

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“UTILIZACIÓN DEL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE PESCADO EN LA
AMAZONÍA PERUANA”**

Presentada por:

JOSE LUIS RODRIGO LOYOLA LLORI

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2020

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 - Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“UTILIZACIÓN DEL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN PARA
IDENTIFICACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE PESCADO EN LA
AMAZONÍA PERUANA”**

Presentada por:

JOSE LUIS RODRIGO LOYOLA LLORI

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg.Sc. César Fernando López Bonilla
PRESIDENTE

Dra. Marta Williams León de Castro
MIEMBRO

Dra. Patricia Gil Kodaka
MIEMBRO

Ph.D. Gretty Katherina Villena Chávez
ASESORA

Dra. Carmen Rosa García Dávila
COASESORA

A mis padres

por el apoyo incondicional brindado a cada instante.

Rodrigo Loyola Llori

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP que financió esta tesis mediante el proyecto “Aplicación de marcadores moleculares (barcoding y metabarcoding) en la caracterización de peces ornamentales y de consumo de la Amazonía peruana y su aplicación en el monitoreo de la exportación, comercio y planes de manejo de los stocks pesqueros - FONDECYT”.

A la Dra. Carmen Rosa García Dávila, por permitirme realizar este trabajo, por asesorarme en esta investigación, por compartir sus conocimientos y corregir mis errores durante este proceso. Agradezco infinitamente sus alentadoras palabras para no desfallecer en el camino.

A la Dra. Gretty Villena Chávez, por sus acertadas correcciones que han contribuido a la mejora de este documento.

A Mayra Flores, Aaron Pajuelo, Diana Castro, Carlos Angulo, Eduardo Mejía, Oliver Bocanegra, Romina Jiménez, José Vértiz, Lucero Pinedo, Guillain Estivals, Christian Nolorbe, Aurea García, David Aldana, María Sánchez, Rossana Díaz, Hugo Panduro, Luis Zafra, Antonio Dávila, Estephane Reyes, Ingrid Sánchez, Audrey Núñez, Clint Chirinos, Simon P, Daniela Campanini y todas las personas que de alguna u otra manera estuvieron conmigo durante el desarrollo de esta investigación, por sus consejos, por la amistad brindada, por los conocimientos y las experiencias compartidas. Los momentos con ustedes fueron únicos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. IMPORTANCIA DEL PESCADO	4
2.2. EL MERCADO DE SUBPRODUCTOS PESQUEROS	5
2.3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	6
2.3.1. Antecedentes.....	6
2.3.2. El ADN mitocondrial	7
2.3.3. El código de barras de ADN	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. COLECTA DE MUESTRAS.....	10
3.2. EXTRACCIÓN DE ADN.....	10
3.3. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MITOCONDRIAL	11
3.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	11
3.5. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DE ADN Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS	111
3.6. DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD GENÉTICA.....	12
3.7. DENOMINACIÓN DE LAS MUESTRAS	13
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	154
4.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	155
4.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	177
4.4. COMPARACIÓN DE LAS TASAS DE SUSTITUCIÓN ENTRE LOS TIPOS DE SUBPRODUCTOS	21
4.5. DIFERENCIAS DE LAS TASAS DE SUSTITUCIÓN SEGÚN EL ORDEN Y ESTACIONALIDAD DE LAS MUESTRAS.....	22
4.6. ESPECIES SUSTITUTAS POR PERÍODOS HIDROLÓGICOS Y POR CIUDADES DE ORIGEN	23
4.7. ESPECIES IDENTIFICADAS EN LOS SUBPRODUCTOS.....	25

4.8. DISCUSIÓN	277
V. CONCLUSIONES.....	34
VI. RECOMENDACIONES	35
VII. BIBLIOGRAFÍA	36
VIII. ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cuantificación de ADN en muestras de subproductos pesqueros (carne picada, filete fresco y filete seco salado)	154
Tabla 2: Especies de peces identificadas en carne picada, con sus respectivos autores y números de acceso en el GenBank.....	177
Tabla 3: Especies de peces identificadas en filete fresco, con sus respectivos autores y números de acceso en el Genbank	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organización del genoma mitochondrial humano, el cual posee los mismos genes y a misma organización de genes que el ADN mitocondrial de otros animales.....	7
Figura 2: Geles de agarosa al dos por ciento	166
Figura 3: Dendograma de las secuencias de haplotipos (H) del subproducto carne picada de pescado, construido bajo el criterio de vecino próximo (Neighbour-Joining).....	188
Figura 4: Dendograma de las secuencias de haplotipos (H) del subproducto filete fresco de pescado, construido bajo el criterio de vecino próximo (Neighbour-Joining).....	200
Figura 5: Dendograma de las secuencias de haplotipos (H) del subproducto filete seco salado de pescado, construido bajo el criterio de vecino próximo (Neighbour-Joining).	211
Figura 6: Tasa de sustitución de especies en subproductos pesqueros (a), carne picada (b), filete fresco (c) y filete seco salado (d)	222
Figura 7: Tasa de sustitución en subproductos pesqueros amazónicos según ciudad de origen y período hidrológico.	233
Figura 8: Proporción de especies sustitutas en subproductos pesqueros según el período hidrológico durante el cual fueron colectados.....	244
Figura 9: Proporción de especies sustitutas en subproductos pesqueros según la ciudad donde fueron colectados.	255
Figura 10: Especies de peces utilizadas como sustitutas en la comercialización de subproductos de carne picada.....	266
Figura 11: Especies de peces utilizadas como sustitutas en la comercialización de subproductos de filete fresco	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Modelo de ficha de registro de información durante la colecta de muestras de subproductos pesqueros.....	46
Anexo 2: Precios promedio (en soles) por kilogramo de pescado en los mercados de las ciudades de Iquitos y Pucallpa	47

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo identificar molecularmente los subproductos pesqueros comercializados en la Amazonía peruana a nivel de especie. Fueron colectados 139 muestras de diferentes subproductos pesqueros (66 filetes frescos, 16 muestras de carne picada y 57 filetes seco-salados), en los mercados de las ciudades de Iquitos y Pucallpa durante los períodos hidrológicos de vaciante y creciente. La identificación molecular fue realizada mediante la secuenciación del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI). Los resultados muestran que el 47 por ciento de las muestras colectadas fueron reemplazadas por otras especies, observándose una relación positiva entre el grado de procesamiento de la carne de pescado y el nivel de sustitución de especie (94, 76 y 0 por ciento en carne picada, filete fresco y filete seco salado, respectivamente). La tasa de sustitución fue significativamente mayor en Pucallpa que en Iquitos (60 y 36 por ciento, respectivamente), asimismo fue ligeramente superior en creciente que en vaciante (49 y 44 por ciento, respectivamente), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significantes. La elevada tasa de sustitución encontrada en este estudio está directamente relacionada con el grado de procesamiento de la carne de pescado y con la disponibilidad de especies sustitutas en los diferentes períodos hidrológicos. La sustitución es intencional y motivada por la falta de un sistema efectivo de monitoreo y fiscalización, la aplicación del código de barras como herramienta para la identificación de especies podría disminuir los niveles de fraude en la sustitución de especies de subproductos y modernizar el sector pesquero con miras a la exportación hacia mercados internacionales.

Palabras clave: código de barras de ADN, peces amazónicos, citocromo c oxidasa (COI), fiscalización, sustitución de especies.

ABSTRACT

The objective of this study was to identify by molecular methods the fishing by-products commercialized in the Peruvian Amazon at the species level. We collected 139 samples of different fishing by-products (66 fresh fillets, 16 samples of minced flesh and 57 dry-salted fillets), in the markets of the cities of Iquitos and Pucallpa during the dry and wet seasons. Molecular identification was performed by sequencing the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. The results show that 47 percent of the samples collected were replaced by other species, observing a positive relationship between the degree of processing of the fish flesh and the level of substitution of species (94, 76 and 0 percent in minced flesh, fresh fillets and dry-salted fillets, respectively). The substitution rate was significantly higher in Pucallpa than in Iquitos (60 and 36 percent, respectively), it was also slightly higher in wet than in dry season (49 and 44 percent, respectively), although these differences were not statistically significant. The high substitution rate found in this study is directly related to the degree of processing of fish flesh and to the availability of substitute species in different seasons. The substitution is deliberate and motivated by the lack of an effective monitoring and inspection system, the application of the DNA barcoding as a tool for the identification of species could reduce the levels of fraud in the substitution of fishery by-product species and upgrade the fishing sector with the aim to reach international markets.

Key words: DNA barcoding, Amazonian fish, COI, inspection, substitution of species.

I. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad ictiológica de los ríos, quebradas y cochas de la Amazonía peruana representa un potencial económico para la población local. La comercialización de estos recursos podría generar desarrollo económico en la zona si se logra su expansión hacia nuevos mercados nacionales e internacionales (Ardura, Pola, Ginuino, Gomes, y Garcia-Vazquez, 2010; Ardura, Pola, Linde, y Garcia-Vazquez, 2010). Para lograr esto, antes se tienen que cumplir varios requisitos, entre ellos, elevar el nivel sanitario en la cadena de producción y procesamiento, así como garantizar la veracidad de la información brindada en el etiquetado, es decir que la especie consignada corresponda con el contenido del mismo. Esto forma parte de las exigencias internacionales de los mercados de consumo de productos y subproductos alimenticios (D'Amico, Armani, Gianfaldoni, y Guidi, 2016; Food and Drug Administration, 2017; Organización Mundial de la Salud y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2007; The European Parliament and The Council of the European Union, 2013). En este último requerimiento, el código de barras de ADN podría cumplir un papel fundamental para la identificación de especies taxonómicas en alimentos de origen animal y vegetal.

Fragmentos estandarizados de ADN han sido exitosamente utilizados como código de barras para la identificación de individuos a nivel de especie en diferentes partes del mundo (Barcaccia, Lucchin, y Cassandro, 2015; Hebert, Cywinska, Ball, y deWaard, 2003; Luo et al., 2011; Scarano y Rao, 2014). La secuencia del gen citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) ha sido empleada para la discriminación de especies en vertebrados (Hebert, Stoeckle, Zemplak, y Francis, 2004; Henriques et al., 2015; Hubert et al., 2008; L. H. G. Pereira, Maia, Hanner, Foresti, y Oliveira, 2011; L. H. G. Pereira, Hanner, Foresti, y Oliveira, 2013; Zhang & Hanner, 2011) e invertebrados (Cywinska, Hunter, & Hebert, 2006; Hebert, Penton, Burns, Janzen, & Hallwachs, 2004; Maturana et al., 2011), incluso, en estadios tempranos del desarrollo de los peces (García-Dávila et al., 2014; Hubert, Delrieu-Trottin, Irisson, Meyer, & Planes, 2010), así como a partir de restos de material biológico o partes de un organismo (Dawnay, Ogden, McEwing, Carvalho, & Thorpe, 2007).

En los últimos años, la globalización y los avances en los medios de transporte y sistemas de conservación han permitido la exportación e importación de grandes volúmenes de alimentos entre diversos lugares del mundo, lo que ha suscitado emergencias en la salud pública debido al consumo de alimentos adulterados y/o contaminados (Barcaccia et al., 2015; D'Amico et al., 2016; Jacquet & Pauly, 2008). Esto ha generado que los fiscalizadores y consumidores demanden mayor calidad y un correcto etiquetado en los productos que consumen (Barbuto et al., 2010; Barcaccia et al., 2015; Bottero & Dalmaso, 2011; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018). Por ejemplo, en el sector pesquero se da oportunidad al fraude de los productos debido a que algunas especies de peces presentan plasticidad morfológica en sus caracteres diferenciales (Bottero & Dalmaso, 2011), esto puede generar que dos o más especies sean denominadas con el mismo nombre vulgar según la región en que se encuentren o que individuos de una misma especie puedan recibir distintos nombres en base a pequeñas diferencias entre ellos (Barbuto et al., 2010; Galimberti et al., 2013), lo cual dificulta el correcto monitoreo de su comercialización. Este problema se agudiza cuando se trata de subproductos de peces (enlatado, filete, rodaja, surimi, salado) donde los caracteres diferenciales o diagnósticos no están presentes o son difusos, obstaculizando su correcta identificación a nivel de especie (Barbuto et al., 2010; Céspedes et al., 1999; Scarano & Rao, 2014), y permitiendo muchas veces la sustitución de una por otra. Esto perjudica no solo la economía del consumidor que recibe un subproducto de menor calidad elaborado en base a una especie distinta a la que supuestamente está comprando (Scarano & Rao, 2014; Wong & Hanner, 2008); sino que también, perjudica los planes de manejo sostenido de las especies, al sobreestimar sus poblaciones naturales. Finalmente, la sustitución de especies puede tener un efecto negativo para la salud del consumidor, ya que la declaración fraudulenta de una especie puede estar enmascarando su procedencia de áreas contaminadas donde la pesca para consumo humano está prohibida (Filonzi, Chiesa, Vaghi, & Nonnis Marzano, 2010). La aplicación del código de barras de ADN para la identificación específica de subproductos, es una herramienta válida para la solución de problemas relacionados al fraude comercial en productos para consumo humano. Diversos estudios realizados con muestras de pescado fresco y procesado adquiridos en mercados, supermercados y restaurantes, corroboran su eficacia (Ardura, Pola, Ginuino, et al., 2010; Barbuto et al., 2010; Daniel C. Carvalho, Neto, Brasil, & Oliveira, 2011; Cline, 2012). Tal es así que la FDA (EU) ha propuesto al código de barras de ADN como una herramienta adicional para la identificación de productos pesqueros (Yancy et al., 2008).

Con el fin de contribuir a la modernización y mejor fiscalización del sector pesquero peruano y permitir su apertura hacia nuevos espacios de comercio nacional e internacional, se planteó utilizar el código de barras de ADN para identificar, a nivel de especie, subproductos de peces (filete fresco, carne picada y filete seco salado) comercializados durante los períodos hidrológicos de vaciante y creciente, en las ciudades de Iquitos y Pucallpa, así como estimar el nivel de sustitución de las especies en los distintos subproductos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. IMPORTANCIA DEL PESCADO

El pescado es una fuente de alimento con un alto nivel de proteínas, contiene ácidos grasos esenciales y micronutrientes importantes como las vitaminas y los minerales que aportan beneficios para la salud (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018; Organización Mundial de la Salud, 2003). Su consumo por persona, a nivel mundial, ha aumentado considerablemente desde 9,0 kg en 1961 a 20,2 kg en 2015, y con una estimación de 20,5 kg para el año 2017 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018). Sin embargo, el consumo per cápita en el Perú fue inferior al mundial en 2018, alcanzando un valor de 16,8 kg (Ríos, 2019). En la Amazonía peruana, el pescado es la principal fuente de proteína, y su consumo promedio superó los 36 kg en 2014 (Programa Nacional A comer pescado. Unidad de Gestión Estratégica y Evaluación, 2015). Es importante mencionar que en esta región, la dieta está fuertemente ligada a factores culturales y a la disponibilidad de recursos en los medios naturales.

Hasta hace algunos años, la producción de la pesca de captura superaba con una gran diferencia a la acuicultura. Actualmente, el sector acuícola ha incrementado su volumen de producción, alcanzando 80 millones de toneladas (28,7 marina y 51,4 continental) en 2016, en tanto que la pesca de captura reportó 90,9 millones de toneladas (79,3 procedentes de aguas marinas y 11,6 de aguas continentales) para el mismo año (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018). Este crecimiento se ha visto reflejado en la oferta de pescado, provocando, en parte, que el consumo se haya elevado a nivel mundial (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018). La pesca en la Amazonía peruana, con una producción inferior en contraste con la pesca marítima, representa un sector importante para la población local al ser generadora de empleo y contribuir a la seguridad alimentaria y nutricional, así como al crecimiento y desarrollo económicos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018). En 2017, los desembarques fueron liderados por la región Loreto con 15,6 miles de toneladas métricas, seguido por Ucayali con 9 mil toneladas métricas, superando con una gran diferencia al sector acuícola, el cual reportó una

producción aproximada de 1583 toneladas métricas de pescado (Ministerio de la Producción, 2018).

2.2. EL MERCADO DE SUBPRODUCTOS PESQUEROS

La enorme diversidad ictiológica que habita en los diversos sistemas acuáticos de la Amazonía peruana se ve reflejada en los mercados locales, donde son comercializados como pescados enteros o como subproductos (filete fresco, carne picada y filete seco salado). Si bien algunas especies como el boquichico *Prochilodus nigricans* tienen una representación importante en los reportes de desembarque pesquero debido a su gran disponibilidad y alta demanda, existen otras especies como los bagres (Siluriformes, Pimelodidae) que también son solicitados por la población local. Con la finalidad de conocer las preferencias del consumidor extranjero respecto del pescado amazónico, se realizaron estudios de mercado en varios países europeos, obteniendo resultados satisfactorios (Mueller, 2006). Actualmente, las especies con mayor aceptación a nivel nacional e internacional son el paiche y la doncella, debido a características como el excelente sabor de la carne, la calidad nutricional y la ausencia de espinas intramusculares, facilitando esta última el proceso de obtención de filetes de pescado (Alván-Aguilar, Chu-Koo, Baluarte Monge, Collado Panduro, & Velarde Ríos, 2016; Chu-Koo et al., 2012; Fernández-Méndez et al., 2012; Schaefer, Kloas, & Wuertz, 2012). Aunque los volúmenes de exportación aún son bajos, la apertura hacia los mercados internacionales ha permitido que varias empresas dedicadas a la acuicultura exporten carne de paiche hacia Estados Unidos, España, Países Bajos, Alemania, Canadá, Bélgica y Emiratos Árabes Unidos, con proyecciones alentadoras (Alván-Aguilar et al., 2016; Chu-Koo et al., 2012; Ministerio de la Producción, 2018). Entre los años 2010 y 2017, el Perú generó 5 millones de dólares americanos en divisas a partir de la exportación de 372 TMB de carne de paiche, teniendo como destino principal Estados Unidos (Ministerio de la Producción, 2018).

En la actualidad, el comercio de pescado viene siendo regulado, principalmente, por barreras económicas y sanitarias (Neto, 2013). Además, la certificación de los productos pesqueros ha tomado gran importancia debido a los daños en la salud pública causados por el consumo de especies adulteradas y/o contaminadas (Barcaccia et al., 2015; Jacquet & Pauly, 2008). Para evitar estas prácticas fraudulentas, diversos países han adoptado una serie de medidas para fiscalizar las importaciones de subproductos pesqueros. Por ejemplo, la Agencia de drogas y alimentos (FDA) de los Estados Unidos implementó y validó el código de barras de ADN para identificar productos ictiológicos (Handy et al., 2011; Yancy et al., 2008). Asimismo, el gobierno federal de Brasil ha

adoptado la misma tecnología con el propósito de fiscalizar los productos pesqueros procesados (Daniel Cardoso Carvalho, Guedes, da Gloria Trindade, Coelho, & de Lima Araujo, 2017).

2.3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

2.3.1. ANTECEDENTES

Los análisis de proteínas y metabolitos involucran ensayos inmunológicos, electroforéticos y cromatográficos, y han sido muy utilizados para la identificación de especies en diversos alimentos. Si bien estos exámenes son efectivos para la evaluación de productos frescos, resultan poco útiles para el análisis de muestras procesadas industrialmente (congelación, salazón, calor, presión, secado, pH, irradiación, entre otros), debido a que la estructura molecular de sus componentes ha sido alterada (Ballin, 2010; Bottero & Dalmaso, 2011; Ferrari, Corser, Salas, & Barboza, 1999; Galimberti et al., 2013; Scarano & Rao, 2014). Además, la síntesis de diversas proteínas y metabolitos se realiza, con frecuencia, en tejidos específicos (Lockley & Bardsley, 2000), lo cual dificulta la posibilidad de estandarizar la etapa de muestreo. Por otro lado, el ADN es una molécula altamente estable y está presente en todas las células, lo cual permite realizar análisis confiables a partir de cualquier muestra que ha sido sometida a procesamiento (Fajardo, González, Rojas, García, & Martín, 2010; Lockley & Bardsley, 2000; Scarano & Rao, 2014). Asimismo, el ADN proporciona mayor información gracias a la existencia de regiones no codificantes y a la degeneración del código genético (Lockley & Bardsley, 2000).

En general, los métodos basados en el ADN son clasificados en dos grupos: marcadores basados en hibridación y marcadores basados en PCR (Galimberti et al., 2013). En el primer caso, se utilizan sondas de ADN marcadas, las cuales se hibridan con muestras de ADN genómico fijadas a membranas de nylon (Galimberti et al., 2013; Lockley & Bardsley, 2000). Los métodos basados en PCR consisten en la hibridación de cebadores a regiones específicas del ADN para realizar, gracias a la acción de la enzima ADN polimerasa, la síntesis de millones de copias de ADN flanqueados por estos oligonucleótidos (Fajardo et al., 2010; Galimberti et al., 2013; Lockley & Bardsley, 2000). Finalmente, los productos de la amplificación pueden ser analizados mediante diversos métodos como electroforesis en gel, secuenciación, polimorfismo de conformación en cadena sencilla (SSCP), amplificación múltiple (multiplex PCR), polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), amplificación en tiempo real, microsatélites (SSR), microarreglos de ADN, entre otros (Aguilar, Alonso, & Barrero, 2012; Céspedes et al., 1999; Fajardo et al., 2010; Ghovvati, Nassiri, Mirhoseini, Moussavi, & Javadmanesh, 2009; Lockley & Bardsley, 2000; Scarano & Rao, 2014).

2.3.2. EL ADN MITOCONDRIAL

El ADN mitocondrial es una molécula circular de doble cadena que se ubica en el interior de las mitocondrias, y cuya longitud aproximada es de 16 kb (Saccone, De Giorgi, Gissi, Pesole, & Reyes, 1999). Su organización estructural se puede apreciar en la Fig. 1, la cual comprende una región codificante (dos genes de ARNr, 22 de ARNt y 13 que codifican proteínas) y una no codificante (región control o D-loop) que regula los procesos de replicación y transcripción (Alberts et al., 2002; Saccone et al., 1999). El genoma mitocondrial posee muchas ventajas, entre las cuales se encuentran la ausencia de intrones, una baja exposición a procesos de recombinación, su elevado número de copias en cada célula, su carácter haploide y su herencia por vía materna (Bucklin, Steinke, & Blanco-Bercial, 2011; Saccone et al., 1999). La gran cantidad de copias de ADNm por célula permite incrementar el éxito en el proceso de detección de secuencias específicas, incluso cuando se dispone de poca cantidad de ADN, o cuando se emplean muestras antiguas o deterioradas (Bottero & Dalmaso, 2011). De otro lado, la herencia uniparental (por vía materna), da como resultado individuos que poseen un solo alelo (Alberts et al., 2002; Lockley & Bardsley, 2000). Otra característica importante es la alta tasa de mutación, que suele ser de hasta 10 veces más que la del genoma nuclear, lo que podría estar relacionado a la reducida eficiencia de los mecanismos de replicación y/o reparación (Alberts et al., 2002). Esta elevada tasa de evolución permite la acumulación de mutaciones puntuales que permiten la discriminación de especies muy relacionadas (Lockley & Bardsley, 2000).

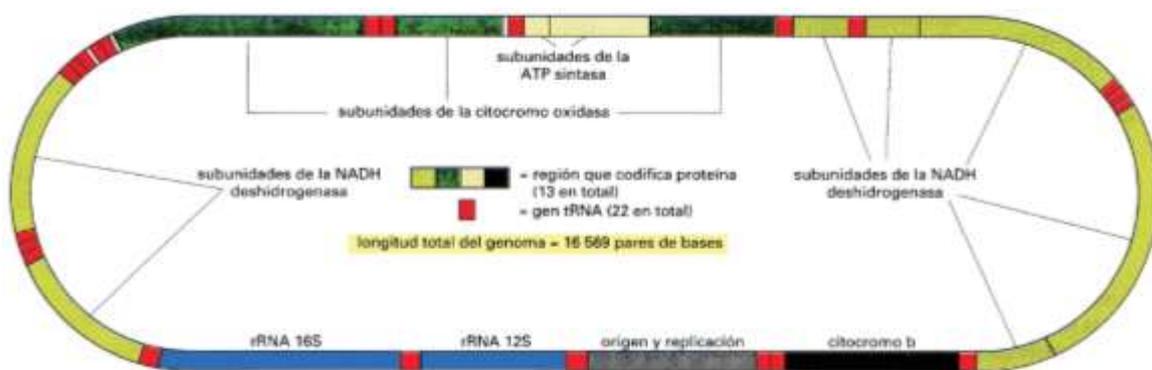


Figura 1: Organización del genoma mitochondrial humano, el cual posee los mismos genes y a misma organización de genes que el ADN mitocondrial de otros animales (Alberts et al., 2012).

2.3.3. EL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN

Desde hace algunos años, la identificación de especies se ha vuelto necesaria para clasificar y monitorear la enorme biodiversidad existente en el planeta (Casiraghi, Labra, Ferri, Galimberti, & De Mattia, 2010). Este gran trabajo, la caracterización genética de los organismos vivos, se

inició en 2004 con el Proyecto Código de Barras de ADN (Barcoding Project, en inglés), que tiene como objetivo construir, hasta 2024, una biblioteca de códigos de barras de ADN para toda la vida eucariota (Bucklin et al., 2011; Ratnasingham & Hebert, 2007). Desde su propuesta, esta herramienta ha sido de gran utilidad debido a que ha revolucionado diversos campos científicos, no sólo por su poder discriminatorio, sino también, porque involucra la molecularización, computarización y estandarización del proceso de identificación de especies (Barcaccia et al., 2015; Casiraghi et al., 2010). El código de barras de ADN se fundamenta en la amplificación y secuenciación de fragmentos cortos de ADN mitocondrial o cloroplástico para que las secuencias obtenidas sean comparadas con secuencias de referencia disponibles en las bases de datos como BOLD (www.boldsystem.org) o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) (Barcaccia et al., 2015).

Según Hebert et al. (2003), el código de barras de ADN funciona como el código de barras universal de los productos comerciales, los cuales emplean 10 dígitos ubicados en 11 posiciones. Este ordenamiento numérico puede generar hasta 100 billones de identificadores únicos para un determinado producto. De forma similar, el código de barras de ADN utiliza cuatro posibles nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina) ubicados a lo largo de la cadena de ADN, la diferencia es la gran extensión de la región genómica que consta de más de 11 posiciones. De este modo, cada taxón puede ser identificado porque presenta una secuencia única de código de barras de ADN.

En animales, la región que ha sido propuesta como código de barras estándar es el gen que codifica la subunidad 1 de la proteína citocromo c oxidasa (*cox1* o COI), de aproximadamente 650 pb (Hebert et al., 2003). Esta proteína forma parte del complejo respiratorio transmembrana IV, el cual participa en la última etapa de la cadena transportadora de electrones. La región COI carece de inserciones y deleciones (indels) como otros genes mitocondriales que codifican proteínas, evitando algún tipo de desajuste en la pauta de lectura de la cadena de nucleótidos (Pires & Marinoni, 2010), y por consiguiente, permitiendo el alineamiento de secuencias y el análisis comparativo de las mismas (Bucklin et al., 2011). Entre las razones más importantes para la elección de la región COI sobre otras regiones mitocondriales codificadoras de proteínas, están el amplio espectro taxonómico, causado por la universalidad de los cebadores COI, que permiten una correcta amplificación del extremo 5' de dicha región genómica para la mayoría de representantes del filo animal (Barcaccia et al., 2015; Hebert et al., 2003; Pires & Marinoni, 2010). Por otro lado, COI muestra una rápida tasa de sustitución de nucleótidos a nivel de la tercera posición de cada codón, lo cual se traduce en un alto poder de resolución o rango de señal

filogenética, permitiendo la discriminación, no sólo, de especies estrechamente relacionadas (Barcaccia et al., 2015; Hebert et al., 2003; Pires & Marinoni, 2010), sino también, la variación intraespecífica de las poblaciones geográficamente aisladas (Bucklin et al., 2011). Además, el análisis de las secuencias COI de numerosas especies ha evidenciado un patrón de variación característico, con una marcada divergencia y ausencia de solapamiento entre las distancias genéticas intraespecífica e interespecífica (Hebert et al., 2003). En general, la variabilidad entre las especies evaluadas debe ser mucho mayor que la encontrada entre organismos de una misma especie (Galimberti et al., 2013).

El poder discriminatorio del código de barras de ADN, basado en la región COI, ha sido probado exitosamente en distintos grupos de animales como aves (Hebert, Stoeckle, et al., 2004), peces marinos y de aguas continentales (Henriques et al., 2015; Hubert et al., 2008; L. H. G. Pereira et al., 2011; L. H. Pereira et al., 2013; Steinke, Zemlak, & Hebert, 2009; Zhang & Hanner, 2011) y diversos grupos de invertebrados (Cywinska et al., 2006; Hebert, Penton, et al., 2004; Maturana et al., 2011), así como también, para la identificación de especies en determinados estadios de vida (García-Dávila et al., 2014; Hubert et al., 2010) y a partir de fracciones de un organismo o trazas de material biológico (Dawnay et al., 2007). Sin embargo, el poder de resolución de la región COI presenta serias dificultades cuando se trata de discriminar especies estrechamente relacionadas entre las esponjas (Filo Poríferos), medusas peine (Filo Ctenóforos), corales y anémonas (Filo Cnidarios), debido a que la tasa de evolución es de 10 a 20 veces menor que en los demás filos (Bucklin et al., 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COLECTA DE MUESTRAS

Fueron colectadas 139 muestras de subproductos pesqueros (filete fresco, filete seco salado y carne picada) en mercados de las ciudades de Iquitos y Pucallpa durante la vaciante de 2016 y la creciente de 2017. Se utilizó una ficha de registro (Anexo 1) donde se anotó el nombre común declarado por el comerciante, el lugar y la fecha de colecta. 77 de las 139 muestras analizadas fueron colectadas en la ciudad de Iquitos y estuvieron conformadas por carne picada, filete fresco y filete seco salado (10, 32 y 35, respectivamente), estas muestras fueron obtenidas a partir de 39 comerciantes. En la ciudad de Pucallpa fueron colectadas 62 muestras que fueron compuestas, también, por carne picada, filete fresco y filete seco salado (6, 34 y 22, respectivamente); estos subproductos fueron adquiridos a partir de 30 comerciantes. Cada muestra de carne picada fue sometida a un submuestreo totalmente al azar, el cual consistió en colocar los cubitos en casilleros numerados de un tablero; se eligieron 10 submuestras mediante un sorteo. Finalmente, una porción de tejido muscular de cada muestra y submuestra fue conservada en alcohol al 96 por ciento dentro de tubos correctamente codificados, hasta su posterior análisis en el laboratorio.

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó por el método CTAB (Doyle & Doyle, 1990). Los pasos del protocolo son descritos a continuación:

Colocar aproximadamente 100 mg de tejido muscular triturado en un microtubo de 2 ml conteniendo 1 ml de tampón de extracción (CTAB 5 por ciento, NaCl 5 M, EDTA 0.5 M pH 8, Tris Base 1M) y 10 µl de proteinasa K 10 mg/ml. Digerir la muestra a 60 °C por 24 horas. Separar el material genómico adicionando 1 ml de cloroformo y centrifugando a 8 000 rpm por 5 minutos. Colectar 500 µl del sobrenadante en un microtubo de 1,5 ml. Adicionar 750 µl de isopropanol frío, mezclar por inversión y dejar precipitando el ADN por 2 horas a -20 °C. Centrifugar a 13 000 rpm por 15 minutos para formar el pellet de ADN. Lavar el pellet con etanol al 70 por ciento, realizar esta etapa dos veces, y centrifugar a 13 000 rpm por 15 minutos. Finalmente, secar el pellet en una centrífuga al vacío por 15 minutos y resuspender en 30 µl de agua ultra pura.

La calidad y concentración de ADN se determinó mediante el método de espectrofotometría (Sambrook et al. 1989), utilizando un Biofotómetro. La absorbancia se midió utilizando las longitudes de onda de 260 y 280 nm. Se trabajó con un factor de dilución (FD) de 100 ng/μl. La calidad del ADN extraído fue evaluada en un rango de aceptación entre 1,7 y 2,1 (A_{260}/A_{280}) y la concentración del ADN se determinó con la fórmula [$A_{260} \times \text{FD} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$], donde A es absorbancia y FD es el factor de dilución (1:100).

3.3. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MITOCONDRIAL

El ADN fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los cebadores del gen citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI): FishF1 5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3' y FishR1 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3' (Ward, Zemlak, Innes, Last, & Hebert, 2005).

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl, conteniendo 100 ng/μl de ADN molde (1,5 μl), 10X de tampón (2 μl), 2 mM de dNTPs (2 μl), 25 mM de MgSO₄ (1,2 μl), 10 μM de cada cebador (0,6 μl), 1U/μl de Taq ADN polimerasa (0,4 μl) y 11,7 μl de agua ultra pura. Las condiciones de temperatura fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguidos de 35 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 54 °C por 40 s y extensión a 72 °C por 1 min), terminando con una extensión final a 72 °C por 10 min.

3.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los amplicones fueron verificados en geles de agarosa al dos por ciento. Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de siembra (1 μl de GelRed, 499 μl de agua ultra pura y 1500 μl de azul de bromofenol) en la proporción 3:3, y fueron cargados en los pocillos del gel. Se realizó la migración molecular en tampón TBE 1X, a 100 V durante 20 minutos. Para visualizar los productos amplificados se utilizó un transiluminador UV y los resultados fueron fotodocumentados mediante el sistema de imagen KODAK modelo GEL LOGIC 100.

3.5. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DE ADN Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS

La reacción de secuenciación de ADN estuvo basada en el método enzimático de incorporación de didesoxinucleótidos (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). Se realizó en una sola dirección (forward) y se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler ProS, utilizando un kit comercial de secuenciación ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing. El volumen final de reacción fue de 10 μl, conteniendo solución de amplicones (4 μl), BigDye (0,8 μl), cebador FishF1 10 μM (0,8 μl) y agua ultra pura (4,4 μl). El perfil de temperatura consistió de una

desnaturalización inicial a 96 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 96 °C por 15 s, hibridación a 50 °C por 15 s, extensión a 60 °C por 4 min), y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los fragmentos obtenidos en la reacción de secuenciación fueron purificados. Se agregó isopropanol al 65 por ciento (40 µl) y se mezcló vigorosamente. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 20 min, se centrifugó a 14000 rpm por 25 min y el sobrenadante fue descartado por inversión. El pellet fue lavado con etanol al 60 por ciento (200 µl) y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. El etanol fue extraído con una micropipeta y se realizó el secado en una centrífuga al vacío a 45 °C por 15 min. El pellet de ADN obtenido fue resuspendido en formamida (10 µl) y sometido a un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 3 min y a 4 °C por 2 min. Los fragmentos purificados fueron analizados mediante electroforesis capilar en un analizador genético 3130XL (Applied Biosystems), siguiendo la metodología del fabricante. Los datos fueron visualizados a través del software Sequencing Analysis v5.3.1.

3.6. DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD GENÉTICA

Las secuencias de ADN obtenidas a partir de muestras de subproductos de pescado fueron editadas utilizando los softwares BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999) y Chromas 2.6.2; este último permitió corroborar la veracidad de las bases a través de la visualización de los electroferogramas. Las secuencias fueron separadas por tipo de subproductos, generando tres matrices. Posteriormente, se adicionaron 142 secuencias de individuos adultos correctamente identificados de la base de datos del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) y depositadas en el GenBank de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), con el fin de alinear todas las secuencias. Para esta etapa se utilizó el programa de alineamiento múltiple ClustalW (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) que está dentro del software BioEdit (Hall, 1999). Las secuencias de referencia utilizadas en este estudio fueron empleadas por otros autores para la identificación de larvas de peces (García-Dávila et al., 2015; Maggia et al., 2017). Los extremos de las secuencias con mayor número de bases fueron recortados para igualarlos con aquellas más cortas, obteniéndose matrices conformadas por secuencias de 506 pares de bases. Fue utilizado el software DNAsp versión 5.10 (Librado & Rozas, 2009) para saber cuántas secuencias de subproductos comparten exactamente la misma información de bases nitrogenadas en cada matriz analizada; estas secuencias fueron denominadas haplotipos.

Para la identificación de los subproductos a nivel de especie, se realizaron los siguientes pasos: i) se determinó el modelo de evolución molecular para cada una de las tres matrices de haplotipos de subproductos con ayuda del software Mega versión 5.05 (Tamura et al., 2011); ii) se eligió el mejor modelo evolutivo para cada grupo de datos a partir de 24 modelos alternativos y de acuerdo a los valores de criterio de información Akaike – AIC (Akaike, 1974) basado en análisis de filogenia y evolución (APE); el mejor modelo de evolución para las matrices de carne picada y filete fresco fue T92+G, mientras que para la matriz de filete seco salado fue T92. iii) Se construyó el árbol de vecino-próximo (neighbor-joining) para cada una de las matrices, utilizando el software MEGA versión 5.05 (Tamura et al., 2011); el nivel de confianza de las relaciones genéticas fue determinado mediante el método no paramétrico de bootstrap (Felsenstein, 1985), con cien réplicas.

3.7. DENOMINACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los nombres comunes utilizados en el presente trabajo son aquellos con los que las especies son comercializadas en los diferentes mercados del área de estudio, y también con los que son registrados en los desembarques pesqueros de las Direcciones Regionales de la Producción (DIREPRO) de Loreto y Ucayali. Se consideró sustitución cuando la especie taxonómica identificada no corresponde a la especie declarada por los comerciantes.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las muestras fueron tratadas en base a un análisis estadístico descriptivo, tomando en cuenta el porcentaje de sustitución de especies en las muestras, por tipo de subproducto, por ciudad de origen, y por período hidrológico. La tasa de sustitución es el cociente entre el número de muestras sustituidas y el total de muestras analizadas, multiplicado por cien. Los datos obtenidos fueron comparados utilizando la prueba de independencia G incluida en el software BioEstat (Ayres, Ayres Jr, Ayres, & Dos Santos, 2007), cuya fórmula computacional es la siguiente:

$$G = 2 \left[\sum f_i \ln(f_i / \overset{\circ}{f}_i) \right],$$

Donde, a es el número de clases o categorías, f_i es la contribución de las muestras sustituidas y $\overset{\circ}{f}_i$ es el total de muestras.

Para las comparaciones entre las tasas de sustitución por tipo de subproducto, fueron considerados dos grados de libertad, mientras que para las comparaciones hechas entre las ciudades de origen y entre los períodos hidrológicos, fue considerado un grado de libertad. Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CUANTIFICACIÓN DE ADN

El análisis cualitativo de ADN proporcionó valores dentro de los rangos óptimos de entre 1.7 a 2.1 de absorbancia, en tanto que la concentración de ADN obtenida para cada muestra fue muy variable. Los resultados de algunas de las muestras se pueden observar en la Tabla 1.

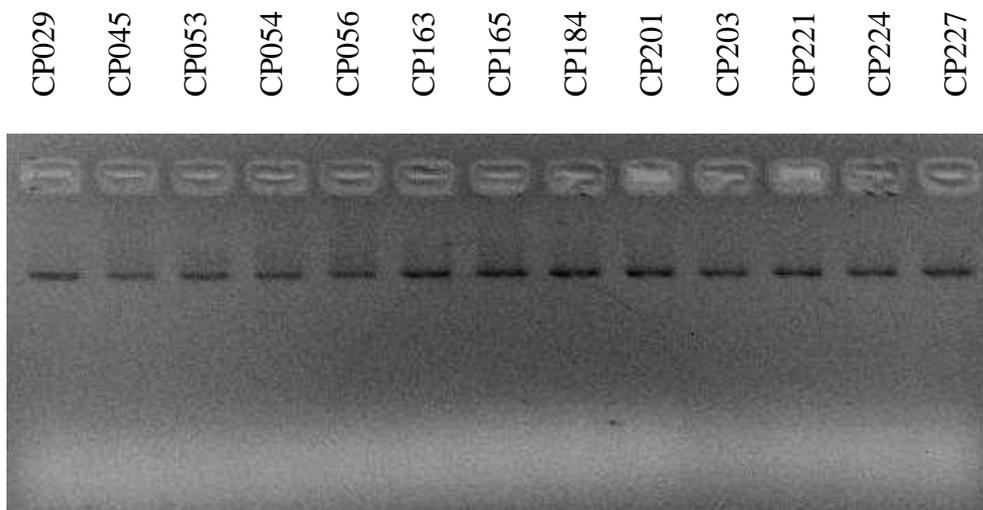
Tabla 1: Cuantificación de ADN en muestras de subproductos pesqueros (carne picada, filete fresco y filete seco salado). CP: carne picada; FF: filete fresco; SS: filete seco salado

<i>Muestra</i>	<i>Concentración</i> <i>(ng/μl)</i>	<i>A260</i>	<i>A230</i>	<i>A280</i>	<i>A260/A280</i>	<i>A260/A230</i>
<i>CP029</i>	<i>624,09</i>	<i>1,283</i>	<i>0,674</i>	<i>0,633</i>	<i>2,09</i>	<i>1,95</i>
<i>CP163</i>	<i>426,38</i>	<i>0,861</i>	<i>0,473</i>	<i>0,419</i>	<i>2,08</i>	<i>1,83</i>
<i>CP165</i>	<i>181,03</i>	<i>0,363</i>	<i>0,184</i>	<i>0,180</i>	<i>2,02</i>	<i>1,98</i>
<i>CP184</i>	<i>418,42</i>	<i>0,848</i>	<i>0,475</i>	<i>0,429</i>	<i>2,00</i>	<i>1,80</i>
<i>CP201</i>	<i>288,62</i>	<i>0,582</i>	<i>0,325</i>	<i>0,299</i>	<i>1,96</i>	<i>1,80</i>
<i>CP203</i>	<i>334,29</i>	<i>0,680</i>	<i>0,387</i>	<i>0,348</i>	<i>1,98</i>	<i>1,78</i>
<i>CP221</i>	<i>382,20</i>	<i>0,788</i>	<i>0,396</i>	<i>0,405</i>	<i>2,01</i>	<i>2,06</i>
<i>CP224</i>	<i>220,59</i>	<i>0,445</i>	<i>0,225</i>	<i>0,225</i>	<i>2,00</i>	<i>1,99</i>
<i>CP227</i>	<i>286,16</i>	<i>0,594</i>	<i>0,302</i>	<i>0,305</i>	<i>2,02</i>	<i>2,04</i>
<i>CP228</i>	<i>273,37</i>	<i>0,551</i>	<i>0,300</i>	<i>0,274</i>	<i>2,03</i>	<i>1,85</i>
<i>FF037</i>	<i>42,80</i>	<i>0,064</i>	<i>0,018</i>	<i>0,023</i>	<i>1,92</i>	<i>2,14</i>
<i>FF049</i>	<i>428,08</i>	<i>0,835</i>	<i>0,380</i>	<i>0,402</i>	<i>2,02</i>	<i>2,13</i>
<i>FF053</i>	<i>497,23</i>	<i>0,994</i>	<i>0,506</i>	<i>0,491</i>	<i>2,03</i>	<i>1,96</i>
<i>FF054</i>	<i>494,94</i>	<i>0,972</i>	<i>0,572</i>	<i>0,470</i>	<i>2,03</i>	<i>1,68</i>
<i>FF070</i>	<i>238,79</i>	<i>0,470</i>	<i>0,226</i>	<i>0,227</i>	<i>2,03</i>	<i>2,04</i>
<i>FF074</i>	<i>242,85</i>	<i>0,466</i>	<i>0,226</i>	<i>0,222</i>	<i>2,01</i>	<i>1,98</i>
<i>FF091</i>	<i>574,89</i>	<i>1,130</i>	<i>0,597</i>	<i>0,549</i>	<i>2,02</i>	<i>1,87</i>
<i>FF092</i>	<i>730,47</i>	<i>1,474</i>	<i>0,684</i>	<i>0,732</i>	<i>2,03</i>	<i>2,18</i>

<i>FF094</i>	<i>1060,57</i>	<i>2,101</i>	<i>1,023</i>	<i>1,021</i>	<i>2,04</i>	<i>2,03</i>
<i>FF095</i>	<i>595,78</i>	<i>1,182</i>	<i>0,566</i>	<i>0,581</i>	<i>2,02</i>	<i>2,07</i>
<i>SS007</i>	<i>235,43</i>	<i>0,450</i>	<i>0,199</i>	<i>0,217</i>	<i>1,98</i>	<i>2,14</i>
<i>SS010</i>	<i>181,04</i>	<i>0,341</i>	<i>0,173</i>	<i>0,162</i>	<i>1,97</i>	<i>1,86</i>
<i>SS011</i>	<i>90,36</i>	<i>0,159</i>	<i>0,084</i>	<i>0,071</i>	<i>1,96</i>	<i>1,71</i>
<i>SS014</i>	<i>336,95</i>	<i>0,674</i>	<i>0,322</i>	<i>0,337</i>	<i>2,00</i>	<i>2,10</i>
<i>SS015</i>	<i>251,17</i>	<i>0,482</i>	<i>0,247</i>	<i>0,233</i>	<i>1,98</i>	<i>1,88</i>
<i>SS018</i>	<i>226,93</i>	<i>0,434</i>	<i>0,205</i>	<i>0,207</i>	<i>2,00</i>	<i>2,02</i>
<i>SS019</i>	<i>170,55</i>	<i>0,321</i>	<i>0,220</i>	<i>0,154</i>	<i>1,95</i>	<i>1,42</i>
<i>SS021</i>	<i>360,23</i>	<i>0,722</i>	<i>0,397</i>	<i>0,359</i>	<i>2,02</i>	<i>1,82</i>
<i>SS026</i>	<i>93,69</i>	<i>0,166</i>	<i>0,128</i>	<i>0,075</i>	<i>1,96</i>	<i>1,26</i>
<i>SS057</i>	<i>179,08</i>	<i>0,344</i>	<i>0,156</i>	<i>0,163</i>	<i>2,02</i>	<i>2,09</i>

4.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos de amplificación mediante PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa. Los resultados de las bandas obtenidas se muestran en la Figura 2.



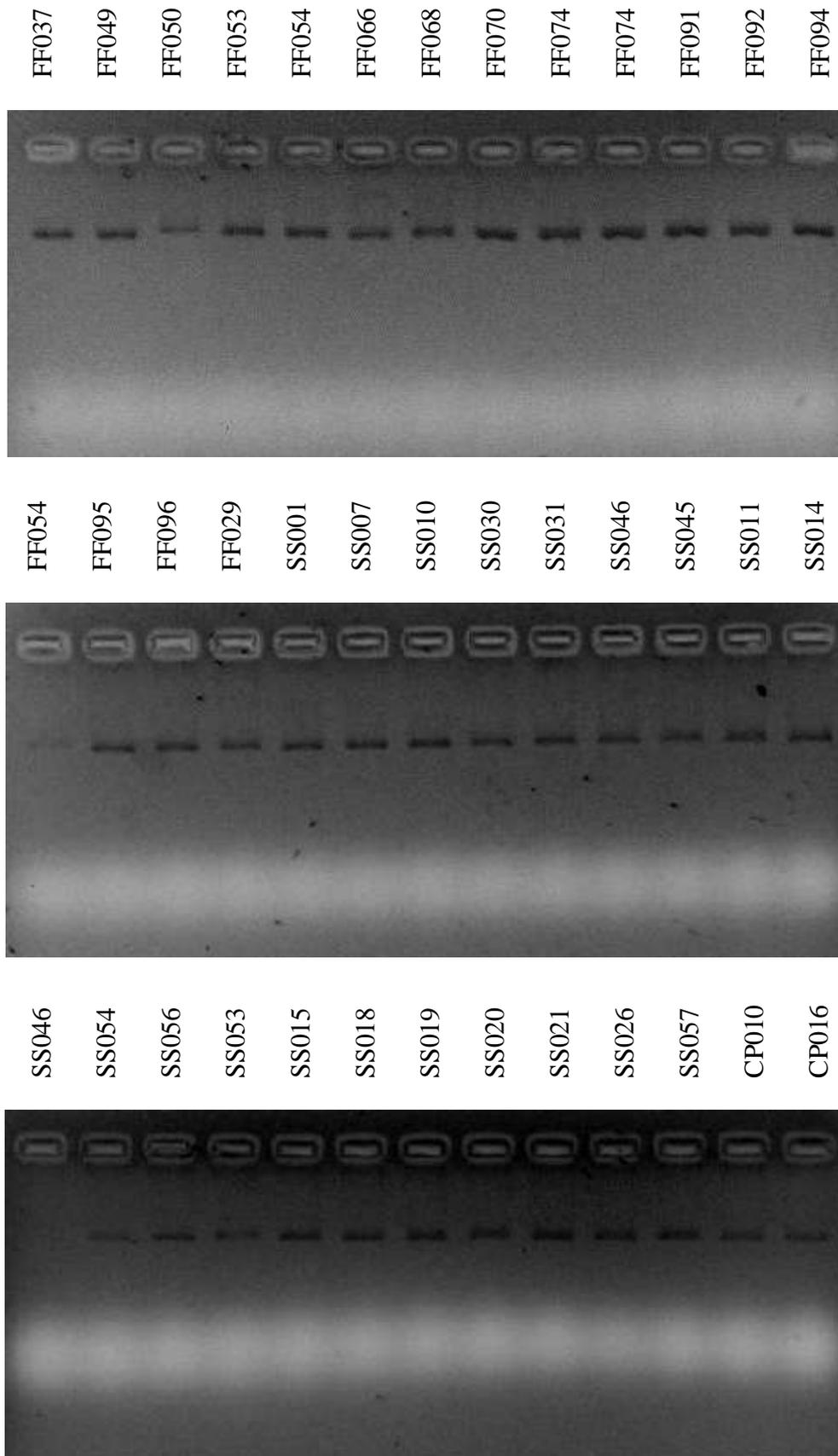


Figura 2: Geles de agarosa al dos por ciento. Las bandas oscuras mostradas representan las secuencias COI amplificadas con los cebadores FishF1 y FishR1

4.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Las 283 secuencias de nucleótidos del gen Citocromo C Oxidasa (COI) revelaron la presencia de 11 diferentes especies de peces entre las 139 muestras analizadas. El dendograma construido bajo el criterio de vecino próximo a partir del modelo de evolución de nucleótidos T96+G muestra que los cubos de carne picada analizados corresponden a siete especies de peces agrupadas en cinco géneros (*Brachyplatystoma*, *Sorubimichthys*, *Zungaro*, *Pseudoplatystoma* y *Pterodoras*) pertenecientes a dos familias del orden Siluriformes (Doradidae y Pimelodidae, Figura 3). Cuando las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en el GenBank mediante el sistema BLASTn, confirmaron las mismas siete especies (Tabla 2).

Tabla 2: Especies de peces identificadas en carne picada, con sus respectivos autores y números de acceso en el GenBank

<i>Familia</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>Fuente</i>	<i>Referencia en GenBank</i>
<i>Pimelodidae</i>	<i>Brachyplatystoma</i>	<i>filamentosum</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952404
<i>Pimelodidae</i>	<i>Brachyplatystoma</i>	<i>jujuense</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952405
<i>Pimelodidae</i>	<i>Brachyplatystoma</i>	<i>platynemum</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952406
<i>Pimelodidae</i>	<i>Sorubimichthys</i>	<i>planiceps</i>	(García-Dávila et al. 2018)	MG911941
<i>Pimelodidae</i>	<i>Zungaro</i>	<i>zungaro</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952431
<i>Pimelodidae</i>	<i>Pseudoplatystoma</i>	<i>punctifer</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952427
<i>Doradidae</i>	<i>Pterodoras</i>	<i>granulosus</i>	(García-Dávila et al. 2018)	MG911862

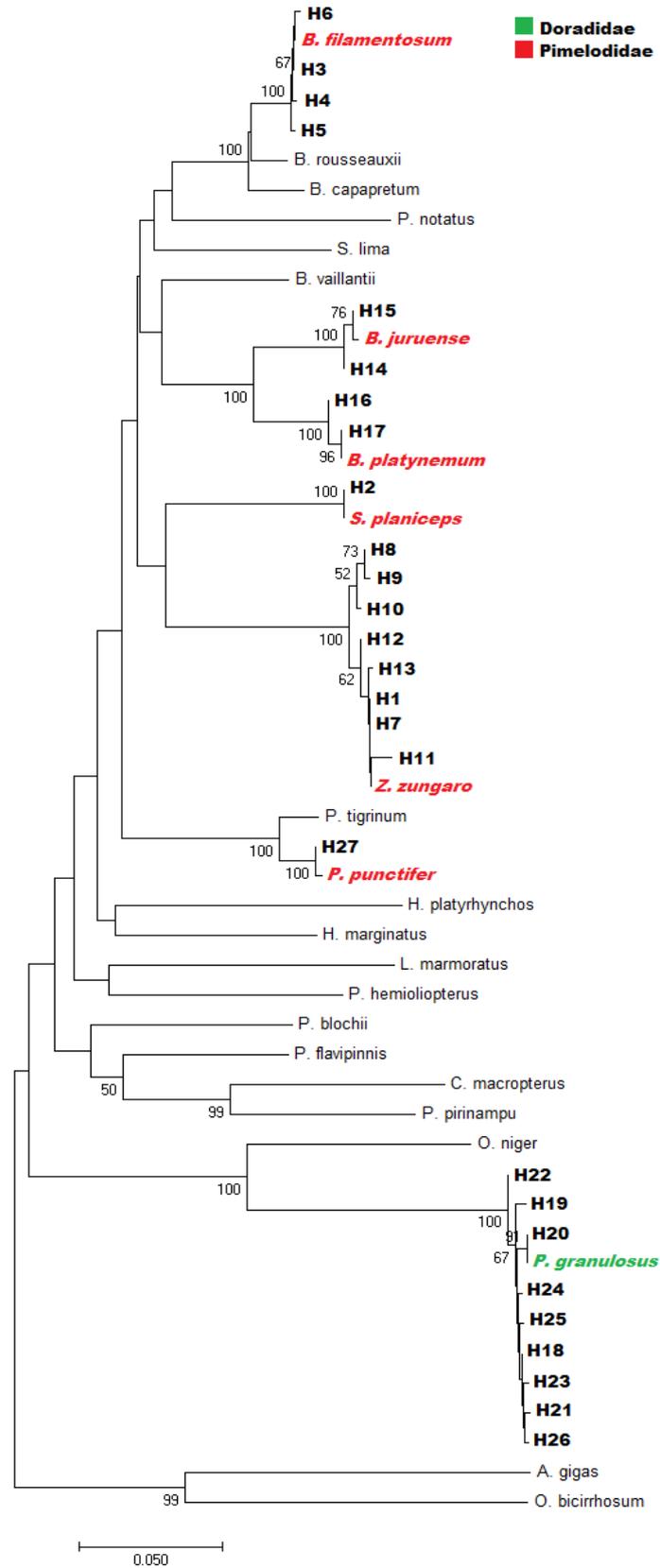


Figura 3: Dendrograma de las secuencias de haplotipos (H) del subproducto carne picada de pescado, construido bajo el criterio de vecino próximo (Neighbour-Joining).

El dendograma construido bajo el criterio de vecino próximo a partir del modelo de evolución nucleotídica T96+G reveló que las muestras de filete fresco analizadas corresponden a 10 especies de peces agrupadas en siete géneros (*Sorubimichthys*, *Brachyplatystoma*, *Phractocephalus*, *Zungaro*, *Pseudoplatystoma*, *Pterodoras*, *Arapaima*) pertenecientes a tres familias del orden Siluriformes (Pimelodidae, Doradidae y Arapaimidae, Figura 4). Cuando las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en el GenBank mediante el sistema BLASTn, confirmaron las mismas 10 especies (Tabla 3).

Tabla 3: Especies de peces identificadas en filete fresco, con sus respectivos autores y números de acceso en el GenBank

<i>Familia</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>Fuente</i>	<i>Referencia en GenBank</i>
<i>Pimelodidae</i>	<i>Brachyplatystoma</i>	<i>vaillantii</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952409
<i>Pimelodidae</i>	<i>Brachyplatystoma</i>	<i>jujuense</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952405
<i>Pimelodidae</i>	<i>Brachyplatystoma</i>	<i>filamentosum</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952404
<i>Pimelodidae</i>	<i>Sorubimichthys</i>	<i>planiceps</i>	(García-Dávila et al. 2018)	MG911941
<i>Pimelodidae</i>	<i>Zungaro</i>	<i>zungaro</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952431
<i>Pimelodidae</i>	<i>Pseudoplatystoma</i>	<i>punctifer</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952427
<i>Pimelodidae</i>	<i>Pseudoplatystoma</i>	<i>tigrinum</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952428
<i>Pimelodidae</i>	<i>Phractocephalus</i>	<i>hemiolepis</i>	(García-Dávila et al. 2015)	KT952415
<i>Doradidae</i>	<i>Pterodoras</i>	<i>granulosus</i>	(García-Dávila et al. 2018)	MG911862
<i>Arapaimidae</i>	<i>Arapaima</i>	<i>gigas</i>	(García-Dávila et al. 2018)	MG911735

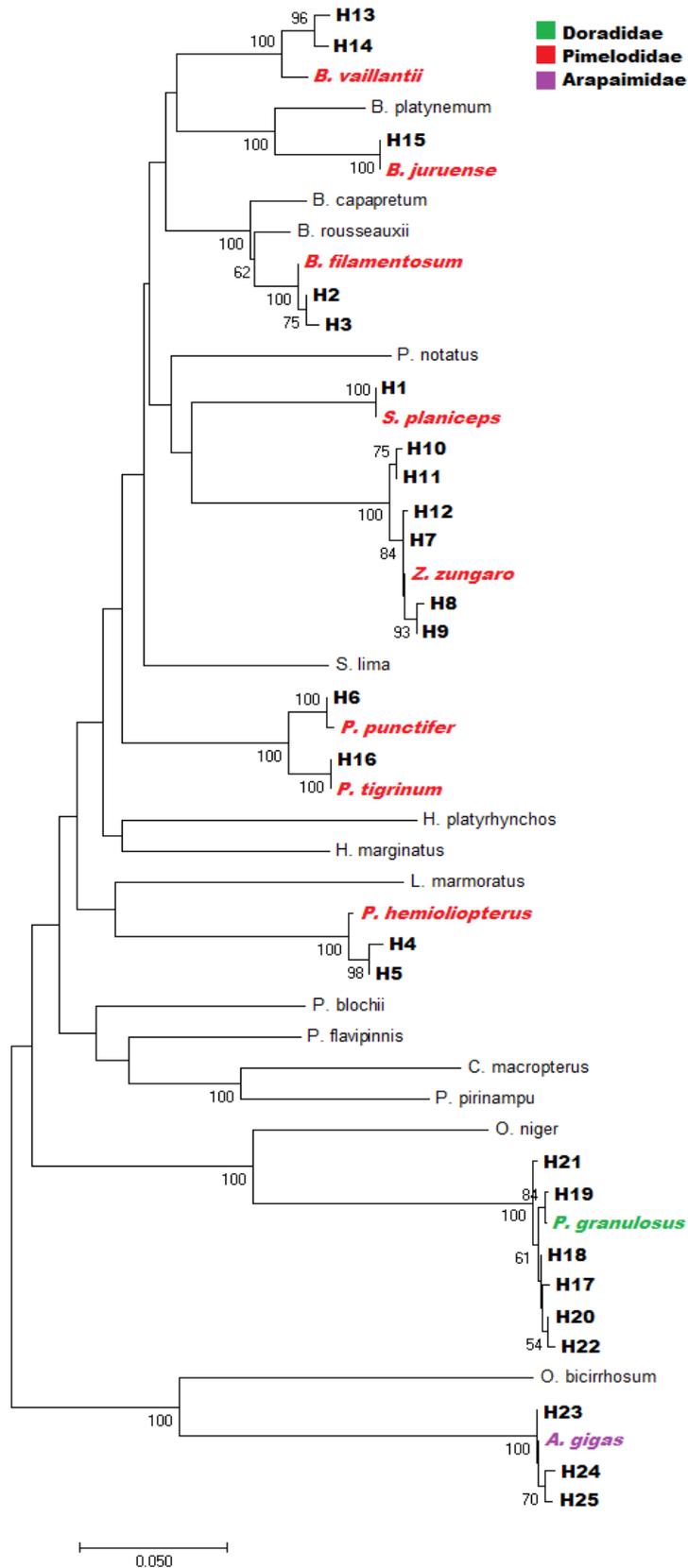


Figura 4: Dendrograma de las secuencias de haplotipos (H) del subproducto filete fresco de pescado, construido bajo el criterio de vecino próximo (Neighbour-Joining).

El dendograma construido bajo el criterio de vecino próximo a partir del modelo de evolución nucleotídica T96 reveló que las muestras de filete seco salado analizadas corresponden a una especie de pez del género *Arapaima* y perteneciente a la familia Arapaimidae (Figura 5). Cuando las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en el GenBank mediante el sistema BLASTn, confirmaron la misma especie.

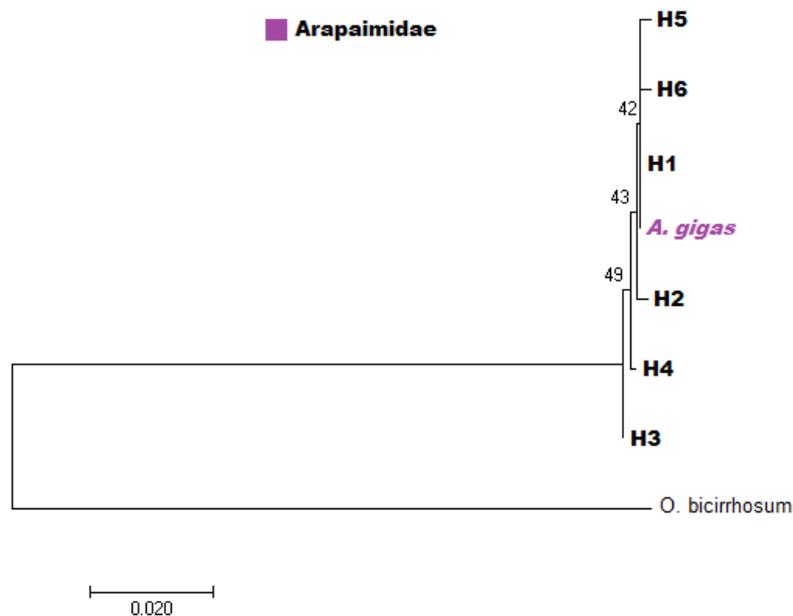


Figura 5: Dendrograma de las secuencias de haplotipos (H) del subproducto filete seco salado de pescado, construido bajo el criterio de vecino próximo (Neighbour-Joining).

4.4. COMPARACIÓN DE LAS TASAS DE SUSTITUCIÓN ENTRE LOS TIPOS DE SUBPRODUCTOS

El resultado global de los subproductos reveló 65 casos de sustitución de especies entre las 139 muestras analizadas, lo que representa un 46,8 por ciento de las mismas (Figura 6a). 15 de 16 muestras de carne picada fueron sustituidas por otras especies (93,8 por ciento, Figura 6b), en tanto que en filete fresco fueron sustituidas 50 de 66 muestras (75,8 por ciento, Figura 6c). Al contrario de los subproductos frescos, la carne seca no reveló ningún tipo de sustitución, mostrando un 100 por ciento de veracidad en la información sobre la especie comercializada (Figura 6d). Cuando se realizó la comparación entre las tasas de sustitución de los tres tipos de subproductos, se observó una diferencia estadística altamente significativa ($G = 111,5212$; $p < 0,0001$).

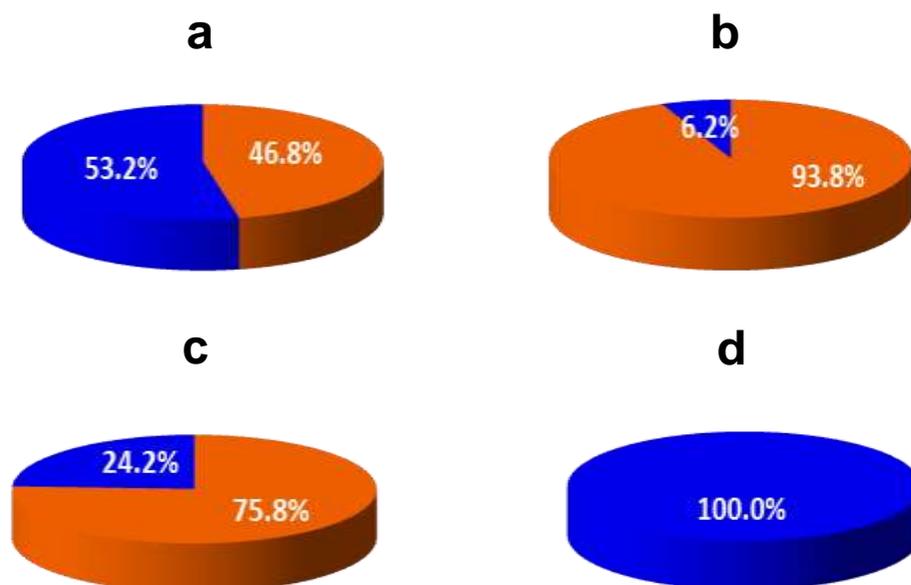


Figura 6: Tasa de sustitución de especies en subproductos pesqueros (a), carne picada (b), filete fresco (c) y filete seco salado (d). El color azul representa el porcentaje de las muestras que fueron auténticas, mientras que el color anaranjado representa el porcentaje de las muestras que fueron sustituidas por otras especies.

4.5. DIFERENCIAS DE LAS TASAS DE SUSTITUCIÓN SEGÚN EL ORDEN Y ESTACIONALIDAD DE LAS MUESTRAS

El nivel de sustitución de las muestras colectadas fue diferente tanto entre las ciudades como entre los períodos hidrológicos. La sustitución de especies fue considerablemente mayor en la ciudad de Pucallpa (37 muestras sustituidas de un total de 62, 59,7 por ciento) que en Iquitos (28 de 77 muestras, 36,4 por ciento), mostrando un 23 por ciento de diferencia entre las tasas de sustitución entre ambas ciudades (Figura 8). La diferencia entre las tasas de sustitución presentó significancia estadística elevada ($G = 7,5546$; $p = 0,0060$).

La diferencia entre las tasas de sustitución de los períodos hidrológicos fue aproximadamente de cinco por ciento. La tasa de sustitución fue mayor durante el período hidrológico de creciente (35 de 71 muestras, 49,3 por ciento) que de vaciante (30 de 68 muestras, 44,1 por ciento, Figura 7). Cuando se realizó la comparación entre las tasas de sustitución de ambos períodos hidrológicos, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($G = 0,3743$; $p = 0,5407$).

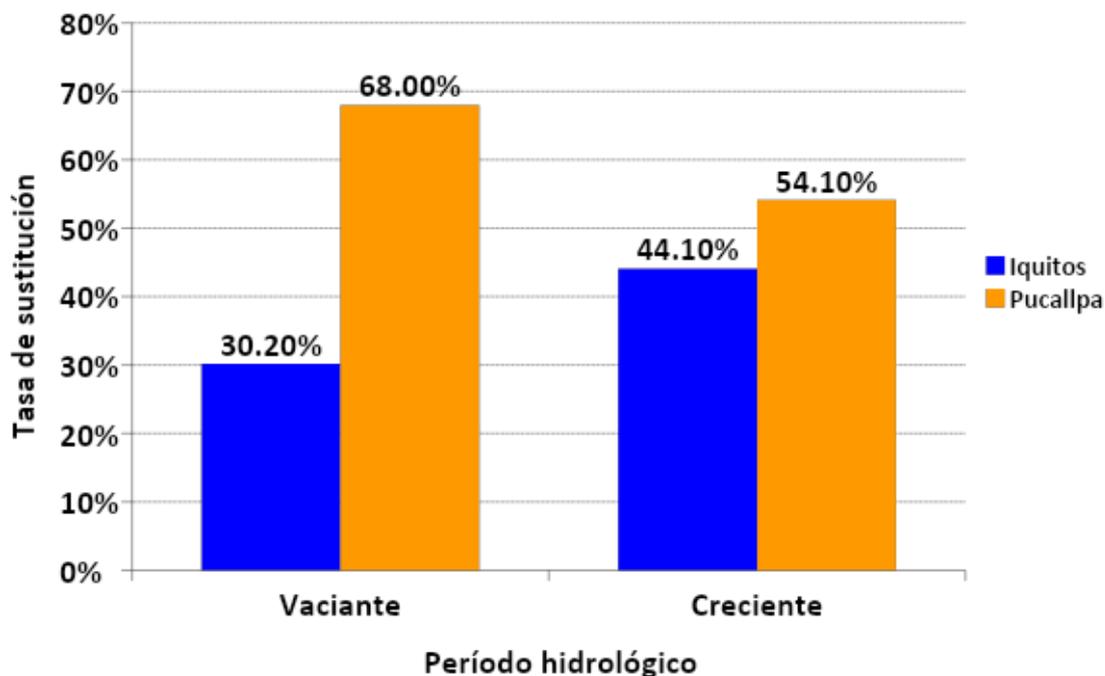


Figura 7: Tasa de sustitución en subproductos pesqueros amazónicos según ciudad de origen y período hidrológico.

4.6. ESPECIES SUSTITUTAS POR PERÍODOS HIDROLÓGICOS Y POR CIUDADES DE ORIGEN

El análisis global de la composición de especies en los subproductos mostró la presencia de 11 entidades taxonómicas diferentes: *P. granulosus*, *Z. zungaro*, *B. filamentosum*, *B. juruense*, *B. platynemum*, *P. hemioliopterus*, *P. tigrinum*, *B. vaillantii*, *P. punctifer*, *A. gigas* y *S. planiceps*. Nueve de estas especies fueron utilizadas como sustitutas en alguno de los subproductos: *P. granulosus*, *Z. zungaro*, *B. filamentosum*, *B. juruense*, *B. platynemum*, *P. tigrinum*, *B. vaillantii*, *P. hemioliopterus* y *S. planiceps*.

Durante la vaciante, la especie más utilizada como sustituto fue *Z. zungaro* (35 sustituciones de un total de 93 muestras, 37,6 por ciento), en tanto que *P. granulosus* lo fue durante la creciente (58 de 106 que representa el 54,7 por ciento, Figura 8). Si bien el número de sustituciones fue ligeramente mayor en creciente que en vaciante, la diversidad de especies encontradas en esta última fue mayor (Figura 8).

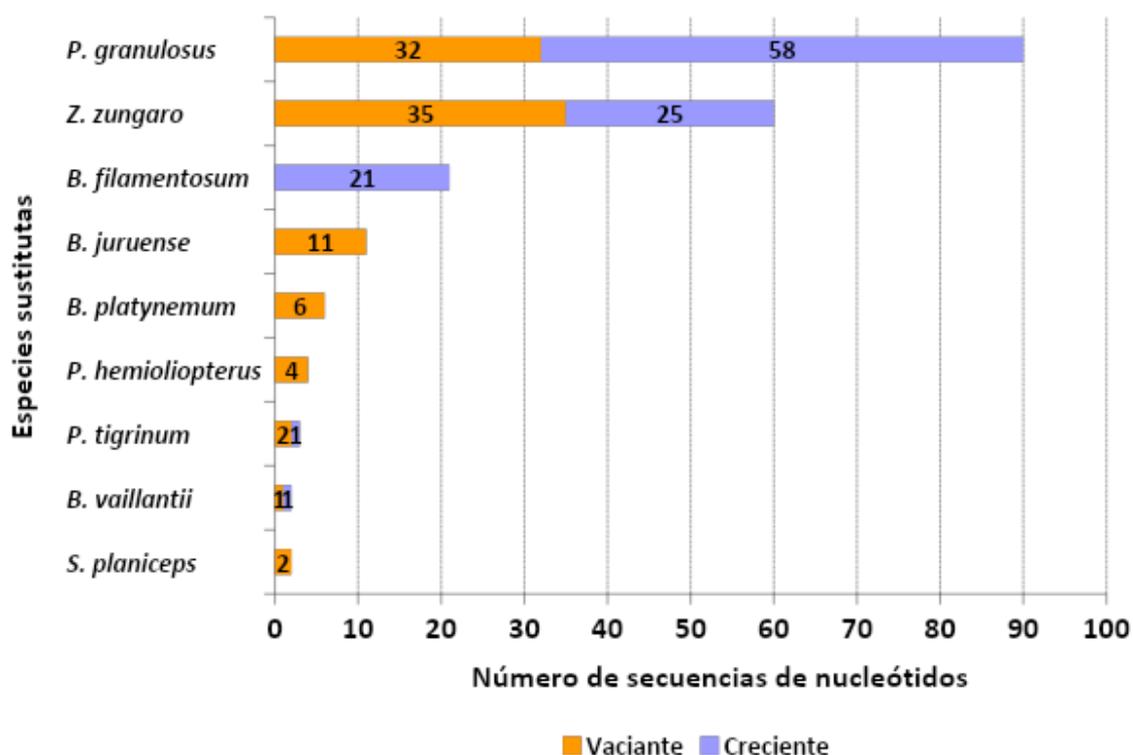


Figura 8: Proporción de especies sustitutas en subproductos pesqueros según el período hidrológico durante el cual fueron colectados.

En la ciudad de Iquitos, la especie más utilizada como sustituto fue *Z. zungaro* (60 sustituciones de un total de 99 muestras, 60,6 por ciento), en tanto que *P. granulosus* lo fue en Pucallpa (77 de 100 que representa el 77 por ciento, Figura 8). Si bien el número de sustituciones fue ligeramente mayor en Pucallpa que en Iquitos, la diversidad de especies encontradas en esta última fue mayor (Figura 9).

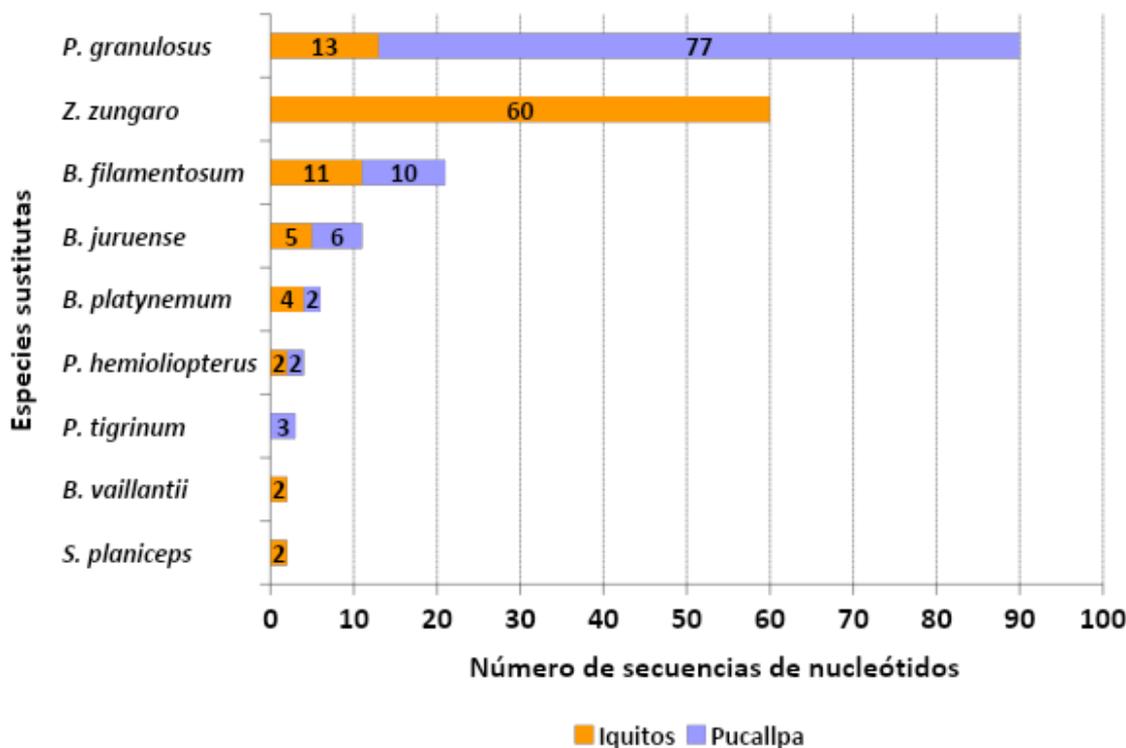


Figura 9: Proporción de especies sustitutas en subproductos pesqueros según la ciudad donde fueron colectados.

4.7. ESPECIES IDENTIFICADAS EN LOS SUBPRODUCTOS

En total, seis especies fueron declaradas por los comerciantes: “saltón” *Brachyplatystoma filamentosum*, “paiche” *Arapaima gigas*, “pez torre” *Phractocephalus hemioliopterus*, “doncella” *Pseudoplatystoma punctifer*, “cunchimama” *Zungaro zungaro* y “dorado” *B. rousseauxii*. La caracterización molecular mostró que éstas tres últimas fueron reemplazadas por especies de menor valor comercial (“cahuara” *Pterodoras granulosus*, *Z. zungaro*, *P. hemioliopterus*, *B. filamentosum*, “manitoa” *B. vaillantii*, “alianza” *B. juruense* y “tabla barba” *B. platynemum*), en tanto que saltón, paiche y pez torre no sufrieron sustitución.

El análisis molecular de la carne picada declarada como doncella, cunchimama, saltón, y dorado permitió la verificación de la identidad específica de las especies declaradas a excepción del dorado, que no estuvo presente entre las 160 secuencias obtenidas de las muestras analizadas. Además se observó que estas muestras estaban constituidas por una mezcla de especies, pudiéndose identificar a cuatro especies adicionales (“tabla barba” *B. platynemum*, “alianza” *B. juruense*, “achacubo” *Sorubimichthys planiceps* y “cahuara” *P. granulosus*) a las declaradas. La cantidad de especies sustitutas por muestra analizada fue variable, encontrándose de una a tres especies distintas. Todas las muestras de dorado y doncella fueron reemplazadas en su totalidad

por otras especies, a excepción de una muestra de doncella que presentó solo un 10 por ciento de autenticidad. *P. granulatus* fue la especie sustituta más utilizada. La composición de especies sustitutas por muestra analizada puede ser observada en la Figura 10.

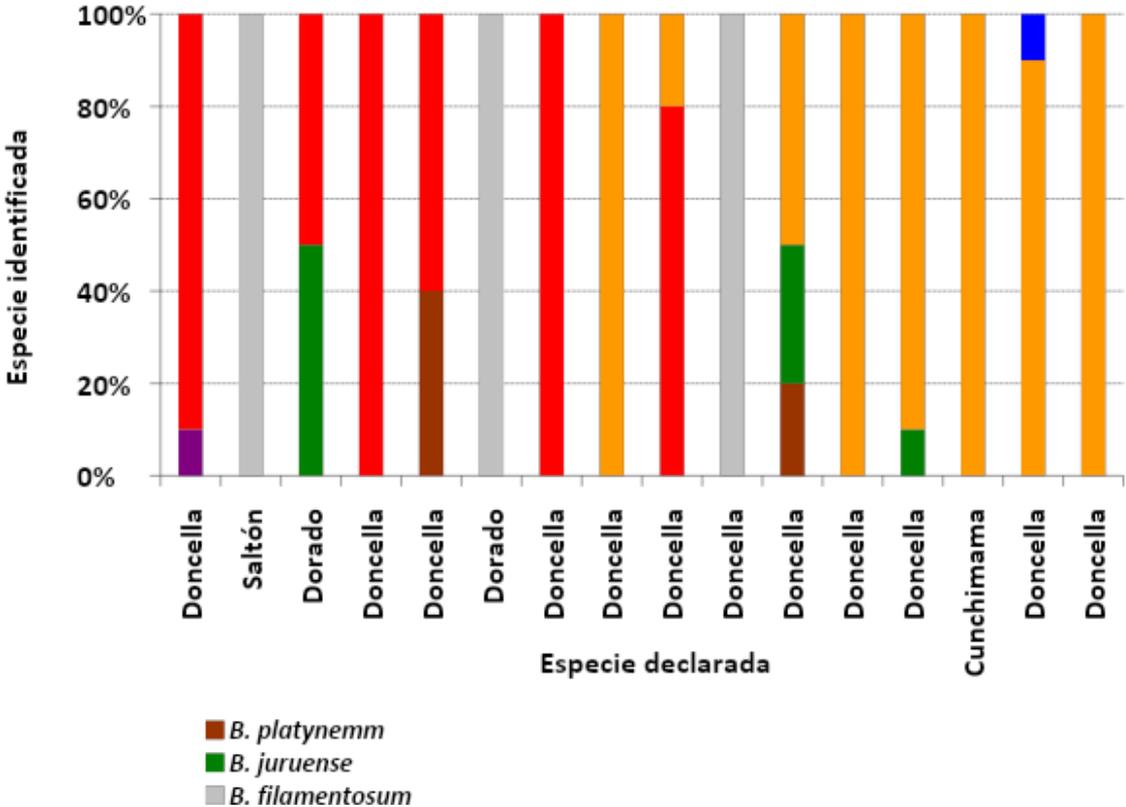


Figura 10: Especies de peces utilizadas como sustitutas en la comercialización de subproductos de carne picada. El gráfico de barras permite observar la proporción de especies identificadas por cada muestra de carne picada.

El análisis molecular de las muestras de filete fresco declaradas como doncella, saltón, pez torre, paiche, cunchimama y dorado permitió la verificación de la identidad específica de las especies declaradas a excepción del dorado, que no estuvo presente entre las 66 secuencias obtenidas de las muestras analizadas. Además se observó la presencia de cinco especies adicionales (“tigre zúngaro” *Pseudoplatystoma tigrinum*, “alianza” *Brachyplatystoma juruense*, “cahuara” *Pterodoras granulatus*, “manitoa” *B. vaillantii* y “achacubo” *Sorubimichthys planiceps*) a las declaradas. La cantidad de especies sustitutas por nombre declarado fue variable, encontrándose desde dos hasta siete especies distintas. Todas las muestras de dorado y doncella fueron reemplazadas en su totalidad por otras especies, a excepción de cinco muestras de doncella que correspondieron con veracidad a lo declarado por los comerciantes. *P. granulatus* fue la especie

sustituta más utilizada. La composición de especies sustitutas en las muestras analizadas puede ser observada en la Figura 11.

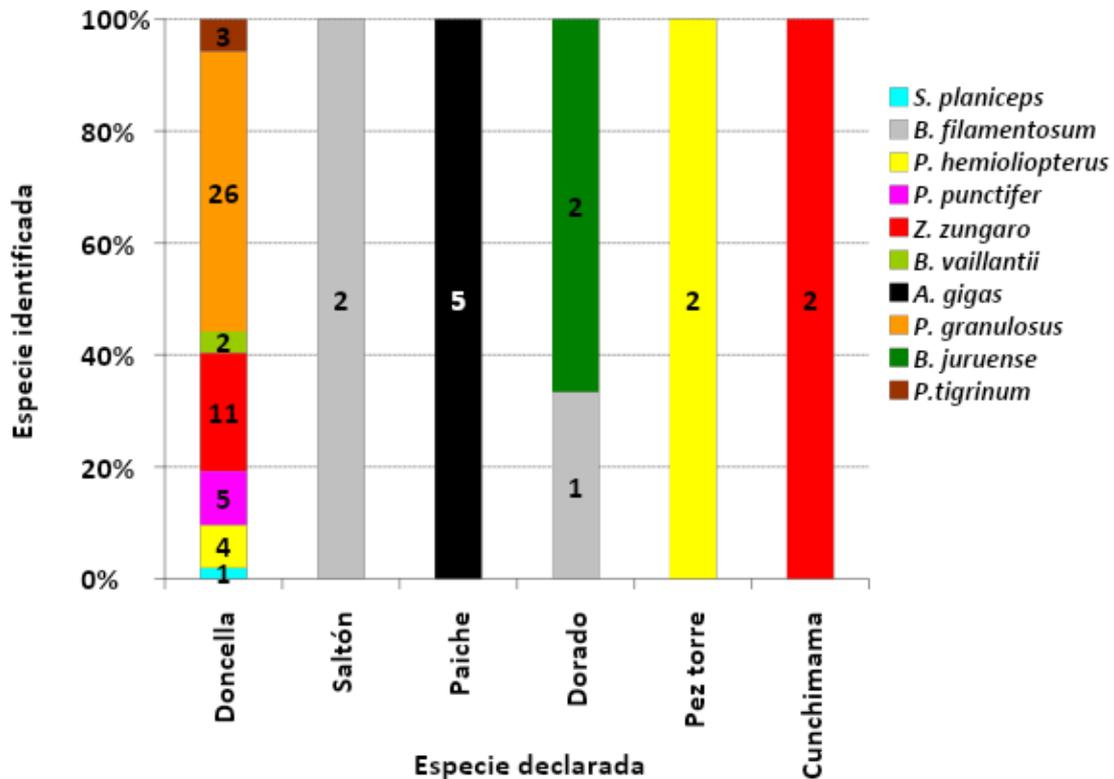


Figura 11: Especies de peces utilizadas como sustitutas en la comercialización de subproductos de filete fresco. El gráfico de barras permite observar la proporción de especies identificadas según el nombre declarado por los comerciantes. Los números sobre el gráfico representan la cantidad de muestras analizadas.

4.8. DISCUSIÓN

Uno de los grandes desafíos que tiene que enfrentar la industria alimentaria actual es la identificación específica de los productos y subproductos que se comercializan a nivel mundial, debido a que los consumidores y fiscalizadores exigen que se cumpla con el correcto etiquetado, es decir que la especie comercializada sea la declarada (Barbuto et al., 2010; Barcaccia et al., 2015; Bottero & Dalmaso, 2011; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018). Esto debido a los recientes casos de intoxicación reportados por el consumo de alimentos adulterados y/o contaminados (Barcaccia et al., 2015; Bottero & Dalmaso, 2011). En cuanto a productos pesqueros, las mejoras en los medios de transporte y en la conservación de alimentos, ha permitido la exportación de enormes volúmenes de pescado o sus subproductos a diversas partes del mundo. Un mercado tan amplio sin estrictas reglas de control, ha facilitado muchas veces la ejecución de fraude económico por sustitución de la especie comercializada (Di

Pinto et al., 2013, 2015). Este problema puede verse a nivel nacional en el comercio de subproductos como carne picada y filete de pescado, en los cuales la identificación específica es casi imposible como consecuencia de la ausencia de caracteres diagnósticos claramente visibles (Barbuto et al., 2010; Céspedes et al., 1999; Scarano & Rao, 2014).

Actualmente, la certificación de la identidad específica de los subproductos pesqueros es vital para poder alcanzar nuevos mercados donde la exigencia de la correspondencia entre la etiqueta y el contenido de un determinado producto es pieza fundamental para la comercialización. El código de barras de ADN ha sido ampliamente utilizado para la identificación de especies de peces en diversos productos y subproductos pesqueros, permitiendo conocer el nivel de fraude existente en diversos países o regiones, siendo propuesta por la FDA como herramienta fundamental para la identificación de subproductos pesqueros en Estados Unidos (Yancy et al., 2008).

Diversos estudios han logrado optimizar y validar el código de barras de ADN para la identificación de especies con el fin de disminuir el tiempo de procesamiento y los costos de uso de reactivos (Neto, 2017). Asimismo, se han desarrollado ensayos o pruebas de repetitividad (precisión), concentración de ADN (límite de detección), exposición a sustancias químicas y condiciones ambientales, y parámetros de amplificación como la temperatura y el número de ciclos (Dawnay et al., 2007; Neto, 2017). Los trabajos de validación del código de barras de ADN concluyen que es posible obtener secuencias COI para diferentes especies de animales de forma confiable (Handy et al., 2011; Neto, 2017; Tinacci et al., 2018; Yancy et al., 2008).

Neto (2017) y Dawnay et al. (2007) señalan que el código de barras de ADN puede ser utilizado con precisión en muestras puras como los filetes y rodajas de pescado, y los pescados enteros, pero no en muestras mixtas. Además, en muestras sometidas a procesamiento extremo, como los enlatados, es posible obtener secuencias cortas de entre 100-200 pb mediante la utilización de cebadores específicos, que permiten la identificación de especies en algunos casos (Dawnay et al., 2007; Handy et al., 2011). El código de barras es un método más efectivo que el utilizado por la FDA hasta 2011 (punto isoeléctrico) debido a que el ADN es más estable, esto permite analizar una amplia gama de productos pesqueros como seco-salado, ahumado, enlatados, entre otros (Handy et al., 2011). Todas las muestras colectadas en el presente estudio fueron de carne fresca y seco-salada de pescado, pudiendo ser identificadas a nivel de especie como ha sido realizado en diversos estudios (Neto, 2017; Yancy et al., 2008).

Por otro lado, el código de barras permite obtener información de forma electrónica. Es decir, los electroferogramas pueden ser almacenados en archivos y posteriormente pueden ser compartidos nacional e internacionalmente (Handy et al., 2011). Esto permite que la información se encuentre disponible para los integrantes del sector pesquero que necesiten monitorear y controlar los casos de sustitución de especies, tales como comerciantes, proveedores, empresarios y órganos de gobierno (Neto, 2017; Yancy et al., 2008).

Este trabajo constituye el primer estudio de evaluación del nivel de sustitución de especies en subproductos pesqueros comercializados en la Amazonía peruana. El análisis de todas las muestras colectadas, reveló una tasa de sustitución relativamente alta (46,8 por ciento, Figura 5a). Este valor fue superior a lo reportado en varios países europeos (4,93 por ciento) (Mariani et al., 2015), Brasil (17 por ciento) (Daniel Cardoso Carvalho et al., 2017) y Sudáfrica (18 por ciento) (Cawthorn, Duncan, Kastern, Francis, & Hoffman, 2015). Valores cercanos se encontraron en Egipto (33 por ciento) (Galal-Khallaf, Ardura, Mohammed-Geba, Borrell Pichs, & Garcia-Vazquez, 2014), Canadá (41 por ciento) (Hanner, Becker, Ivanova, & Steinke, 2011) y China (58 por ciento) (Xiong et al., 2018). Un caso particular se evidenció en Australia, donde las especies identificadas a partir de las muestras analizadas correspondieron con veracidad a la información brindada en su etiquetado (Lamendin, Miller, & Ward, 2015). La elevada tasa de sustitución encontrada en el presente estudio se contrapone a lo señalado por Bénard-Capelle et al. (2015) sobre el hecho de que a mayor tamaño de la cadena de suministro se espera encontrar mayor nivel de sustitución. Nuestros resultados no siguen esta tendencia, en la Amazonía la cadena de suministro consta únicamente de dos partes (pescador/ intermediario y comerciante) y los niveles de sustitución son elevados, mostrando que otros factores podrían estar influenciando el grado de sustitución en estos subproductos. En estos mercados el comerciante recibe el pez entero, sabe de qué especie se trata, sustituye la especie en los subproductos porque tiene la certeza de que los sistemas de fiscalización son casi inexistentes. Es decir, el comerciante comete fraude porque sabe que no será descubierto y su acción no será penalizada por las autoridades. La fiscalización juega un papel importante en el control de la sustitución específica de los subproductos. En lugares donde los sistemas de fiscalización son constantes y muy estrictos, las tasas de sustitución son bajas, como sucede en Europa y Australia donde la tasa de sustitución está alrededor del cinco por ciento (Lamendin et al., 2015; Mariani et al., 2015). Asimismo, los trabajos realizados en Brasil confirman que la tasa de sustitución ha descendido después de la implementación de un sistema de fiscalización a nivel nacional (Daniel Cardoso Carvalho et al., 2017; Daniel Cardoso Carvalho, Palhares, Drummond, & Frigo, 2015). Estos ejemplos reafirman el efecto negativo de

la fiscalización sobre la sustitución observada por diversos autores (Bénard-Capelle et al., 2015; Daniel Cardoso Carvalho et al., 2017).

Algunos estudios afirman que la sustitución puede ser involuntaria debido a la semejanza morfológica entre las especies involucradas como señalan Lasso et al. (2011) para el “dorado” *B. rousseauxii* y el “saltón” *B. filamentosum*, así como para la “doncella” *P. punctifer* y el “tigre zúngaro” *P. tigrinum*. Sin embargo, estos autores se refieren a la confusión en especímenes vivos, en tanto que, aquí nos referimos a organismos muertos que son palpables por los comerciantes y establecen claras diferencias en la textura de la piel como en el dorado y el saltón (el primero tiene piel suave que puede ser rasgada con facilidad, en tanto que el segundo tiene una piel áspera y dura). Lo mismo sucede con la doncella y el tigre zúngaro, donde el comerciante puede diferenciar los patrones de coloración (doncella tiene líneas negras y blancas rectas, en tanto que el tigre zúngaro tiene líneas sinuosas que se unen en el dorso). Entonces, la sustitución no es accidental sino más bien a propósito, ya que el dorado y la doncella tienen mayor precio comercial que sus sustitutos (Anexo 2).

Si bien, la cantidad de estos eventos fueron reducidos para el presente estudio, la mayoría de sustituciones observadas se han realizado de forma deliberada, debido a que una especie ha sido reemplazada por otra morfológicamente diferente. Por ejemplo, la sustitución del “dorado” *B. rousseuxii* por “cunchimama” *Z. zungaro* y “alianza” *B. juruense*, así como la sustitución de “doncella” *P. punctifer* por “cahuara” *P. granulatus*, “saltón” *B. filamentosum* y cunchimama. Como se puede observar, las especies sustitutas son de un valor comercial bastante inferior que las sustituidas (Anexo 2), lo que representa un típico caso de fraude motivado claramente por factores económicos. Numerosos investigadores han reportado tal patrón de conducta entre los comerciantes de diversos establecimientos (Barbutto et al., 2010; Daniel C. Carvalho et al., 2011; Daniel Cardoso Carvalho et al., 2017; Cawthorn, Steinman, & Witthuhn, 2012; Cline, 2012; de Brito, Schneider, Sampaio, & Santos, 2015; Di Pinto et al., 2013; Filonzi et al., 2010; Muñoz-Colmenero, Blanco, Arias, Martínez, & García-Vázquez, 2016). La ejecución de este tipo de prácticas fraudulentas afecta el bolsillo de los consumidores y bloquea su libertad para elegir conscientemente un determinado subproducto (de Brito et al., 2015).

El grado de procesamiento de la carne de pescado podría tener relación con el nivel de sustitución, tal como se ha observado al comparar las tasas de sustitución de los tres tipos de subproductos (filete fresco, carne picada y filete seco salado). Es posible que los consumidores puedan diferenciar algunos caracteres diagnósticos como la coloración y textura de la carne, que aún son

visibles en los filetes de pescado, lo cual es imposible hacer en carne picada, debido a que ha sufrido un procesamiento mayor. Técnicamente, estos caracteres diagnósticos serían la conformación de los miómeros y mioseptos, y la predominancia de músculo rojo o blanco (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016), que aún son utilizados para realizar una rápida diferenciación (aunque estos métodos no son confiables cuando se trata de especies con características musculares semejantes como es el caso de muchas especies amazónicas). Esta relación positiva entre el grado de procesamiento y el nivel de sustitución ha sido observado en Brasil e Italia, donde las tasas de sustitución de los subproductos más procesados siempre muestran valores más altos (Carvalho, Neto, Brasil, & Oliveira, 2011; Di Pinto et al., 2013). Nosotros pensamos que el grado de procesamiento puede influir en el nivel de sustitución cuando la coloración y la textura de la carne son semejantes entre las especies, como se ha observado en los bagres que son un grupo numeroso donde los filetes frescos son casi imposibles de diferenciar sin la piel de la especie; se observan filetes con distinta coloración pero no se sabe a qué especies pertenecen. Un caso contrario fue observado en la carne de paiche que presenta una coloración y textura diferente a la de los bagres, por lo que estos no pueden ser utilizados como sustitutos del primero (tasa de sustitución nula). Que no se haya encontrado sustitución, no quiere decir que no exista, puede deberse a que en el muestreo realizado no se haya encontrado casos de sustitución, ya que algunas informaciones extraoficiales afirman que la carne de paiche es muchas veces sustituida por carne de lagarto cuya textura es semejante (carne mucho más sólida y fibrosa). Entonces, la presencia de piel en los filetes comercializados, tendría un papel importante para que los consumidores reconozcan la especie que están adquiriendo y eviten ser estafados como lo han reportado Di Pinto et al. (2013) y Muñoz-Colmenero, Blanco, Arias, Martinez, & Garcia-Vazquez (2016).

Con respecto a la sustitución por ciudades, los resultados revelaron que esta fue mayor en Pucallpa que en Iquitos, contrario a lo señalado por Bénard-Capelle et al. (2015), quien afirma que las preferencias de los consumidores están sujetas a la disponibilidad de pescado en una determinada área geográfica, ya que los pobladores de ambas ciudades presentan los mismos patrones de consumo de pescado en su dieta. Nosotros pensamos que esto tiene una mayor relación con los menores volúmenes de desembarque y demanda de una determinada especie en la ciudad de Pucallpa. Los datos de desembarque muestran que las especies con mayor volumen de desembarque son las que tienen bajo valor comercial, pero la demanda sigue siendo doncella que en esta región presenta un volumen de captura bajo, lo que incita la sustitución, en tanto que

en la ciudad de Iquitos, los volúmenes de desembarque de las especies demandadas es mayor, influyendo en cierto modo sobre la diferencia del nivel de sustitución entre ambas ciudades.

Si bien, las tasas de sustitución entre vaciante y creciente no fueron estadísticamente significativas, se pudo observar una mayor tasa de sustitución durante la creciente, época en la que la mayoría de especies de peces se dispersan a las florestas inundadas y sus volúmenes de captura decrecen, es decir que tanto la diversidad como la abundancia disminuyen (Gallo, 2000; Guerra Flores, 1995). En este período, los desembarques son bajos y las especies predominantes por lo general son las no migratorias de bajo valor comercial. Debido a esto, la oferta de algunas especies se vería limitada en los mercados locales, provocando que la demanda sea satisfecha mediante el reemplazo por otras especies de menor valor económico que son abundantes en esta época, como por ejemplo la “cahuara” *P. granulatus* (Anexo 2). Tasas de sustitución relacionadas a la estacionalidad, fueron encontrados también en salmón del Atlántico, donde el nivel de sustitución fue mayor durante el invierno, época en la cual esta especie es escasa (Cline, 2012). Además, en este estudio se pudo observar que hay mayor número de especies sustitutas en vaciante que en creciente, esto puede deberse a que en esta época hay una mayor diversidad de peces en los ambientes naturales, como afirma Guerra Flores (1995), entonces hay mayor diversidad de especies que pueden ser utilizadas por los comerciantes como sustitutas de especies de valor comercial elevado.

La presión de pesca histórica y actual sobre las especies de alto valor comercial como la doncella y el dorado, ha causado la disminución de sus poblaciones naturales, por lo que actualmente sus volúmenes de desembarque son reducidos. En los mercados, las preferencias por estas especies y sus subproductos es elevado, lo que ha incentivado a los comerciantes sustituirlas por especies de menor valor, como “cahuara” *P. granulatus* y “cunchimama” *Z. zungaro* (Anexo 2), para cubrir la demanda en las grandes ciudades amazónicas. Por ejemplo, el porcentaje de “dorado” *B. rousseauxii* en el desembarque que fue del cinco por ciento de la captura total en los años noventa, pasando por 0,4 por ciento en 2006 y 0,1 por ciento en 2015, hasta llegar a 0,04 por ciento en 2017 (García, Tello, Vargas, & Duponchelle, 2009; Ministerio de la Producción, 2018). La tendencia para doncella fue similar, representando el 8,4 por ciento del volumen de extracción en 2000, pasando por 3,4 por ciento en 2016, hasta alcanzar el 0,6 por ciento en 2017 (Dirección Regional de la Producción; Ministerio de la Producción, 2018). Esto corrobora nuestro supuesto de que el alto nivel de sustitución encontrado en estas dos especies podría ser explicado por la carencia de estas en su medio natural y la creciente demanda en el mercado local. Además, la disponibilidad de especies de menor valor pero más abundantes en la naturaleza como cahuara y

cunchimama (con volúmenes de captura que han pasado de 0,4 por ciento del desembarque total en 1996, a 1,4 por ciento en 2016) (DIREPRO), facilitan la sustitución. Tanto la demanda como la disminución de las poblaciones naturales son factores que en conjunto elevan los porcentajes de sustitución de especies (Jacquet & Pauly, 2008). Casos de sustitución relacionados a la disminución de las capturas fueron observados para *G. morhua* (Di Pinto et al., 2013) y algunas especies de esturión del Mar Caspio (Jacquet & Pauly, 2008).

Debido a que la demanda de pescado y sus subproductos va en aumento y las normas de comercio internacional son cada vez más exigentes, es necesario tomar medidas que sean eficientes y sostenibles para el sector industrial pesquero. La utilización de herramientas eficaces para la discriminación de especies y sus subproductos, como el código de barras de ADN, en el monitoreo y fiscalización del sector pesquero viene siendo realizada en diversos países a nivel mundial, lo cual permitiría que los productos locales alcancen nuevos mercados donde el etiquetado es primordial.

V. CONCLUSIONES

1. El código de barras de ADN demostró ser una herramienta útil en la discriminación eficiente de las especies en cualquier tipo de subproducto pesquero comercializado en la Amazonía peruana. Su utilización en sistemas de monitoreo y fiscalización podría modernizar los sistemas de comercialización con miras a mercados nacionales e internacionales.
2. La sustitución de especies es realizada por los comerciantes de manera intencional con el objetivo de obtener mayores beneficios económicos en la transacción, esta actividad ilícita es generalizada en las ciudades debido a la ausencia de un sistema de monitoreo y fiscalización eficiente por parte de las autoridades competentes.
3. La elevada tasa de sustitución encontrada en subproductos pesqueros en las ciudades de Iquitos y Pucallpa está relacionada con el grado de procesamiento de la carne de pescado y con la disponibilidad de especies sustitutas en los diferentes períodos hidrológicos.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar un estudio posterior, en el que la colecta se realice no sólo en mercados locales, sino también en otros tipos de negocio como supermercados y restaurantes, con el fin de abarcar la mayor parte de la cadena de suministro.
2. Con miras a la exportación de subproductos, se sugiere que los órganos de gobierno implementen el código de barras de ADN como herramienta para la certificación específica de subproductos pesqueros amazónicos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A., Alonso, G., y Barrero, M. (2012). Identificación de especies de atún (*Thunnus* spp) en Venezuela utilizando la técnica de PCR. *Revista Científica*, XXII(4), 368-375.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716-723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4 edition). New York: Garland Science.
- Alván-Aguilar, M. A., Chu-Koo, F. W., Baluarte Monge, G. C., Collado Panduro, L. Á., y Velarde Ríos, D. A. (2016). Análisis de las estadísticas de producción de carne y semilla de paiche *Arapaima gigas* en Loreto y Ucayali (Perú). *Folia Amazónica*, 25(2), 183-189. <https://doi.org/10.24841/fa.v25i2.404>
- Ardura, A., Pola, I. G., Ginuino, I., Gomes, V., y Garcia-Vazquez, E. (2010). Application of barcoding to Amazonian commercial fish labelling. *Food Research International*, 43(5), 1549-1552. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.016>
- Ardura, A., Pola, I. G., Linde, A. R., y Garcia-Vazquez, E. (2010). DNA-based methods for species authentication of Amazonian commercial fish. *Food Research International*, 43(9), 2295-2302. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.08.004>
- Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D. L., y Dos Santos, A. D. A. S. (2007). *BioEstat. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas* (5a Edição). Belém, Pará, Brasil.
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577-587. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>
- Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P., y Casiraghi, M. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International*, 43(1), 376-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.009>

- Barcaccia, G., Lucchin, M., y Cassandro, M. (2015). DNA Barcoding as a Molecular Tool to Track Down Mislabeling and Food Piracy. *Diversity*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.3390/d8010002>
- Bénard-Capelle, J., Guillonneau, V., Nouvian, C., Fournier, N., Loët, K. L., y Dettai, A. (2015). Fish mislabelling in France: Substitution rates and retail types. *PeerJ*, 2, e714. <https://doi.org/10.7717/peerj.714>
- Bottero, M. T., y Dalmasso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, 190(1), 34-38. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.024>
- Bucklin, A., Steinke, D., y Blanco-Bercial, L. (2011). DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Review of Marine Science*, 3(1), 471-508. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-080950>
- Carvalho, D. C., Guedes, D., da Gloria Trindade, M., Coelho, R. M. S., y de Lima Araujo, P. H. (2017). Nationwide Brazilian governmental forensic programme reveals seafood mislabelling trends and rates using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 191, 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.02.021>
- Carvalho, D. C., Neto, D. A. P., Brasil, B. S. A. F., y Oliveira, D. A. A. (2011). DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(sup1), 97-105. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588219>
- Carvalho, D. C., Palhares, R. M., Drummond, M. G., y Frigo, T. B. (2015). DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. *Food Control*, 50, 784-788. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.025>
- Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A., y De Mattia, F. (2010). DNA barcoding: Theoretical aspects and practical applications. *Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems*, 269-273.
- Cawthorn, D.-M., Duncan, J., Kastern, C., Francis, J., y Hoffman, L. C. (2015). Fish species substitution and misnaming in South Africa: An economic, safety and sustainability conundrum revisited. *Food Chemistry*, 185, 165-181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.113>

- Cawthorn, D.-M., Steinman, H. A., y Witthuhn, R. C. (2012). DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, 46(1), 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.011>
- Céspedes, A., García, T., Carrera, E., González, I., Fernández, A., Hernández, P. E., y Martín, R. (1999). Application of polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) to identification of flatfish species. *Journal of AOAC International*, 82(4), 903-907.
- Chu-Koo, F., Sánchez, N., Perea, C., Panduro, D., Alván-Aguilar, M., Alcántara, F., ... Núñez, J. (2012, enero 1). Estado actual del cultivo de paiche o pirarucu en el Perú.
- Cline, E. (2012). Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Research International*, 45(1), 388-393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.043>
- Cywinska, A., Hunter, F. F., y Hebert, P. D. N. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(4), 413-424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x>
- D'Amico, P., Armani, A., Gianfaldoni, D., y Guidi, A. (2016). New provisions for the labelling of fishery and aquaculture products: Difficulties in the implementation of Regulation (EU) n. 1379/2013. *Marine Policy*, 71, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2016.05.026>
- Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R., y Thorpe, R. S. (2007). Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, 173(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.09.013>
- de Brito, M. A., Schneider, H., Sampaio, I., y Santos, S. (2015). DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). *Food Research International*, 70, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.031>
- Di Pinto, A., Di Pinto, P., Terio, V., Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E., y Tantillo, G. (2013). DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chemistry*, 141(3), 1757-1762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.093>
- Doyle, J. J., y Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.

- Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., y Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 408-421. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.002>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fernández-Méndez, C., Castro-Ruiz, D., García-Dávila, C. R., Duponchelle, F., Renno, J. F., y Nuñez, J. (2012). Adaptación, crecimiento y supervivencia de alevines de dondella *Pseudoplatystoma punctifer* al consumo de alimento balanceado. *Folia Amazónica*, 21(1-2), 63-70. <https://doi.org/10.24841/fa.v21i1-2.33>
- Ferrari, G. T., Corser, P. I., Salas, E. M., y Barboza, Y. (1999). Separación de proteínas sarcoplásmicas por electroforesis en gel de agarosa como método para la identificación de algunas especies de pescado. *Revista Científica*, 9(1). Recuperado de <http://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14398>
- Filonzi, L., Chiesa, S., Vaghi, M., y Nonnis Marzano, F. (2010). Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International*, 43(5), 1383-1388. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.016>
- Food and Drug Administration. (2017). U.S.C. Title 21—Food and drugs. Recuperado 7 de diciembre de 2019, de <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2017-title21/html/USCODE-2017-title21.htm>
- Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Mohammed-Geba, K., Borrell Pichs, Y., y Garcia-Vazquez, E. (2014). DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*, 46, 441-445. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.016>
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., ... Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036>
- Gallo, R. G. (2000). Situación del manejo de las pesquerías de grandes bagres migratorios amazónicos en el Perú (p. 22) [Informe de campo]. Iquitos, Perú: FAO.
- García, A., Tello, S., Vargas, G., y Duponchelle, F. (2009). Patterns of commercial fish landings in the Loreto region (Peruvian Amazon) between 1984 and 2006. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 53-67. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9212-7>

- García- Dávila, C., Castro- Ruiz, D., Renno, J.-F., Chota- Macuyama, W., Carvajal- Vallejos, F. M., Sanchez, H., ... Duponchelle, F. (2015). Using barcoding of larvae for investigating the breeding seasons of pimelodid catfishes from the Marañón, Napo and Ucayali rivers in the Peruvian Amazon. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(S4), 40-51. <https://doi.org/10.1111/jai.12987>
- García-Dávila, C. R., Castro-Ruiz, D., Sánchez-Ribeiro, H., Ismiño-Orbe, R. A., Rengifo-Trigoso, D., García-Vásquez, A., ... Renno, J. F. (2014). Diversidad de ictioplancton en los ríos Curaray, Arabela y Napo (Amazonía peruana). *Folia Amazónica*, 23(1), 67-78. <https://doi.org/10.24841/fa.v23i1.9>
- Ghovvati, S., Nassiri, M. R., Mirhoseini, S. Z., Moussavi, A. H., y Javadmanesh, A. (2009). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*, 20(8), 696-699. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.002>
- Guerra Flores, H. (1995, octubre). Estado actual del conocimiento de la pesquería en la Amazonía Peruana.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, (41), 95-98.
- Handy, S. M., Deeds, J. R., Ivanova, N. V., Hebert, P. D. N., Hanner, R. H., Ormos, A., ... Yancy, H. F. (2011). A single-laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance. *Journal of AOAC International*, 94(1), 201-210.
- Hanner, R., Becker, S., Ivanova, N. V., y Steinke, D. (2011). FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. *Mitochondrial DNA*, 22(sup1), 106-122. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588217>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., y deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., y Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>

- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., y Francis, C. M. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLOS Biology*, 2(10), e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Henriques, J. M., Silva, G. J. C., Ashikaga, F. Y., Hanner, R., Foresti, F., y Oliveira, C. (2015). Use of DNA barcode in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). *DNA Barcodes*, 3(1), 118–128. <https://doi.org/10.1515/dna-2015-0015>
- Hubert, N., Delrieu-Trottin, E., Irisson, J.-O., Meyer, C., y Planes, S. (2010). Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding: A test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3), 1195-1203. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.02.023>
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., Burridge, M., ... Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLOS ONE*, 3(6), e2490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002490>
- Jacquet, J. L., y Pauly, D. (2008). Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*, 32(3), 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2007.06.007>
- Lamendin, R., Miller, K., y Ward, R. D. (2015). Labelling accuracy in Tasmanian seafood: An investigation using DNA barcoding. *Food Control*, 47, 436-443. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.039>
- Lasso, C. A., Agudelo, E., Jiménez-Segura, L. F., Ramírez-Gil, H., Morales-Betancourt, M., Ajiaco-Martínez, R. E., ... Sanabria, A. I. (2011). I. Catálogo de los recursos pesqueros continentales de Colombia. Bogotá, D.C., Colombia.
- Librado, P., y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lockley, A. K., y Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 67-77. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00049-2)
- Luo, A., Zhang, A., Ho, S. Y., Xu, W., Zhang, Y., Shi, W., ... Zhu, C. (2011). Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: A case study using eutherian mammals. *BMC Genomics*, 12, 84. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-84>

- Maggia, M. E., Vigouroux, Y., Renno, J. F., Duponchelle, F., Desmarais, E., Nunez, J., ... Mariac, C. (2017). DNA Metabarcoding of Amazonian Ichthyoplankton Swarms. *PLOS ONE*, 12(1), e0170009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170009>
- Mariani, S., Griffiths Andrew M, Velasco Amaya, Kappel Kristina, Jérôme Marc, Perez-Martin Ricardo I, ... Sotelo Carmen G. (2015). Low mislabeling rates indicate marked improvements in European seafood market operations. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13(10), 536-540. <https://doi.org/10.1890/150119>
- Maturana, C. S., Moreno, R. A., Labra, F. A., González-Wevar, C. A., Rozbaczyló, N., Carrasco, F. D., y Poulin, E. (2011). DNA barcoding of marine polychaetes species of southern Patagonian fjords. *Revista de biología marina y oceanografía*, 46(1), 35-42. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572011000100005>
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ed.). (2016). Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura. Recuperado de <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/pescadoweb.pdf>
- Ministerio de la Producción. (2018). Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. La actividad productiva del sector en números (Primera). Recuperado de http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca_2017.pdf
- Mueller, O. (2006). Arapaima gigas market study. Current status of Arapaima global trade and perspectives on the Swiss, French and UK markets.
- Muñoz-Colmenero, M., Blanco, O., Arias, V., Martínez, J. L., y García-Vázquez, E. (2016). DNA Authentication of Fish Products Reveals Mislabeling Associated with Seafood Processing. *Fisheries*, 41(3), 128-138. <https://doi.org/10.1080/03632415.2015.1132706>
- Neto, D. A. P. (2013). Detecção de adulteração de espécies em pescado e derivados por meio da técnica de DNA barcoding (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais). Recuperado de <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUBD-9D8EAV>

- Neto, D. A. P. (2017). Validação do ensaio genético de determinação de espécies de pescado por DNA Barcode segundo ABNT NBR ISO/IEC 17025 e desenvolvimento de método para identificação molecular de espécies de Salmão e Trutas por minissequenciamento (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais). Recuperado de <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-ARBGKL>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Recuperado de <http://www.fao.org/3/I9540es/i9540es.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Ginebra: OMS.
- Organización Mundial de la Salud, y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2007). Etiquetado de los Alimentos (Quinta). Recuperado de <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3203486>
- Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, R., Foresti, F., y Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(sup1), 71-79. <https://doi.org/10.3109/19401736.2010.532213>
- Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., y Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>
- Pires, A. C., y Marinoni, L. (2010). DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: A view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, 10(2), 339-346. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000200035>
- Programa Nacional A comer pescado. Unidad de Gestión Estratégica y Evaluación. (2015). Patrones de consumo de productos hidrobiológicos en el Perú. Una aproximación con la Encuesta Nacional de Hogares. Ministerio de la Producción.
- Ratnasingham, S., y Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>

- Ríos, M. (2019, febrero 5). Consumo per cápita de productos hidrobiológicos en el Perú aumentó a 16.8kg. *Gestión*. Recuperado de <https://gestion.pe/economia/consumo-per-capita-productos-hidrobiologicos-peru-aumento-16-8kg-257858-noticia/>
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., y Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195-209. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00270-X)
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Scarano, D., y Rao, R. (2014). DNA Markers for Food Products Authentication. *Diversity*, 6(3), 579-596. <https://doi.org/10.3390/d6030579>
- Schaefer, F., Kloas, W., y Wuertz, S. (2012). Arapaima—Candidate for intensive freshwater aquaculture. *Global Aquaculture Alliance*, 15, 50-51.
- Steinke, D., Zemlak, T. S., y Hebert, P. D. N. (2009). Barcoding Nemo: DNA-Based Identifications for the Ornamental Fish Trade. *PLOS ONE*, 4(7), e6300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006300>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- The European Parliament and The Council of the European Union. (2013). Regulation (EU) No 1379/2013 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2013 on the common organisation of the markets in fishery and aquaculture products, amending Council Regulations (EC) No 1184/2006 and (EC) No 1224/2009 and repealing Council Regulation (EC) No 104/2000. 21.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.

- Tinacci, L., Guidi, A., Toto, A., Guardone, L., Giusti, A., D'Amico, P., y Armani, A. (2018). DNA barcoding for the verification of supplier's compliance in the seafood chain: How the lab can support companies in ensuring traceability. *Italian Journal of Food Safety*, 7(2). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.6894>
- Ward, R. D., Zemplak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., y Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Wong, E. H.-K., y Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41(8), 828-837. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.005>
- Xiong, X., Yao, L., Ying, X., Lu, L., Guardone, L., Armani, A., ... Xiong, X. (2018). Multiple fish species identified from China's roasted Xue Yu fillet products using DNA and mini-DNA barcoding: Implications on human health and marine sustainability. *Food Control*, 88, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.035>
- Yancy, H. F., Zemplak, T. S., Mason, J. A., Washington, J. D., Tenge, B. J., Nguyen, N.-L. T., ... Hebert, P. D. N. (2008). Potential use of DNA barcodes in regulatory science: Applications of the Regulatory Fish Encyclopedia. *Journal of Food Protection*, 71(1), 210-217.
- Zhang, J. B., y Hanner, R. (2011). DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(1), 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.12.017>

ANEXO 2

PRECIOS PROMEDIO (EN SOLES) POR KILOGRAMO DE PESCADO EN LOS MERCADOS DE LAS CIUDADES DE IQUITOS Y PUCALLPA

<i>Nombre científico de la especie</i>	<i>Nombre común declarado por el comerciante</i>	<i>Precio promedio (en soles) por kilogramo de pescado*</i>
<i>P. granulosus</i>	<i>Cahuara</i>	<i>4</i>
<i>Z. zungaro</i>	<i>Cunchimama</i>	<i>8</i>
<i>B. filamentosum</i>	<i>Saltón</i>	<i>10</i>
<i>B. juruense</i>	<i>Alianza</i>	<i>10</i>
<i>B. platynemum</i>	<i>Tablabarba</i>	<i>13</i>
<i>P. hemioliopterus</i>	<i>Pez torre</i>	<i>13</i>
<i>P. tigrinum</i>	<i>Tigre zúngaro</i>	<i>20</i>
<i>B. vaillantii</i>	<i>Manitoa</i>	<i>10</i>
<i>P. punctifer</i>	<i>Doncella</i>	<i>23</i>
<i>A. gigas</i>	<i>Paiche</i>	<i>23</i>
<i>S. planiceps</i>	<i>Achacubo</i>	<i>20</i>

* Precios promedio declarados por los comerciantes durante los años 2017 y 2018.