiene un cuerpo alargado, relativamente comprimido, el dorso es de color azul plateado (iridiscente) y el resto del cuerpo color plateado. Cabeza, boca y ojos grandes, con cresta en forma de ‘v’ abierta hacia adelante. El margen posterior de la aleta caudal es usualmente cóncavo (Zavalaga *et al.*, 2018).

## **Distribución y hábitat**

*M. gayi* se encuentra presente en la costa del Pacífico suramericano entre Perú y Chile, dividida en dos poblaciones que se encuentran separadas por unos 1 300 km. Al norte, en Perú, se encuentra *M. gayi peruanus*, que se distribuye entre Puntas Pariñas (4°40’S) y Tambo de Mora (13°56’S), estando las mayores concentraciones entre 6°S y 9°S (Lloris *et al.*, 2003).

### **2.1.6. *Paralonchurus peruanus* (Steindachner, 1875)**

*Paralonchurus peruanus* pertenece a la clase Actinopterygii, orden Perciformes, familia Sciaenidae, género *Paralonchurus*. También se le conoce como “coco“, “coco croaker“, “lambe coco“, “coco dorado“, “Peruvian banded croaker“ (Fischer *et al.*, 1995; Chirichigno y Cornejo, 2001). Los sciaénidos constituyen una familia de peces abundantes, cuentan con 70 géneros y 270 especies distribuidas en regiones tropicales y

subtropicales, dentro de los cuales se encuentra los recursos que sustentan la pesquería en el Perú: *Sciaena deliciosa*, *Paralonchurus peruanus*, *Sciaena fasciata*, *Menticirrcus*, *Cynoscion analis*. (Moreno, 2011). *P. peruanus*, tienen una gran demanda en el consumo humano, y es uno de los principales recursos de la pesca artesanal ya que habita sobre fondos arenosos cercanos a las playas, y es de amplia distribución este, se encuentra en mayor abundancia en el norte y el centro del litoral peruano (Bringas *et al*, 2014).

### **Descripción morfológica**

*P. peruanus* tiene cuerpo alargado y redondeado, de color gris plateado con visos dorados. Hocico muy romo con boca inferior. Puede o no tener bandas oscuras verticales a ambos lados del cuerpo. Ojos pequeños, bordes del preopérculo y del ojo esponjosos. Margen de la aleta caudal en forma de 's' (Zavalaga *et al.*, 2018).

### **Distribución y hábitat**

*P. peruanus* en condiciones normales se distribuye desde puerto Pizarro (Perú) a Arica (Chile), mientras que, durante eventos cálidos como el fenómeno “El Niño”, se desplaza hacia el sur, haciéndose más disponible en la zona central del litoral peruano (Valdivia y Arntz, 1985; Chirichigno y Cornejo, 2001).

#### **2.1.7. *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867)**

*P. adspersus* también conocida como “lenguado común“, “lenguado fino“, “Fine flounder“, pertenece a la clase Atinopterygii, orden Pleuronectiformes, familia Paralichthyidae, género Paralichthys. *P. adspersus*, es un recurso íctico marino de gran importancia en términos de abundancia, demanda y valor comercial, debido a la calidad de su carne, alto valor nutritivo y a los altos precios que alcanza a nivel nacional e internacional (Cota, 2012; Iannacone *et al.*, 2012).

### **Descripción morfológica**

*P. adspersus* tiene un cuerpo alto y elíptica, su línea lateral está fuertemente curvada, tiene una cabeza grande y con el perfil casi recto; hocico un poco más grande que el diámetro del ojo. Boca grande y oblicua. Branquiespinas cortas. Las narinas ubicadas en el lado ocular son de tamaño pequeño y situadas una al lado de la otra cercanas al perfil de la cabeza, similar a las narinas del lado ciego. Aleta dorsal alargada sin espinas, se inicia por encima o a nivel de la mitad del ojo; aletas pectorales cortas con radios rameados, su longitud corresponde casi a la mitad de la longitud de la cabeza en el lado ocular y casi

un tercio de la longitud de la cabeza sobre el lado ciego; la base de las aletas pélvicas es corta y casi simétrica (Kong y Castro, 2002)

### **Distribución y hábitat**

*P. adpersus* se distribuye en el pacífico sudeste su distribución es desde Paita (Perú) hasta Lota e islas Juan Fernández (Chile). Habita aguas costeras con fondos de arena y alcanza profundidades mayores de 100 metros. Básicamente su distribución depende de la protección frente a la depredación, abundancia de alimento y la búsqueda de temperaturas adecuadas, profundizándose o alejándose de la costa en los meses con mayores temperaturas o con la presencia de “El Niño” (Cota 2012).

#### **2.1.8. *Odontesthes regia* (Humboldt, 1821)**

*Odontesthes regia* también conocido como “pejerrey peruano“, pejerrey o “Peruvian silverside“, pertenece a la clase Actinopterygii, orden Atheriniformes, familia Atherinidae, género *Odonthesthes* (Chirichigno y Cornejo, 2001). *O. regia regia*, es un recurso costero de gran aceptación para el consumo humano directo, en torno al cual se desarrolla una importante pesquería en la región central y sur del Perú, pero con capturas que son fluctuantes y están relacionadas con las variaciones ambientales, como las producidas durante los eventos de “El Niño” (Gonzáles, 2001; IMARPE, 2010).

### **Descripción morfológica**

*O. regia regia* tiene un cuerpo alargado, comprimido lateralmente, con pedúnculo caudal largo y bajo. De perfil dorsal más o menos recto, con hocico puntiagudo. Su dorso de color verde oliváceo presenta una banda longitudinal plateada sobre los flancos, con una línea azul reflectante en su reborde superior. La aleta caudal es amarilla, marginado con negro, aletas dorsales y pectorales (región dorsal) suavemente punteadas, aletas pélvicas y anal traslúcidas e incoloras. Presenta escamas cicloides pequeñas que cubren todo el cuerpo, sin invadir las aletas, a excepción de la base de la caudal. Línea lateral discontinua, con escamas acanaladas distribuidas en forma irregular

### **Distribución y hábitat**

Se reconoce a *O. regia*, como una especie marino costera del Pacífico sudoriental, entre los 5m y 15 m de profundidad, formando pequeños cardúmenes, asociado a sardina y anchoveta. Su distribución es de Piura (5° S) Perú, hasta el Archipiélago de los Chonos o islas Guaitecas, Aysén (46°S) Chile (Dyer, 2000).

### **2.1.9. *Sciaena deliciosa* (Tschudi, 1846)**

*Sciaena deliciosa* también conocida como “lorna“, “Ronchado“, “Lorn drum“; pertenece a la clase Actinopterygii, orden Perciforme, familia Sciaenidae, género *Sciaena* (Fisher *et al.*, 1995). La “lorna“, constituye un recurso importante en la pesquería artesanal peruana; pues casi el total de sus capturas se destina a consumo humano, esta especie es bentopelágica de la plataforma continental sobre sustratos someros arenosos y arenorocosos (IMARPE, 2000; Chero *et al.*, 2014).

#### **Descripción morfológica**

*Sciaena deliciosa* tiene cuerpo fusiforme, alto, algo corto y comprimido, de color gris en el dorso, plateado en el vientre y garganta, con escamas grandes. Boca inferior. Ojos pequeños. Perfil dorsal suavemente convexo en la nuca. Margen superior del opérculo es oscuro y margen del preopérculo con borde membranoso y dentado. Aleta pectoral larga y aleta caudal cóncava (Zavalega *et al.*, 2018).

#### **Distribución y hábitat**

*Sciaena deliciosa* se le ubica hasta alrededor de los 140 m de profundidad, es posible encontrarla en rangos de temperaturas de 14.1 a 16.7 °C y oxígeno entre 0.00 y 2.77 ml/l en condiciones normales; durante “El Niño“ se halla de 14.8 a 21.2 °C y de 0.53 a 3.53 ml/l de oxígeno (Espino, 1990). Su pesquería se localiza en San José, Chimbote, Huacho y Callao, pero con mayor concentración entre Chimbote y Pisco, capturándose principalmente con redes cortinas y trasmallo (Espino *et al.*, 1989; Gonzales, 2001).

### **2.2. El ADN en la identificación de especies**

El ADN puede utilizarse como un recurso para la diferenciación de especies y de materias primas, ya que es una molécula que se encuentra en todas las células de un organismo, es igual en todas sus células y además en la unidad de la misma especie (Wolf *et al.*, 2000). El contenido de información del ADN es mayor en comparación al de las proteínas a consecuencia de la irrestricción en la secuencia de nucleótidos, y adicionalmente al hecho de ser una molécula estable, de forma que se puede extraer de diferentes tipos de muestras (Meyer y Candrian, 1996).

En los últimos años se han presentado nuevas herramientas moleculares que permiten la identificación de especies con una fiabilidad y sensibilidad muy superior a todas las otras técnicas de diagnóstico utilizadas, empleándose en la gran mayoría de ellas el ADN mitocondrial (Telectchea, 2009; Pappalardo *et al.*, 2015). Entre los genes mitocondriales

que se utilizan para la identificación de especies se encuentran *COI*, *Cyt b*, *16S*, *12S*, *5S* (Meyer y Cadrian, 1996; Balitzki-Korte *et al.*, 2005; Pappalardo *et al.*, 2015).

### 2.3. Marcadores mitocondriales

La mitocondria es un organelo celular dentro del cual los azúcares, grasas de cadena larga y ácidos grasos se descomponen, el ADP se recicla nuevamente en ATP, los esteroides y lípidos se sintetizan, el ADN antiguo se replica, se transcribe y las proteínas se traducen, junto con muchas otras reacciones que son esenciales para la vida (McBride *et al.*, 2006). Las mitocondrias contienen su propio ADN, que contiene 37 genes, 13 de los cuales especifican proteínas del sistema de fosforilación oxidativa, y los otros proporcionan los elementos de ARN necesarios para su traducción: dos para ARN ribosomales pequeños (12S rDNAs y 16S rDNA) y 22 para tDNAs (Kazak *et al.*, 2012).

Dentro de los genes mitocondriales más usados como marcadores moleculares está el gen *Citocromo oxidasa I (COI)*, que codifica para la proteína citocromo c oxidasa subunidad I, que forma parte del complejo IV “Complejo citocromo c oxidasa”, cuya función es catalizar la oxidación del citocromo c por el oxígeno, durante el transporte de electrones en la respiración celular (Voet, 2004).

El gen *COI* es heredado maternalmente, fácilmente purificado y ampliamente utilizado para evaluar la diversidad genética, la estructura poblacional de organismos acuáticos, permitiendo el estudio de estructuras filogeográficas y la demografía histórica de especies, debido a que posee una tasa de mutación relativamente alta (Vawter y Wesley, 1986; Birky *et al.*, 1989; Aranishi *et al.*, 2005).

Además, haciendo uso del gen *COI* se detecta variaciones polimórficas que permiten separar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos y debido a que tiene una baja variabilidad genética intra-específica, pero alta variación inter-específica, permite identificar una gran variedad de organismos marinos (Ward *et al.*, 2005; Astorga, 2008; Páiz-Medina, 2012).

También se emplea en laboratorios el gen *16SrDNA*, que codifica la sub unidad ribosomal mitocondrial *16S*, necesaria para la traducción de proteínas mitocondriales (Roldán *et al.*, 2014; Dasgupta *et al.*, 2015) para la identificación de especies. El gen *16S rDNA* permite una identificación rápida, reproducible y confiable de las especies, siendo además utilizado en análisis filogenético de variaciones intra-especies y sub-especies de organismos marinos, debido a que tiene regiones polimórficas, lo que permite la

discriminación e identificación de especies (Clouse *et al.*, 2005; Zhang y Hanner; 2012; Huang *et al.*, 2013; Patwardhan *et al.*, 2014).

Los marcadores *COI* y *16S rDNA* , son principalmente utilizados en las técnicas como PCR y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), técnicas simples, confiables y rápidas, además de bajo costo para la identificación de especies (Nebola, 2010; Dudu *et al.*, 2010).

## **2.4. Técnicas basadas en el ADN para la identificación de especies**

### **2.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés)**

La PCR desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80, es una técnica que consiste en la amplificación exponencial *in vitro* de una secuencia de ADN. Fue desarrollada con la finalidad de que la cantidad extraída de DNA ya no sea un problema en los procedimientos de Biología Molecular, ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de DNA (Mullis y Faloona, 1987; García, 2006).

La capacidad distintiva de la PCR para producir una cantidad sustancial de DNA a partir de una cantidad inicialmente pequeña, revolucionó la Biología Molecular, creando variedades de aplicaciones exitosas de esta técnica, siendo utilizada para la clonación de secuencias genómicas, detección de patógenos virales, secuenciación directa de genomas mitocondriales y nucleares, en áreas como genética de poblaciones, evolución molecular, medicina forense, etc., donde es muy sensible para el desarrollo de la identificación de especies. (Saiki *et al.*, 1988; Dillon y Thompson, 2003; Surachetpong *et al.*, 2005; Eguiarte *et al.*, 2007).

Algunas de las variantes de la PCR son los Polimorfismos de Restricción de Fragmentos (PCR – RFLP), Polimorfismo de Conformación o Cadena simple (PCR-SSCP), Amplificación Aleatoria de ADN (PCR-RAPD), Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos amplificados (PCR-AFLP).

La elección de técnicas para la identificación de especies depende de varios factores, como el tipo de muestra, el costo de la técnica, el equipamiento necesario, la reproducibilidad, la fiabilidad, la viabilidad en productos comerciales, la aplicación en matrices complejas o en mezclas de especies, etc. (Sánchez, 2012).

#### **2.4.2. Amplificación Aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs por sus siglas en inglés)**

La técnica molecular RAPDs, consiste en la amplificación por PCR de segmentos aleatorios de ADN genómico utilizando un único cebador corto de secuencia arbitraria, por lo que la exploración del genoma es aleatoria (Partis y Wells, 1996).

Entre las dos principales ventajas de esta técnica están el no requerir de conocimiento previo de las secuencias de ADN, y además al dirigirse a varias secuencias en el ADN de la muestra, produce patrones de ADN que permiten la comparación de muchos *loci* simultáneamente (Partis y Wells, 1996; Eguiarte, 2007; Telectchea, 2009). Sin embargo, se presentan problemas en cuanto a la presencia de bandas “erróneas” (artefactos), la reproducibilidad de los resultados y la co-migración de bandas (Eguiarte, 2007).

RAPD-DNA ha sido aplicada para la identificación de peces y moluscos, para el estudio de genética de poblaciones, para resolver ambigüedades taxonómicas y documentar la variabilidad genética interespecífica entre especies de peces (Partis y Wells, 1996; Lackra, 2007; Partis y Wells, 1996).

#### **2.4.3. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP por sus siglas en inglés).**

AFLP es una técnica basada en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción, a partir de una digestión total de ADN genómico (Vos *et al.*, 1995). Esta técnica combina a RAPD y RFLP, haciendo de AFLP una técnica de alta resolución, reproducibilidad y sensibilidad a nivel de todo genoma (Telectchea, 2009).

La técnica AFLP consta de la digestión parcial del ADN utilizando enzimas de restricción, a los fragmentos se les unen en cada extremo adaptadores complementarios y posteriormente se amplifican por PCR, separándose los productos por electroforesis (Montaño *et al.*, 2006).

Esta técnica ha sido aplicada para construir mapas genéticos de alta densidad de segmentos de genoma, siendo útil para generar huellas genéticas, mapeo y estudios de genética de poblaciones. Así mismo, es una técnica que genera cientos de marcadores genéticos informativos que aumentan la probabilidad de detección de polimorfismos específicos de especies y población (Telectchea, 2009). Sin embargo, requiere un gran número de pasos para obtener los resultados, por lo cual cada vez son menos los trabajos en los cuales se utiliza.

#### **2.4.4. Código de barras (Barcoding)**

La técnica de *Barcoding*, es una herramienta utilizada para la identificación rápida y precisa de diferentes taxones e incluso permite la detección de especies crípticas. Se basa en la identificación de especies a través de la generación de códigos de barras, para lo cual se usa el gen mitocondrial *Citocromo oxidasa I (COI)*, que está entre los genes codantes más conservados en el genoma mitocondrial de los animales y posee un mayor rango de señal filogenética que cualquier otro gen mitocondrial (Folmer *et al.*, 1994; Herbert *et al.*, 2003).

Debido a la utilidad de esta técnica, y la enorme cantidad de información generada, se creó el programa internacional, "*Barcode of Life Initiative* ", con la finalidad de estudiar y catalogar molecularmente la diversidad de especies, animales y plantas de la Tierra (<http://www.Barcoding.si.edu/>) (Teletchea, 2009).

Sin embargo, entre los principales problemas que se han presentado con esta técnica, es el saber si un gen de 648 pb podrá identificar a tantas especies sin llevar a un error (Lipscom *et al.*, 2003). Así mismo, entre sus desventajas se encuentra que se tienen que secuenciar todas las muestras, haciéndola una técnica costosa (Eguiarte *et al.*, 2007; Fisher y Smith, 2008).

#### **2.4.5. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP por sus siglas en inglés)**

Esta técnica, se presenta como una alternativa la técnica RFLP, permitiendo diferenciar distintos organismos mediante el análisis de patrones de bandas o perfiles de restricción que son derivados de la ruptura de sus respectivos ADNs, originados por la actividad de endonucleasas de restricción (Rodríguez, 2008).

Esta técnica utilizada por primera vez en 1974 por biólogos poblacionales, como una herramienta para el análisis genético (Grodzicker *et al.*, 1974), utiliza la amplificación por PCR de ADN genómico, seguido de la digestión mediante enzimas de restricción (ER), las cuales digieren el producto de PCR en los sitios que presentan sitio de corte específico para la enzima, separando fragmentos por medio de electroforesis, y obteniendo un patrón de bandas específico para cada genotipo (Eguiarte *et al.*, 2007; Sánchez, 2012).

Este método es simple, sencillo, robusto, y no requiere de instrumental complejo (Rodríguez, 2008), es fácil de realizar y replicar, y es menos costoso en comparación con otras técnicas que requieren de secuenciamiento (Telectchea, 2009).

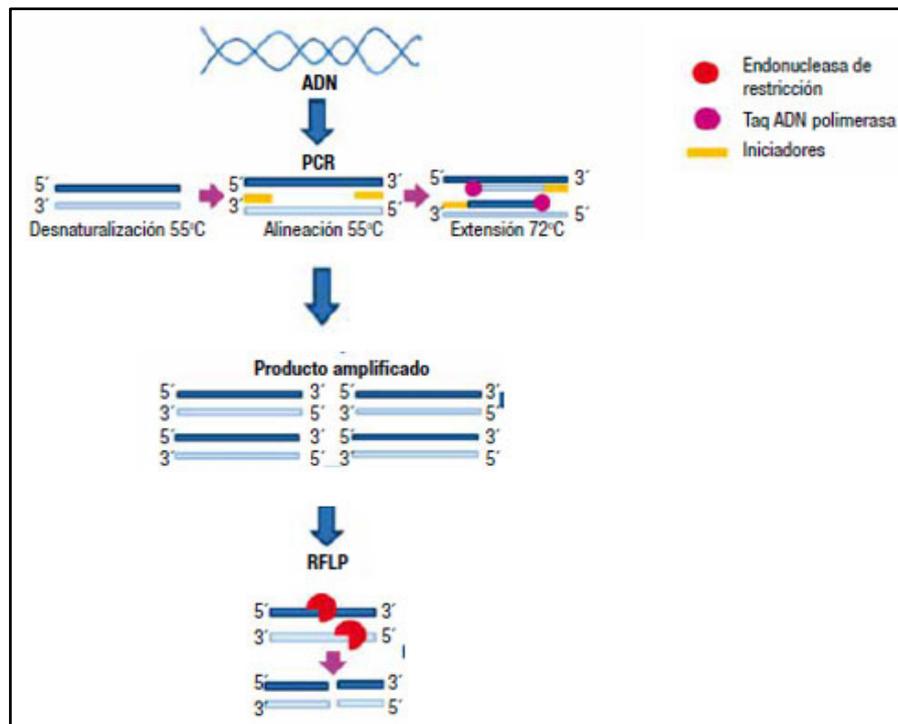


Figura 1. Análisis de polimorfismos por medio de PCR-RFLP. Primero se realiza la amplificación de un fragmento de ADN, posteriormente el producto de PCR es digerido con una enzima de restricción adecuada. En este caso la enzima reconoce el alelo variante generando 2 fragmentos, posteriormente, se separan los fragmentos por medio de electroforesis, obteniendo un patrón de bandas específico para cada genotipo (Imagen obtenida de Ramírez *et al.*, 2013)

## 2.5. Enzimas de restricción

Estas enzimas también llamadas endonucleasas, fueron descubiertas por Nathan y Smith (1975) en bacterias, y su principal función es reconocer las secuencias de ADN foráneo y cortarlo, con el fin de proteger la integridad de la célula bacteriana. Se clasifican en 4 tipos, siendo las enzimas de tipo II las que revolucionaron el desarrollo de investigaciones biológicas (Yuan, 1981).

Las enzimas tipo II (ER) son homodímeros o tetrámeros que escinden el ADN en sitios definidos de 4-8 pb de longitud de secuencias palindrómicas y difieren de las enzimas de tipo I, III y IV porque no requieren de adenosina trifosfato (ATP) o guanosa trifosfato (GTP) para su funcionamiento, pero necesitan un catión como  $Mg^{+}$  que actúe como cofactor (Pingout *et al.*, 2014).

Las ER han sido nombradas en base a una sugerencia original de Nathans y Smith, quienes propusieron que los nombres de las enzimas deben comenzar con un acrónimo de tres letras en el que la primera letra es la primera letra del género del que se aisló la enzima y las siguientes dos letras son las dos primeras letras del nombre de la especie, agregando letras o números para indicar cepas individuales o serotipos. Por ejemplo: *Haemophilus influenzae* serotipo **d**, *Hind* III (Roberts *et al.*, 2003). En casos en que se presenta el sistema R-M (sistema de restricción-modificación) dos componentes enzimáticos, una endonucleasa de restricción y una enzima de modificación que comparten características similares, entonces se proporciona la abreviatura de la especie de género en cursiva del huésped y el símbolo del elemento extracromosómico sigue en letra no cursiva, como es en el caso de, *Eco*R I, el cual es *Echerichia coli* siendo el uso de RI en lugar de los nombres de plásmidos RTF-1 (Smith y Nathans, 1973).

### III. Materiales y Métodos

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Área de estudio

Las especies fueron adquiridas del muelle Gildemeister, distrito Chimbote, provincia del Santa, departamento de Ancash.

##### 3.1.2. Muestra biológica y colecta de la muestra

Se adquirieron nueve especies de peces, cinco organismos por cada especie, haciendo un total de 45 ejemplares, de las siguientes especies: *P. adspersus*, lenguado; *E. ringens*, anchoveta; *S. japonicus*, caballa; *T. picturatus*, jurel; *S. chiliensis*, bonito; *M. gayi peruanus*, merluza; *O. regia regia*, pejerrey; *P. peruanus*, coco; *S. deliciosa*, lorna (Tabla 1).

Tabla 1. Ubicación taxonómica de las nueve especies de peces estudiadas

| Especies                | Género        | Familia         | Orden             | Clase          |
|-------------------------|---------------|-----------------|-------------------|----------------|
| <i>E. ringens</i>       | Engraulis     | Engraulidae     | Clupeiformes      | Actinopterygii |
| <i>S. japonicus</i>     | Scomber       | Scombridae      | Perciformes       | Actinopterygii |
| <i>T. picturatus</i>    | Trachurus     | Carangidae      | Perciformes       | Actinopterygii |
| <i>S. deliciosa</i>     | Sciaena       | Sciaenidae      | Perciformes       | Actinopterygii |
| <i>P. peruanus</i>      | Paralanchurus | Sciaenidae      | Perciformes       | Actinopterygii |
| <i>O. regia regia</i>   | Odonthestes   | Atherinopsidae  | Perciformes       | Actinopterygii |
| <i>M. gayi peruanus</i> | Merluccius    | Merluccidae     | Gadiformes        | Actinopterygii |
| <i>P. adspersus</i>     | Paralichthys  | Paralichthyidae | Pleuronectiformes | Actinopterygii |
| <i>S. chiliensis</i>    | Sarda         | Scombridae      | Perciformes       | Actinopterygii |

De cada uno de los individuos se cortó un pedazo de aleta con la ayuda de un bisturí, y se colocó las muestras en envases plásticos de 15 ml de capacidad, que contenían alcohol al 96%. Las muestras fueron rotuladas y transportadas al Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa, en donde se les hizo un recambio de alcohol y almacenados a -20°C, para posteriormente ser sometidos al proceso de extracción de ADN.

### **3.2. Metodología de laboratorio para la identificación de los ejemplares.**

#### **3.2.1. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se hizo utilizando el método de fenol-cloroformo, a partir de la aleta previamente preservada en alcohol al 96% (Taggar, 1992).

#### **3.2.2. Evaluación de la concentración y calidad del ADN**

Una vez extraído el ADN, se procedió a evaluar la calidad y concentración del mismo. La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría, utilizando un cuantificador marca Epoch (Biotek Instruments) que brindó la concentración de ADN, la calidad del extracto se valoró midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda.

Para determinar la pureza del DNA se estableció la relación:

$$\text{Pureza DNA} = A_{260} / A_{280} \geq 1.8$$

#### **3.2.3. Evaluación de la calidad del ADN**

El estado del ADN fue evaluado por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, usando una solución amortiguadora TBE 0.5X (Tris-HCL, ácido bórico, EDTA). La electroforesis se realizó en una cámara electroforética horizontal marca Cleaver, a 80 V durante 45 minutos. La muestra sólo fue aceptada como válida cuando se detectó la presencia del ADN genómico íntegro, definido como una única banda en el gel de agarosa.

#### **3.2.4. Amplificación de PCR del marcador molecular *Citocromo oxidasa I (COI)*.**

El marcador molecular *Citocromo oxidasa I* fue amplificado haciendo uso de los cebadores COL 6BF y COH 6R (Tabla 2).

La amplificación se realizó utilizando el siguiente protocolo: 1 ul de *Taq* buffer – KCl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.1 ul de cada Primer (25 uM), 0.5 ul de dNTPs (2.5 mM), **6.94 de H<sub>2</sub>O de PCR, 0.1 ul de *Taq* polimerasa y 1 ul de DNA**, siguiendo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 45 s, alineación a 47 °C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min), y una extensión final a 72° C por 3 min (Figuras 2 y 3).

Tabla 2. Cebadores para la amplificación de los genes *Citocromo oxidasa I* y *16S rDNA*

| Cebadores o Primers | Secuencias                         | Referencias               |
|---------------------|------------------------------------|---------------------------|
| COL 6BF             | 5' d ACAAATCATAAAGATATYGG 3'       | Schubart y Huber (2006)   |
| COH 6R              | 5' d TADACTTCDGGRTGDCCAAARAAYCA 3' |                           |
| 16 Sar – 5'         | 5' d CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'       | Kerr <i>et al.</i> (2004) |
| 16 Sbr – 5'         | 5' d CCGGTCTGAACTGAGATACACGT 3'    |                           |

### 3.2.5. Amplificación de PCR del marcador molecular *16S rDNA*

El marcador molecular *16S rDNA* fue amplificado empleando los cebadores, 16 Sar y 16 Sbr – 3 (Kerr *et al.*, 2004). La amplificación se realizó utilizando el siguiente protocolo: 1 ul de *Taq* buffer – KCl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.1 ul de cada primer (25 uM), 0.5 ul de dNTPs (2.5 mM), 6.94 de H<sub>2</sub>O de PCR, 0.1 ul de *Taq* polimerasa y 1 ul de DNA, siguiendo las condiciones de: la inicial desnaturalización a 95°C por 3 min, 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 45s, alineación a 52 °C por 30s, y extensión a 72°C por 35s), y una extensión final a 72° C por 10 min.

Para ambos casos la visualización del producto amplificado se realizó en electroforesis de agarosa al 1% (Figuras 4 y 5).

### 3.2.6. PCR-RFLP

Los productos de PCR amplificados, fueron digeridos por enzimas de restricción (PCR - RFLP) agrupándose en dos grupos de 2 individuos por especie. Cada grupo fue sometido a digestión con cada una de las enzimas de restricción (*Apa* I, *Eco*R I, *Bam*H I, *Not* I, *Hind* III, *Hinc* II).

Se preparó un mix con volumen final de 7.5 µl: 2.5µl de reacción de PCR, 4µl de H<sub>2</sub>O de PCR, 0.5µl de 10X de buffer y 0.25µl de la enzima de restricción. El mix fue incubado por 2 horas con 30 minutos en un thermo mixer marca Eppendorf, a 37°C, seguido de la inactivación de las enzimas a -80°C por 5 minutos (Chen *et. al.*, 2013). Se visualizó en gel de agarosa al 1%.

### Limpieza de los productos amplificados

Para la purificación de los productos de PCR, se utilizó el kit exoSAP- IT. A cada muestra de amplificación se agregó 1ul, se programó el termociclador en 37°C por 60 min, seguido por 85°C por 15 min y para finalizar 10° C ∞.

## **Secuenciación**

El producto amplificado (una muestra por especie) se envió al Laboratorio de Genética del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) para su secuenciación por electroforesis capilar de la hebra forward.

### **3.3. Desarrollo de la metodología para la predicción *in silico* de las secuencias propias y las obtenidas del NCBI**

Las secuencias propias y las secuencias obtenidas del NCBI, fueron alineadas en el programa Mega 7, posteriormente se ingresaron en el programa NEBcutter, para predecir *in silico* el patrón de corte producido por las enzimas de restricción que se utilizaron en el estudio (Anexo I y II).

El programa MyImage fue utilizado para la medición de cada uno de los fragmentos formados por las enzimas de restricción en los geles de agarosa.

### **3.4. Desarrollo de la metodología para la identificación de las especies**

Las especies fueron identificadas de acuerdo al perfil de cortes realizados por las enzimas de restricción, tomándose en cuenta el tamaño del fragmento formado por la escisión de éstas.

La medición de los fragmentos formados por las enzimas de restricción se hizo a través, de una regresión cuadrática formulada por el programa MyImage.

### **3.5. Análisis Filogenético (FINS)**

Para los análisis filogenéticos se utilizó el software Mega 7.0. El cálculo de las distancias genéticas entre secuencias se hizo haciendo uso del modelo de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980). La inferencia del árbol filogenético se llevó a cabo con el método Neighbor-Joining. Asimismo, se evaluó la fiabilidad de los clados formados mediante la prueba bootstrap con 1000 repeticiones.

#### IV. Resultados

##### 4.1. Amplificación de los productos de PCR del gen *Citocromo oxidasa I* y *16S rDNA*

Se obtuvo un amplificado del gen *Citocromo oxidasa I* de 800pb para las especies *S. japonicus*, *T. picturatus*, *P. peruanus*, *P. adspersus*, *O. regia regia*, *S. deliciosa*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus* y *S. chiliensis* (Figuras 2 y 3).

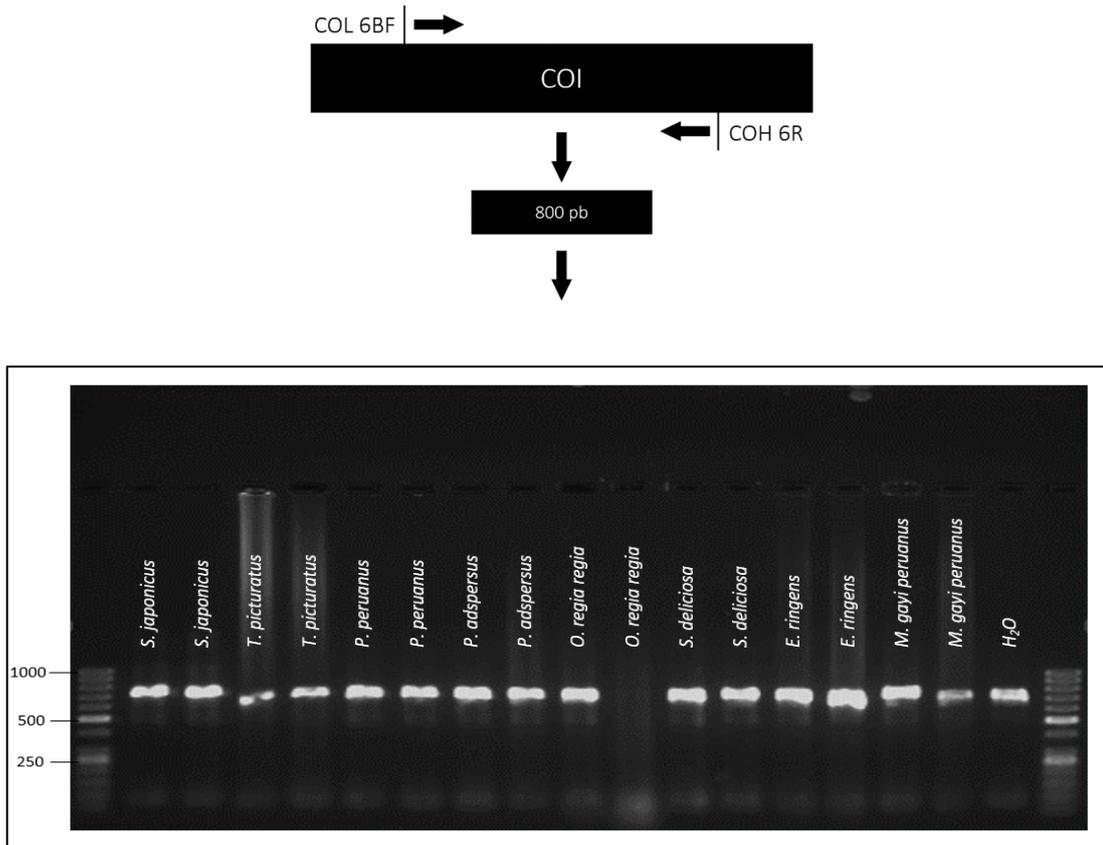


Figura 2. Posición del conjunto de cebadores utilizados y producto de amplificación del gen *Citocromo oxidasa I* en gel de agarosa al 1%: *S. japonicus*, *P. peruanus*, *P. adspersus*, *O. regia regia*, *S. deliciosa*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus*

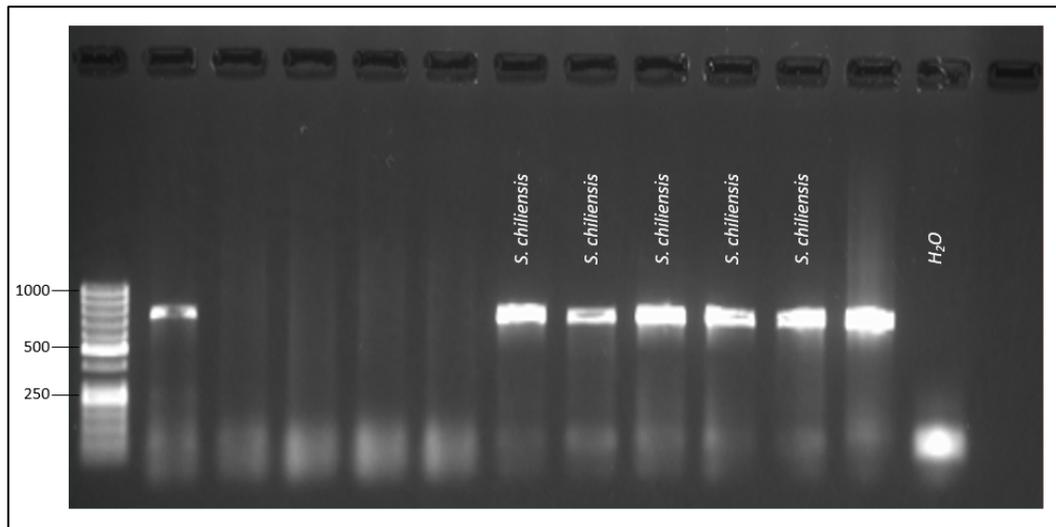


Figura 3. Producto de amplificación del gen *Citocromo oxidasa I* en gel de agarosa al 1%: *S. chiliensis*

El gen *16S rDNA* tuvo un amplificado de 600pb para las especies *S. chiliensis*, *S. japonicus*, *T. picturatus*, *M. gayi peruanus*, *P. peruanus*, *P. adspersus*, *O. regia regia* y *S. deliciosa* (Figura 4).

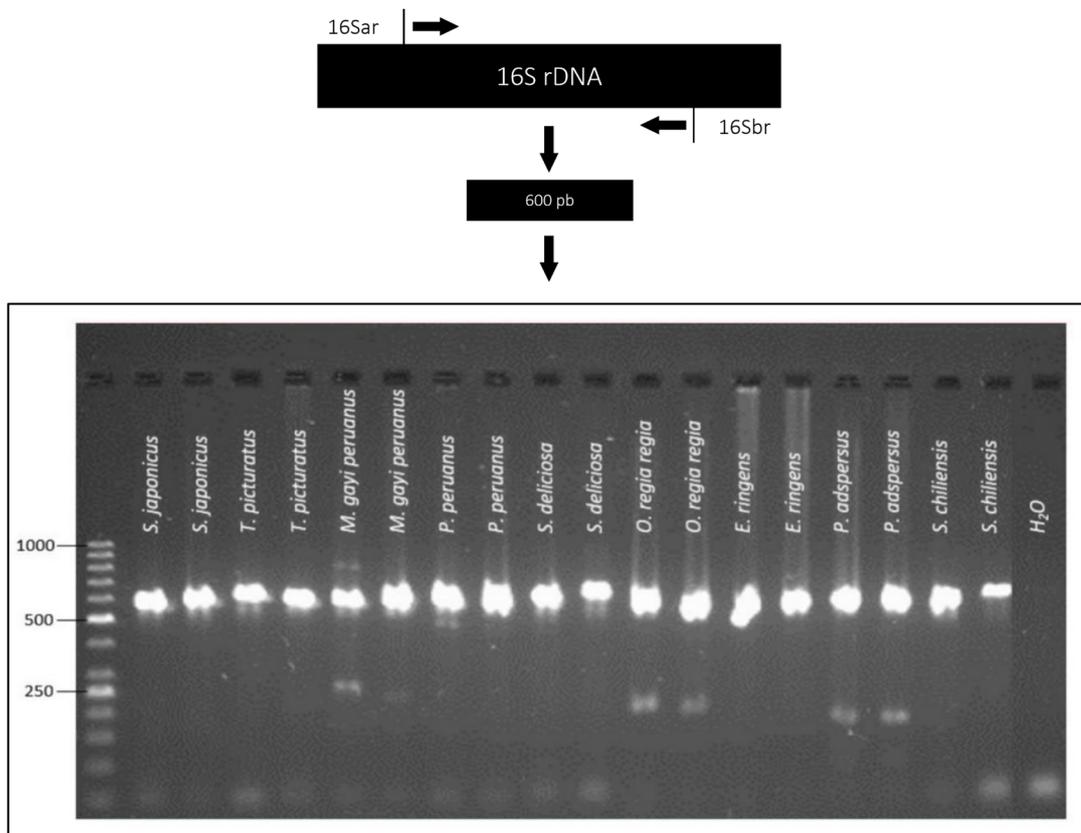


Figura 4: Posición del conjunto de cebadores utilizados y producto de amplificación del gen *16S rDNA* en gel de agarosa al 1%: *S. japonicus*, *T. picturatus*, *M. gayi peruanus*, *P. peruanus*, *S. deliciosa*, *O. regia regia*, *E. ringens*, *P. adspersus*, *S. chiliensis*

#### **4.2. Comparación de los cortes formados *in silico* por las enzimas de restricción usando las secuencias propias y las obtenidas del NCBI del gen *Citocromo oxidasa I***

En la comparación de las secuencias propias y las obtenidas del NCBI de cada especie se presentaron los mismos sitios de corte *in silico* para cada enzima de restricción (Tabla 3).

De igual forma, se compararon los tamaños de los fragmentos formados *in silico* de las secuencias propias, y los fragmentos formados por PCR-RFLP del gen *COI*, observándose que para las especies *T. picturatus* y *O. regia regia* no se observaron fragmentos *in silico* y tampoco por PCR-RFLP, con ninguna de las enzimas utilizadas. Asimismo, haciendo uso de la técnica PCR-RFLP se visualizó que los fragmentos menores a 60pb que se observaban *in silico* (con la enzima *Hinc II* en *S. japonicus* y *M. gayi peruanus* y con la enzima *Hind III* en *S. japonicus*), no se lograron percibir por PCR-RFLP.

Para las especies *S. japonicus*, *M. gayi peruanus*, *S. deliciosa*, *S. chiliensis*, *E. ringens* y *P. adspersus* los fragmentos que se formaron mayores a 60pb estuvieron presentes tanto *in silico* como haciendo uso de la técnica PCR-RFLP. No obstante, al comparar los tamaños de los fragmentos por PCR-RFLP con las obtenidas *in silico*, se observó que el tamaño de los fragmentos no coincidía totalmente, sino que había una diferencia de tamaño de entre 20 y 60pb (Tabla 3).

Además, haciendo uso de la técnica PCR-RFLP y de la enzima *Apa I* en *S. deliciosa* hubo una formación de tres fragmentos de 784pb, 513pb y 232pb mientras que *in silico* solo se observaron dos fragmentos de 449pb y 189pb (Tabla 3). De igual modo, para *E. ringens* hubo una formación de tres fragmentos 800pb, 538pb y 220pb mientras que *in silico* solo se observó dos fragmentos 469pb y 189pb, asimismo, para *P. peruanus* también hubo una formación de tres fragmentos 787pb, 534pb, 225pb, mientras en el análisis *in silico* solo se observó dos fragmentos 399pb, 254pb.

#### **4.3. Comparación de los cortes formados *in silico* por las enzimas de restricción usando las secuencias propias y las obtenidas del NCBI del gen *16S rDNA*.**

En la comparación de las secuencias obtenidas del NCBI y las secuencias propias del gen *16S rDNA*, se observó que *E. ringens* presentó sitio de corte para la enzima *Hinc II* en ambos casos. La secuencia de *P. peruanus* no fue hallada en el NCBI, sin embargo, haciendo uso de la secuencia propia se observó que para la enzima *EcoR I* tuvo sitio de corte, formando dos fragmentos de 435pb y 218pb (Tabla 4).

Tabla 3. Comparación de los números de corte y de los perfiles de restricción formados *in silico* en las secuencias propias y obtenidas del NCBI del gen *Citocromo oxidasa I* por las enzimas de restricción usadas en el presente trabajo

| Análisis   |  | Enzimas de restricción | <i>Scomber japonicus</i> | <i>Trachurus picturatu</i> | <i>Merluccius gayi peruanus</i> | <i>Sciaena deliciosa</i> | <i>Sarda chiliensis</i> | <i>Engraulis ringens</i> | <i>Paralichthys adspersus</i> | <i>Paralonchurus peruanus</i> | <i>Odonthestes regia regia</i> |
|--|--|------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| N° de corte de las ER en las secuencias                            | Secuencias del NCBI  | <i>Hinc</i> II         | 1                        | -                          | 1                               | 1                        | 1                       | -                        | -                             | 1                             | -                              |
|  |  | <i>Hind</i> III        | 2                        | -                          | 1                               | -                        | 1                       | 1                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Apa</i> I           | -                        | -                          | -                               | 1                        | -                       | 1                        | -                             | 1                             | -                              |
|  |  | <i>Bam</i> H I         | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Eco</i> R I         | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Not</i> I           | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  | Secuencias Propias   | <i>Hinc</i> II         | 1                        | -                          | 1                               | 1                        | 1                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Hind</i> III        | 2                        | -                          | 1                               | -                        | 1                       | 1                        | 1                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Apa</i> I           | -                        | -                          | -                               | 1                        | -                       | 1                        | -                             | *                             | -                              |
|  |  | <i>Bam</i> H I         | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Eco</i> R I         | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  | <i>Not</i> I   | -                      | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             |                                |
| Perfil de restricción de las secuencias propias del Gen <i>COI</i> | Perfil de restricción <i>in silico</i> de las secuencias propias | <i>Hinc</i> II         | 597pb,59pb               | -                          | 607pb, 48pb                     | 178pb, 340pb             | 346pb, 293pb            | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Hind</i> III        | 426pb, 230pb, 31pb       | -                          | 434pb, 221pb                    | -                        | 623pb, 16pb             | 436pb, 222pb             | 421pb, 215pb                  | -                             | -                              |
|  |  | <i>Apa</i> I           | -                        | -                          | -                               | 449pb, 189pb             | -                       | 469pb, 189pb             | -                             | *                             | -                              |
|  |  | <i>Bam</i> H I         | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Eco</i> R I         | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Not</i> I           | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  | Perfil de restricción formado por PCR-RFLP                       | <i>Hinc</i> II         | 674pb                    | -                          | 684pb                           | 407pb, 276pb             | 420pb, 277pb            | -                        | -                             | 399pb,254pb                   | -                              |
|  |  | <i>Hind</i> III        | 467pb, 149pb             | -                          | 411pb, 234pb                    | -                        | 680pb                   | 453pb, 268pb             | 494pb, 296pb                  | -                             | -                              |
|  |  | <i>Apa</i> I           | -                        | -                          | -                               | 784pb, 513pb, 232pb      | -                       | 800pb, 538pb, 220pb      | -                             | 787pb,534pb, 225pb            | -                              |
|  |  | <i>Bam</i> H I         | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Eco</i> R I         | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  | <i>Not</i> I           | -                        | -                          | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |
|  |  |                        |                          |                            |                                 |                          |                         |                          |                               |                               |                                |

\*El fragmento amplificado de esta especie, no fue enviado a secuenciar.

Tabla 4. Comparación de los números de corte y de los perfiles de restricción formados *in silico* en las secuencias propias y obtenidas del NCBI del gen *16S rDNA* por las enzimas de restricción

| Análisis  |  | Enzimas de restricción | <i>Scomber japonicus</i> | <i>Trachurus picturatus</i> | <i>Merluccius gayi peruanus</i> | <i>Sciaena deliciosa</i> | <i>Sarda chiliensis</i> | <i>Engraulis ringens</i> | <i>Paralichthys adspersus</i> | <i>Paralonchurus peruanus</i> | <i>Odonthestes regia regia</i> |   |
|---|--|------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|
| N° de corte de las ER en las secuencias                                 | Secuencias del NCBI  | <i>Hinc</i> II         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | 1                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Hind</i> III        | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Apa</i> I           | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Bam</i> H I         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Eco</i> R I         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | *                             | -                              |   |
|   |  | <i>Not</i> I           | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   | Secuencias Propias   | <i>Hinc</i> II         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | 1                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Hind</i> III        | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Apa</i> I           | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Bam</i> H I         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Eco</i> R I         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | 1                             | -                              |   |
|   |  | <i>Not</i> I           | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
| Perfil de restricción de las secuencias propias del Gen <i>16S rDNA</i> | Perfil de restricción <i>in silico</i> de las secuencias propias | <i>Hinc</i> II         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | 390pb, 181pb             | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Hind</i> III        | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Apa</i> I           | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Bam</i> H I         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   |  | <i>Eco</i> R I         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | 416pb, 173pb                  | -                              |   |
|   |  | <i>Not</i> I           | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              |   |
|   | Perfil de restricción formado por PCR-RFLP                       | <i>Hinc</i> II         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | 451pb, 118pb                  | -                             | -                              | - |
|   |  | <i>Hind</i> III        | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              | - |
|   |  | <i>Apa</i> I           | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              | - |
|   |  | <i>Bam</i> H I         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              | - |
|   |  | <i>Eco</i> R I         | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | 435pb, 218pb                   | - |
|   |  | <i>Not</i> I           | -                        | -                           | -                               | -                        | -                       | -                        | -                             | -                             | -                              | - |

\*La secuencia de esta especie no fue hallada en el NCBI.

#### 4.4. Identificación de las especies usando la técnica PCR-RFLP empleando el gen mitocondrial *Citocromo oxidasa I*

Los productos amplificados de 800 pb del gen *COI* (Figuras 2 y 3), solo presentó sitio de corte para tres de las enzimas de restricción utilizadas: *Hind* III, *Hinc* II y *Apa* I. Las enzimas *EcoR* I, *BamH* I y *Not* I no produjeron fragmentos específicos debido a que no encontraron sitio de reconocimientos para las enzimas en las secuencias (Figuras 22-24).

##### 4.4.1. *Hind* III

Para la enzima *Hind* III se encontró sitio de corte en las especies: *S. japonicus*, *P. adspersus*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus* y *S. chiliensis*; sin embargo, solo se pudieron discriminar a tres especies por su perfil de restricción: *S. japonicus*, *S. chiliensis* y *M. gayi peruanus*: *S. chiliensis* presentó un fragmento de 680pb, *S. japonicus* presentó un perfil con dos cortes de 467pb y 149pb (Figura 5) y *M. gayi peruanus* 411pb y 234pb.

Los productos amplificados de las especies *P. adspersus*, *E. ringens* también fueron escindidas por esta enzima de restricción, con un perfil de restricción bastante similar entre sí, pero que bien podría diferenciarse del perfil de *S. japonicus*. sin embargo, el perfil de restricción fue similar para estas dos especies lo que no permitió su correcta discriminación (Figura 5 y 6).

Con la enzima *Hind* III no se pudieron discriminar *T. picturatus*, *P. peruanus*, *O. regia* y *S. deliciosa*, demostrado por la falta de sitio de corte (Tabla 3).

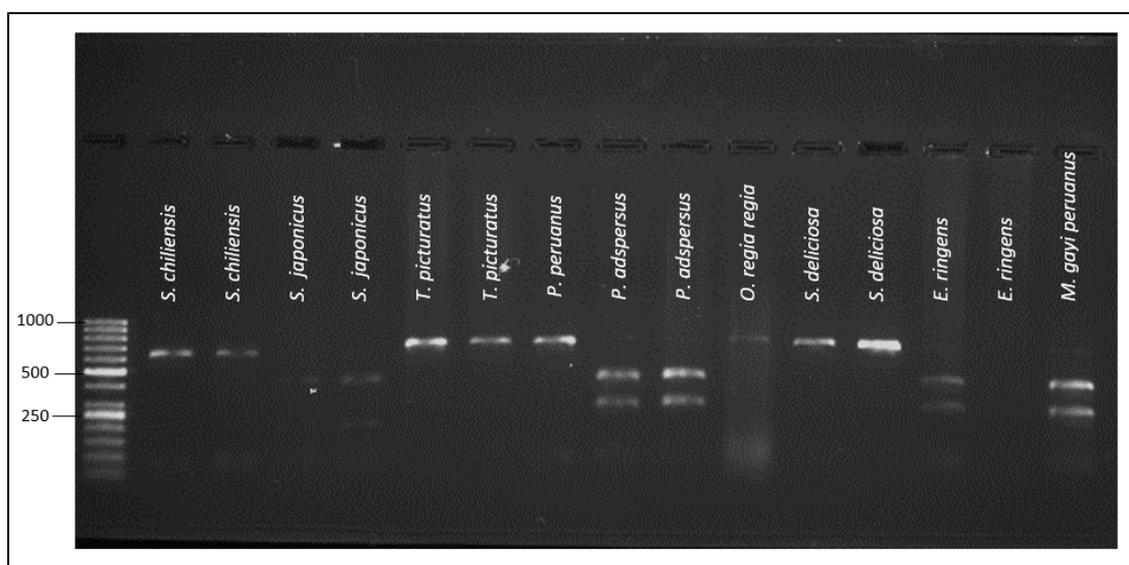


Figura 5. Perfil de restricción formado por la enzima *Hind* III en la región mitocondrial *Citocromo oxidasa I* de las especies *S. chilensis* 680 pb, *S. japonicus* miden 467 bp y 149 bp, de *P. adspersus* 494 bp y 296 bp, de *E. ringens* 453 pb y 268 pb, *M. gayi peruanus* presentó fragmentos de 411bp y 234 bp

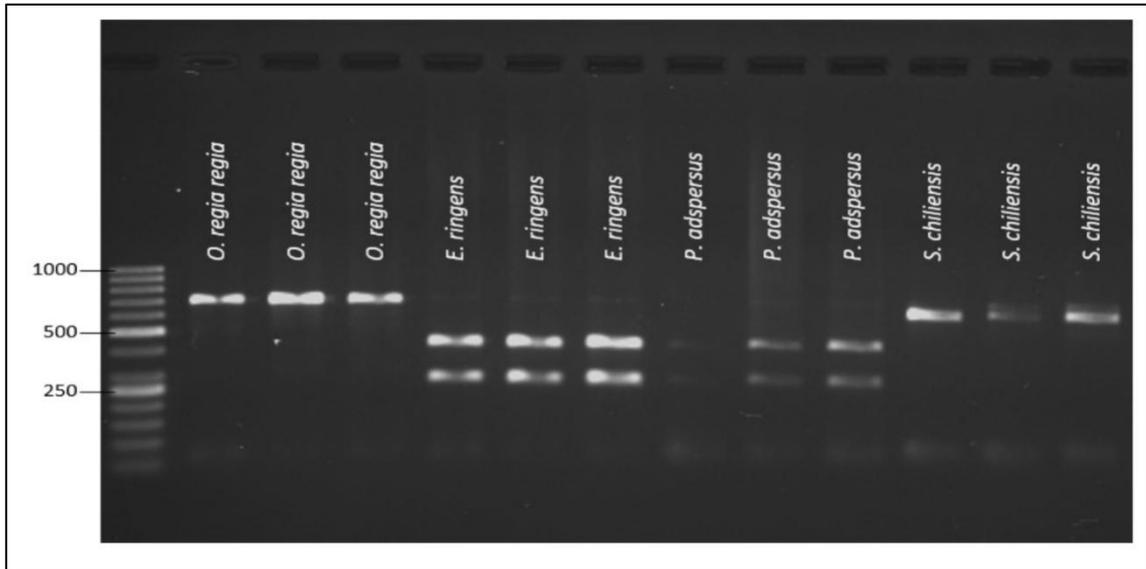


Figura 6. Perfil de restricción formado por la enzima *Hind* III en la región mitocondrial *Citocromo oxidasa I* de las especies *E. ringens* miden 453 pb y 268 pb, *P. adspersus* 494 pb y 296 pb, *S. chilensis* 680 pb

#### 4.4.2. *Hinc* II

Para la enzima *Hinc* II las especies que presentaron sitio de corte fueron *S. chilensis*, *S. japonicus*, *P. peruanus*, *S. deliciosa*, *M. gayi peruanus*, tal como se muestra en la Figura 7.

*S. japonicus* y *M. gayi peruanus*, presentaron un perfil de corte muy similar por lo cual no se pudieron discriminar entre sí. *S. chilensis* con un patrón de 420pb y 277pb no pudo ser diferenciada de *P. peruanus* con un patrón de 399pb y 254pb, ni de *S. deliciosa*, ya que, el perfil de estas tres especies fue muy similar. Si bien *in silico*, el tamaño de los fragmentos es diferente.

*T. picturatus*, *P. adspersus*, *O. regia regia*, *E. ringens*, no presentaron sitio de corte para la enzima *Hinc* II, debido a que no se encontró sitio de corte para esta enzima en sus secuencias, notándose en la Figura 7 el amplificado sin digerir de 800pb.

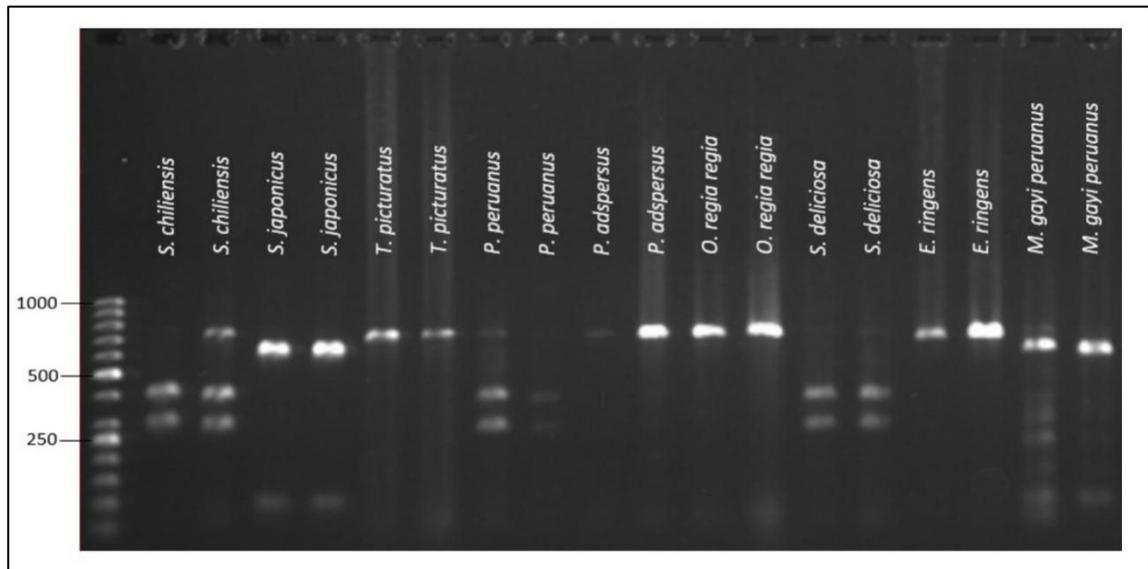


Figura 7. Perfil de restricción formado por la enzima *Hinc* II en la región mitocondrial *Citocromo oxidasa I* de los fragmentos generados por: *S. chilensis* midieron 420 pb y 277 pb; *S. japonicus* midieron 674 pb de *P. peruanus* 399 pb y 254 pb y de *S. deliciosa* 407 bp y 276 pb; *M. gayi peruanus* 684 pb

#### 4.4.3. *Apa* I

Para la enzima *Apa* I las especies que presentaron sitio de corte fueron *P. peruanus*, *S. deliciosa*, *E. ringens*; sin embargo, solo se pudo discriminar a *P. peruanus* por su perfil de restricción: *P. peruanus* presentó un fragmento de tres cortes 787pb, 534pb, y 225pb, las especies *S. deliciosa*, *E. ringens* no se lograron identificar pese a que presentaron sitio de corte para la enzima *Apa* I. (Figura 8).

*S. deliciosa* presentó fragmentos de 784pb, 513pb y 232pb, *E. ringens* tuvo fragmentos de 800pb, 538pb y 220pb, sin embargo, sus perfiles de restricción fueron muy similares lo que no permitió una correcta identificación.

Las especies *S. japonicus*, *T. picturatus*, *M. gayi peruanus*, *O. regia regia*, *P. adspersus*, *S. chilensis* no presentaron sitio de corte para la enzima *Apa* I notándose en el amplificado de 800pb sin digerir, por lo cual, *P. peruanus* también se pudo discriminar de estas especies,

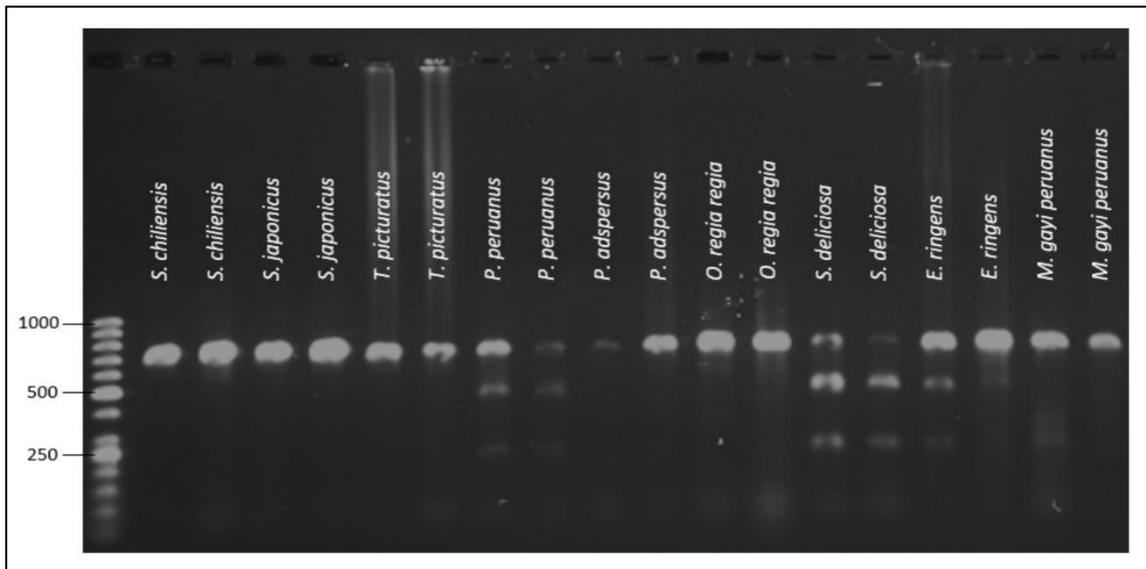


Figura 8. Perfil de restricción formado por la enzima *Apa I* en la región mitocondrial *Citocromo oxidasa I* de los fragmentos generados por: *P. peruanus* midieron 787 pb, 534 pb y 225 pb, *S. deliciosa* midieron 784pb, 513pb y 232pb, *E. ringens* midieron 800pb, 538pb y 220pb.

#### 4.4.4. Identificación de las especies usando la técnica PCR-RFLP empleando el gen mitocondrial *16S rDNA*

Los amplificados para el gen *16S rDNA* fueron de 600pb (Figura 4), para este gen se halló que solo dos de las enzimas de restricción utilizadas que tuvieron sitio de corte en las secuencias amplificadas siendo estas *Hinc II* y *EcoR I*.

Las enzimas *Hind III*, *Apa I*, *BamH I* y *Not I* no produjeron fragmentos específicos debido a que no encontraron sitio de reconocimientos en las secuencias (Figuras 25- 29)

#### 4.4.5. *Hinc II*

Para la enzima *Hinc II* solo se halló sitio de corte en la especie *E. ringens* formando dos fragmentos de 451pb y 118pb. Por lo que esta especie se pudo discriminar de las otras especies estudiadas que no presentaron sitio de corte para la enzima de restricción, observándose en el amplificado sin escindir como lo podemos observar en las Figuras 9 y 10.

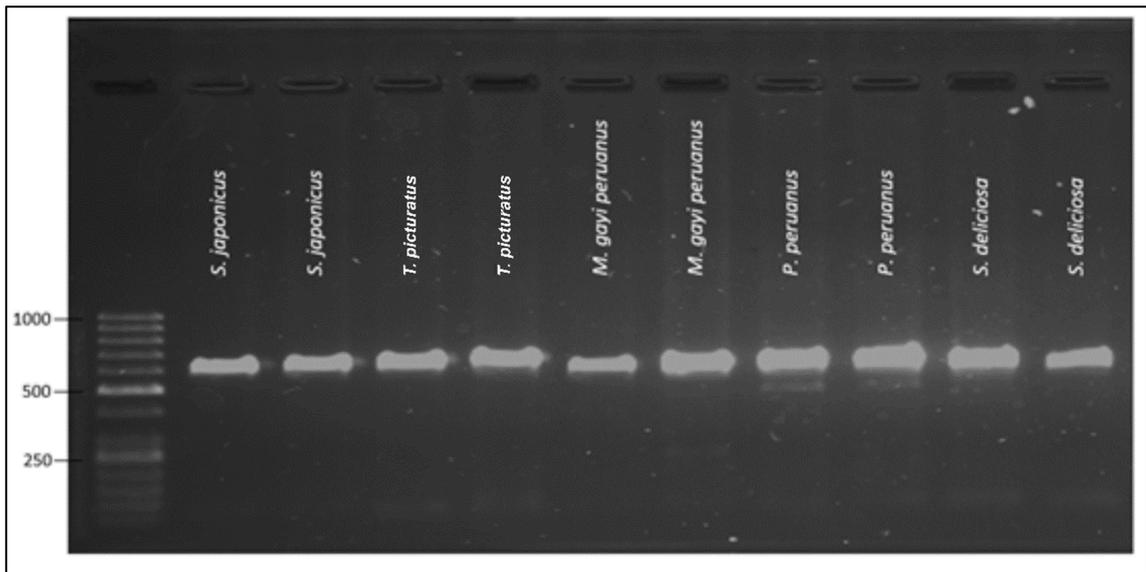


Figura 9. Perfil de restricción formado por la enzima *Hinc* II en la región mitocondrial *16S rDNA* en *S. japonicus*, *T. picturatus*, *M. gayi peruanus*, *P. peruanus*, *S. deliciosa*

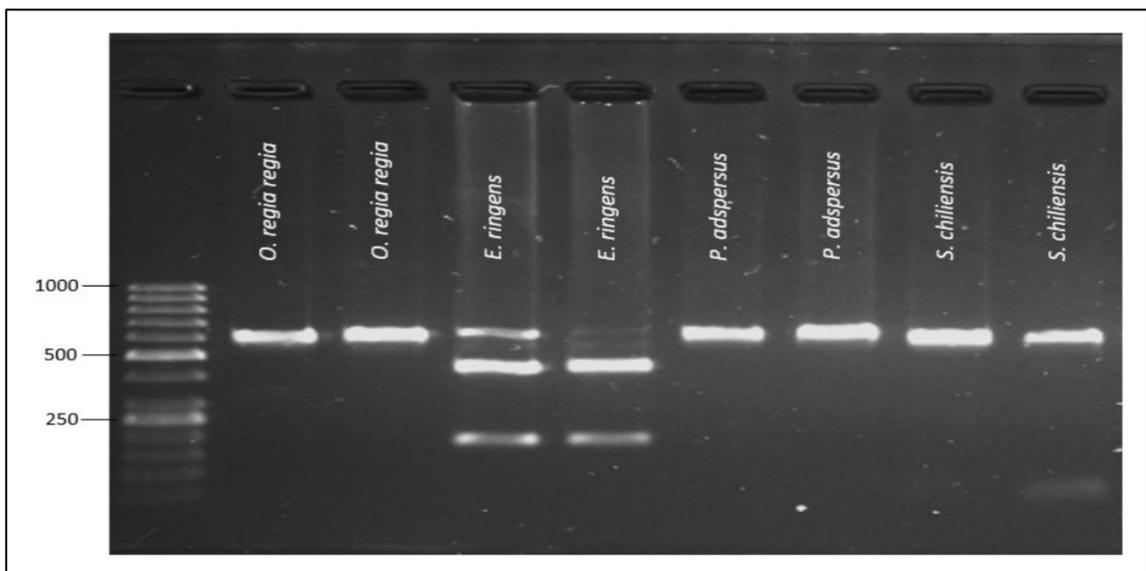


Figura 10. Perfil de restricción formado por la enzima *Hinc* II en la región mitocondrial *16S rDNA* en *E. ringens* fueron de 451bp, 118bp

#### 4.4.6. *EcoR* I

Esta enzima solo presentó sitio de corte en la especie *P. peruanus* formando fragmentos de 435pb y 218pb, lo que permitió discriminar a esta especie del resto de las especies estudiadas, las que al no presentar sitio de corte para *EcoR* I, no escindieron al fragmento amplificado, como se puede observar en la Figura 11.

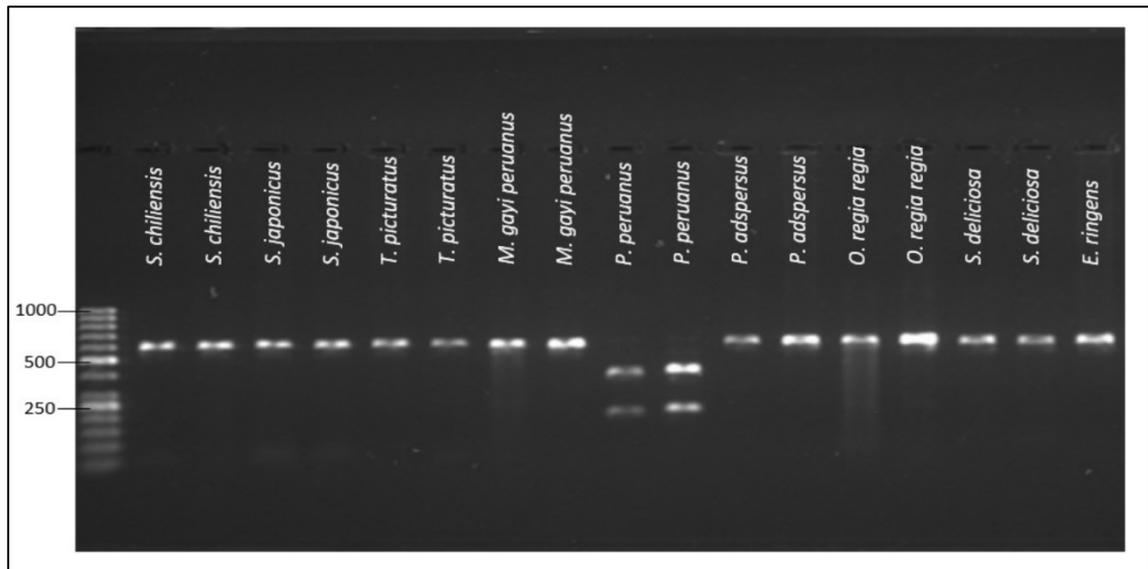


Figura 11. Perfil de restricción formado por la enzima *EcoR* I en la región mitocondrial *16S rDNA* en *P. peruanus* fueron de 435 bp y 218 bp

#### 4.5. Metodología FINS haciendo uso de las secuencias del gen *Citocromo oxidasa I*

A partir de las secuencias nucleotídicas, se calculó una matriz de distancia. Los resultados de este análisis mostraron un árbol filogenético, donde las secuencias de las especies más cercanas se agrupan en clados.

Se utilizaron las secuencias de las especies en estudio, estas secuencias de 800pb fueron alineadas por distancia genética y se construyó un árbol filogenético Neighbor-Joining basado en distancias genéticas. Como puede verse en la Figura 12, las especies agrupadas por clados fueron *S. chilensis* con *S. japonicus*, *P. peruanus* con *S. deliciosa*, *O. regia* con *M. gayi* y *E. ringens* con *P. adspersus*.

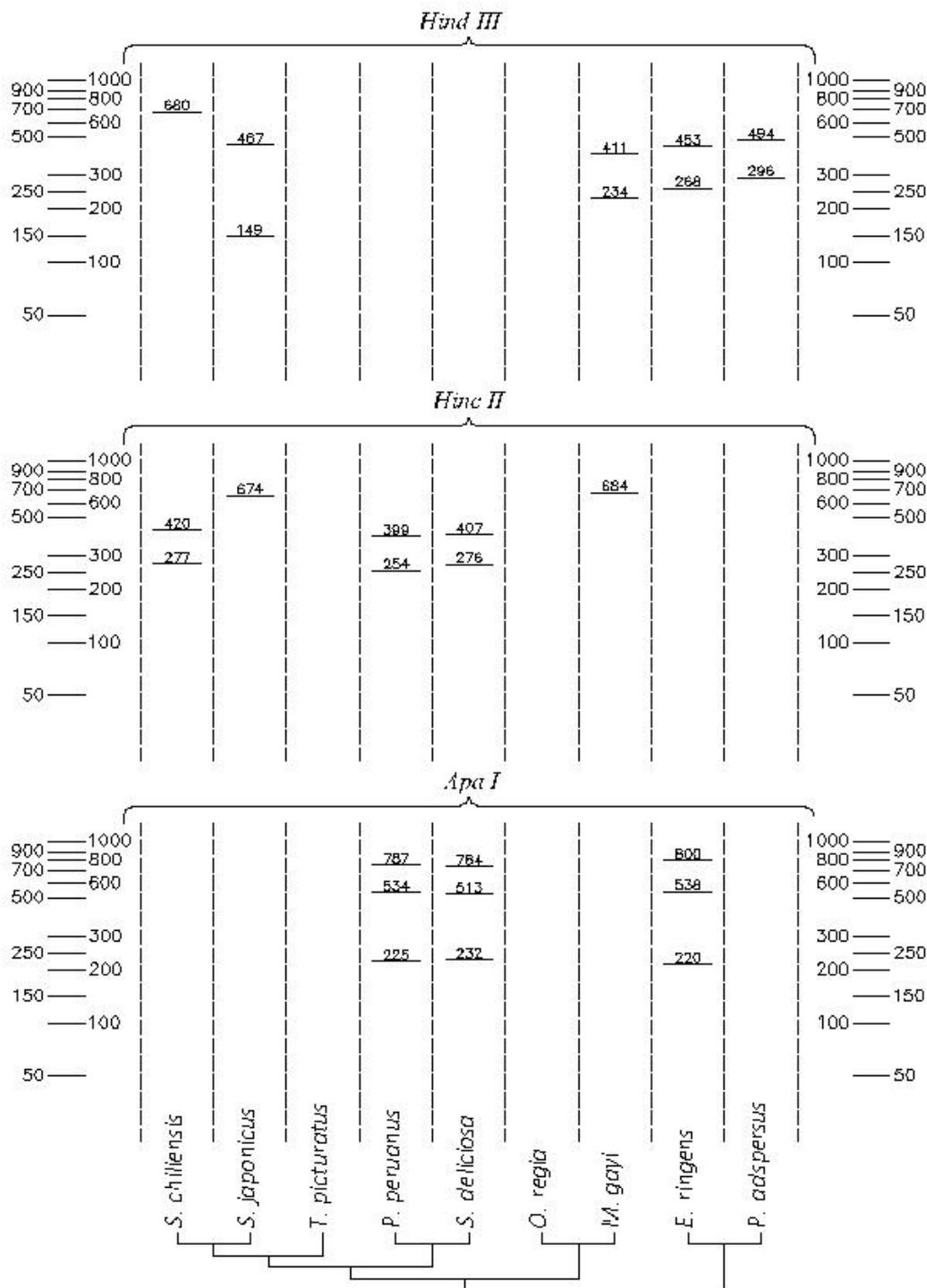


Figura 12. Árbol filogenético molecular de las especies *E. ringens*, *S. chiliensis*, *P. adspersus*, *S. japonicus*, *S. deliciosa*, *M. gayi peruanus*, *O. regia regia*, *T. picturatus*, *P. peruanus* (para esta especie se usó la secuencia descargada del NCBI). Basado en un análisis Neighbor-Joining de las secuencias del gen *Citocromo oxidasa I*. En la parte superior del árbol se muestra los fragmentos obtenidos por PCR RFLP haciendo uso de las enzimas *Apa I*, *Hinc II* y *Hind III*. Los patrones están separados por líneas verticales. El marcador de tamaño se muestra en ambos lados y la longitud de cada fragmento se encuentra sobre el fragmento.

El patrón de restricción coincidió sólo en los clados formados por las especies *S. chiliensis* con *S. japonicus* escindidos por las enzimas *Hind* III y *Hinc* II y *P. peruanus* con *S. deliciosa* escindidos por *Hinc* II y *Apa* I. En el clado formado por *E. ringens* y *P. adpersus* ambas presentaron sitio de restricción para *Hind* III, pero solo *E. ringens* presentó sitio de corte para *Apa* I. Mientras que en el clado formado por *M. gayi* y *O. regia*, solo *M. gayi* presentó sitio de corte para *Hinc* II y *Hind* III.

#### **4.6. Metodología FINS haciendo uso de las secuencias del gen 16S rDNA**

Se utilizaron las secuencias de las especies en estudio, estas secuencias de 600 pb fueron alineadas por distancia genética y se construyó un árbol filogenético Neighbor-Joining basado en distancias genéticas, que muestra las especies más cercanas agrupadas en un mismo clado (Figura 13). Las especies que fueron agrupadas en clados fueron *T. picturatus* con *P. adpersus*, *S. chiliensis* con *S. japonicus*, *S. deliciosa* con *P. peruanus*, mientras que *O. regia regia*, *M. gayi* y *E. ringens* no se agruparon con otras especies. Para este gen, no se presenta ninguna coincidencia entre las especies agrupadas y los patrones de restricción.

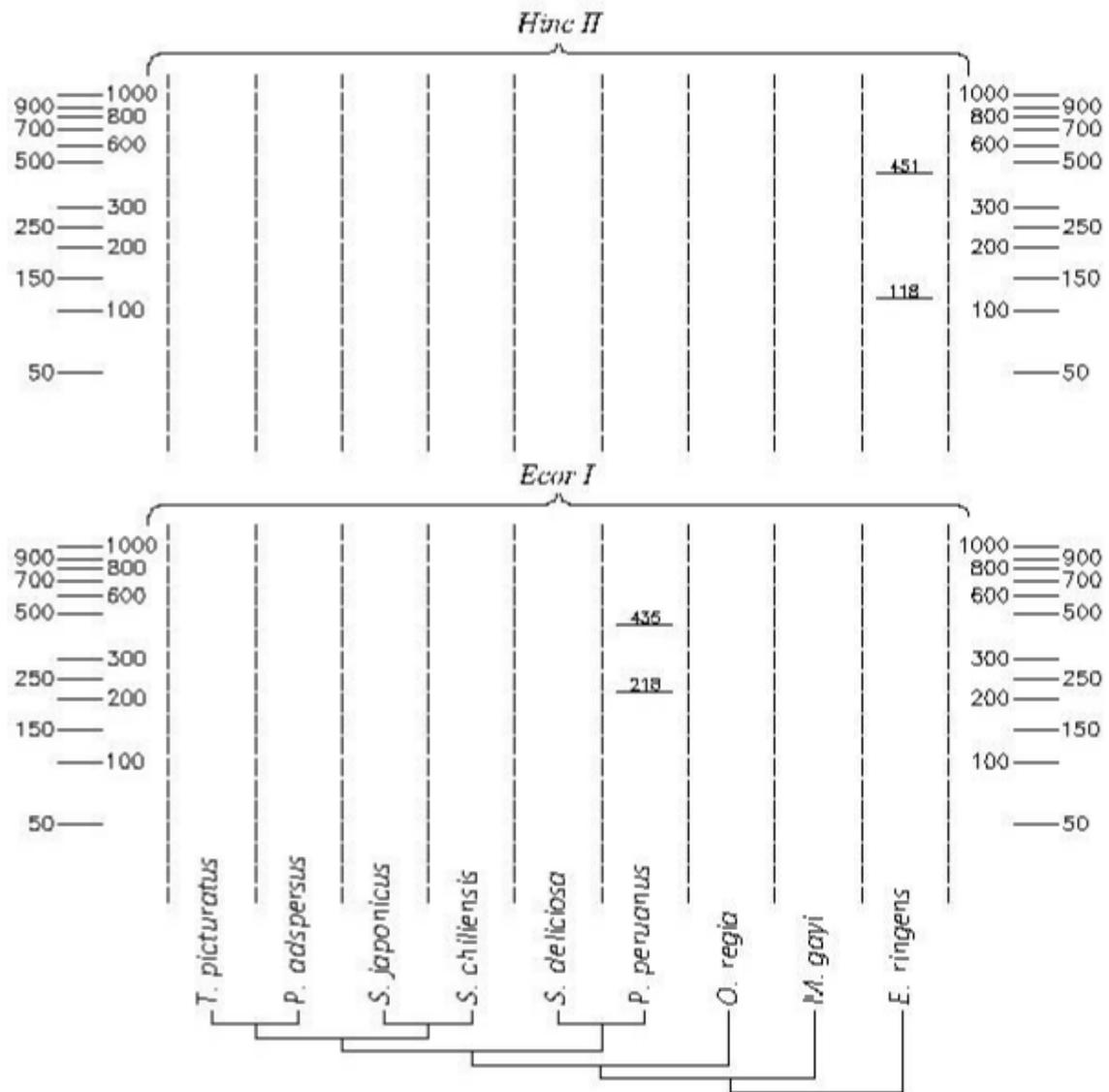


Figura 13. Árbol filogenético molecular de las especies *T. picturatus*, *P. adspersus*, *S. japonicus*, *S. chilensis*, *S. deliciosa*, *P. peruanus*, *O. regia*, *M. gayi*, *E. ringens*. Basado en un análisis Neighbor-Joining de las secuencias del gen *16S rDNA*. En la parte superior del árbol se muestra los fragmentos obtenidos por PCR RFLP haciendo uso de las enzimas *EcoR I* y *Hinc II*. Los patrones están separados por líneas verticales. El marcador de tamaño se muestra en ambos lados y la longitud de cada fragmento se encuentra sobre el fragmento.

## V. Discusión

### **Amplificados de los genes *COI* y *16S***

En el presente estudio los amplificadores obtenidos por el gen *COI* fueron de 800pb (Figura 2 y 3) y para el gen *16S* fueron de 600pb (Figura 4). En la identificación de especies es recomendable que los amplificadores sean de un peso molecular alto, de modo tal que se aproveche la diversidad entre las secuencias de ADN de las especies a identificar, accediendo a mayores posibilidades para la discriminación de especies (Kurtzman *et al.*, 1994; Herbert *et al.*, 2003). Por ello, no se tomaron en cuenta las bandas poco visibles y de bajo peso molecular de menos de 80pb obtenidas, puesto que, las bandas menores a menudo son poco visibles, no discriminatorias y de presencia inconstante en la parte inferior de los geles (Paillard *et al.*, 2003).

De igual modo, para la identificación de grupos taxonómicos a nivel de género o superior, se debe tomar en cuenta el grado de conservación evolutiva en las secuencias de ADN de los marcadores con que se va a trabajar (Sánchez, 2012); por lo cual, se recomienda los marcadores mitocondriales, como los empleados en este trabajo *COI* (Figura 2 y 3) y *16S rDNA* (Figura 4). Estos genes tienen una importante variación genética que permite la diferenciación entre especies de peces, dado que, presentan un alto nivel de conservación de las secuencias del mtDNA dentro de las especies (Palumbi, 1996; Haider *et al.*, 2012).

Los genes utilizados como marcadores moleculares en el presente estudio son genes mitocondriales, escogidos dado que el ADN mitocondrial posee varias ventajas sobre el ADN nuclear, debido a que su divergencia es hasta 30 veces mayor, por lo que existen regiones con un nivel de variabilidad genética adecuado para la diferenciación interespecífica (Ferris y Berg, 1987; Barlett y Davidson, 1991; Caccone *et al.*, 2004; Asensio, 2007), evoluciona mucho más rápido que el ADN nuclear, su alta abundancia le permite ser más efectivo en la amplificación por PCR (Zeng, 2018), es de condición haploide, no recombinante, sin intrones, con pequeños espacios intergénicos, y de mucho menor tamaño (Meyer, 1993; Rodríguez, 2004). Con respecto específicamente al uso de las secuencias del gen *16S*, éstas son empleadas comúnmente, debido a que, al no haber cambiado su función en el tiempo, sugiere que los cambios de secuencia aleatorios que se presenten, están midiendo el grado de separación ocurrido durante una especiación, además de ser un gen lo suficientemente grande para fines informáticos (Janda y Abbot, 2007). Este gen fue empleado para estudios filogenéticos de importancia, donde se

describieron tres dominios de la vida, Archaea, Bacteria y Eukarya, a diferencia de la clasificación tradicional de organismos vivos en procariotas y eucariotas (Woo *et al.*, 2008). Las secuencias de los genes rDNA como el *16S* son muy conservadas en organismos vivos del mismo género y especie, pero difieren entre organismos de otros géneros y especies lo que hace que sean utilizados para diagnósticos y estudios filogenéticos, ya que, están compuestos por varias copias de secuencias similares (Bendezu *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2008; Zeng 2018). Asimismo, son empleados en la identificación de especies como *Mytilus* spp, *Pecten maximus*, así como en la discriminación de pepinos de mar, bacterias, camarones entre otros (Bendezu *et al.*, 2005; Janda y Abbott, 2007 y Pascoal *et al.*, 2008).

Con respecto al uso de enzimas de restricción para evaluar diversidad, Brown *et al.* (1979) usando 11 de ellas en cuatro primates, encontraron que los sitios de restricción parecen estar distribuidos al azar en cada genoma. Por este motivo, varios estudios de identificación de especies utilizan RFLP en productos amplificados de genes mitocondriales como *COI* y *16S*, lo que además permite la correcta identificación no solo de organismos completos, sino de aquéllos que han pasado por un proceso térmico y, por lo tanto, tienen un ADN degradado (Carrera *et al.*, 1999; Bellagamba *et al.*, 2001; Di Finizio *et al.*, 2007; Haider *et al.*, 2012).

### **Comparación de los cortes *in silico* usando las secuencias propias y las obtenidas del NCBI de los genes *16S* y *COI***

Para la identificación de especies, la predicción *in silico* del lugar de corte por la enzima a utilizar, es una prueba necesaria que debe realizarse previo a la aplicación del PCR-RFLP, puesto que, este análisis permite predecir qué enzimas de restricción funcionarán para la discriminación de las especies de interés, dando a conocer el sitio de corte y por lo tanto el número y el tamaño de los fragmentos que podrán ser obtenidos (Cienfuegos *et al.*, 2008); pudiéndose además predecir si los patrones de banda que se generen estarán bien definidos y serán específicos para la especie (Zapata *et al.*, 2007). En este estudio, al aplicar el análisis *in silico* en las secuencias obtenidas de las especies en estudio (Tabla 3 y 4), tanto para el gen *COI* como el *16S*, los sitios de corte observados fueron los mismos obtenidos al aplicar la técnica PCR-RFLP, lo que corrobora la importancia de realizar este análisis previo. Para el gen *COI* se hallaron sitios de corte para siete especies de las cuales se pudieron discriminar a *S. japonicus*, *S. chiliensis*, *P. peruanus* y *M. gayi*

*peruanus* y solo dos especies en el gen *16S rDNA*, *E. ringens* y *P. peruanus*. Caldelli *et al.* (2013) usaron la predicción *in silico*, previo a la técnica PCR-RFLP, para distinguir a *P. platessa* de entre diecisiete especies de la familia Pleuronectidae y de otras tres especies de la familia *Solea*, logrando su identificación. Asimismo, Zapata *et al.* (2007) emplearon el análisis *in silico* para elegir entre las enzimas *Alu* I y *Msp* I para la digestión de productos de PCR de las regiones ITS1 e ITS2 en la identificación de siete especies de *Anopheles*, demostrando la eficacia del análisis *in silico* para predecir los sitios de corte de las enzimas de restricción.

Al comparar nuestros resultados *in silico* con los obtenidos por la técnica PCR-RFLP se detectó que los fragmentos menores a 60pb que predecía el programa no se observaban haciendo uso de la técnica PCR-RFLP. Al respecto, Wolf *et al.*, (1999) mencionaron que no se utilizan bandas menores a 80pb para la diferenciación de especies, debido a que estas bandas son poco visibles y discriminativas.

### **Identificación de las especies usando la técnica PCR-RFLP empleando el gen mitocondrial *COI***

La técnica usada en el presente estudio - PCR-RFLP - hace uso de mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (SNP), inserción o delección (*indel*) de fragmentos de ADN de diversas longitudes, duplicación o inversión de fragmentos de ADN (Aguilar *et al.*, 2012), que se traducen en la aparición o desaparición de sitios de corte específicos de cada enzima de restricción. Por ello, la digestión del ADN con enzimas de restricción da como resultado fragmentos cuyo número y tamaño pueden variar entre individuos, poblaciones y especies, observándose una variación en el peso de los fragmentos amplificados de individuos de la misma especie (Becerra y Paredes, 2000; Liu y Cordes, 2004).

La utilización de pocos individuos en la aplicación de PCR-RFLP, obedece a que la técnica está estandarizada con pocos individuos por especie, citándose trabajos como el de Boonphakdee y Sawangwong, (2008) quienes trabajaron en la discriminación de seis especies de pez payaso haciendo uso de tres individuos por especie para observar si se presentaba polimorfismo entre individuos de la misma especie, observándose que todos los individuos exhibieron el mismo perfil RFLP, sin embargo, recomiendan que se trabaje con un mayor número de especies. Por lo cual, en el presente trabajo se empleó cinco individuos por especie, y no se observó alguna variación de tamaño entre los fragmentos

obtenidos de diferentes individuos de la misma especie. Haider *et al.* (2012), hicieron identificación de especies trabajando con cinco individuos a más por especie para la correcta identificación de carne de vaca, pollo, pavo, oveja, cerdo, búfalo, camello y burro. Asimismo, Chen-Hung *et al.* (2013) hizo uso de cuatro muestras de *Cyprinus carpio carpio*, ocho muestras de *Carassius auratus auratus*, y doce muestras como *Ctenopharyngodon idella* para una correcta identificación de estas especies.

Con el gen *COI* y la enzima *Hind* III se logró discriminar a *S. japonicus*, *M. gayi* (Figura 5) y *S. chiliensis* (Figura 6), De igual modo, empleando el gen *COI* y la enzima *Apa* I se identificó a *P. peruanus* (Figura 8) que presentaron un perfil de restricción único. Hebert, *et al.* (2003) mencionan que el análisis de la diversidad de secuencias en amplicones de tramos cortos de la subunidad I del citocromo c oxidasa (*COI*), puede proporcionar una herramienta eficaz para el diagnóstico de especies en el reino animal, ya que tiene una alta tasa de variación interespecífica, la cual es suficiente para generar un análisis específico de perfiles de restricción para cada especie, permitiendo discriminar especies de modo fácil e inequívoco ( Ward *et al.*, 2005; Astorga, 2008; Haider *et al.*, 2012; Páiz-Medina, 2012).

Sin embargo, debido a que una enzima de restricción determinada cortará el ADN si éste presenta o no el sitio de corte, se obtuvo también, que haciendo uso del gen *COI* y *Apa* I, los perfiles que presentaron *S. deliciosa* y *E. ringens* (Figura 8) no permitieron identificarlas porque presentaron patrones iguales; tampoco se pudieron identificar a las especies *P. adspersus* y *E. ringens* con el gen *COI* y *Hind* III (Figura 6); haciéndose difícil una correcta identificación (Cheng *et al.*, 2014).

Brown *et al.* (1979) haciendo uso de varios grupos de vertebrados, demuestran que con respecto a los genes que codifican para ARNs, en los genes de ARNt y ARNr las acumulaciones de sustituciones o cambios en las secuencias de ADN se acumulan más rápido que las correspondientes al rDNA nuclear. Sin embargo, se considera que al ser este gen ligeramente más conservado que *COI*, con una mejor resolución a nivel de familia (Martin *et al.*, 2009), dará menor información que *COI*, demostrado en la presente investigación, ya que con el gen *16S*, sólo se identificaron dos especies: *Hinc* II que identificó a *E. ringens* (Figura 10), y *P. peruanus* identificada con *EcoR* I (Figura 11). Resultados similares como el de la presente investigación, fueron obtenidos por Pappalardo *et al.*, (2015) quienes empleando el gen *COI* y las enzimas *AluI*, *BsII*, *FokI*,

*Hinf* I y *Mbo*I, lograron discriminar a *E. encrasicolus* de las especies *Sardinella aurita*, *Sardina pilchardus*, *E. japonicus*. Asimismo, Ferrito *et al.*, (2016) lograron identificar a tres especies del género *Merluccius* utilizando el gen *COI* y las enzimas de restricción *Alu* I, *Hpa* II, *Hinf*I, *Mbo* I y *Pvu* II. Así mismo, Abdulmawjood y Bülte, (2001) haciendo uso del gen mitocondrial *16S* y las enzimas de restricción *Nsp* I, *Sfu* I, *Taq* I lograron discriminar entre dos especies de caracoles *H. pomatia* y *H. lucorum*. De igual modo, Borgo *et al.* (1996) trabajaron en la identificación de tres especies de caracoles *H. pomatia*, *H. lucorum* y *A. fulica* empleando los genes mitocondriales *12S rRNA* y *16S rRNA* y cuatro enzimas de restricción, de las cuales haciendo uso de la enzima *Dra* I y los productos amplificados de *16S* se pudo distinguir entre las tres especies de caracoles.

### **Comparación del árbol filogenético de las secuencias de los genes *COI* y *16S* y el perfil de restricción obtenido (FINS)**

La posibilidad de que exista una correlación entre la similitud de patrones de restricción presentadas en las especies estudiadas y una relación filogenética, se hizo a través del análisis FINS, haciendo uso de sus secuencias de ADN. En este estudio el análisis filogenético mostró la formación de agrupaciones de las especies formadas por similitudes entre sus secuencias, pero no mostrando una coincidencia total. Con el gen *COI* las especies que fueron agrupadas en el mismo clado y presentaron sitio de corte para ambas enzimas *Hinc*II y *Hind*III fueron *S. chiliensis* y *S. japonicus* (Figura 12), especies pertenecen a la familia Scombridae. De igual manera, las especies *P. peruanus* y *S. deliciosa*, agrupadas en el mismo clado, pertenecientes a la familia Sciaenidae, también presentaron sitio de corte para las enzimas *Apa*I y *Hinc*II (Tabla 1). Resultados coincidentes son reportados por Espiñeira *et al.*, (2008) donde el perfil de restricción de las especies del género *Lophius* generado por la enzima *Mbo* I y el marcador molecular *COI* coincidió en un cien por ciento con las agrupaciones formadas en árbol filogenético, lo que permitió la correcta discriminación de siete especies de peces del género *Lophius*.

Sin embargo, en nuestros resultados también se puede observar, que existen especies agrupadas filogenéticamente en el mismo clado (*M. gayi* y *O. regia regia*,) que no fueron coincidentes en sus perfiles de restricción para *Hinc* II. Asimismo, *E. ringens* y *P. adpersus* fueron agrupadas y aunque ambas presentaron sitio de corte para *Hind* III, sólo *E. ringens* presentó sitio de corte para *Apa* I.

Según el análisis filogenético con el gen *16S*, *T. picturatus* y *P. adspersus*, se agruparon en el mismo clado, así como *S. chiliensis* y *S. japonicus*; en ambos casos ninguna fue escindida por las enzimas de restricción. El grupo formado por *P. peruanus* y *S. deliciosa*, sólo una de ellas presentó sitio de corte para *EcoR* I, mientras que *E. ringens*, presentó sitio de corte para *Hinc II* pero no se agrupó con otras especies, de igual modo *M. gayi* y *O. regia regia* no se agruparon con otras especies (Figura 13). Estos resultados estarían demostrando que, en nuestro estudio, el gen *COI* es el que presenta mayor potencial en la discriminación de especies, aunque existen investigaciones, como la de Zeng *et al.* (2018) con pepinos de mar, donde encontraron coincidencia total entre el perfil de restricción de las especies estudiadas y su agrupación en el árbol filogenético, usando *16S* como marcador molecular.

Finalmente, este trabajo establece que la técnica PCR-RFLP ha permitido la correcta discriminación de las especies *S. japonicus*, *P. peruanus*, *S. chiliensis* y *M. gayi peruanus* empleando el gen mitocondrial *COI* y las enzimas *Hind* III y *Apa* I, mientras que con el gen *16S* y las enzimas *Hinc* II y *EcoR* I se puede discriminar a las especies *E. ringens* y *P. peruanus*. Por lo tanto, en comparación con otras técnicas, la técnica PCR-RFLP es simple, confiable y rentable para los análisis rutinarios de un gran número de muestras, siendo no solo aplicable en la discriminación de especies frescas, sino también en la identificación de especies enlatadas (Borgo *et al.* 1996).

## VI. Conclusiones

Las predicciones *in silico* de las secuencias propias y las obtenidas del GenBank del gen *Citocromo oxidasa I*, presentaron en ambos casos los mismos patrones para las especies *Scomber japonicus*, *Merluccius gayi peruanus*, *Sarda chiliensis*, *Engraulis ringens*, *Sciaena deliciosa*, *Paralichthys adspersus* generados por las enzimas de restricción *Hind* III, *Hinc* II y *Apa* I.

Las predicciones *in silico* de las secuencias propias y las obtenidas del GenBank del gen *16S rDNA*, presentaron los mismos patrones de corte en ambos casos para las especies *Paralichthys peruanus* y *Engraulis ringens* generados por las enzimas *EcoR* I y *Hinc* II.

Se identificó con el gen *Citocromo oxidasa I* y haciendo uso de la enzima *Hind* III a *Scomber japonicus*, de las especies *Paralichthys adspersus*, *Engraulis ringens*, *Trachurus picturatus*, *Merluccius gayi peruanus*, *Odonthestes regia regia*, *Sarda chiliensis*, *Paralichthys peruanus* y *Sciaena deliciosa*.

Se identificó con el gen *Citocromo oxidasa I* y la enzima *Hind* III a *Sarda chiliensis* de las especies *Scomber japonicus*, *Paralichthys adspersus*, *Trachurus picturatus*, *Merluccius gayi peruanus*, *Odonthestes regia regia*, *Paralichthys peruanus*, *Sciaena deliciosa* y *Engraulis ringens*.

Se identificó con el gen *Citocromo oxidasa I* y haciendo uso de la enzima *Hind* III a *Merluccius gayi peruanus*, de las especies *Scomber japonicus*, *Paralichthys adspersus*, *Engraulis ringens*, *Trachurus picturatus*, *Odonthestes regia regia*, *Sarda chiliensis*, *Paralichthys peruanus* y *Sciaena deliciosa*.

Se identificó con el gen *Citocromo oxidasa I* y la enzima *Apa* I a *Paralichthys peruanus* de las especies *Scomber japonicus*, *Paralichthys adspersus*, *Engraulis ringens*, *Trachurus picturatus*, *Merluccius gayi peruanus*, *Odonthestes regia regia*, *Sarda chiliensis* y *Sciaena deliciosa*.

Se discriminó con el gen *16S rDNA* y la enzima *Hinc* II a *Engraulis ringens* de las especies *Scomber japonicus*, *Paralichthys adspersus*, *Trachurus picturatus*, *Merluccius*

*gayi peruanus*, *Odonthestes regia regia*, *Sarda chiliensis*, *Sciaena deliciosa* y *Paralonchurus peruanus*.

Se discriminó con el gen *16S rDNA* y la enzima *EcoR I* a *Paralonchurus peruanus* de las especies *Scomber japonicus*, *Paralichthys adspersus*, *Trachurus picturatus*, *Merluccius gayi peruanus*, *Odonthestes regia regia*, *Sarda chiliensis* y *Engraulis ringens*.

El análisis filogenético presentó coincidencia con el perfil de restricción en *S. chilensis* y *S. japonicus*, para el gen *COI* y con las enzimas *Hind III* y *Hinc II*.

El análisis filogenético presentó coincidencia con el perfil de restricción en *P. peruanus* y *S. deliciosa*, para el gen *COI* y con las enzimas *Hinc II* y *Apa I*.

## VII. Recomendaciones

- Se recomienda trabajar con más especies de peces, ya que el Perú tiene una gran diversidad de especies que son empleadas como productos alimenticios, y que son vendidos en diferentes presentaciones (salados, frescos, enlatados, ahumados, congelados).
- Replicar este trabajo evaluando los productos que ya están en el mercado como conservas, filetes entre otros, que son consumidos por gran parte de la población y que pueden estar siendo etiquetados con una descripción errónea del producto.
- Trabajar con un mayor número de enzimas de restricción, para poder discriminar a más especies, ya que algunas especies no presentaron sitio de restricción para las enzimas empleadas, asimismo se debería agregar el uso de otros genes mitocondriales en la identificación de especies, para una mayor discriminación entre especies.
- Se recomienda trabajar con alguna de las siguientes enzimas de restricción, para la identificación de las especies que no se pudieron discriminar haciendo uso del gen *COI* y las enzimas empleadas en el presente trabajo.
  - *S. deliciosa*: *Ban* II; *BsmF* I; *HpyCH4* III
  - *O. regia regia*: *Bsa* XI; *BsII*; *SfaNIa* III
  - *T. picturatus*: *Bsa* XI; *Hph* I, *Nla* III
  - *P. adspersus*: *Bmr* I; *Bmt* I; *BseR* I; *BspCN* I
- Se recomienda trabajar con alguna de las siguientes enzimas de restricción, para la identificación de las especies que no se pudieron discriminar haciendo uso del gen *16S* y las enzimas empleadas en el presente trabajo.
  - *O. regia regia*: *Bmr* I; *Ban* II; *Bsp1286I*
  - *S. deliciosa*: *HpyAV*; *MsI* I; *ApeK* I
  - *P. adspersus*: *BseR* I; *Bsp 1286*; *Mme* I
  - *M. gayi peruanus*: *Bmr* I; *Nla* III; *Ase* I; *Bsg* I
  - *S. chiliensis*: *Bsg* I; *Pst* I; *Tsp45* I; *TspR* I
  - *S. japonicus*: *Ban* II; *Mme* I; *BtsC* I; *HpyAV*

### VIII. Referencias Bibliográficas

- Abdulmawjood, A. & M. Bülte. (2001). Snail Species Identification by RFLP-PCR and Designing of Species-Specific Oligonucleotide Primers. *Journal of Food Science*, 66(9): 1287 – 1293 pp.
- Aguilar, A., G. Alonso, M. Barrero. (2012). Identificación de Especies de Atún (*Thunnus* spp) en Venezuela Utilizando la Técnica de PCR. *Fcv-Luz*. XXII (4): 368-375 pp.
- Asensio, G. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Elsevier. Food science e technology*. 558 – 566 pp.
- Asensio, L., I. González, T. García, R. Martín. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *ScienDirect*. 1-8 pp.
- Aranishi, F., T. Okimoto, S. Izumi. (2005). Identification of galoid species (*Pisces*, *Gadidae*) by PCR- RFLP analysis. *J. Appl. Genet*.69-73 pp.
- Asma, G., K. Mohammed, A. Osman, k. AbouelFald, Y. Borrell, E. Garcia-Vazquez. (2016). SNP-based PCR-RFLP, T-RFLP and FINS methodologies for the identification of comercial fish species in Egypt. *Fisheries Research*. 1 – 9 pp.
- Astorga, M. (2008). Estado actual del uso de marcadores moleculares de bivalvos de importancia para la acuicultura. 277-287 pp.
- Balitzki-Korte, B., k. Anslinger, C. Bartsch, B. Rolf. (2005). Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene. *Int J Legal Med*. 119: 291–294 pp.
- Barlett, S. & W. Davidson. (1991). Identification of *Thunnus* tuna Species by the Polymerase Chain Reaction and Direct Sequence Analysis of their Mitochondrial Cytochrome b Genes. *Can. J. Fish. Sci*. 309-317 pp.
- Baruah, J., G. Das, N. Ahmed, D. Sarmah, M. Lal, B. Bhau. (2016). Genetic diversity study amongst *Cymbopogon* species from NE-India using RAPD and ISSR markers. *Industrial Crops and Products*. 1-9 pp.
- Becerra, V. & M. Paredes. (2000). Uso de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en Estudios de Diversidad Genética. *Agric. Téc*. 60(3):270-281 pp.

- Bellagamba, F., V. Moretti, S. Comincini, F. Valfre. (2001). Identification of Species in Animal Feedstuffs by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 49:3775-3781 pp.
- Bendezu, I., J. Slater, B. Carney. (2005). Identification of *Mytilus* spp. and *Pecten maximus* in Irish Waters by Standard PCR of the 18S rDNA Gene and Multiplex PCR of the 16S rDNA Gene. *Marine Biotechnology.* 7:687–696 pp.
- Birky, C. P. Fuerst, T. Matuyama. (1989). Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift, equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells and comparison to nuclear genes. *Genetics.* 613-627 pp.
- Boonphakdee and Pichan Sawangwong. 2008. Discrimination of Anemonefish Species by PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial Gene Fragments. *EnviromentAsia* 1. 51-54 pp.
- Borgo, R., C. Souty-Grosset, D. Bouchon, L. Gomot. (1996). PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA for Identification of Snail Meat Species. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE.*61:1-4 pp.
- Bossier, P. (1999). Authentication of Seafood Products by DNA patterns. *Journal of food science.* 64:1-5 pp.
- Bringas A., Z. Culquichicon, D. Atoche. (2014). Biología y Pesquería de *Paralonchurus peruanus* “suco” en la región libertad, mayo 2011 – abril 2012. *Sciendo.* 17(1). 120:135 pp.
- Brown, W., M. George, A. Wilson. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 (4): 1967-1971 pp.
- Bruce, B., C. Collette, B. Reeb, A. Block. (2001). Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). *Fish Physiology.* Volume 19, 2001, 1-33 pp.
- Caccone, A., G. Gentile, C.E. Burns, E. Sezzi, W. Bergman, M. Ruelle, K. Saltonstall & J.R. Powell. (2004). Extreme difference in rate of mitochondrial and

- nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galápagos tortoises. *Mol Phylogenet Evol.* 31(2): 794-798pp.
- Caldelli, A., Z. Gigliarelli, T. Bottinelli, S. Chiesa, L. Lucentin. (2014). PCR- RFLP approaches to easily identify *Pleuronectes platessa* from other flatfishes: a rapid and efficient tool to control label information. *CyTA-journal of Food.*12(4):331-335pp.
- Cardenal, J., A. Barahona, A. Lazcano, *et al.* (2009). Un Polizón Llamado Darwin. *Conocimiento Tecnológico.* 1-108 pp.
- Carrera, E., T. Garcia T., Céspedes A., González I., Fernández A., Hernández P, Martín R. (1999). Salmon and Trout Analysis by PCR-RFLP for Identity Authentication. *Journal of Food Science.*410-413 pp.
- Castro-González., M. (2002). Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia.* 27 (3): 128-136 pp.
- Chen, C.H., C.H. Hsieh, D.F. Hwang. (2013). PCR-RFLP Analysis using Capillary electrophoresis for species identification of cyprinidae related products. *Elsevier.*477-483 pp.
- Cheng, Y-T & Y-H, Hsieh. (2014). A Sandwich ELISA for the detection of fish and fish products. *Elsevier.*265-273pp.
- Chirichigno, N; Vélez, J. (1998). Clave para identificar los peces marinos del Perú. 2 ed. 496 pp.
- Cienfuegos, A., G. Gomez, L. Córdoba, S. Luckhart, J. Conny, M. Correa. (2009). Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles spp.* (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Rev Biomed.* 19:35-44 pp.
- Clouse, R., D. Janies, A. Kerr. (2005). Resurrection of *Bohadschia bivittata* from *B. marmorata* (Holothuroidea: Holothuriidae) based on behavioral, morphological, and mitochondrial DNA evidence. *Zoology. Elsevier.*27-39 pp.

- Cocolin, L., E. D'Agario, M. Manzano, D. Lanari, G. Comi. (2000). Rapid PCR-RFLP Method for the Identification of marine fish fillets (Seabass, Seabream, Umbrine and Dentex). *Food Chemistry and toxicology*.1315-1317 pp.
- Collette B.B & C. E. Nauen. 1983. Catálogo de la especie FAO. Vol. 2. Escómbridos del mundo: un catálogo anotado e ilustrado de atunes, caballas, bonitos y especies afines conocidas hasta la fecha. Alimento y organización agrícola de la sinopsis de la pesca de las Naciones Unidas (FAO) número 125, volumen 2.
- Cota, N. 2012. “Escala de Madurez Gonadal del Lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867). Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Comi, G., L. Iacumin, K. Rastsiou, C. Cantoni, L. Cocolin. (2005). Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds. *Elsevier. Food Control. Sciencedirect*. 37-42 pp.
- Chavez, F.P., J. Ryan, S.E. Lluch-Cota, M. Ñiquen. (2003). From anchovies to sardines and back: multidecadal change in the Pacific Ocean. *Science*. 299: 217-221 pp.
- Darwin, C. (1921). *Las Especies Por Medio de la Selección Natural*. 1<sup>er</sup> Tomo. Madrid.1-161 pp.
- Dasgupta, N., Y. Peng, Z. Tang, G. Ciruolo, D. Wang, R. Li. (2015). mi RNAs in mt DNA-less cell mitochondria. *Cell Death Discovery*. 1-6 pp.
- Di Finizio, A., G. Guerreiro, G. Russo, G. Ciarcia, (2007). Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S and 16rRNA gene fragments. *Eur.Food.Res.Technol*. 225:237-344 pp.
- Dillon, M. & M. Thompson. (2003). Developing and Implementing an Effective Traceability and Product Recall System. In LEES M. ed. *Food Authenticity and Traceability*, Cambridge UK: Woodhead Publishing, 2003. 1-554 pp.
- Dooley, J., A. Clark, D. Sage, M. Brown, S. D. Garrett, (2005). Fish species identification using PCR-RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis: application to detect white fish species in food products and an

- Interlaboratory study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (9): 3348–3357 pp.
- Dudu, A., S. Georgescu, A. Dinischiotu, M. Costache. (2010). PCR-RFLP method to identify fish species of economic importance. *Archivia Zootechnica*. 53-59 pp.
- Dyer, B. (2000). Revisión Sistemática de los Pejerreyes de Chile (Teleostei, Atheriniforme) Sistemática Review of the Fishes of Chile (Teleostei, Atheriniformes). *Estudios Oceanol.* 19:99-127.
- Eguiarte, L., V. Souza, X. Aguirre. (2007). *Ecología Molecular*. 1<sup>era</sup> Edición. México, D.F. 1-592 pp.
- Ellegren, H. & N. Galtier. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nat Rev Genet.* 17: 422–433 pp.
- Esparza, E. & A. Bermejo. (2015). Fitoplacton y la productividad marina. *Pesca Worldwide circulation magazine*. 169 – 199 pp.
- Espino, M., Veliz, M., Valdivia, E. (1989). Algunos aspectos sobre la biología y pesquería de los recursos que sustentan la actividad artesanal en el Perú. *Rev. Com. Perm. Pacífico Sur* (18): 49-68.
- Espiñeira, M., N., Gonzáles-Lavín, J. Vieites, F. Santa Clara. (2008). Authentication of anglerfish species (*Lophius* spp) by means of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(22):10594-10599 pp.
- Espiñeira, M., N. Gonzales- Lavín, J. Vieto, J. Santaclara, (2009). Development of a method for the identification of scombroid and common substitute species in seafood products by FINS. *Food Chemistry*. 698–704 pp.
- FAO. (1997). *Aquaculture Development*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. 1- 40 pp.
- FAO. (2009). *Fishery and Aquaculture statistics*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 1-103 pp.

- FAO. (2016). El Estado Mundial de la Pesca y La Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 1-226 pp.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in action. Rome. 1-206 pp.
- Ferris, S. & W. Berg. (1987). The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. - In: Uttar, F. and Ryman, N. (eds), The application of population genetics to fisheries management. Univ. Washington Press, Seattle, WA. 277-299 pp.
- Ferreito, B. & A. Smith. (2008). A Revision of Malagasy Species of *Anochetus* Mayr and *Odontomachus* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). 1-23 pp.
- Ferreito, V., V., Bertolino, A. M Pappalardo. (2016). White fish authentication by COI Bar-RFLP: Toward a common strategy for the rapid identification of species in convenience seafood. *Food Control*. 1-21 pp.
- Fisher, B. & A. Smith. (2008). A Revisión of Malagasy Species of *Anochetus* Mayr and *Odontomachus* Latreille. (Hymenoptera: Formicidae). 1-23 pp.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, V. H. Niem. (1995). Guía FAO para Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. Pacífico Centro-Oriental. Volumen II y III. Vertebrados. Roma. FAO.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5), 294-299 pp.
- Flores, T. & A. Zafra. (2019). Evento climático El Niño en la sostenibilidad bioeconómica de *Engraulis ringens* en Perú. *Agroind. sci.* 9(2): 133 – 137 pp.
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2021. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (02/2021).
- Gálvez E., y J. Castillo. 2015. Escala de madurez gonadal de bonito *Sarda chiliensis chiliensis* (Cuvier, 1832). Boletín Instituto Del Mar Del Perú, 30(1-2), 29-39. Recuperado a partir de <https://revistas.imarpe.gob.pe/index.php/boletin/article/view/104>.

- García, D. (2006). Desarrollo de Métodos Moleculares y su aplicación al Estudio de la Resistencia Genética y Patogenia Molecular del Scrapie. Tesis Doctoral. Universidad Euskal Herriko. Departamento de Microbiología Inmunología y Parasitología. 1 – 159 pp.
- Garrett, S. & J. Dooley. (2001). Determination of PCR-RFLP Profiles for Fish Species Using the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Cp.Chem.Agilent.Com.* 1-7 pp.
- Gogus, U. & C. Smith. (2010). N-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *Food Science & Technology.* 45:417-436 pp.
- González, A. (2001). Contribución al conocimiento pesquero y biológico de cinco peces costeros de importancia comercial en el Perú: cabinza, lisa, lorna, machete y pejerrey. Biblioteca, Instituto del Mar del Perú. Huacho. Informe progresivo IMARPE, N° 136, enero 2001. 46 pp.
- Grodzicker, T., J. Willians, P. Sharp, J. Sambrook. (1974). Physical mapping of temperatura sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant, Biol.* 39:439-446 pp.
- Gutierrez-Estrada, J.C., C. Silva, E. Yañez, N. Rodríguez, I. Pulido-Calvo. (2007). Monthly catch forecasting of anchovy *Engraulis ringens* in the north area of Chile: Non-linear univariate approach. *Fisheries Research.* 86 (2007) 188–2007 pp.
- Haider, N., I. Nabulsi, B. Al-Safadi. (2012). Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial *COI* gene. *Elsevier.* 490-493 pp.
- Herbert, P., A. Cywinska, S. Ball, J. Waard. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society.* 313-321 pp.
- Hsieh, C.H., W.T. Chang, H. Chang, H.S. Hsieh, Y.L. Chung, D.F. Hwang. (2010). Puffer fish-based commercial fraud identification in a segment of cytochrome b región by PCR-RFLP analysis. *Food Chemistry,* 1305-1311 pp.
- Huang, Y.R., M.C. Ying, Y.L. Hsieh, Y.H. Yeh, Y.C. Yang, Y.L. Chung, C.H. Euan. (2013). Authentication of consumer fraud in Taiwanese fish products by molecular trace evidence and forensically informative. *Elsevier. Food Research International.* 294-302 pp.

- Huss, H. (1994). Assurance of Seafood Quality. FAO Fisheries Technical Paper 334. Rome, Italy: FAO.
- Iannacone J., J. Dávila, E. Hon, C. Sánchez. (2012). Parasitofauna del lenguado fino *Paralichthys adspersus* (steindachner) (osteichthyes, paralichthyidae) capturados por pesquería artesanal en chorrillos, LIMA, PERÚ. Neotrop. Helminthol. 6(1). 127-133 pp.
- IMARPE. (2000). INFORME: Aspectos biológico pesqueros de la lorna (*Sciaena deliciosa*) y el machete (*Ethmidium maculatum*) en el área de Huacho durante un período frío y otro cálido. N°128.
- IMARPE. (2007). Jurel (en línea). Consultado 15 Ene. 2013. Disponible en [http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/recursos\\_pesquerias/adj\\_pelagi\\_adj\\_pelagi\\_jurel\\_mar07.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/recursos_pesquerias/adj_pelagi_adj_pelagi_jurel_mar07.pdf)
- IMARPE. (2010). INFORME IMARPE: EDAD Y CRECIMIENTO DEL PEJERREY ODONTESTHES REGIA REGIA (HUMBOLDT) EN EL MAR PERUANO. 2002. vol. 37 (3-4): 75-77 pp.
- IMARPE. (2014). Reporte Trimestral de las Estadísticas Pesqueras Artesanales. Trimestre I, II, III. 1 pp.
- IMARPE. (2019). Reporte Semanal de la Pesquería de Jurel y Caballa. Reporte semanal N°31. 1 pp.
- INDECOPI (2009). *Norma Técnica Peruana*. NTP 209-038. Packed food labelling. Lima, Perú. 1-17 pp.
- Jeltsch, A., Alves, J., Maass, G. & Pingoud, A. (1992). Substrate-assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoR* I and *EcoR* V restriction enzymes. *FEBS Lett.* 304, 4-8.
- Jacquet, J. & D. Pauly. (2008). Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *ScienDirect.* 309-318 pp.
- Janda, J. & S. Abbott. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology.* 2761–2764 pp.

- Jeltsch, A., J. Alves, G. Maass, A. Pingout. (1992). On the catalytic mechanism of *EcoR* I and *EcoR* V A detailed proposal based on biochemical results, structural data and molecular modelling. *Elsevier*.304 (1):4-8 pp.
- Kazack, L. A. Reyes, I. Holt. (2012). Minimizing the damage repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Molecular Cell Biology*. 13: 659-671pp.
- Kerr, A., D. Janies, R. Clouse, Y. Samyn, J. Kusak, J. Kim. (2004). Molecular Phylogeny of Coal-Reef Sea Cucumbers (Holoturiidae: Aspidochirotida). *Marine Biotechnology*. 53-60 pp.
- Kimura, M. (1980). Simple method for estimating rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120 pp.
- Kong, I. & H. Castro.2002. Guía de Biodiversidad: Macrofauna y Algas Marinas. 2002, vol. 1, nº 3, 23 p.
- Kurtzman, C. (1994). Molecular Taxonomy of the Yeasts. *Yeast*. 10:1727-1740 pp.
- Lackra, W. M. Goswami. V. Mohinda. K. Lal. P. Punia. (2007). Molecular identification of five Indian sciaenids (pisces: perciformes, sciaenidae) using RAPD markers. *Springer Science*. 583: 359 – 363 pp.
- Liu, Z. & J. Cordes. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 238: 1 – 37 pp.
- Llapapasca, A. (2018). “Evaluación de la calidad de la merluza (*Merluccius gayi peruanus*) capturada con palangre y enmalle en las caletas el ñuro y los órganos - talara 2016”. Título profesional. Universidad Nacional de Piura. <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1705/FIP-LLA-NUN-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Lleonart, J., M. Taconet, M. Lamboeú. (2006). Integrating information on marine species identification for fishery purposes. *Marine Ecology Progress Series*. 316: 231-238 pp.
- Lloris, D., J. Matallanas, P. Oliver. (2003). Merluzas del mundo (Familia Merlucciidae): Catálogo comentado e ilustrado de las merluzas conocidas (No. 2). Catálogo de Especies para los Fines de la Pesca (FAO). Roma, FAO, 2003. 57p. 12.

- Lipscom, D., N. Platnick, Q. Wheeler. (2003). The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*. 62-63 pp.
- Mackie, I., S. Pryde, C. Gonzales, I. Medina, R. Pérez, J. Quinteiro, M. Rey, H. Rehbein. (1999). Challenges in the identification of species of canned fish. *Elsevier. Food Science & Technology*. 9-14 pp.
- Mafra, I., I. Ferreira, M. Beatriz, P. Oliveira. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.* 227:649-665 pp.
- Martin, W.; K. Crandall and D. Felder. (2009). Decapod Crustacean Phylogenetics. International Standard Book: 633 pp.
- McBride, H., M. Neuspiel, S. Wasiak. (2006). Mitochondrial: More Than Just a Powerhouse. *Elsevier*. 1-10 pp.
- McKeown, N., J. Robin, P. Shaw. (2015). Species specific PCR-RFLP for identification of early life history stages of squid and other applications to fisheries research. *Fisheries Research*. 167: 207-209 pp.
- Merkle, S., E. Giese, S. Rohn, K. Horts, I. Lehmann, A. Wohltmann, J. Fritsche. (2017). Impact to fish species processing technology on minor fish oil components. *Food Control*. 1-9 pp.
- Meyer, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: Biochemistry and molecular biology in fishes. Hochachka and Mommsen. *Elsevier, Amsterdam*. 1-38 pp.
- Meyer, R. & U. Candrian. (1996). PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensm - Wiss. Technol.* 29: 1-9 pp.
- Montaño-Pérez, K., E. Villalpando-Canchola, F. Vargas-Albores. (2006). *Interciencia*. 1-563 pp.
- Morata, G. (2014) El siglo del gen. *Biología molecular y genética*. 161-9 pp. <https://www.bbvaopenmind.com/articulo/el-siglo-del-gen-biologia-molecular-y-genetica/>
- Moreno, A. 2011. Osteología comparada de cinco especies de peces de la familia Sciaenidae, Región La Libertad Mayo - Octubre 2011. Escuela de Pesquería,

Facultad de Biología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.

- Moya, A. (1988). La Estructura de la Teoría de la Evolución. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Filosofía y Educación. 1-214 pp.
- Mozaffarian, D., MD. DRPH, H. Jason, Y. Wu. (2011). Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease Effects on Risk Factors, Molecular Pathways, and Clinical Events. *Journal of the American College of Cardiology*. 58:1-21 pp.
- Mullis, K. & Faloona F. (1987). Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350 pp.
- Smith, H. & D. Nathans. (1973). A Suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *Journal of Molecular Biology*. 81:419-423 pp.
- Nathans, D. & H. Smith. (1975). Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 279-293 pp.
- Nebola, M., G. Borilova, J. Ksalova. (2010). PCR-RFLP Analysis of Dna for the Differentiation of Fish Species in Seafood Samples. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 49-53 pp.
- Nilson, L. & L. Gram. (2002). Improving the control of pathogens in fish products. In: Bremmer, H. A. (Ed). In safety and Quality issues in fish processing. Woodhead. Ltd Cambridge. England. 54-84pp.
- Nixon, S. & A. Thomas. 2001. On the size of Peru upwelling ecosystem. *Deep Sea Research I* 48: 2521-2528 pp.
- Paillard, D., V. Dubois, R. Duran, *et al.* (2003). Rapid identification of *Listeria* Species by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR Amplified 23S *rRNA* gene Fragment. *Applied and Environmental Microbiology*. 6386-6392 pp.
- Páiz-Medina, L. & J. Huete-Pérez. (2012). Filogenética Molecular de Peces del Complejo Mides Cichlidae que habitan lagos y lagunas de Nicaragua, utilizando el gen *COI*. 101-117 pp.

- Patwardhan, A., S. Ray, A. Roy. (2014). Molecular markers in Phylogenetic Studies-A Review. 1-9 pp.
- Palumbi, S.R., (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer & Associates Inc., Massachusetts, 205–247 pp.
- Pappalardo, A. & V. Ferrito. (2015). A COIBar – RFLP strategy for the detection of *Engraulis encrasicolus* in processed anchovy products. *Elsevier*. 57:385-392 pp.
- Partis, L. & R. Wells. (1996). Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes*. 435 – 441 pp.
- Porturas R., & V. Juyo. (2009). Estudio de la elaboración de conservas de trozos de jurel (*trachurus picturatus murphyi*) en aceite vegetal en envases flexibles esterilizables. *Anales científicos UNALM Vol. 70 N° 4*, 2009, pp. 49-59.
- Pascoal, A., Barros-Velasques, J. Cepeda, A. Cepeda, J. Gallardo, P. Calo – Mata. (2008). A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method based on the analysis of a 16S rRNA/tRNAVal mitochondrial region for species identification of commercial penaeid shrimps (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) of food interest. *Electrophoresis 2008*, 29:499–509 pp.
- Peña, C. (2011). Métodos de Inferencia filogenética. *Rev. peru. biol.* 18(2): 265 – 267.
- Pingout, A. & A., Jeltsh. (2001). Structure and Function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*. 29 (18): 3705-3727 pp.
- Pingout, A., G. Wilson, W. Wende. (2014). Type II restriction endonucleases a historical perspective and more. 42:7489-7527 pp.
- PNUMA (1999). Programa de las Naciones Unidas del Medio Ambiente. <http://research.un.org/es/docs/environment/unep>.
- Pramod, G., Nakamura, K., Pitcher, T.J. & Delagran, L. (2014). Estimates of illegal and unreported fish in seafood imports to the USA. *Marine Policy*, 48: 102–113pp.

- PRODUCE. (2012). Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola. 1-180 pp.
- PRODUCE. (2013). Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola. 1-113 pp.
- Prom PERÚ. (2015). Servicios al Exportador. 1-14pp.
- Ramírez- Pacheco, A., S. Moreno-Guerrero, A. Medina-Sanson. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 12 (3): 162 – 173 pp.
- Reglamento (CE) N°104/2000 Del Consejo de la Unión Europea. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Disponible en: <http://www.carm.es/chac/interleg/r0104-00.pdf>
- Reglamento (CE) N°178/2002 Del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea. Disponible en: <http://www.carm.es/chac/interleg/r0104-00.pdf>.
- Roberts, R. M. Belfort, T. Bestor, A. Bhawat, T. Bickle, J. Bitinaite, R. Blumenthal, et al. (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research*. 31:1805-1812 pp.
- Rodríguez, M. (2004). Utilización de Técnicas Genéticas (PCR Y PCR Cuantitativo en Tiempo Real) e Inmunológicas (Elisa), para la Detección y Cuantificación de Diferentes Especies Animales en Foie Gras. Tesis Doctoral. 1 – 319 pp.
- Rodríguez, L., Y. Rodríguez, S. Reyes, J. Tello, R. Zamora. (2008). Identificación de Moluscos de Interés Comercial con Análisis de DNA en Yucatán, México. Instituto Tecnológico de Mérida. 541 – 546 pp.
- Roldán, E., J. Martínez, R. Ramírez, L. Velásquez. (2014). Análisis morfológico del sistema reproductor e identificación molecular a través de los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA de *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Strophocheilidae) de Colombia. *Revista Peruana de Biología*. 21:79-88 pp.
- Roos, N., Md. Abdul Wahab, C. Chamnan, S. Thilsted. 2007. The Role of Fish in Food-Based Strategies to Combat Vitamin A and Mineral Deficiencies in Developing Countries. *J. Nutr.* 137: 1106–1109 pp.

- Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Schare, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, H. Erlich. (1988). Primer-Direct Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. 487-490 pp.
- Santaclara, F., M. Espiñeira, J. Vieites. (2007). Genetic Identification of Squids (Families Ommastrephidae and Loliginidae) by PCR–RFLP and FINS Methodologies. *J. Agric. Food Chem.* 55:9913–9920 pp.
- Sánchez, A. (2012). Identificación y Cuantificación de Especies del Género *Merluccius* Mediante la Utilización de PCR a Tiempo Real. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. 1-327pp.
- Seeman, N., J., Rosenberg, Rich, A. (1975). Sequence recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73 (3): 804-808 pp.
- Shuangya, C., Z. Yongxiang, H. Li, J. Wang, W. Chen, Y. Zhou. (2014). Differentiation of fish species in Taiwan Strait by PCR-RFLP and lab-on-a-chip system. *Food Control.* 26-34 pp.
- Schuhart, C.& M. Huber. (2006). Genetic comparisons of german populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidae). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 1019-1028 pp.
- Sumathi, G., G. Jeyasekaran, R. Jeya, B. Sivaraman, G. Arunkumar, U. Manimaran, D. Sukumar. (2014). Molecular Identification of grouper species PCR-RFLP technique. *Elsevier.* 1-7 pp.
- Surachetpong, W., B. Poulos, K. Tang, D. Lightner. (2005). Improvement of PCR method for the detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *Aquaculture.* 1-7 pp.
- Taggart, J., R. Hynes, P. Prodohl, A. Ferguson. (1992). Simple protocol for routine total DNA isolation from Salmoid fisher. *Journal of fishes.* 40:963-965 pp.
- Telectchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fisheries.* 19:265 – 293 pp.
- Valdivia E, Arntz W. (1985). Cambios en los recursos costeros y su incidencia en la pesquería artesanal durante “El Niño” 1982-1983. En: Arntz W, Landa A,

- Tarazona J. (Eds.) “El Niño” Su Impacto en la Fauna Marina. Bol. Volumen extraordinario. Inst. Mar Perú. p.143-152.
- Vawter, L. & W. Brown. (1986). Nuclear and Mitochondrial DNA Comparisons Reveal Extreme Rate Variation in the Molecular Clock. 194-196 pp.
- Voet, D. & J. Voet. (2004). Bioquímica. 3<sup>era</sup> Edición. España. Madrid. 1-1776 pp.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. De Lee Van, H. Hornes, J. Frijerts, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeu. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. 1-8 pp.
- Ward, R., T. Zemlak, B. Innes, P. Last, P. Hebert. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *The Royal Society*.1-12 pp.
- Wolf, C., J. Rentsch, P. Hübner. (1999). PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. *J. Agric. Food Chem.* 1350–1355 pp.
- Wolf, C., M. Burregener, P. Hübner, J. Lüthy. (2000). PCR-RFLP Analysis of mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. *Technol.* 144-150 pp.
- Woo, P., S. Lau, J. Teng, H. Tse, K. Yuen. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 14: 908–934 pp.
- Yuan, R. (1981). Structure and Mechanism of Multifunctional Restriction Endonucleases. *Am. Rev. Biochem.* 50:285-315pp.
- Zapata, M., A. Cienfuegos, O. Quirós, M. Quiñones, S. Luchart, M. Correa. (2007). Discrimination of Seven *Anopheles* Species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of its Sequence. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 77(1):67-72pp.
- Zavalaga, F., W. Elliott, R. Pastor, J. Palacios. (2018). Guía Ilustrada para el reconocimiento de peces capturados en la pesquería de arrastre. Lima. Inst Mar Perú, 90 p. Disponible en: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/3256>.

- Zeng, L., J. Wen, S. Fan, Z. Chen, Y. Xu, Y. Sun, D. Chen, J. Zhao, L. Xu, Y. Li. (2018). Identification of sea cucumber species in processed food products by PCR-RFLP method. *Food control*. 90: 166-171 pp.
- Zhang, J. & Hanner R. (2012). Molecular Approach to the Identification of Fish in the South China Sea. (7): 1-9 pp.
- Zubeldia, J., L. Baeza, I. Jáuregui, C. Senent. (2012). Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA. Bilbao: Nevera, S.A.
- Zuzunaga, J. (2013). Medidas de conservación y ordenación pesquera del jurel *Trachurus murphyi* en el Perú. *Rev. peru. biol.* 20(1): 107 – 113 pp.



---

*Merluccius gayi peruanus*

GCATAGTCGGAACAGCCCTAAGCCTGCTCATCCGAGCAGAACTTAGTCAACCAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTAATCGTCACG  
GCACACGCCTTCGTAATAATTTCTTTATAGTAATACCGTTAATAATTGGGGGCTTTGGAAACTGACTTGTCCCCATAATGATCGGAGCCCCGACATAG  
CCTTCCCCGAATAAATAATATAAGCTCTGACTTCTCCCTCCATCTTTCCTGCTCCTTAGCATCTCCGGAGTAGAAGCCGGGGCCGGGACAGGTTG  
AACAGTATATCCCCCTCTCGCAAGCAATCTTGCCACGCTGGCGCCAGCGTGGACCTACTATTTTCTCACTTCACTTAGCAGGCGTTTCTCAATTCTGG  
GAGCAATTAATTTTACTACTATTATCAATATGAAGCCCCCTGCAATCTACAATACCAGACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTACTTATTACAGCTGTCC  
TTCTCCTACTCTCCCTACCCGTCTTAGCCGCGGCATCACAATACTGCTAACTGACCGAAACCTCAACACCTCTTCTTTGACCCCGCCGGAGGGGAGA  
CC

*Hinc II*  
(46 pb)  
*Hind III*  
(221 pb)

---

*Sciaena deliciosa*

GGTGCATGAGCCGGAATAGTGGGCACAGCTTTAAGCCTACTAATCCGAGCAGAACTAAGTCAGCCCGGCTCACTCCTCGGAGATGATCAGATCTATAA  
CGTAATTGTTACGGCACATGCCTTCGTTATAATTTCTTTATAGTAATGCCATTATGATTGGAGGCTTTGGAAACTGACTTGTGCCCTAATGATTGGG  
GGCCCGGACATGGCATTCCCTCGAATAAATAACATAAGTTTCTGACTTCTCCCCCTCTTTTCTTACTCCTAACCTTTCAGGGGTAGAAGCCGGGGC  
AGGGACCGGATGAACCGTATACCCTCCATTAGCTGGAAACCTCGCACACGAGGAGCTTCCGTTGACTGGCCATTTTTCCCTACATCTCGCAGGTGT  
CTCCTCAATTCTGGGGCCATCAACTTTATCACAACAATTATAACATAAAACCTCCCGCCATTTCTCAATACCAAACGCCTTTATTCGTGTGAGCCGTTCT  
AATTACGGCTGCTCTACTACTACTACTACTCTTCTGTTTTAGCTGCTGGTATTACGATACTTCTAACAGACCGAAACCTCAACACAACCTTTCTTTGACCCAG  
CTGGGGGAGGTGACCCAATTCTTTACCAACATTTATTCTGATTCTTTGGCCAC

*Apa I*  
(197pb)  
*Hinc II*  
(361 pb)

---

*Sarda chiliensis*

CCTTTATCTAGTATTTGGTGCATGAGCTGGAATAGTTGGCACAGCCCTAAGCTTGCTTATTCGAGCTGAACTAAGCCAACCCGGTGCCCTTCTTGGGGA  
CGACCAGATTTACAATGTAATCGTTACGGCCCATGCCTTCGTAATGATTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATTGGAGGTTTGGAAACTGACTCATC  
CCCCTAATGATTGGAGCCCCGACATAGCATTCCCCGAATGAACAATATGAGCTTTTACTCCTTCCCCCTTCTTCTTCTACTCCTTGCCTTCTGGG  
GTCGAAGCCGGTGCCGGAACCGGTTGAACAGTTTACCCTCCCTTCTGCTGGTAACCTAGCTCACGCCGGAGCATCAGTTGACTTAACTATTTTCTCCCTAC  
ATTTAGCAGGTGTTTCTCAATTCTGGGGCAATTAACCTCATCACAACAATTATAATATGAAACCCGAGCTATTTCTCAATATCAGACACCCCTATTT  
GTATGAGCTGCTCAATTACAGCCGCTCTTCTCTACTATCACTACCAGTCTTGGCGCTGGCATTACAATGCTCCTAACGGACCGAAACCTAAATACAAC  
CTTTTTGACCCCTGCAGGCGGGGGTGATCCCATCCTTTACCAGCACTTA

*Hind III*  
(49 pb)  
*Hinc II*  
(379 pb)

---

---

|                               |  |   |
|-------------------------------|--|---|
| <i>Engraulis ringens</i>      | <p>GCAGGAATGGTAGGAACAGCACTTAGCCTACTGATCCGAGCAGAATTAAGCCAACCGGGAGCACTTTTGGGAGATGATCAAATTTATAATGTGATCGT<br/> CACCGCTCACGCATTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATCCTAATCGGCGGATTGGGAATTGACTAGTTCCTTTAATACTCGGGCCCCAGAC<br/> ATAGCATTCCCCGAATAAATAACATAGCTTTGACTTCTCCCCCTCATTTCTTCTCCTTGCCTCATCTGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACGG<br/> GCTGAACGGTCTACCCCTTTAGCAGGAAACCTGGCCACGCGGGGGCATCCGTGGACCTTACAATTTTTCCCTTCACTTGGCGGGCATTTCATCAAT<br/> CTTGGGTGCCATTAACCTCATTACCACTATTATTAACATAAAACCTCCTGCCATCTACAATATCAGACGCCTATTTGTCTGAGCTGTGCTAATTACAG<br/> CAGTACTTTTACTTCTTCACTCCCTGTTCTAGCGGCTGGGATCACTATGCTTCTTACAGATCGAAACCTAAACACCACCTTTTGACCCAGCAGGAGGG<br/> GGAGACCCAATCCTTTATCAACACCTA</p>                   | <p><i>Hind III</i><br/>(225 pb)<br/><i>Apa I</i><br/>(188 pb)</p> |
| <i>Paralanchurus peruanus</i> | <p>CCTCTACCTAGTCTTCGGTGCATGGGCCGGAATGGCAGGCACAGCCTTAAGCCTCCTAATTCGGGCCGAGCTGAGCCAGCCCGGCTCACTCCTGGAG<br/> ACGACCAAATTTATAACGTAATTGTTACGGCGCATGCCTTCGTTATAATTTCTTTATAGTAATGCCGTTATAATCGGAGGGTTTGAAAACCTGACTTAT<br/> CCCCAATGATCGGGCCCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATATGAGCTTCTGACTGCTTCCCCCTCCTTCTACTTTTAACTTCTTCAG<br/> GGGTAGAAGCAGGAGCCGGAACCGGATGAACA GTCTACCCCCACTCGCCGGAATCTTGCCACGCAGGGGCTCTGTTGACCTGGCAATCTTTCT<br/> CTTCATCTTGCCGGTGTCTCATCAATTCTGGGGCTATTAATTTATTACAACAATTATCAACATGAAACCCCCGCTATCTCCAGTATCAAACACCCTT<br/> GTTTGTCTGAGCTGTCTGATTACGGCGTTCCTACTACTTTCACTCCAGTCTAGCCGCTGGCATTACAATGCTTTTAAACAGATCGTAATCTGAATA<br/> CAACCTTCTTTGACCCGGAGGAGGGGAGACCCGATCCTCTATCAACACCT</p> | <p><i>Apa I</i><br/>(217 pb)<br/><i>Hinc II</i><br/>(379 pb)</p>  |

---

Fuente: Elaboración propia

Tabla 6: Especies, Secuencias del NCBI del gen *16S rDNA* de las especies en estudio y sitios de corte donde escindieron las enzimas de restricción.

| Especies                    | Secuencias del NCBI del gen <i>16S rDNA</i> de las especies en estudio y los sitios de corte de las enzimas de restricción   | Sitio de corte de las enzimas de restricción (ER) |
|-----------------------------|--|---|
| <i>Scomber japonicus</i>    | <p>CGCTTTTGCAAAAACAAAGAATAAAAGGTGAGCCTGCCAGTGACTATATGTTCAACGCGCCGGTATTTTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACT<br/> TGCTTTTAAATGAAGACCTGTATGAATGGTATTACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTTTCAGGTCAGTGAATGATCTCCCGTGCAGAAGCGGGGAT<br/> AAAACCATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAAGACTAAGCCATATCAAGTTAAATACCCCTAACAAAGGGGCCAACTTATTGAAATCATTG<br/> GCCGTATGTCTTCGGTTGGGGCGACCATGGGGAAACAAAAACCCACCTGGAATGGGAGCACATTTACTCCTACAGTCAAGAGCCGCCACTCTAA<br/> CAAACAGAATTTCTGACCAATAACTGATCCGGCAACGCCGATCAACGGACCAAGTTACCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGCCCTATC<br/> GACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTATTGAAGGTTGTTTCAACGATTAAGTCCT</p>           | -   |
| <i>Trachurus picturatus</i> | <p>ATACATAGGAGGTCCGCCTCGCCTGTGACTTTACGTTTAAACGCGCGGTATTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTTAAATGAA<br/> GACCTGTATGAATGGCAGCAGGAGGGCTTAACTGTCTCCTCCTCCAGTCAATGAAATTGATCTCCCGTGCAGAAGCGGGGCTATACATAAGACG<br/> AGAAGACCCTGTGGAGCTTTAGACCCGGGGCAAGACCATGTCAAGAATATTGGACAAACGATTTGAACTAATTGGACCCTCCCTAATGTCTTTGGTT<br/> GGGGCGACCGGGGAAACAAAAACCCCATGTGGAATGGAACACCCATTTTCCACAACCAAGAGCCACAGCTCTAAGTAACAGAATTTCTGAC<br/> CTACAAGATCCGGCAAAGCCGATCAACGGACCCAGTTACCCAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGCCCATATCGACAAGGGGGTTTACGAC<br/> CTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTCAACGATTAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG</p>       | -   |
| <i>Merluccius gayi gayi</i> | <p>GCCTGCCAGTGACAACAGTTCAACGCGCCGGTATTTGACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTTAAATGAAGACCTGTATGAATGGCAT<br/> AACGAGGGCTTAACTGTCTCCTCTTTCCAGTCAATGAAATTGATCTCCTCGTGCAGAAGCGGAGATAAGAACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGC<br/> TTAGACACAAAGACAGATCATGTTAAACACCCCAATAAAGGCCAACTTAATGATCTCCTGTCTTAATGTCTTCGGTTGGGGCGACCATGGGGA<br/> AACACAAATCCCCATGTGGAATAGGAGGACAATCCCATATTATTTTCTCCTCCTCCACAAGCAAGAGCCACAACCTAGCTAACAGAATTTTGACC<br/> TTATATGATCCGGCACACGCCGATCAACGGACCAAGTTACCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGCCCATATCGACAAGGGGGTTTACGAC<br/> CTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTCAACGATTAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGG</p> | -   |

---

*Sciaena  
deliciosa*

GAGGTCCAGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAAACGGCCGCGGTATTTTAAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTTAAATGGAGACCTGTAT  
GAATGGCATTACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTTTCAAGTCAGTGAAATTGATCTCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAAGACGAGAAGACC  
CTATGGAGCTTTAGACACCAAGGCATTTTCATGTTAAATACCCCTAAACAAAGGACCAACCAATGAACCATGCCCCATGTCTTTGGTTGGGGCGAC  
CGCGGGGAAATAAAAAACCCACGTGGAATGGGAGTACTACCTCCTACAACCAAGAGCTGCAGCTCTAATTAACAGAATATCTGACCAATAAGATC  
CGGCAACGCCGATCAACGGACCGAGTTACCCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCTTTTAGAGCCATATCGACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTG  
GATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTGTTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAAGTCCTACGTGATCT

---

*Sarda  
chiliensis*

TTCGCCCTGTTTTATTCCAAAACATCGCCTCTTGCAAACATAAGTATAAGAGGTCCCGCCTGCCAGTGACAATATAGTTTAAACGGCCGCGGTATTTT  
GACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTTAAATGAAGACCCGTATGAATGGCATAACGAGGGCTTAACTGTCTCTTCCCTGGTCAATGAAA  
TTGATCTCCCGTGCAGAAGCGGGGATATGCTCATAAGACGAGAAGACCCATGGAGCTTTAGACGCAAAGGCAGATCATGTCAAATACACCCAGCT  
ATGGGACCTGAACTAAATGAAGCCAGCCTTGATGTCTTCGTTGGGGCGACCATGGGGAACACAAAACCCACGTGGAAAAGGAGTACACCCCTAC  
ATTTCCCTCCTCTACAAACTAGAGCGACAGCTTAATCAGCAGAAATTCTGACCAGACTGATCCGGCAAAGCCGATCAACGAATCAAGTTACCCCTAG  
GGATAACAGCGCAATCCCTTTTAGAGCCATATCGACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAG  
GGTTCGTTTGTTCACGATTAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG

---

*Engraulis  
ringens*

ATAAGAGTCCACCTGCCCTGTGACTTAAAGTTTAAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCAATTGCCTTTTAAATGAAGGCCT  
GTATGAATGGTATAACGAGGGTTTACTGTCTTTTTCTAGTCAGTTAACTGATCTGCCCGTGCAGAAGCGGGCATTACTATACAAGACGAGAAG  
ACCCTATGGAGCTTTAGACGCTAGCCAATATCGACAGGCGACTGGCCACTAAACAGACCTTAAATACCCGTTAGTTGTGGTGAGGCAGTCTTAGGTT  
GGGGCGACCACGGGAGAAAATGAAGCTCCAGGCAGACCGGGGGATACCCCTGAGCCAAGAGTAGCTACTAAGCCACAAAATTTTACTGAAA  
TGATCCG**GTTGAC**AAACCGATTGACGAACCAAGTTACCCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCTCCAGAGTCCCTATCGACGAGGGGGTTTACGACCTC  
GATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAAGTCCTACGTGATCTGAGT

*Hinc II*  
(399 pb)

---

Fuente: Elaboración propia

## Anexo 2: Secuencias propias de los genes *Citocromo oxidasa I* y *16S rDNA* de las especies en estudio y sitio de corte donde escindió la enzima de restricción

Tabla 7: Especies, Secuencias propias del gen *Citocromo oxidasa I* de las especies en estudio y sitios de corte donde escindieron las enzimas de restricción.

| Especies                 | Secuencias del gen <i>Citocromo oxidasa I</i> de las especies en estudio y los sitios de corte de las enzimas de restricción   | Sitio de corte de las enzimas de restricción (ER)                             |
|--------------------------|--|---|
| <i>Engraulis ringens</i> | <p>CAGGATGGTAGGACAGCACTTAGCCTACTAATCCGAGCAGAATTAAGCCAACCGGGAGCACTTTTGGGAGATGATCAAATTTATAATGTGATCGTCA<br/>           CCGCTCACGCATTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATCCTAATCGGCGGATTGCGGAATTGACTAGTTCCTTTAATACTCGGGGCCAGACAT<br/>           AGCATTCCCCGAATAAATAACATAAGCTTTTACTTCTCCCCCTCATTTCTTCTCCTTGCCTCATCTGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACGGG<br/>           CTGAACGGTCTACCCCTTTAGCAGGAAACCTGGCCACGCGGGGGCATCCGTGGACCTTACAATTTTTCCCTTCACTTGGCGGGCATTTCATCAAT<br/>           CTTGGGTGCCATTAACCTCATTACCACTATTATTAACATAAAACCTCCTGCCATCTACAATATCAGACGCCTCTATTTGTCTGAGCTGTGCTAATTACA<br/>           GCAGTACTTTTACTTCTTCACTCCCTGTTCTAGCGGCTGGGATCACTATGCTTCTTACAGATCGAAACCTAAACACCACCTTCTTTGACCCAGCAGGAG<br/>           GGGGGGACCAATTCTTTATCAACACCTATTCTGATTCTTTGGACATCCAGAAGTATAATAAA</p> | <p><i>Hind III</i><br/>(222 pb)<br/><i>Apa I</i><br/>(189 pb)</p>             |
| <i>Scomber japonicus</i> | <p>GTGCATGAGCTGGATAGTTGGCACGGCCTTAAAGCTTGCTTATCCGAGCTGAACCTAAGTCAACAGGGTCCCTTCTCGGCGACGACCAAACCTACAACGT<br/>           AATTGTTACGGCCACGCCTTCGTTATAATCTTCTTTTAGTAATGCCAGTTATGATTGGAGGGTTGCGAAACTGACTGATCCCCTAATGATCGGAGCC<br/>           CCCGACATGGCATTCCCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTGCCCCCTCTCTCTGCTGCTCCTGTCTTCTTCGAGTTGAAGCCGGTGCCGG<br/>           AACTGGTGAACAGTTTATCCTCCCTCGCTGGGAACCTAGCACACGCGGGGCATCAGTTGATTTGACCATTCTACTCCACCTAGCAGGTGTTTCCT<br/>           CAATCCTGGGGCCATTAACCTCATCACAACAATCATTAAACATAAAACCTGCAGGTGTATCCCAACCAAACCCCTCTGTTCTGCTGAGCAGTCTAATTA<br/>           CAGCTGCTTCTCTTCTATCCCTACCAGTCTTCTGCTGCCGGCATTACAATGCTCCTACAGACCGAAATCTAAATACTACCTTCTTCGACCCTGGAGGA<br/>           GGGGGAGACCCATTCTTTACCAACACCTTCTGATTCTTTGGACATCCTGAAGTATAAA</p> | <p><i>Hind III</i><br/>(31 pb)<br/>230 pb)<br/><i>Hinc II</i><br/>(59 pb)</p> |

*Sarda  
chiliensis*

AGTTGGCACAGCCCTAAGCTTGGCTTATTCGAGCTGAACTAAGCCAACCCGGTGCCCTTCTGGGGACGACCAGATTTACAATGTAATCGTTACGGCCC  
ATGCCTTCGTAATGATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATTGGAGGGTTTGGAACTGACTCATCCCCCTAATGATTGGAGCCCCGACATAGCAT  
TCCCCGAATGAACAATATGAGCTTTTACTCCTCCCCCTTCTTCTCTACTCCTTGCCCTTCTGGGGTCGAAGCCGGTGCCGGAACCGTTGAAC  
AGTTTACCCTCCCCTTGCTGGTAACCTAGCTCACGCCGGAGCATCAATTGACTTAACTATTTTCTCCCTACATTTAGCAGGTGTTTCTCAATTCTTGGG  
GCAATTAACCTCATCACAACAATTATTAATATGAAACCCGAGCTATTTCTCAATATCAGACACCCCTATTTGTATGAGCTGCCTAATTACAGCCGTCC  
TTCTCCTACTATCACTACCAGTTCTTGCCGTGGCATTACAATGCTCCTAACGGACCGAAACCTAAATACAACCTTTTTCGACCCTGCAGGCGGGGGTG  
ATCCCATCCTTACCAGCACTATTCTGATTCTTTGGACATNC

*Hind III*  
(16 pb)  
*Hinc II*  
(346 pb)

*Trachurus  
picturatus*

GCTTGAGCTGGATAGTAGGANCCGCTTTAAGCCTGCTTATTCGGGCAGAACTAAGCCAACCTGGCGCCCTTCTAGGGGATGACCAAATTTACAACGT  
AATTGTTACGGCCACGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTAATGCCAATTATGATTGGAGGCTTTGGAACTGACTGATTCCGCTAATGATCGGAGC  
CCCTGATATAGCCTTCCCTCGAATGAATAACATGAGCTTCTGACTACTCCCTCCCTCCTTCTTTGCTTTTAGCCTCTTCAGGTGTTGAAGCCGGGGCC  
GAACTGGTTGAACAGTCTATCCCCACTGGCTGGGAACCTTGCCACGCCGGAGCATCCGTAGATTTAACCATCTTCTCCCTTACCTAGCAGGGGT  
CTCATCAATTCTAGGGGCTATTAACCTTATTACCACTATTATCAACATGAAACCTCCTGCAGTCTCAATATATCAAATCCCACTATTTGTTGAGCTGTCT  
TAATTACAGCTGTCTTCTTCTCTCTTCTGCTCCTAGCTGCTGGCATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTAAATACTGCTTTCTTTGACCCG  
GCAGGCGGGGGAGACCAATTCTTACCAACACCTATTCTGATTCTTTGGACACCCAGAAGTATAA

-

*Paralichthys  
adsperus*

TGGGGACAGCCCTAAGCCTTCTCATTTCGGGCAGAACTAGCCAACCTGGAGCTCTCTAGGGGACGACCAGATTTATAACGTAATCGTTACCGCACAC  
GCCTTTGTAATAATCTTTTTATGTTTATACCAATTATGATCGGAGGTTTTGGCAATTGACTCATCCCCCTAATAATCGGCGCCCCAGATATAGCATTTC  
CCCGAATAAACAACATAAGCTTCTGACTTCTACCCCTCATTCTCCTTCTCTAGCTTCTCAGGTGTTGAAGCCGGGGCCGGTACTGGGTGGACTG  
TCTACCCCTTTAGCTAGCAACCTCGCCACGCTGGAGCCTCGGTAGATCTGACTATCTTTTCACTTACCTTGCAGGCATCTCCTCAATTCTTGGGGC  
CATTAACTTCATCACCACCTATTATTAATATGAAGCCACGACTGTGTCCATATACCAAGTCCCCTATTTATCTGAGCCGTAATAATTACGGCCGTCTC  
CTACTTCTTCCCTACCAGTCTAGCCGTGGCATCACAATGCTACTCACAGACCGAAACCTGAATACAACCTTCTTTGACCCTGCAGGGGGAGGTGAT  
CCCATCTCTACCAACACCTGTTCTGATTCTTTGGACACC

*Hind III*  
(215 pb)

---

*Sciaena  
deliciosa*

CACAGCTTTAAGCCTACTAATCCGAGCAGAACTAAGTCAGCCCGGCTCACTCCTCGGAGATGACCAGATCTATAACGTAATTGTTACGGCACATGCCT  
TCGTTATAATTTCTTTATAGTAATGCCATTATGATTGGAGGCTTTGGAACTGACTTGTGCCCTAATGATTGGGGCCGACATGGCATTCCCTC  
GAATAAATAACATAAGTTTCTGACTTCTCCCCCTTCTTTCTTACTCTAACCTTTCAGGGGTAGAAGCCGGGGCAGGGACCGGATGAACCGTAT  
ACCCTCCATTAGCTGGAAACCTCGCACACGCAGGAGCTTCCGTTGACTGGCCATTTTTCCCTACATCTCGCAGGTGTCTCCTCAATTCTGGGGCCAT  
CAACTTATACAACAATTATTAACATAAAACCTCCCGCATTCTCAATACCAAACGCCTTTATTCGTGTGAGCCGTTCTAATTACGGGTGTCTATTAC  
TACTATCACTTCTGTTTTAGCTGTGGTATTACGATACTTCAACAGACCGAAACCTAAACACAACCTTTCTTTGACCCAGCTGGGGGAGGTGACCCAA  
TTCTTTACCAACATTATTCTGATTCTT

*Apa I*  
(189 pb)  
*Hinc II*  
(340 pb)

---

*Merluccius gayi  
peruanus*

GAATAGTCGGAACAGCCCTAAGCCTGCTCATCCGAGCAGAACTTAGTCAACAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTAATCGTCAC  
GGCACACGCCTTCGTAATAATTTCTTTATAGTAATACCGTTAATAATTGGGGCTTTGGAACTGACTTGTCCCATAATGATCGGAGCCCCGACAT  
AGCCTTCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGACTTCTCCCTCCATCTTCTGCTCTTCTAGCATCTTCCGGAGTAGAAGCCGGGGCCGGGACAGG  
TTGAACAGTATATCCCCCTCTCGCAAGCAATCTTGCCACGCTGGCGCCAGCGTGGACCTCACTATTTCTCACTTCACTTAGCAGGCGTTTCTCAATT  
CTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACTATTATCAATATGAAGCCCCCTGCAATCTACAATACCAGACACCCCTTTGTTTGATCCGTAATTATTACAG  
TGTCTTCTCCTACTCTCCCTACCCGCTTAGCCGCGGCATCACGATACTGCTAACTGACCGAAACCTCAACACCTCCTTCTTTGACCCCGCGGAGGG  
GGAGACCCATCCTATACCAGCACTTATTCTGATTCTTTGGcATCCAGAAAAATAATA

*Hinc II*  
(48 pb)  
*Hinc III*  
(221 pb)

---

*Odontesthes  
regia regia*

GCTTTAAGCCTTCTCATCCGAGCAGAACTCAGCCAACCAGGCTCTCCTAGGAGACGATCAGATTTATAATGTTATCGTTACAGCACACGCTTTCGTA  
ATAATTTCTTTATAGTAATGCCAATCATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCATTCTCTAATGATCGGTGCTCCCGATATGGCTTCCCCGAATAA  
ATAATATGAGCTTCTGACTACTCCCCCTCATTCTACTTCTCTGGCTTCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACCGGATGAACAGTATACCCC  
CTCTGTCTGGTAATCTAGCTCACGCCGGAGCATCCGTAGACCTAACTATTTCTCTCTCCACTTAGCAGGAGTTTCATCAATCCTGGGAGCCATTAATT  
TATTACCACCATTATTAACATGAAACCTCCCGGATTTACAATATCAAACCTCCCTCTTTGTATGAGCTGTACTCATTACCGCTGACTTCTCTCTCT  
CCCTCCCGTCTTGTCTGCCGGCATTACAATGCTTCTGACAGACCGGAATCT

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8: Especies, Secuencias propias del gen *16S rDNA* de las especies en estudio y sitios de corte donde escindieron las enzimas de restricción.

| Especies                        | Secuencias del gen <i>16S rDNA</i> de las especies en estudio y los sitios de corte de las enzimas de restricción   | Sitio de corte de las enzimas de restricción (ER) |
|---------------------------------|---|---|
| <i>Scomber japonicus</i>        | <p>ACTTCGtCTTTAAATTGAAGACCTGTATGAATTTGTATTACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTTCAGGTCAGTGAAATTGATCTCCCCGTGCAGAA<br/>                     GCGGGGATAAAAtCCATAAgACgAGAAGACCCTATGGAGCTTTAAGACACTAAGCCATATCAAGTTAAATACCCCTAACAAAGGGGCCAACTTAT<br/>                     TGAAATCATTGGCCGTATGTCTTCGGTTGGGGCGACCATGGGGAAACAAAAACCCACGTGGAATGGGAGCACATTTACTCCTACAGTCAAG<br/>                     AGCCGCCACTTAACAAACAGAATTTCTGACCAATAACTGATCCGGCAACGCCGATCAACGGAcCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCgCAATCCC<br/>                     CTTTAgAGCCCCTATCGACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCAATGGTGCAGCCGCTATTGAAGGTTGTTTGTTCACG<br/>                     GATTAAGtCCTaCgTGATCTGAgTTCaGACCGGAT</p>  | -   |
| <i>Trachurus picturatus</i>     | <p>CCCGCTGCCAGTGACAACAGTTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCGAAGGTATgcGTAATCACTTGTCTTTAAATGAAGACCTGTATGAA<br/>                     TGGCATAACGAGGGCTTAACTGTCTCCTCTTTCCAGTCAATGAAATTGATCTCTCCGTGCAGAAGCGGAGATAGAAACATAAGACGAGAAGACCC<br/>                     TATGGAGCTTTAGACACAAAGACAGATCATGTCAAACACCCCAATAAAGGCCAACTTAATGATCTCCTGTCTAATGTCTTCGGTTGGGGC<br/>                     GACCATGGGGAAACACAAATCCCCATGTGGAATAGGAGGACAATCCCATATATTTTCTCTCCTCCACAAGCAAGAGCCACAGCTCTAGCTA<br/>                     ACAGAACTTTTGACCTTATATGATCCGGCCACGCCGATCAACGGACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGCCCATATCG<br/>                     ACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAAAGTCTACGTG<br/>                     ATCTGAGTTCAGACCAGA</p> | -   |
| <i>Merluccius gayi peruanus</i> | <p>CCCTCAATAGCGGCTGCACCACTAGGATGTCTGATCCAACATCGAGGTGTAACCCCTCGTCGATATGAGCTCTGAGAGGGGATTGCGCTGT<br/>                     TATCCCTGGGGTAACTGGGTTTCGTTAATCGGTTGTACCGGATCAGTAAGGTCAGAATTTCTGTTGCTTGGAGTGGAGGCTCTGAGTTTTAGGGAA<br/>                     AGTATCCCCGTCCACATGGAGGTTGTGTTTTACTCCGGTTCGCCCAACCAAGACACTTAAATAAATGTCCACTAAGTTTTTGCTATTAATTTA<br/>                     GTACATTAACGTGGTTTACTTTAGGTCTAAAGCTCCACAGGGTCTTCTCGTCTTATAGAAATATCCCCGCTCTGCACGGGGAGGTCAATTTTATT<br/>                     GACTGGAGAGGGGAGACAGTTAAGCCCTCGTGATGCCATTATACAGGTCTTCAATTTAAAGACAAGTGATTACGCTACCTTCGCACGGTTAAGA<br/>                     TACCGCGCCGTTAAACATATAGTCACAGGGCAGGCGGGACCTCTTATATTTGGGGACAAGAGGCGATGTTTTGATAAACAGGCGA</p>   | -   |

|                                |  |                          |
|--------------------------------|--|--------------------------|
| <i>Paralonchurus peruanus</i>  | <p>AAGGGTCTTGCCTGCCCGGTGACCATGAGTTCAACGGCCGCGGTATTTGACCGTGCAaaggTaGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAAGACC<br/> CGTATGAATGGCAAGACGAGGGCTTAAGTGTCTCCTTTTCAAGTCAATGAAATTGATCTCCCGTGCAGAAGCGGGAATTCACATAAGACGA<br/> GAAGACCCTATGGAGCTTTAGACTAAGGCAGATCACGTTAAACTTCTGATAAAGAATAAACTAAATGATCCCTGCTCTGATGTCTTTGGTT<br/> GGGGCGACCACGGGAAACACAAAACCCCGCGTGGACTGAGAGTACACCCCTCCACCCCTACTCTCACAATAAGAGCCTCCGCTAATAAAC<br/> AGAATTTCTGACCAAAATGATCCGGCAATGCCGATCAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTAGAGCCCATATCGAC<br/> AAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTCAACGATTAAAGTCTACGTGAT<br/> CTGAGTTCAGACCGAAA</p> | <i>EcoR I</i><br>(173pb) |
| <i>Sciaena deliciosa</i>       | <p>AGAGGTCCCGCCTGCCAGTGACATATAGTTCAACGGCCGCGGTATTTGACCGTGCTAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTAAATGAAGACCC<br/> GTATGAATGGCATAACGAGGGCTTAAGTGTCTCCTCCCGTGGTCAATGAAATTGATCTCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAGTACATAAGACGAG<br/> AAGACCCTATGGAGCTTTAGACTAAGACAGACCATGTTAAATGTACCCTCCACGGACCTACAAACCAATGAAATCCGTCTTAATGTCTTCGG<br/> TTGGGGCGACCATGGGGAACACAAAACCCCGCGTGGAAAAGGAGGACACCCAGTATCCACCCCTCTACAAATCAGAGCAACAGCTCAAAT<br/> TAGCAGAAATTCTGACCATACTGATCCGGCAACGCCGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCTTTTAGAGCCCATATC<br/> GACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTCAACGATTAAAGTCTACKT<br/> GATCTGAGTTCA</p>  | -                        |
| <i>Odontesthes regia regia</i> | <p>TGTGACTTTACGTTTAAACGGCCGCGGTATTTGACCGTGCAAAGGgAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAAGACCTGTATGAAtGgCACGACGA<br/> GGGCTTAAGTGTCTCCTTCCAGTCAATGAAATTGATCTCCCGTGCAGAAGCGGGGCTATATaCATAAGACGAGAAGACCCTGTGGAGCTTT<br/> AGACCCGGGCAAGACCATGTCAAGAATATTGGACAAACGATTTGAACTAATTGGACCCTTCCCTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGA<br/> AACAAAAACCCCATGTGGAATGGAACACCCATTTTCCACAACCAAGAGCCACAGCTCTAAGTAACAGAATTTCTGACCTACAAGATCCGGC<br/> AAAGCCGATCAACGGACCCAGTTACCCAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTAGAGCCCATATCGACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGA<br/> TCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTCAACGATTAAAGTCTACGTGATCTGAGTTCAgACCGGA</p>                             | -                        |

|                              |   |                           |
|------------------------------|---|---------------------------|
| <i>Engraulis ringens</i>     | <p>CCCTGGCCCTGTGACTTAAAGTTAAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAGAAgCgTagCGCAATCAATTGCCTTTTAAATGAAGGCCTGTATGAAT<br/> GGTATAACGAGGGTTTACTGTCTCTTTTTCTAGTCAGTTAACTGATCTGCCGTGCAGAAGCGGGCATTACTATAACAAGACGAGAAGACCCCT<br/> ATGGAGCTTTAGACGCTAGCCAATATCGACAGGCGACTGGCCACTAAACAGACCTTAAATACCCGTTAGTTGGTGAGGCAGTCTTAGGTTGG<br/> GGCGACCACGGGAGAAAATGAAGCTCCAGGCAGACCCGGGGGATACCCTTGAGCCAAGAGTAGCTACTCTAAGCCACAAAATTTTACTGAAAA<br/> TGATCCG<b>GTTGAC</b>AAACCGATTGACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTCCAGAGTCCCTATCGACGAGGGGGTTTACGAC<br/> CTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCAACGATTAAGTCTACGTGATCTGAGTTCAGACCAG<br/> A</p> | <i>Hinc II</i><br>(390pb) |
| <i>Paralichthys adpersus</i> | <p>TAACCGAGGGCTTAACTGTCTCCTTCCCCTGGTCAATGAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATATgCtCATAAGACGAGAAGACCCCTATG<br/> GAGCTTTAGACGCAAAGGCAGATCATGTCAAATACCCAGCTATGGGACCTGAACTAAATGAAGCCAGCCTTGATGTCTTCGGTTGGGGCGAC<br/> CATGGGGAAACAAAAACCCACGTGAAAAAGGAGTACACCCCTACATTTCCCTCCTACAACTAGAGCGACAGCTCTAATCAGCAGAAATT<br/> CTGACCAGACTGATCCGGCAAAGCCGATCAACGAATCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCATCCCCTTTTAGAGCCCATATCGACAAGGGGGTT<br/> TACGACCTCgATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCAACGATTAAGTCTACgTGATCTGAaTTCAAC<br/> CGGAAATTT</p>   | -                         |
| <i>Sarda chiliensis</i>      | <p>GTCCTGATCCAACATCGAGGTCGTAACCCCTTGTGATATGGGCTCTAAAAGGGGATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTAACTCGGTCCGTTGAT<br/> CGGCGTTGCCGGATCTTATTGGTCAGATATTCTGTTAATTAGAGCTGCAGCTCTTGGTTGTAGGAGGTAGTACTCCATTCCACGTGGGGGTTTTT<br/> TATTTCCCGCGGTCGCCCCAACCAAGACATGGGGGCATGGTTCATTTGGTTTGGTCTTTGTTTAGGGGTATTTAACATGAAATGCCTTGGTGT<br/> CTAAAGCTCCATAGGGTCTTCTCGTCTTATGGTTTTATCCCCTTCTGCACGGGGAGATCAATTTCACTGACTTGAAAAAGGAGACAGTTAAGCC<br/> CTCGTAATGCCATTACATACAGTCTCCATTTAAAAGACAAGTGATTGCGCTACCTTCGCACGGTTAAAATACCGCGGCCGTTAAACATATAGTCAC<br/> AGGGCAGGCTGGACCTCTTATTCTTTGCTTTTGAAGAGGCGATGTTTTTG</p>   | -                         |

Fuente: Elaboración propia

**Anexo 3: PCR RFLP de las especies en estudio en las cuales no se halló sitio de escisión.**

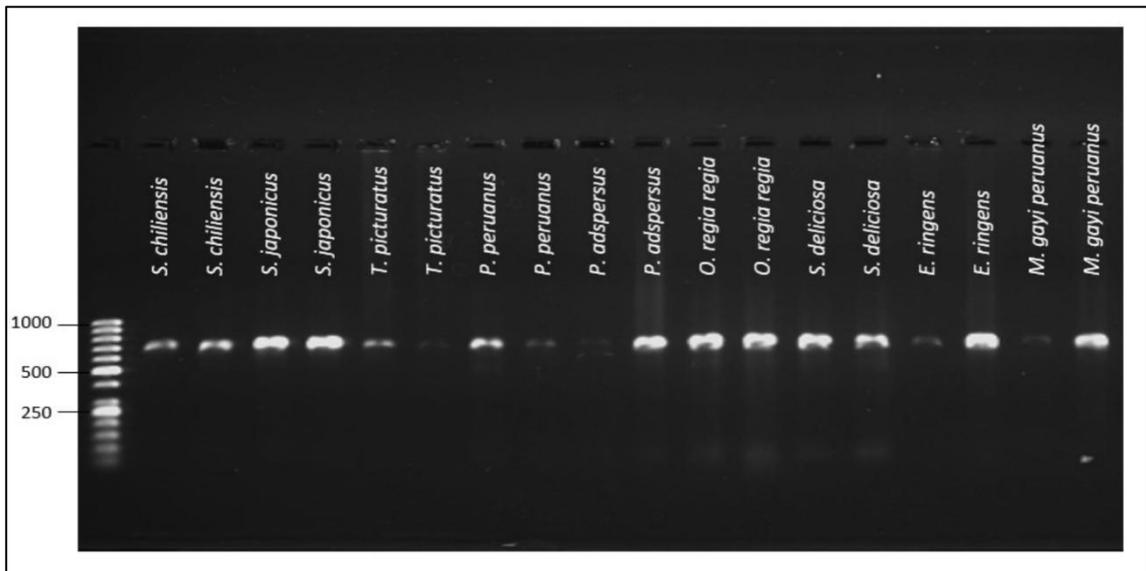


Figura 14: Perfil de restricción formado por la enzima *EcoR I* y el gen *Citocromo oxidasa I* en las especies *S. chilensis*, *S. japonicus*, *T. picturatus*, *P. peruanus*, *P. adspersus*, *O. regia regia*, *S. deliciosa*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus*.

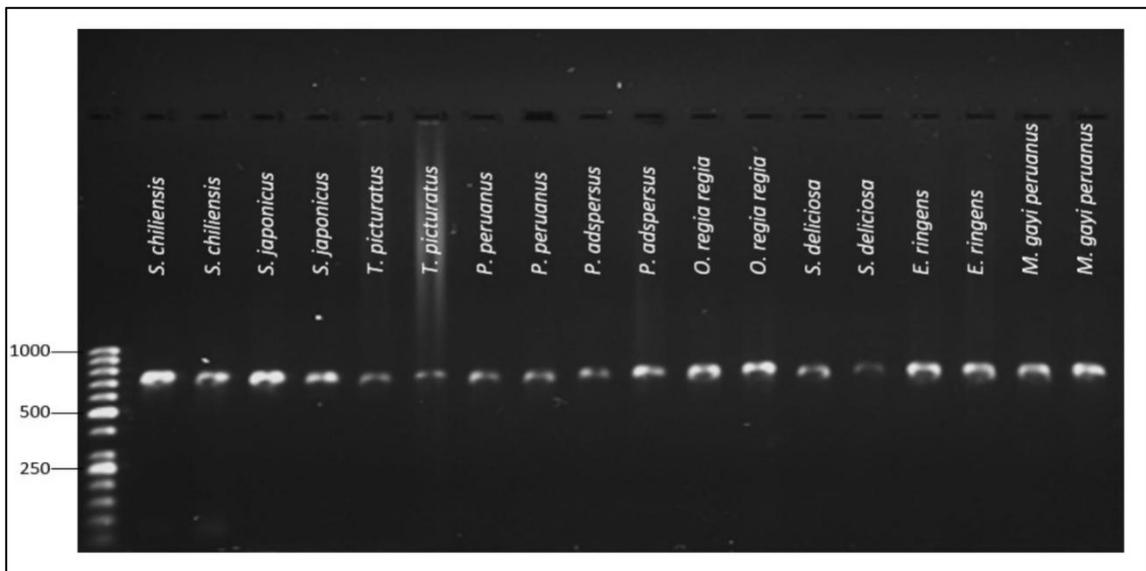


Figura 15: Perfil de restricción formado por la enzima *Not I* y el gen *Citocromo oxidasa I* en las especies *S. chilensis*, *S. japonicus*, *T. picturatus*, *P. peruanus*, *P. adspersus*, *O. regia regia*, *S. deliciosa*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus*.

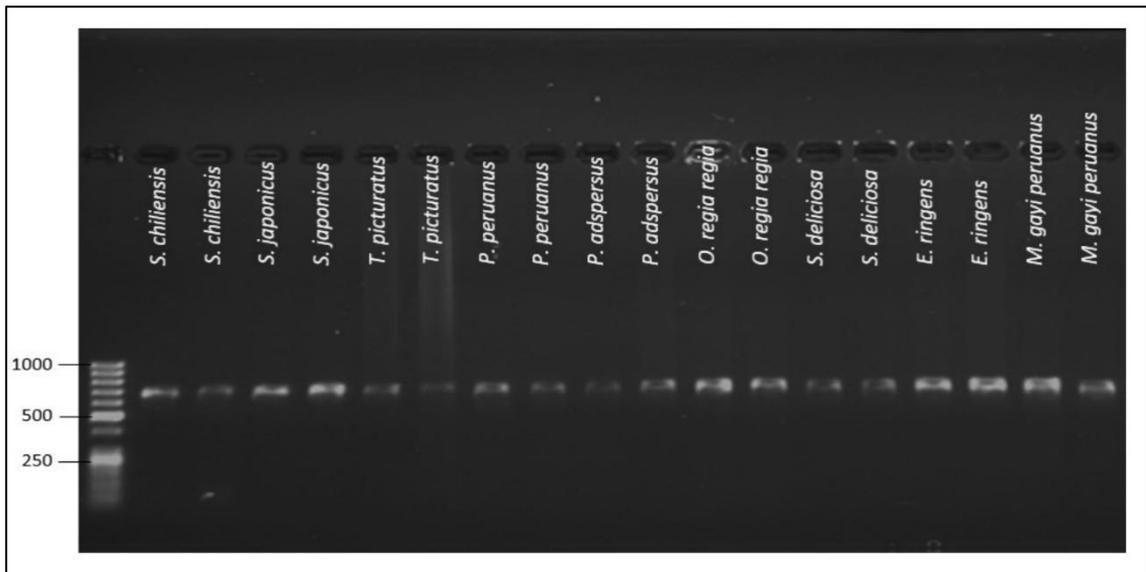


Figura 16: Perfil de restricción formado por la enzima *BamH I* y el gen *Citocromo oxidasa I* en *S. chilensis*, *S. japonicus*, *T. picturatus*, *P. peruanus*, *P. adspersus*, *O. regia regia*, *S. deliciosa*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus*.

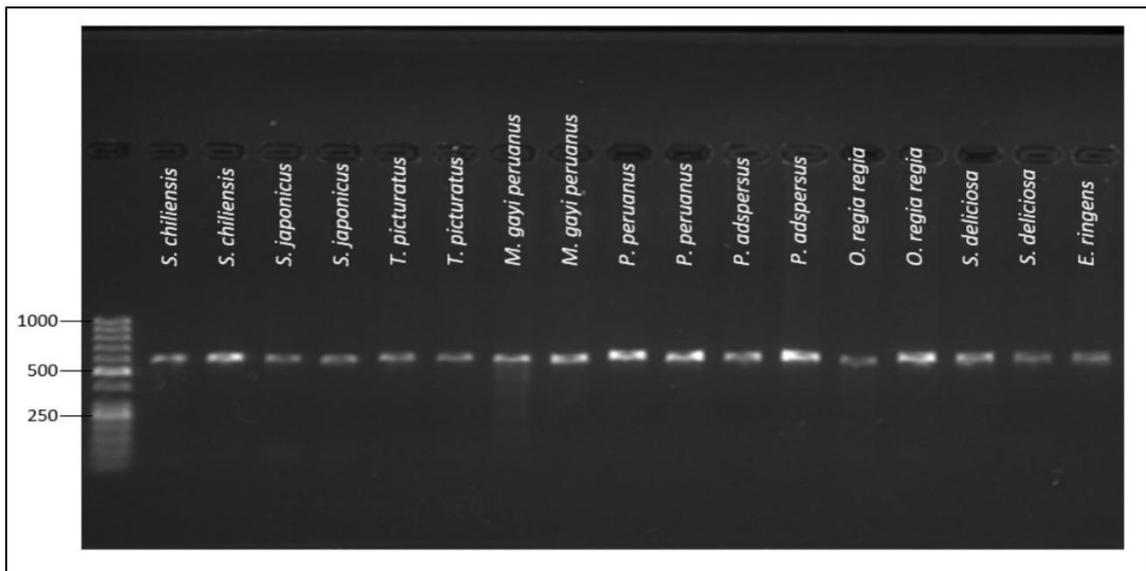


Figura 17: Perfil de restricción formado por la enzima *Apa I* y el gen *16S rDNA* en las especies *S. chilensis*, *S. japonicus*, *T. picturatus*, *P. peruanus*, *P. adspersus*, *O. regia regia*, *S. deliciosa*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus*.

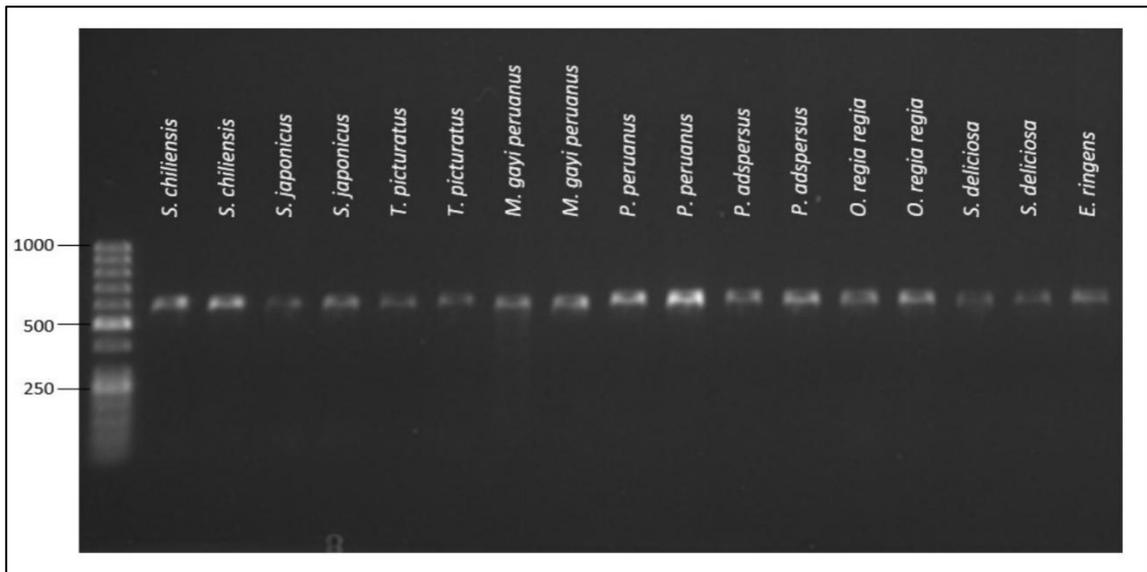


Figura 18: Perfil de restricción formado por la enzima *Not I* y el gen *16S rDNA* en las especies en *S. chilienis*, *S. japonicus*, *T. picturatus*, *P. peruanus*, *P. adpersus*, *O. regia regia*, *S. deliciosa*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus*.

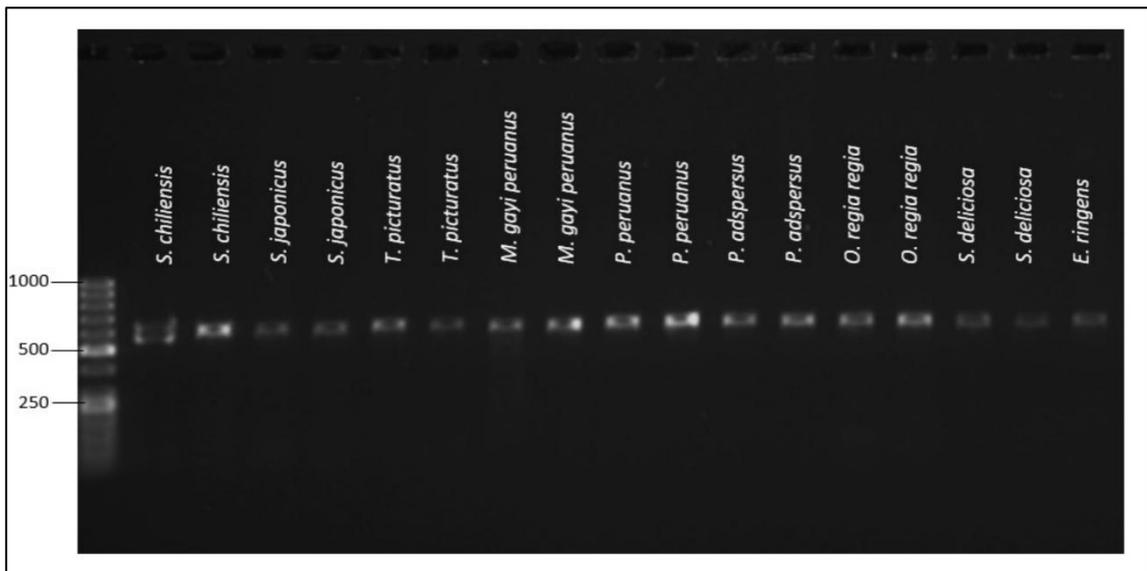


Figura 19: Perfil de restricción formado por la enzima *BamHI* y el gen *16S rDNA* en las especies *S. chilienis*, *S. japonicus*, *T. picturatus*, *P. peruanus*, *P. adpersus*, *O. regia regia*, *S. deliciosa*, *E. ringens*, *M. gayi peruanus*.

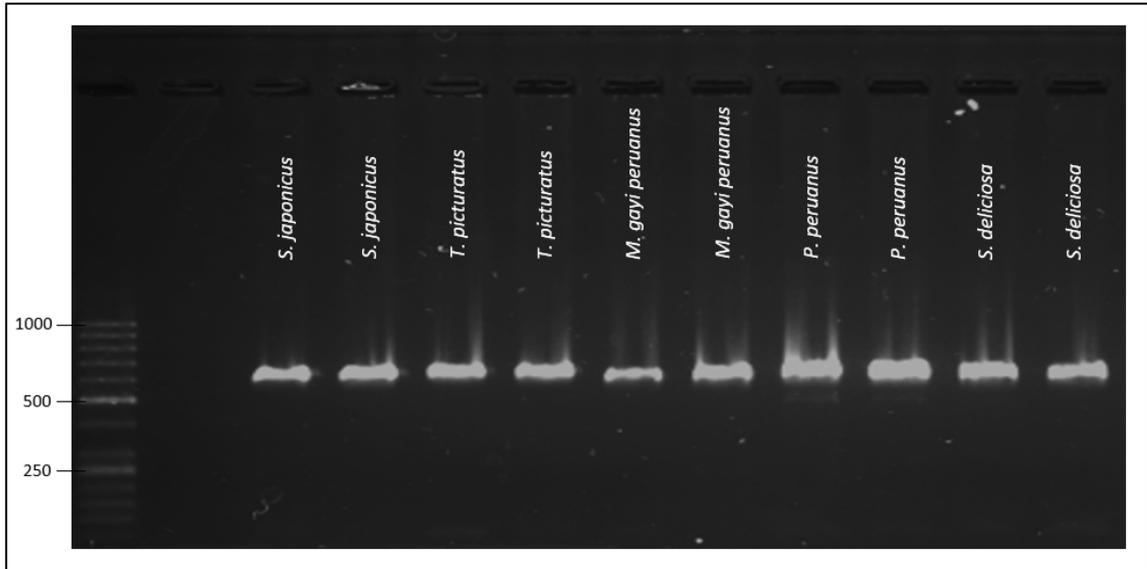


Figura 20: Perfil de restricción formado por la enzima *Hind III* y el gen *16S rDNA* en las especies *S. japonicus*, *T. picturatus*, *M. gayi peruanus*, *P. peruanus*, *S. deliciosa*.

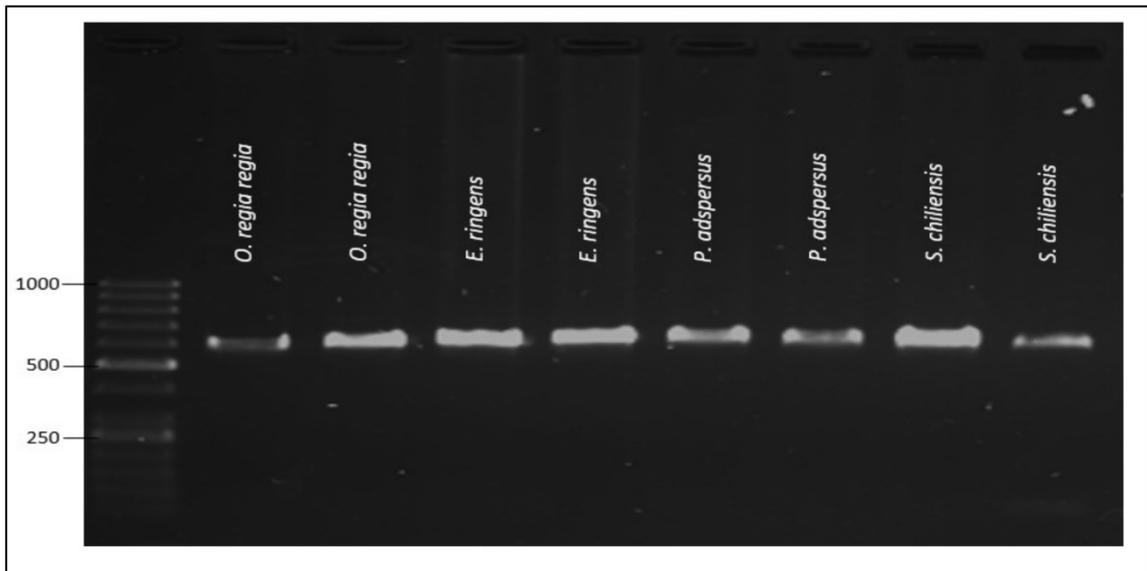


Figura 21: Perfil de restricción formado por la enzima *Hind III* y el gen *16S rDNA* en *O. regia regia*, *E. ringens*, *P. adspersus*, *S. chiliensis*.

**Anexo 4: Registro fotográfico de las 9 especies en estudio.**



Figura 22: *Odonthestes regia regia*



Figura 23: *Sarda chiliensis*



Figura 24: *Paralichthys peruianus*



Figura 25: *Sciaena deliciosa*



Figura 26: *Merluccius gayi peruanus*



Figura 27: *Trachurus picturatus*



Figura 28: *Paralichthys adspersus*



Figura 29: *Scomber japonicus*



Figura 30: *Engraulis Ringens*

# Identificación molecular de nueve principales especies ícticas marinas de interés pesquero – industrial, basado en el análisis por PCR-RFLP de los genes mitocondriales 16S rDNA y Citocromo Oxidasa I

*por Sissy Emperatriz Barrón Pérez*

---

**Fecha de entrega:** 16-may-2022 11:58a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1837698827

**Nombre del archivo:** Tesis\_Lista.pdf (4.74M)

**Total de palabras:** 20505

**Total de caracteres:** 133045

# Identificación molecular de nueve principales especies ícticas marinas de interés pesquero – industrial, basado en el análisis por PCR-RFLP de los genes mitocondriales 16S rDNA y Citocromo Oxidasa I

## INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

17%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | <a href="http://repositorio.lamolina.edu.pe">repositorio.lamolina.edu.pe</a><br>Fuente de Internet | 2% |
| 2 | <a href="http://cybertesis.unmsm.edu.pe">cybertesis.unmsm.edu.pe</a><br>Fuente de Internet         | 1% |
| 3 | <a href="http://repositorio.uns.edu.pe">repositorio.uns.edu.pe</a><br>Fuente de Internet           | 1% |
| 4 | <a href="http://eprints.ucm.es">eprints.ucm.es</a><br>Fuente de Internet                           | 1% |
| 5 | <a href="http://pt.scribd.com">pt.scribd.com</a><br>Fuente de Internet                             | 1% |
| 6 | <a href="http://repositorio.upch.edu.pe">repositorio.upch.edu.pe</a><br>Fuente de Internet         | 1% |
| 7 | <a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a><br>Fuente de Internet                           | 1% |
| 8 | <a href="http://ictiochile.cl.tripod.com">ictiochile.cl.tripod.com</a><br>Fuente de Internet       | 1% |

|    |  |      |
|----|--|------|
| 9  | conogasi.org<br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 10 | docplayer.es<br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 11 | repositorio.unsa.edu.pe<br>Fuente de Internet  | <1 % |
| 12 | digital.csic.es<br>Fuente de Internet  | <1 % |
| 13 | www.coursehero.com<br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 14 | www.redalyc.org<br>Fuente de Internet  | <1 % |
| 15 | sedici.unlp.edu.ar<br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 16 | repositorio.unp.edu.pe<br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 17 | Jean Philippe Salier, Vera Verga, Janine Doly, Maryam Diarra-Mehropour, Robert P. Erickson. "The genes for the inter-?-inhibitor family share a homologous organization in human and mouse", Mammalian Genome, 1992<br>Publicación | <1 % |
| 18 | "El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020", Food and Agriculture Organization of  | <1 % |

---

|    |  |      |
|----|--|------|
| 19 | Submitted to Universidad Anahuac México Sur<br>Trabajo del estudiante            | <1 % |
| 20 | repositorio.usfq.edu.ec<br>Fuente de Internet                                    | <1 % |
| 21 | dspace.unitru.edu.pe<br>Fuente de Internet                                       | <1 % |
| 22 | humboldt.iwlearn.org<br>Fuente de Internet                                       | <1 % |
| 23 | tdx.cat<br>Fuente de Internet  | <1 % |
| 24 | Submitted to Universidad de Las Palmas de Gran Canaria<br>Trabajo del estudiante | <1 % |
| 25 | repositorio.unjfsc.edu.pe<br>Fuente de Internet                                  | <1 % |
| 26 | idus.us.es<br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 27 | Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León<br>Trabajo del estudiante        | <1 % |
| 28 | doctor.cirdy.com<br>Fuente de Internet   | <1 % |

---

|    |  |      |
|----|--|------|
| 29 | <a href="http://repositorio.ug.edu.ec">repositorio.ug.edu.ec</a><br>Fuente de Internet                                   | <1 % |
| 30 | <a href="http://www.thefreelibrary.com">www.thefreelibrary.com</a><br>Fuente de Internet                                 | <1 % |
| 31 | Submitted to Universidad Nacional del Santa<br>Trabajo del estudiante  | <1 % |
| 32 | <a href="http://rasisbi.uqroo.mx">rasisbi.uqroo.mx</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 33 | <a href="http://148.206.53.84">148.206.53.84</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 34 | <a href="http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe">biblioimarpe.imarpe.gob.pe</a><br>Fuente de Internet                         | <1 % |
| 35 | <a href="http://repositorio.uigv.edu.pe">repositorio.uigv.edu.pe</a><br>Fuente de Internet                               | <1 % |
| 36 | <a href="http://repositorio.unjbg.edu.pe">repositorio.unjbg.edu.pe</a><br>Fuente de Internet                             | <1 % |
| 37 | <a href="http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es">www.investigacion.biblioteca.uvigo.es</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 38 | <a href="http://repositorio.untumbes.edu.pe">repositorio.untumbes.edu.pe</a><br>Fuente de Internet                       | <1 % |
| 39 | <a href="http://tintorero-wwwartesdepesca.blogspot.com">tintorero-wwwartesdepesca.blogspot.com</a><br>Fuente de Internet | <1 % |
| 40 | <a href="http://cybertesis.uach.cl">cybertesis.uach.cl</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |

|    |  |      |
|----|--|------|
| 41 | <a href="http://ddd.uab.cat">ddd.uab.cat</a><br>Fuente de Internet                                     | <1 % |
| 42 | <a href="http://repositorio.unfv.edu.pe">repositorio.unfv.edu.pe</a><br>Fuente de Internet             | <1 % |
| 43 | <a href="http://www.scribd.com">www.scribd.com</a><br>Fuente de Internet                               | <1 % |
| 44 | Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS<br>Trabajo del estudiante  | <1 % |
| 45 | <a href="http://repositorio.utelesup.edu.pe">repositorio.utelesup.edu.pe</a><br>Fuente de Internet     | <1 % |
| 46 | Submitted to Corporación Universitaria Remington<br>Trabajo del estudiante                             | <1 % |
| 47 | <a href="http://revistas.imarpe.gob.pe">revistas.imarpe.gob.pe</a><br>Fuente de Internet               | <1 % |
| 48 | <a href="http://www.repositoriodigital.ipn.mx">www.repositoriodigital.ipn.mx</a><br>Fuente de Internet | <1 % |
| 49 | <a href="http://repositorio.uwiener.edu.pe">repositorio.uwiener.edu.pe</a><br>Fuente de Internet       | <1 % |
| 50 | Submitted to Universidad de Ciencias y Humanidades<br>Trabajo del estudiante                           | <1 % |
| 51 | Submitted to University of the Western Cape<br>Trabajo del estudiante                                  | <1 % |

52

Submitted to colpos

Trabajo del estudiante

<1 %

---

53

repositorio.urp.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo