

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Identificación de carne de tiburón utilizando PCR en productos de venta en mercados y pescaderías de Quito, Guayaquil e Ibarra.

Dana Catalina Serrano Abarca

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Identificación de carne de tiburón utilizando PCR en productos de venta en
mercados y pescaderías de Quito, Guayaquil e Ibarra.**

Dana Catalina Serrano Abarca

Nombre del profesor, Título académico

Juan José Guadalupe, MSc.

Nombre del profesor, Título académico

Gabriela Pozo, M.B.S.

Quito, 20 de diciembre de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Dana Catalina Serrano Abarca

Código: 00212580

Cédula de identidad: 1750439018

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La autenticidad de las especies de pescados comercializadas en Ecuador ha suscitado inquietud porque recientes investigaciones han revelado casos de sustitución por especies de tiburón protegidas y/o en peligro de extinción. Este estudio es la continuación de investigaciones previas realizadas en Ecuador. El objetivo de esta investigación es la identificación molecular de especies de tiburón comercializadas como pescado en mercados y pescaderías de Quito, Guayaquil e Ibarra. Se recolectó 50 muestras de carne de pescado vendidas como: “corvina barata”, “atún”, “picudo” y “albacora”. La identificación de tiburón fue mediada por PCR múltiple basadas en el marcador ITS2 del ADN ribosomal. De las muestras recolectadas, se encontró 22 muestras positivas para tiburón en la Sierra y ninguna positiva en la Costa. Este hallazgo sugiere la posibilidad de fraude alimentario por sustitución de alimentos y falta de trazabilidad. Las especies identificadas incluyeron: tiburón rabón bueno (*Alopias pelagicus*) 63.63%; tiburón azul (*Prionace glauca*) 18.19%; tiburón sedoso (*Carcharhinus falciformis*) 9.09% y tiburón martillo liso (*Sphyrna zygaena*) 9.09%. Estos resultados se vinculan al tipo de pesca regional y hábito migratorio de las especies. Igualmente, podrían relacionarse con la autorización de la pesca incidental en Ecuador y/o con el incumplimiento de las regulaciones nacionales y acuerdos internacionales. La importancia de los tiburones radica en el mantenimiento de la salud y equilibrio del ecosistema marino. No obstante, la sobrepesca contribuye a la disminución de sus poblaciones. La detección de tiburón comercializado contribuirá en su conservación, probablemente evitará su sobreexplotación y promoverá una pesca sostenible.

Palabras Clave: tiburones, conservación, sobrepesca, PCR múltiple, marcador ITS2, sustitución de alimentos.

ABSTRACT

The authenticity of commercialized fish specimens in Ecuador has brought concerns because recent investigations have revealed cases of substitution of fish specimens with protected and/or endangered shark specimens. This study is the continuation of earlier investigations carried out in Ecuador. The objective of this research is the molecular identification of shark species that are traded as fish in markets and fishmongers in Quito, Guayaquil, and Ibarra. Fifty samples of fish meat sold as: "corvina barata," "tuna," "picudo," and "albacora" were collected. Shark DNA was identified using multiplex PCR based on the ITS2 marker of ribosomal DNA. Of the collected samples, twenty-two were positive for shark in the Sierra region, and none were identified as positive in the Coast region. This result suggests the possibility of food fraud through food substitution and lack of traceability. The identified species were thresher shark (*Alopias pelagicus*) 63.63%; blue shark (*Prionace glauca*) 18.19%; silky shark (*Carcharhinus falciformis*) 9.09%; and smooth hammerhead shark (*Sphyrna zygaena*) 9.09%. These results are linked to the type of regional fishing and migratory habits of these species. In the same way, the results could be related to the authorization of incidental fishing in Ecuador and/or the non-compliance with the national regulations and international agreements. The relevance of sharks lies in maintaining the health and balance of the marine ecosystem. However, overfishing contributes to the shark population decline. The detection of traded sharks will contribute to the conservation of the species, likely prevent overexploitation, and promote sustainable fishing.

Key words: sharks, conservation, overfishing, multiplex PCR, ITS2 marker, food substitution.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	12
1.1.	Información general de los tiburones	12
1.1.1.	Características principales de los tiburones y su presencia en Ecuador ..	12
1.1.2.	Importancia de los tiburones para los ecosistemas marinos y la humanidad.	12
1.2.	Pesca de tiburón como amenaza a su existencia	13
1.3.	Identificación molecular de tiburón	14
2.	MÉTODOS	16
2.1.	Colección de tejido de pescado en mercados y pescaderías	16
2.2.	Extracción de ADN genómico y cuantificación	16
2.3.	Selección de primers y amplificación del marcador ITS2	17
2.4.	Identificación de presencia de ADN de tiburón e identificación de familia por medio de PCR simple	17
2.5.	Identificación de especies de tiburón de las muestras positivas mediante PCR triple y quintuple	18
3.	RESULTADOS	19
3.1.	Recolección de muestras obtenidas en pescaderías y mercados	19
3.2.	Extracción, cuantificación y calidad de ADN extraído de carne de pescado	19
3.3.	Amplificación de las regiones ITS2 para la identificación de tiburón en carne analizada	19
3.3.1.	Identificación de tiburón con PCR simple y primers universales	19
3.3.2.	Identificación de las especies de tiburón con primers especie específicos y PCR simple y múltiple	20
4.	DISCUSIÓN	22
4.1.	Extracción y cuantificación de ADN de pescado	22
4.2.	PCR múltiple para la identificación de presencia de tiburón y especies	22
4.3.	Identificación de especies relacionado al tipo de pesca y hábito migratorio	23
4.4.	Proporción relativa de las especies encontradas y su estado de conservación ..	23
4.5.	Fraude alimentario en la Sierra y normas que protegen al consumidor	24
4.6.	Aplicación de herramientas moleculares en la conservación de las especies	25
5.	CONCLUSIONES	26
6.	TABLAS	27

7. FIGURAS.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de primer universales y especie-específico para especies de tiburón encontrados en aguas ecuatorianas	27
Tabla 2. Lista de muestras de carne de pescado comprados en mercados y pescaderías de 3 ciudades junto a la fecha de recolección	29
Tabla 3. Lista de controles positivos y negativos utilizados en la PCR.....	30
Tabla 4. Lista de muestras junto a su identidad después de haber realizado PCR.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la amplificación de la región ITS2 del ARNr de tiburón .	33
Figura 2. Diagrama de flujo para la elección de PCR Múltiple.	34
Figura 3. Evaluación de la integridad del ADN genómico de las muestras.....	35
Figura 4. PCR simple para la identificación de presencia de tiburón y su especie.....	36
Figura 5. PCR quintuple para la identificación de especie.	37
Figura 6. Comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio vs. Estudios realizados en Quito (2014) y Santo Domingo de los Tsáchilas (2022).	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación y determinación de la calidad de ADN de las muestras recolectadas	43
Anexo 2. PCR simple de muestras que amplificaron banda a pesar de no ser tiburón de la pescadería El Dorado, Ibarra.	44

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Información general de los tiburones

1.1.1. Características principales de los tiburones y su presencia en Ecuador

Los tiburones, miembros de los peces cartilagosos, han formado parte de las comunidades marinas durante más de 400 millones de años (Cortés, 2000). Estos depredadores son distribuidos globalmente y caracterizados por su esqueleto cartilaginoso, aletas pectorales, mandíbulas con grandes dientes afilados y hendiduras branquiales en la cabeza (Ebert, et al., 2014). Poseen sentidos agudos, incluyendo una buena visión, un olfato agudo y órganos electrorreceptores para localizar presas mediante la detección de sus campos electromagnéticos (Castro, 2010). Los tiburones pertenecen al superorden Selachimorpha y a la subclase Elasmobranchii, que también incluye a las rayas (Ebert, et al., 2014; Castro, 2010). Los tiburones comprenden más de 536 especies conocidas de su subclase y 37 familias del superorden (Ebert, et al., 2014; Mull, et al., 2022). Ecuador cuenta con más de 70 especies de tiburones (WWF, 2019). Las más encontradas en diversos estudios dentro del país son: tiburón rabón bueno (*Alopias pelagicus*), tiburón azul (*Prionace glauca*), tiburón sedoso (*Carcharhinus falciformis*); tiburón martillo (*Sphyrna zygaena* y *Sphyrna lewini*); tiburón rabón amargo (*Alopias superciliosus*); y tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*) (Martínez y Galván., 2007; Hidalgo, 2013; Mateo, 2014; Manzanillas y Acosta, 2022).

1.1.2. Importancia de los tiburones para los ecosistemas marinos y la humanidad.

Los tiburones desempeñan un papel crucial en los ecosistemas marinos debido a su importancia en las redes alimentarias. Su disminución en número puede tener efectos negativos, como la disminución de la mortalidad natural de las presas y cambios en la abundancia, distribución y comportamiento de otras especies como mesopredadores elasmobranquios, tortugas y mamíferos marinos (Ferretti, et al., 2010). Además, son esenciales para mantener el

equilibrio trófico en el océano al eliminar peces débiles y enfermos (Galindo, 2010), y actúan como indicadores de la salud oceánica (Motivarash, et al., 2020). Desde una perspectiva de investigación, los tiburones son valiosos para el estudio de la biología de la conservación. Esto se debe a su singularidad evolutiva y a su capacidad para sobrevivir a extinciones masivas, lo que ha llevado a genetistas a investigar su historia evolutiva (Domingues, et al., 2018). En términos económicos, el avistamiento de tiburones por parte de turistas genera ingresos significativos, con alrededor de 590,000 turistas gastando 314 millones de dólares al año y generando 10,000 empleos. Además, la pesca mundial de tiburones produce 630 millones de dólares anuales (Cisneros, et al., 2013).

1.2. Pesca de tiburón como amenaza a su existencia

A pesar de los beneficios económicos que derivan de los tiburones, se ha observado una disminución en sus poblaciones y la de las rayas, incrementando su vulnerabilidad. Desde 1970, a nivel global, hay una disminución del 71% en la abundancia de tiburones y rayas. Este fenómeno se ha correlacionado con un incremento de 18 veces en la presión pesquera relativa (Pacoureaux, et al., 2021 y Manzanillas y Acosta, 2022). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) indica que el estado de conservación de muchas especies de tiburones comerciales es preocupante, en el caso de los tiburones pelágicos, más del 77% de las especies se encuentran en estado de amenaza (Fowler, 2021). Estos grupos son clasificados como especies protegidas en los Apéndices de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) (Pacoureaux, et al., 2021).

En un análisis llevado a cabo durante el período 2007-2018 por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Ecuador se sitúa en la vigésima posición de la lista de las naciones con mayores capturas de tiburones a nivel global,

registrando una captura media anual de 7,540 individuos (Fowler, 2021). De acuerdo con el Decreto Ejecutivo 486 (2007), a nivel nacional, se prohíbe la pesca dirigida de tiburones, sin embargo, se permite la pesca incidental y la comercialización de los productos pesqueros derivados de esta actividad. En contraste, leyes como la Ley Orgánica para el desarrollo de la Acuicultura y Pesca e iniciativas gubernamentales como el Plan de Acción Nacional para la Conservación y el Manejo de Tiburones de Ecuador (PAT-Ec) implementan medidas destinadas a fomentar la conservación, evitar la sobreexplotación y promover el uso sostenible de estas especies (Aguilar, et al., 2005; Rosero y Rosero, 2020).

1.3. Identificación molecular de tiburón

La identificación de las especies comercializadas desempeña un papel crucial en el fortalecimiento y posible reforma de las leyes orientadas a la conservación de los tiburones. Una estrategia efectiva para dicho propósito implica el uso de marcadores moleculares, como los espacios internos de transcripción (ITS2) del ADN ribosomal (ADNr) (Manzanillas y Acosta, 2022). Los ITS2 son regiones que se encuentran flanqueando a los componentes codificantes 5,8S y 28S. La región ITS2 se usa en estudios taxonómicos y filogenéticos por su alta divergencia entre taxones, especialmente por encima del nivel de género. La ventaja de usar este marcador para identificar tiburón es que existe una escasa probabilidad de amplificar ADN de otras especies (Shivji et al., 2002; Chapman et al., 2003; Abercrombie, 2004; Hidalgo, 2013;).

Para la amplificación del marcador ITS2, la técnica de PCR múltiple es fundamental. Esta variante de la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) común permitirá usar más de un par de primers a la vez (Abercrombie, 2004) (Tabla 1). En otras palabras, esto significa que simultáneamente se puede identificar varias especies de tiburón y las familias a las que pertenecen en una sola PCR amplificando la región ITS2. Por ejemplo, al identificar al tiburón

Isurus oxyrinchus, se producen 2 amplicones: uno de familia y otro de especie (Figura 1) (Shivji et al., 2002).

Dichas técnicas de identificación molecular han permitido conocer qué especies de tiburón son las más comercializadas en los mercados de Ecuador. Existen varios estudios internacionales usando la técnica de PCR múltiple y marcadores ITS2 para la caracterización de tiburón como: Pank et al. (2001), Shivji et al. (2002), Chapman et al. (2003) y Abercrombie (2004), etc. También hay estudios nacionales que evalúan carne de tiburón vendida como distintos pescados en los mercados del Ecuador (Mateo, 2014; Manzanillas y Acosta, 2022).

Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo principal la identificación molecular de especies de tiburón comercializadas como pescado en mercados y pescaderías de Quito, Guayaquil e Ibarra. Los objetivos secundarios serán: a) identificar las especies más comercializadas en la actualidad, comparándolas con estudios pasados; b) realizar un contraste entre la cantidad de tiburón vendido en la Sierra a comparación de la Costa c) analizar el marco legislativo del país y acuerdos internacionales que resguardan las especies y protegen al consumidor de pescado, para proponer soluciones y mejoras que promuevan la conservación de tiburones y resguarden al consumidor.

2. MÉTODOS

2.1. Colección de tejido de pescado en mercados y pescaderías

De junio a septiembre del 2023 se tomaron muestras de pescado de mercados y pescaderías de las ciudades de Quito, Guayaquil e Ibarra; estas muestras eran vendidas como “corvina barata”, “atún”, “picudo” y “albacora”. En Quito se visitó 3 mercados: Iñaquito, América y Calderón y en Guayaquil se visitó también 3 mercados: Sauces 9, Central y Este. En cambio, en Ibarra se tomó muestras de 2 mercados: La Playa, Santo Domingo y una pescadería: El Dorado. De cada mercado/pescadería se obtuvo un promedio de 5 muestras. Las muestras tomadas se trasladaron en coolers hasta el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (USFQ) y se almacenaron a -20°C (Tabla 2).

2.2. Extracción de ADN genómico y cuantificación

La extracción del ADN genómico se hizo siguiendo el protocolo de Broderick, et al. (2011), usado para la extracción de ADN de pescado, con algunas variaciones y/o condiciones específicas. Los pedazos de tejido cortados pesaban en promedio 100 mg y para la eliminación de proteínas se colocó 5 μl de proteinasa K. También, para la precipitación se colocó 250 μl de acetato de amonio y centrifugó por 20 min a 18 000 rcf (g) a temperatura de 4°C . A su vez, en el paso de precipitación se centrifugó por 20 min a 18 000 rcf (g) a 4°C . Luego, en los pasos de lavados se centrifugó por 20 min a 10 000 rpm a temperatura de 4°C . Finalmente, se colocó 35 μl de agua de PCR para la resuspensión y se almacenó a -20°C .

Después de 24 horas se cuantificó y determinó la calidad del ADN con NanoDrop 2000TM (Thermo Scientific) (Thermo Fisher Scientific, 2009). Para evaluar la integridad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,5% a 100 V por 30 minutos. El gel se fotografió con ayuda del foto-documentador GelDoc (Biorad).

2.3. Selección de primers y amplificación del marcador ITS2

La selección de primers se basó en estudios previos realizados por Pank et al., 2001, Shivji et al., 2002, Abercrombie., 2004 y Abercrombie, et al., 2005 para la identificación de 10 especies de tiburón pertenecientes a 4 familias. Estas especies se encuentran en aguas ecuatorianas y muchas de ellas son muy comercializadas en mercados del país (Hidalgo, 2013; Mateo, 2014; Manzanillas y Acosta, 2022). Los primers universales forward y reverse de tiburón amplifican la región ITS2 (FISH5.8SF y FISH28SR) e identifican la presencia de ADN de tiburón de la muestra. El tamaño de amplicón formado difiere según la familia a la que pertenezca. Los primers especie-específicos forward son para identificar la especie de tiburón (Tabla 1).

2.4. Identificación de presencia de ADN de tiburón e identificación de familia por medio de PCR simple

Los primers universales forward y reverse de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) seleccionados, que amplifican la región ITS2, fueron empleados para identificar la presencia de tiburón con PCR simple en las muestras recolectadas (Hidalgo, 2013). La concentración de reactivos para la PCR se basó en lo establecido por Pinhal, et al., 2012. Cada 25 μ l de Reacción de PCR contiene 20-25 ng/ μ l de ADN, 12,5 picomol de cada primer, 1X de Buffer de PCR (Invitrogen), 2.0 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, y una unidad de PlatinumTM Taq ADN Polimerasa. La PCR se amplificó bajo las siguientes condiciones establecidas por Hidalgo (2013): denaturación inicial por 15 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos de denaturación a 94°C durante 1 minuto, annealing de 65°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos de extensión y 5 minutos a 72°C de extensión final. Después del ciclaje, se mantuvo la muestra a 4°C o -20°C. Posteriormente, la muestra se analizó en electroforesis de gel de agarosa al 2% y se empleó el Ladder 100 pb (Invitrogen). Se dejó correr durante 2 horas a 80 V. Finalmente, se

reveló en el foto-documentador GelDoc XR (Biorad) y se identificó bajo luz Ultravioleta (UV) las bandas en el caso que se hayan formado.

Si se formaban bandas de 860, 1200, 1350 y 1470 pb significaba que la muestra pertenecía a tiburón, es decir dieron positivo para tiburón. El tamaño de la banda indicaba a que familia pertenecía. Si había ausencia de banda o se formaban bandas con tamaños inferiores significaba que la muestra no era tiburón. Para la interpretación del tamaño de bandas se usaron muestras que previamente se conocía que eran tiburón como controles positivos. En la PCR simple se usó 3 controles positivos (Io52, Ap13 y Pg 209) y como control negativo corvina. Todos los controles del estudio pertenecen a una investigación previa de Hidalgo, 2013 (Tabla 3).

2.5. Identificación de especies de tiburón de las muestras positivas mediante PCR triple y quintuple

Una vez identificada la familia de la muestra que dio positivo para tiburón, se prosiguió con la PCR múltiple. El número de primers específicos usados en la PCR dependían de la familia analizada. Es decir, en un primer escenario, si la muestra perteneció a la familia Lamnidae, se realizaba PCR triple. En esta PCR se colocó un primer forward especie específico, un universal forward y un universal reverse. Se esperó observar 2 bandas: la banda de familia (banda de diagnóstico) y otra banda de especie (Tabla 1). En el segundo caso, para la familia Carcharinidae/Sphyrnidae/Alopiidae, se realizó una PCR quintuple. En esta PCR se colocó 3 primers especie específico y los 2 universales. Igualmente, se formó la banda de familia y la banda de especie.

En caso de no formarse banda de especie, se realizó varias PCR simples con un primer especie específico forward y el primer universal reverse, hasta saber qué especie era (Figura 2). En las PCRs se usó un control negativo (corvina) y un control positivo que dependía de la familia analizada (Tabla 3).

3. RESULTADOS

3.1. Recolección de muestras obtenidas en pescaderías y mercados

Se obtuvo 50 muestras en total de carne de pescado que se vendía bajo el nombre de “corvina barata”, “picudo”, “atún” y “albacora” de 5 mercados y 1 pescadería de la Sierra (Quito e Ibarra) y 3 mercados de la Costa (Guayaquil) (Tabla 2).

3.2. Extracción, cuantificación y calidad de ADN extraído de carne de pescado

La cuantificación inicial del ADN extraído oscilaba entre 33.7 a 8540.7 (ng/μl), con un promedio de 879.71 (ng/μl). Después de la dilución se obtuvo una concentración de ADN entre 20-25 (ng/μl). En cuanto a la calidad de ADN, los valores A260/A280 fueron en promedio 1.88 y de A260/230 en promedio fue 1.55. El valor en promedio de A260/A280 se ubicó dentro del rango 1.8-2.0, que indica una muestra libre de contaminantes y/o compuestos aromáticos (Thermo Fisher Scientific, 2016). El valor en promedio de A260/230 está fuera del rango de 2.0-2.2. Este rango indica ausencia de contaminantes como carbohidratos, sales caotrópicas o fenoles (Thermo Fisher Scientific, 2016). Así mismo, al correr el gel de electroforesis al 1.5% con ADN genómico, se observó bandas discretas con un ligero smear (Figura 3).

3.3. Amplificación de las regiones ITS2 para la identificación de tiburón en carne analizada

3.3.1. Identificación de tiburón con PCR simple y primers universales

La amplificación de la región ITS2 del ARN ribosomal con los primers universales: forward (FISH5.8SF) y reverse (FISH28SR) fue exitosa. Con esta PCR se identificó un total de 22 tiburones en las 50 muestras colectadas en los distintos sitios de la Sierra, esto representa el 44% de muestras totales. En la Costa no se encontró tiburón. De las muestras de la Sierra que fueron positivas, 6 amplicones tuvieron un tamaño de 1470 pb, correspondientes a familia Carcharinidae. 14 amplicones tuvieron un tamaño de 1200 pb, correspondientes a familia

Alopiidae y 2 amplicones tuvieron un tamaño de 860 pb, correspondientes a familia Sphyrnidae. La figura 4a. es el ejemplo de cómo se definió una muestra positiva para tiburón por la presencia de banda con los tamaños esperados entre 860-1470 pb. Además, se identificó la familia de tiburón basándose en el tamaño de las bandas y comparándolas con los controles. Las muestras demostraron pertenecer a las familias Sphyrnidae y Carcharinidae Después se identificó la especie dependiendo la familia hallada.

3.3.2. Identificación de las especies de tiburón con primers especie específicos y PCR simple y múltiple

Las muestras correspondientes a *Prionace glauca* tuvieron una banda de 929 pb, al igual que su control positivo Pg209. En cambio, las muestras pertenecientes a *Carcharinus falciformes* tuvieron un tamaño de 1085 pb que coincidía con su control positivo Cf217. Las muestras identificadas como *Sphyrna zygaena*, por su lado tuvieron un tamaño 249 pb, que coincidió con el tamaño del control Sz3. Por último, las muestras identificadas como *Alopias pelagicus* tuvieron un tamaño de 230 pb al igual que el control positivo de Ap13. Los controles se especifican en la Tabla 3.

De las 22 muestras de la Sierra positivas para tiburón: 14 fueron de tiburón rabón bueno (*Alopias pelagicus*), esto representó el 63.63% de las muestras positivas; 4 fueron de tiburón azul (*Prionace glauca*), cuyo porcentaje fue de 18.19%; 2 pertenecieron a tiburón sedoso (*Carcharinus falciformes*), lo que significó el 9.09% de las muestras y 2 fueron tiburón martillo liso (*Sphyrna zygaena*), con el 9.09% (Tabla 4).

De manera específica, cuando se hizo la PCR quintuple, se pudo identificar 3 familias: Alopiidae, Sphyrnidae y Carcharinidae. De las 22 muestras positivas, 19 se identificaron con esta técnica y las especies halladas fueron: *Alopias pelagicus*, *Sphyrna zygaena*, y *Prionace glauca* que tenían bandas de 230 pb, 249 pb, y 929 pb, respectivamente. La figura 5 es un

ejemplo de la identificación de especie, donde se forma una banda de 230 pb, perteneciente a la especie *Alopias pelagicus* y una banda de diagnóstico de 1200 pb, perteneciente a la familia. La banda de 230 pb se asemeja al control positivo Ap13 que también es de *Alopias pelagicus*. Las 3 muestras que no pudieron identificarse con la PCR quintuple fueron identificadas su especie por PCR simple. Esta PCR permitió la detección de 2 especies: 2 ejemplares de *Carcharinus falciformes* y 1 ejemplar de *Prionace glauca*, cuyas bandas fueron de 1085 pb y 929 pb, respectivamente. La figura 4b. es un ejemplo de la aplicación de esta PCR simple para la identificación de *Prionace glauca*. La muestra formó una banda de 929 pb, lo que se asemeja al control positivo Pg209 que también es de *Prionace glauca*.

4. DISCUSIÓN

4.1. Extracción y cuantificación de ADN de pescado

Se obtuvo ADN de calidad, dentro de los rangos 260/280. Aunque es posible que exista contaminación por carbohidratos, sales o fenoles por estar fuera de los rangos 260/230, mencionados en resultados (Thermo Fisher Scientific, 2016). Además, se considera a la integridad del ADN como adecuada, según el Departamento de Control de Calidad del Banco Nacional de ADN (2020), al presentar una banda definida en la parte superior del gel con un ligero smear (que puede indicar degradación).

4.2. PCR múltiple para la identificación de presencia de tiburón y especies

La PCR permitió la detección de 22 muestras positivas para tiburón pertenecientes a 4 especies (*Alopias pelagicus*, *Carcharinus falciformes*, *Sphyrna zygaena* y *Prionace glauca*). Con la PCR simple se formaron bandas pertenecientes a 3 familias (Carcharinidae, Sphyrnidae y Alopiidae). Sin embargo, con la PCR múltiple, muchas veces la banda de familia dejaba de verse al incorporar los primers especie específicos para especie (Figura 5). Pank et al. (2001), Shivji et al. (2002), Chapman et al. (2003) y Abercrombie (2004), lo atribuyen a la competencia de primers, porque el primer forward universal tiene un sitio de hibridación muy próximo al sitio de los primer forward especie específicos. Si bien no se formó la banda de familia en la PCR múltiple, ya se sabía previamente que esta muestra si pertenecía a tiburón. Por tal motivo es recomendado empezar por una PCR simple para evitar falsos positivos en la PCR múltiple.

En la PCR se usó 3 controles positivos, con estos se probó la especificidad de los primers y la corvina como control negativo evitó falsos positivos. Los controles negativos sin bandas implicaron que no existió contaminación de reactivos con alguna muestra (Mateo, 2014). Por otro lado, en la PCR simple con primers universales de las muestras de la pescadería se

amplificaron regiones no-target, estas fueron evaluadas con primer-BLAST y se identificó que pertenecían posiblemente a 2 especies de pescado (Anexo 3) (Ye et al., 2012).

4.3. Identificación de especies relacionado al tipo de pesca y hábito migratorio

Las corrientes oceánicas y vientos en la línea ecuatorial promueven el ascenso de las aguas de las profundidades a la superficie incrementando la productividad primaria (Martínez, et al, 2007). Estas áreas son de interés para las pescaderías del país, al ser zonas de mayor productividad. Los tipos de pesca predominantes son: la “oceánico-artesanal” con palangres pelágicos, la flota “costera-artesanal” con redes de enmalle de superficie y fondo y las redes de cerco (Martínez, et al, 2015; Bailón, 2023). Los tiburones se localizan en aguas pelágicas, donde son susceptibles a la pesca y viven en aguas ecuatorianas al destinarlas como zonas de crianza, alimentación y desarrollo. Muchos nadan junto a bancos de peces epipelágicos, atún, dorado, etc., lo que les hace susceptibles a las pescas dirigidas a estas especies (WWF, 2019) . De las 4 especies encontradas: el tiburón martillo liso se encuentra en la superficie y el epipelágico (hasta 200 metros de profundidad), por eso es susceptible a las redes de cerco. El tiburón rabón bueno, sedoso y azul se distribuyen entre el epipelágico y mesopelágico (0-1000 metros de profundidad), por eso son susceptibles a las pescas “costera y oceánica- artesanal” y redes de cerco (WWF, 2019; Fowler, et al., 2021). Según Martínez, et al., 2015, las capturas por palangre están predominadas por Alopiidae (principalmente tiburón rabón bueno), a esto le siguen los carcharínidos (especialmente tiburones azules y sedosos), y los tiburones martillo.

4.4. Proporción relativa de las especies encontradas y su estado de conservación

En el estudio realizado en Manta por Martínez, et al., 2007, de septiembre de 2003 a diciembre de 2006 se encontró que las especies prevalentes en los desembarques de esa época fueron: tiburón rabón bueno con 36%; tiburón azul con 24%; tiburón sedoso con 15%; tiburón martillo liso con 11%; otras especies de tiburón con 9%. La proporción de especies encontradas

en 2007 y el presente estudio fue similar. Estudios previos realizados en Quito por Mateo (2014) y Santo Domingo de los Tsáchilas por Manzanillas y Acosta (2022), al igual que el presente estudio, se identificó carne de tiburón vendida como pescado en mercados del Ecuador. El tiburón más comercializado fue el azul en 2014 y tiburón rabón bueno en el 2022, al igual que los resultados obtenidos (Figura 6).

Según la UICN, las especies encontradas se clasifican en distintos estados de conservación: el tiburón rabón bueno está en peligro de extinción y su pesca en Ecuador representa el 21% de las pescas globales a su género (Fowler, et al., 2021). El tiburón azul está cerca de la amenazada y a diferencia de los demás tiburones hallados, es el único en no estar dentro de los acuerdos internacionales CITES. Esto sugiere que se deberían reforzar las leyes dirigidas a su conservación, principalmente en el país. Los tiburones sedoso y martillo liso se clasifican como vulnerables. A nivel global, el tiburón sedoso es la segunda especie más comercializada por sus aletas (Fowler, et al., 2021). Además, haber encontrado al tiburón martillo liso es preocupante, ya que está protegido por el Acuerdo Ministerial (Nro.2020-0084) que prohíbe su retención, almacenamiento y venta, sin embargo, puede no haber estado fuera de la ley ya que se permiten hasta 5 tiburones de esa especie si ha sido capturado por pesca artesanal.

4.5. Fraude alimentario en la Sierra y normas que protegen al consumidor

Los resultados positivos para tiburón fueron solo de la Sierra. Según la WWF, se distribuye una mayor cantidad de carne de tiburón pescado incidentalmente en la Sierra, siendo mercados sus principales puntos de distribución y adquirido principalmente porque su precio equivale un 50% menos que el precio de otros pescados (2019). La sustitución de distintos pescados por tiburón contribuye al fraude alimentario al estar vendiendo estos productos por desconocimiento de las leyes o a propósito para obtener un beneficio económico (Saubí, 2018). La Ley Orgánica del Consumidor (No. 2000-21, art.17) indica que el proveedor de alimentos

debe proporcionar al consumidor información veraz de los bienes ofrecidos y el Art. 4 de este cuerpo legal, indica que los consumidores están en su derecho de recibir dicha información veraz y ser educados para tener compras informadas. Es evidente que se necesitan reforzar las leyes dirigidas a promover la trazabilidad y autenticidad de los productos (Pazartzi, et al., 2019). Igualmente, se sugiere realizar estudios adicionales de bioacumulación de mercurio en la carne de tiburón comercializada en Ecuador, ya que podría representar un riesgo a la salud (infringiendo el Art. 57 de esta ley). Barcia, et al., encontró presencia de altos niveles de mercurio en aletas de tiburón vendidas en Hong Kong y China (2020). Estos países importan tiburón de Ecuador (Fowler, 2021).

4.6. Aplicación de herramientas moleculares en la conservación de las especies

Los tiburones son susceptibles a la sobrepesca al tener bajas tasas de fecundidad y maduración tardía (Almerón, et al., 2018). Los cadáveres de tiburón ingresados a mercados y pescaderías están sin aletas y cabeza, representando un desafío si se quiere hacer identificación morfológica (Saubí, 2018). Por eso, el uso de marcadores ITS2 para identificar tiburón, es fundamental para su conservación de las especies. El haber encontrado especies pelágicas es un indicativo de que la pesca va hacia aguas abiertas y costeras (Godin, et al., 2011). Si bien se deberían hacer controles durante la pesca, el fomentar estas pruebas moleculares en las cadenas de suministro puede prevenir el fraude alimentario y evitar que se comercialicen especies protegidas (WWF, 2019). Es recomendable usar qPCR para una detección rápida ya que en una sola reacción es capaz de detectar 9 especies de tiburón CITES sin necesidad de secuenciación o uso de electroforesis (Cardeñosa, et al., 2018). A su vez se podría expandir estos estudios hacia el análisis de carne de tiburón ya procesada (por ejemplo, en sopas), cuya ADN ya se encuentra degradado, usando técnicas similares como el multiplex PCR mini-barcode assay basado en el gen COI (Cardeñosa, et al., 2017).

5. CONCLUSIONES

El presente estudio identificó 4 especies de tiburón comercializadas como distintas especies de pescado en la Sierra en las siguientes proporciones: tiburón rabón bueno (*Alopias pelagicus*) 63.63%; tiburón azul (*Prionace glauca*) 18.19%; tiburón sedoso (*Carcharhinus falciformis*) 9.09% y tiburón martillo liso (*Sphyrna zygaena*) 9.09%. Por eso se presume que existe fraude alimentario en la región y un incumplimiento a la Ley de defensa del consumidor, por ello se necesita educación hacia los consumidores para que realicen compras informadas y eviten comprar alimentos sustituidos. Las herramientas moleculares, como los marcadores ITS2, son fundamentales para conocer el estado de comercialización de distintas especies y con la información obtenida se podrán incorporar planes para la conservación adaptados a la realidad del país y de la especie encontrada. Se necesita reforzar las políticas internas dirigidas a la conservación del tiburón rabón bueno, porque en el estudio del 2021 y el presente estudio fue la más comercializada en el Ecuador y está categorizada en peligro de extinción. Además, haber encontrado al tiburón martillo liso, especie protegida por un acuerdo ministerial sugiere que posiblemente no se están cumpliendo las legislaciones. Se recomienda tomar un mayor número de muestras en más ciudades para conocer la situación de todo el país con respecto a la comercialización de tiburón, así como una misma cantidad de muestras por región analizada. También, incorporar estas técnicas moleculares en el PAT-Ec para el diagnóstico molecular de pescado comercializado y controles periódicos en mercados. Finalmente, se recomienda hacer análisis complementarios relacionados al impacto del consumo de tiburón en la salud y análisis para carnes de tiburón ya procedas con el multiplex PCR mini-barcode assay.

6. TABLAS

Tabla 1. Secuencias de primer universales y especie-específico para especies de tiburón comúnmente encontradas en aguas ecuatorianas

Nombre Científico	Nombre Común	Código de Primer	Secuencia del Primer	Tamaño del amplicón (bp)	Referencia
<i>Prionace glauca</i>	Tiburón azul	Primer Blue	5'AGAAGTGGAGCGACTGTCTT CGCC3'	929	Shijvi et al. (2002)
<i>Carcharhinus falciformis</i>	Tiburón sedoso	Primer Silky	5' ACCGTGTGGGCCAGGGGTC 3'	1085	Shijvi et al. (2002)
<i>Carcharhinus galapagensis</i>	Tiburón galápagos	Primer Dusky	5'GTGCCTTCCCACCTTTTGGC G3'	480	Pank et al. (2001)
<i>Sphyrna lewini</i>	Tiburón martillo cola roja	ScHH401F	5'GGTAAAGGATCCGCTTTGCT GGA3'	445	Abercrombie et al. (2005)
<i>Sphyrna zygaena</i>	Tiburón martillo liso	SmHH630F	5'TGAGTGCTGTGAGGGCACGT GGCCT3'	249	Abercrombie et al. (2005)
<i>Sphyrna mokarran</i>	Tiburón martillo	GtHH123F	5'AGCAAAGAGCGTGGCTGGG GTTT CGA3'	782	Abercrombie et al. (2005)
<i>Alopias superciliosus</i>	Tiburón rabón amargo	Bigeye thresher 272F	5'AGTGCTTGACCATTCGGTGT GCGT3'	ca1000	Abercrombie (2004)
<i>Alopias vulpinus</i>	Tiburón rabón	Common thresher 792F	5'TTCCGTCTCCTTCCACACGT CGAGT3'	601	Abercrombie (2004)
<i>Alopias pelagicus</i>	Tiburón rabón bueno	Common thresher 1113F	5'CAAGCCTTGCACCTTTCGAAT GAA GC 3'	230	Abercrombie (2004)

<i>Isurus oxyrinchus</i>	Tiburón mako	Shortfin mako 575F	5'AGGTGCCTGTAGTGCTGGTA GACACA3'	771	Shijvi et al. (2002)
-	-	Universal FISH5.8SF	5'TTAGCGGTGGATCACTCGGC TCGT3'	F. Sphyrnidae (SZ): 860	Pank et al. (2001)
-	-	Universal FISH28SR	5'TCCTCCGCTTAGTAATATGC TTAA ATTCAGC3'	F. Carcharinidae (PG/CF/CG): 1470 F. Lamnidae (IO): 1350 F. Alopiidae (AP): 1200	Pank et al. (2001)

La tabla está basada en el protocolo de Hidalgo (2013), los códigos ya fueron asignados previamente.

Tabla 2. Lista de muestras de carne de pescado comprados en mercados y pescaderías de 3 ciudades junto a la fecha de recolección

Número de muestra	Muestra	Ciudad	Mercado/ Pescadería	Fecha
M1	MIQ1	Quito	América	9/6/2023
M2	MIQ2	Quito	América	9/6/2023
M3	MIQ3	Quito	América	9/6/2023
M4	MIQ4	Quito	América	9/6/2023
M5	MIQ5	Quito	América	9/6/2023
M6	MAQ1	Quito	Iñaquito	9/6/2023
M7	MAQ2	Quito	Iñaquito	9/6/2023
M8	MAQ3	Quito	Iñaquito	9/6/2023
M9	MAQ4	Quito	Iñaquito	9/6/2023
M10	MAQ5	Quito	Iñaquito	9/6/2023
M11	MCQ1	Quito	Calderón	6/6/2023
M12	MCQ2	Quito	Calderón	6/6/2023
M13	MCQ3	Quito	Calderón	6/6/2023
M14	MCQ4	Quito	Calderón	6/6/2023
M15	MCQ5	Quito	Calderón	6/6/2023
M16	MS9G1	Guayaquil	Sauces 9	5/7/2023
M17	MS9G2	Guayaquil	Sauces 9	5/7/2023
M18	MS9G3	Guayaquil	Sauces 9	5/7/2023
M19	MS9G4	Guayaquil	Sauces 9	5/7/2023
M20	MS9G5	Guayaquil	Sauces 9	5/7/2023
M21	MCG1	Guayaquil	Central	5/7/2023
M22	MCG2	Guayaquil	Central	5/7/2023
M23	MCG3	Guayaquil	Central	5/7/2023
M24	MCG4	Guayaquil	Central	5/7/2023
M25	MCG5	Guayaquil	Central	5/7/2023
M26	MEG1	Guayaquil	Este	5/7/2023
M27	MEG2	Guayaquil	Este	5/7/2023
M28	MEG3	Guayaquil	Este	5/7/2023
M29	MEG4	Guayaquil	Este	5/7/2023
M30	MEG5	Guayaquil	Este	5/7/2023
M31	MLPI1	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M32	MLPI2	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M33	MLPI3	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M34	MLPI4	Ibarra	La Playa	12/7/2023

M35	MLPI5	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M36	MLPI6	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M37	MLPI7	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M38	MLPI8	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M39	MLPI9	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M40	MLPI10	Ibarra	La Playa	12/7/2023
M41	MSDI1	Ibarra	Santo Domingo	12/7/2023
M42	MSDI2	Ibarra	Santo Domingo	12/7/2023
M43	MSDI3	Ibarra	Santo Domingo	12/7/2023
M44	MSDI4	Ibarra	Santo Domingo	12/7/2023
M45	MSDI5	Ibarra	Santo Domingo	12/7/2023
M46	PEDI1	Ibarra	El Dorado	1/9/2023
M47	PEDI2	Ibarra	El Dorado	1/9/2023
M48	PEDI3	Ibarra	El Dorado	1/9/2023
M49	PEDI4	Ibarra	El Dorado	1/9/2023
M50	PEDI5	Ibarra	El Dorado	1/9/2023

Se presentan los códigos de las muestras dependiendo de la ciudad (Q, I y G), mercado/ pescadería (M/P) y cantidad de muestras por mercado (1-5 o 1-10).

Tabla 3. Lista de controles positivos y negativos utilizados en la PCR

Controles	Identidad	Especie	Familia	Código
Positivos	Tiburón	<i>Isurus oxyrinchus</i>	Lamnidae	Io52
	Tiburón	<i>Alopias pelagicus</i>	Alopiidae	Ap13
	Tiburón	<i>Prionace glauca</i>	Carcharinidae	Pg209
	Tiburón	<i>Sphyrna zygaena</i>	Sphyrnidae	Sz3

	Tiburón	<i>Carcharinus falciformes</i>	Carcharinidae	Cf217
Negativo	Corvina	-	-	Corv/ Corvina

Los códigos se asignaron previamente en el estudio de Hidalgo (2013).

Tabla 4. Lista de muestras junto a la especie de tiburón identificada después de haber realizado PCR.

Número de muestra	Muestra	Especie de tiburón
M1	MIQ1	Negativo
M2	MIQ2	Negativo
M3	MIQ3	<i>C. falciformes</i>
M4	MIQ4	Negativo
M5	MIQ5	<i>P. glauca</i>
M6	MAQ1	<i>S. zygaena</i>
M7	MAQ2	Negativo
M8	MAQ3	<i>C. falciformes</i>
M9	MAQ4	Negativo
M10	MAQ5	<i>S. zygaena</i>
M11	MCQ1	<i>A. pelagicus</i>
M12	MCQ2	<i>P. glauca</i>
M13	MCQ3	<i>P. glauca</i>
M14	MCQ4	<i>P. glauca</i>
M15	MCQ5	<i>A. pelagicus</i>
M16	MS9G1	Negativo
M17	MS9G2	Negativo
M18	MS9G3	Negativo
M19	MS9G4	Negativo
M20	MS9G5	Negativo
M21	MCG1	Negativo
M22	MCG2	Negativo
M23	MCG3	Negativo

M24	MCG4	Negativo
M25	MCG5	Negativo
M26	MEG1	Negativo
M27	MEG2	Negativo
M28	MEG3	Negativo
M29	MEG4	Negativo
M30	MEG5	Negativo
M31	MLPI1	<i>A. pelagicus</i>
M32	MLPI2	<i>A. pelagicus</i>
M33	MLPI3	Negativo
M34	MLPI4	<i>A. pelagicus</i>
M35	MLPI5	<i>A. pelagicus</i>
M36	MLPI6	<i>A. pelagicus</i>
M37	MLPI7	<i>A. pelagicus</i>
M38	MLPI8	<i>A. pelagicus</i>
M39	MLPI9	<i>A. pelagicus</i>
M40	MLPI10	<i>A. pelagicus</i>
M41	MSDI1	Negativo
M42	MSDI2	<i>A. pelagicus</i>
M43	MSDI3	<i>A. pelagicus</i>
M44	MSDI4	Negativo
M45	MSDI5	<i>A. pelagicus</i>
M46	PEDI1	Negativo
M47	PEDI2	Negativo
M48	PEDI3	Negativo
M49	PEDI4	Negativo
M50	PEDI5	Negativo

7. FIGURAS

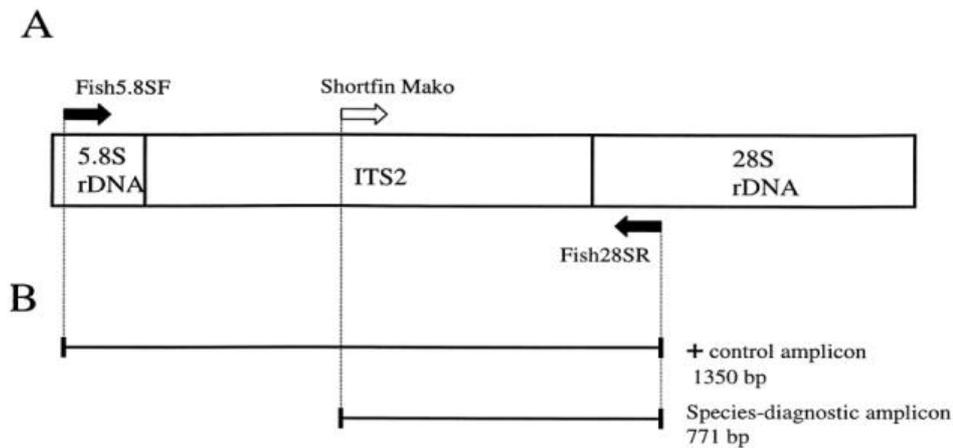


Figura 1. Representación de la amplificación de la región ITS2 del ARNr de tiburón.

Tomado de *Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring* (pg. 1040), por Shijvi, et al., 2002. Representación de la amplificación de la región ITS2 del ARNr de tiburón *Isurus oxyrinchus*. A) Es un esquema del ARN ribosomal producto la transcripción 2 genes 5.8S y 28 S separados por el espaciador transcrito interno 2 (ITS2), esta muestra los sitios de annealing a los primers y la orientación de los mismos durante la PCR. Los primers universales de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) son las flechas intensas negras y el primer especie específico para Shortfin Mako es el de la flecha blanca. B) Son los amplicones formados: el primero se formó por los primers universales forward y reverse (FISH5.8SF y FISH28SR) y el segundo por el primer especie específico (Shortfin Mako) y el primer universal reverse. El primer amplicón fue de 1350 pb, que indica que pertenece a la familia Lamniidae y la segunda de 771 pb, que indica que la especie es shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*).

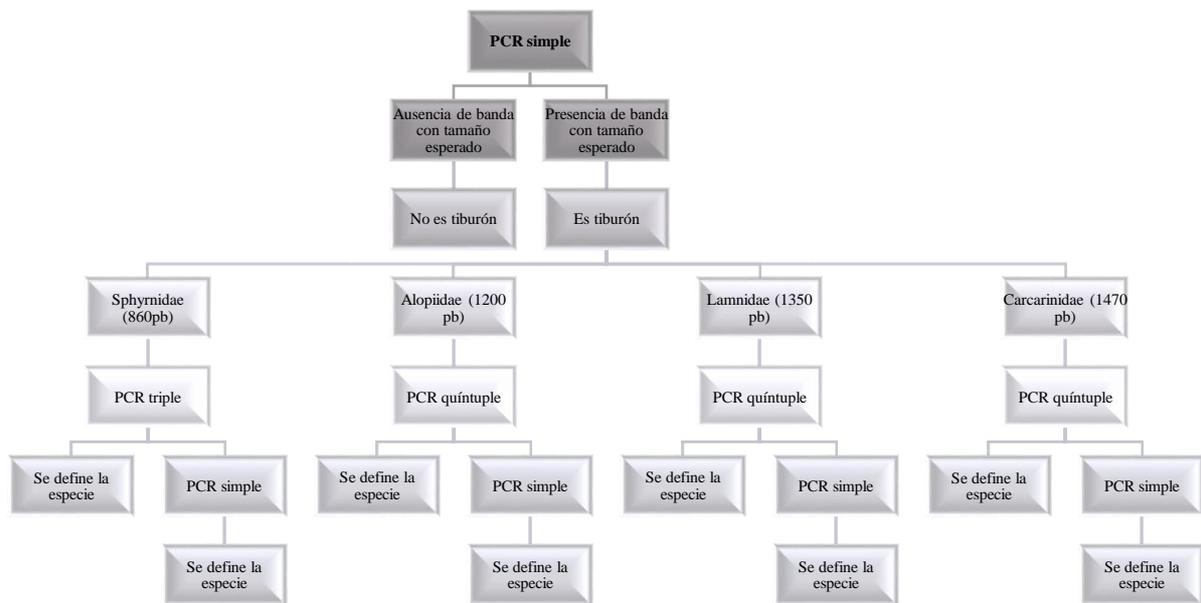


Figura 2. Diagrama de flujo para la elección de PCR múltiple. Este diagrama representa el camino que se tomó para la realización de la PCR simple o múltiple. Primero se realizó una PCR simple con primers universales forward y reverse de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) para evaluar si la muestra es o no tiburón de las 4 familias analizadas. Si la muestra dio positiva para tiburón se lo clasificará dependiendo su familia (esto indicado por el tamaño del amplicón) y dependiendo de ella se realizará un PCR múltiple (triple o quintuple). Con la PCR múltiple (con primers universal forward, universal reverse y primers especie específicos forward) se definirá la especie. En el caso de no definir la especie, se vuelve a hacer una PCR simple (únicamente con un primer especie específico forward y un primer universal reverse) y se define la especie.

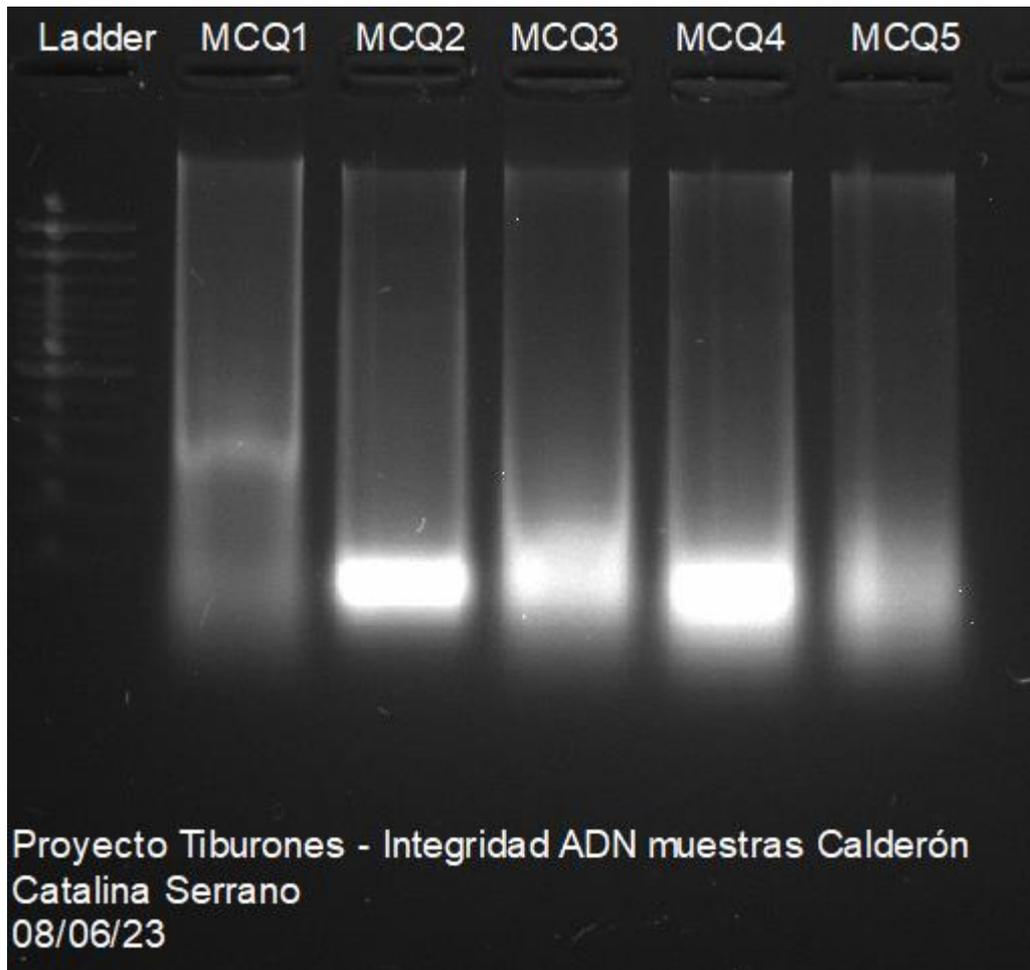


Figura 3. Evaluación de la integridad del ADN genómico de las muestras. Electroforesis en gel de agarosa a 1.5% de muestras de ADN extraído a partir de carne de pescado. Este es un ejemplo de cómo se evaluó la integridad del ADN de las muestras pertenecientes al mercado de Calderón, Quito. El gel se observa de izquierda a derecha, donde el pocillo “Ladder”, contiene Ladder 1 kb (Invitrogen), que nos sirve como una escalera de referencia. Seguido de este se encuentran 5 muestras. Las muestras MCQ2, MCQ3 y MCQ4 presentan banda definida y smear. Mientras que las muestras MCQ1 y MCQ5 no presentan banda definida y presentan smear.

a)



b)

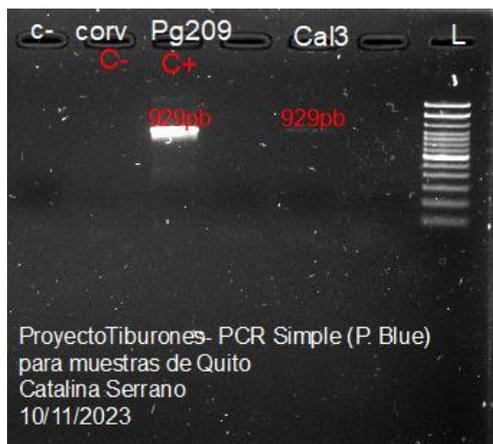


Figura 4. PCR simple para la identificación de presencia de tiburón y su especie. a) Electroforesis en gel de agarosa al 2% para PCR simple usada en la identificación de presencia de tiburón y su familia. Este ejemplo de PCR para la muestra A3 del mercado América, Quito. El gel se observa de derecha a izquierda, donde el pocillo “L” es el Ladder 100 pb (Invitrogen). Los controles negativos son C- (control master mix) y la corvina. Los controles positivos son

Pg209, Io52 y Ap 13 que indican 3 posibles familias: Carcharinidae (1470pb), Lamnidae (1350pb) y Alopiidae (1200 pb), respectivamente. Se colocó un segundo Ladder al final para facilitar la visualización del tamaño de la muestra. La muestra A3 tiene una banda de tamaño de 1470 pb, similar al control Pg209, que indica que la muestra es tiburón y pertenece a la familia Carcharinidae. b) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la determinación de su especie. Este ejemplo es con los primers; universal reverse de tiburón (FISH28SR) y especie específico Blue, para la especie *P. glauca*. Esta PCR se hizo para la muestra 3 del mercado Calderón, Quito. El gel se observa de derecha a izquierda, donde el pocillo “L” es el Ladder 100 pb (Invitrogen). La muestra de Cal3 formó una banda de 929 pb. El control positivo fue Pg209 que formó una banda de 929 pb, es decir la muestra Cal3 tuvo una banda del mismo tamaño. Esto indica que Cal3 es *P. glauca*. Los controles negativos son C- (control master mix) y “corv” de corvina.

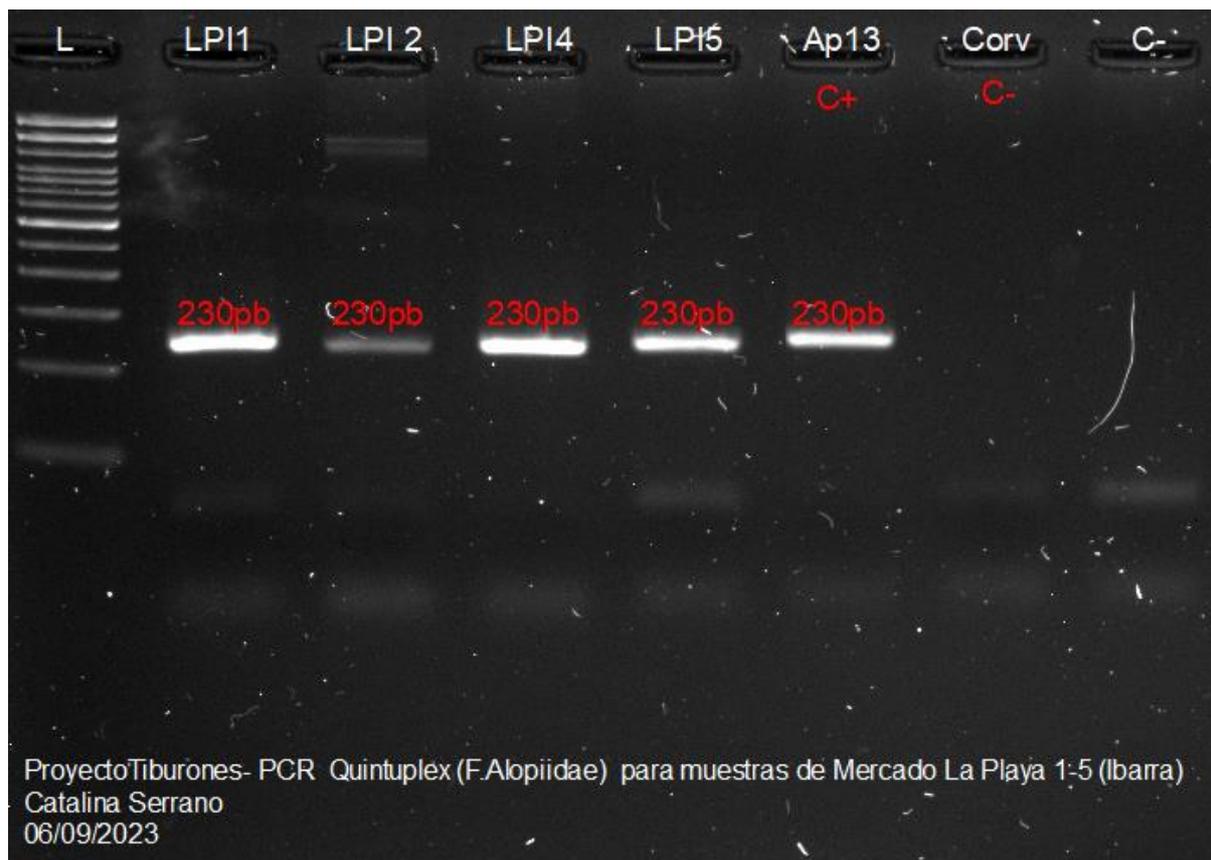


Figura 5. PCR quíntuple para la identificación de especie. Electroforesis en gel de agarosa a 1.5% de muestras de ADN extraído a partir de carne de pescado perteneciente al mercado de La Playa, Ibarra. El gel se observa de izquierda a derecha, donde el pocillo “L”, contiene Ladder 100 pb (Invitrogen). Seguido de este se encuentran 5 muestras (LPI1-5) de 230 pb cada una. El control Ap13 (que pertenece a la especie *A. pelagicus*) tiene un tamaño de 230 pb, lo que indica que todas las muestras pertenecen a dicha especie. Los controles negativos son “Corv” de corvina y C- (del mastermix).

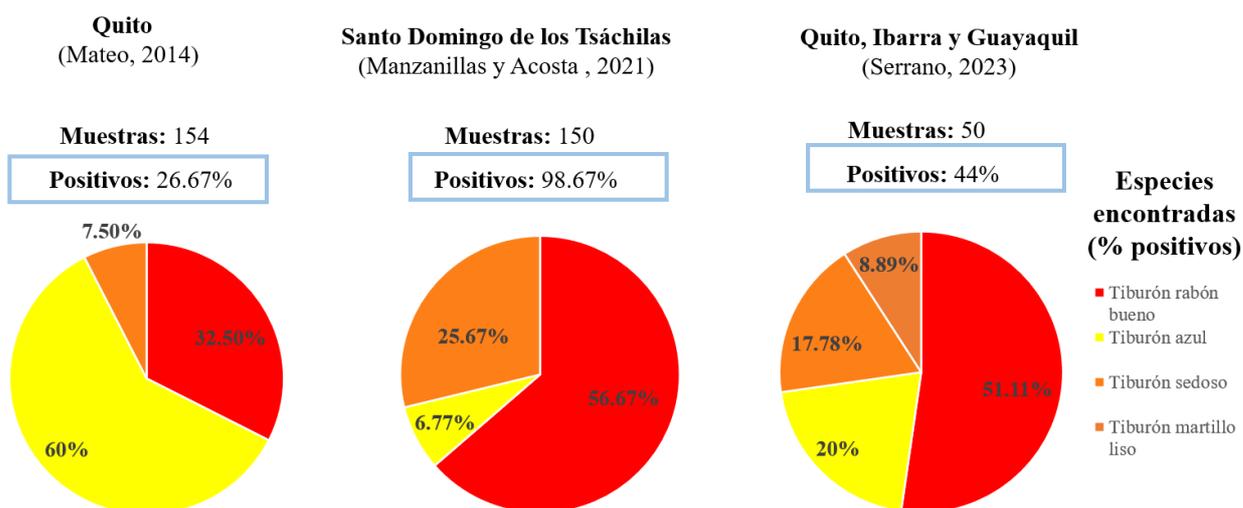


Figura 6. Comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio vs. Estudios realizados en Quito (2014) y Santo Domingo de los Tsáchilas (2022). Cada color representa el estado de vulnerabilidad: rojo significa en peligro de extinción, amarillo es cerca de la amenaza y naranja (claro y oscuro) es vulnerable. La especie de mayor prevalencia es el tiburón azul en el estudio de Mateo (2014) y la de mayor prevalencia en el presente estudio y el de Manzanillas y Acosta (2022) es el tiburón rabón bueno. Los porcentajes de las especies se basan únicamente en el porcentaje de las muestras positivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie, D. (2004). *Efficient PCR-based identification of shark products in global trade: applications for the management and conservation of commercially important mackerel sharks (Family Lamnidae), thresher sharks (Family Alopiidae) and hammerhead sharks (Family Sphyrnidae)*. M.S. thesis. Nova Southeastern University Oceanographic Center, Dania Beach, Florida.
- Abercrombie, D. L., Clarke, S. C., & Shivji, M. S. (2005). Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation genetics*, 6, 775-788. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9036-2>.
- Acuerdo Ministerial MPCEIP-SRP-2020-0084-A. Prohíbese la comercialización externa o exportación de las siguientes especies de tiburones; Cachuda blanca, Cachuda roja, Cachuda cabeza de pala, Cachuda gigante y Oceánico o Aletón. 10 de septiembre de 202. Registro Oficial, Edición Especial Nro. 988.
- Aguilar, F., Chalén, X., & Villón, C. (2005). *Plan de acción nacional de tiburones. Proceso de investigación recursos bioacuáticos y ambiente. Instituto Nacional de Pesca, Quito*. Instituto Nacional de Pesca.
<https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/IPOAS/national/ecuador/PlandeAccionTiburonesPAT-Ec.pdf>.
- Almerón-Souza, F., Sperb, C., Castilho, C. L., Figueiredo, P. I., Gonçalves, L. T., Machado, R., ... & Fagundes, N. J. (2018). Molecular identification of shark meat from local markets in Southern Brazil based on DNA barcoding: evidence for mislabeling and trade of endangered species. *Frontiers in Genetics*, 9, 138.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00138>.
- Barcia, L. G., Argiro, J., Babcock, E. A., Cai, Y., Shea, S. K., & Chapman, D. D. (2020). Mercury and arsenic in processed fins from nine of the most traded shark species in the Hong Kong and China dried seafood markets: The potential health risks of shark fin soup. *Marine pollution bulletin*, 157, 111281.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111281>.
- Bailón, J. (2023). *Análisis morfológico de los dentículos dérmicos en 5 especies de tiburones comercializados en el puerto de Santa Rosa, Ecuador* (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2023.).
- Castro, J. I. (2010). *The sharks of north America*. Oxford University Press.
[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=fa9oAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Castro,+J.+I.+\(2010\).+The+sharks+of+north+America.+&ots=Nv-xhVAewA&sig=aI5SG5LKOF27YKzHGX1YRRMNvkY](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=fa9oAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Castro,+J.+I.+(2010).+The+sharks+of+north+America.+&ots=Nv-xhVAewA&sig=aI5SG5LKOF27YKzHGX1YRRMNvkY).
- Cardeñosa, D., Fields, A., Abercrombie, D., Feldheim, K., Shea, S. K., & Chapman, D. D. (2017). A multiplex PCR mini-barcode assay to identify processed shark products in

- the global trade. *PloS one*, 12(10), e0185368.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185368>.
- Cardeñosa, D., Quinlan, J., Shea, K. H., & Chapman, D. D. (2018). Multiplex real-time PCR assay to detect illegal trade of CITES-listed shark species. *Scientific Reports*, 8(1), 16313. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34663-6>.
- Cisneros, A., Barnes, M., Al, D., Navarro, E., & Sumaila, U. (2013). Global economic value of shark ecotourism: implications for conservation. *Oryx*, 47(3), 381-388.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0030605312001718>.
- Cortés, E. (2000). Life History Patterns and Correlations in Sharks. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4), 299–344. <http://dx.doi.org/10.1080/10408340308951115>.
- Decreto Ejecutivo 486. Pesca del tiburón, comercialización y exportación. 30 de julio de 2007, reformado el 15 de febrero de 2008. Registro Oficial, Suplemento Nro. 137.
- Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN (2020). Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN. *Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca)*. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>.
- Domingues, R. R., Hilsdorf, A. W. S., & Gadig, O. B. F. (2018). The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conservation genetics*, 19, 501-525.
- Ebert, D. A., Dando, M., & Fowler, S. (2014). *Sharks of the world: a complete guide* (Vol. 22). Princeton University Press.
- Ferretti, F., Worm, B., Britten, G. L., Heithaus, M. R., & Lotze, H. K. (2010). Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecology letters*, 13(8), 1055-1071. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01489.x>.
- Fowler, S., Bräutigam, A., Okes, N., & Sant, G. (2021). *Conservation, fisheries, trade and management status of CITES-listed sharks*. Federal Agency for Nature Conservation: <https://bfm.bsz-bw.de/files/7/Skript607.pdf>.
- Galindo, M. A. (2010). *Posición trófica de juveniles de tiburón mako (Isurus oxyrinchus) capturado en la costa occidental de Baja California Sur*. SOMEPEC.
<https://somepec.org/wp-content/uploads/2018/10/Memorias-IV-Simposium-Nacional-de-Tiburones-y-Rayas-1.pdf#page=40>.
- Hidalgo, C. (2013). *Protocolo de Identificación Molecular de Especies de Tiburón Analizando Muestras de Galápagos y Puerto López*. Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Quito.
- Ley Orgánica de Defensa del Consumidor. 10 de julio de 2000. Registro Oficial Suplemento, Nro. 116.

- Ley Orgánica para el desarrollo de la acuicultura y pesca. 21 de abril del 2020. Registro Oficial, Suplemento, Año1, Nro. 187.
- Manzanillas Castro, A. B., & Acosta-López, C. (2022). Molecular identification of shark species commercialised in the '17 de Diciembre' market, Santo Domingo de los Tsáchilas-Ecuador. *Biodiversity*, 23(3-4), 110-117. <https://doi.org/10.1080/14888386.2022.2140309>.
- Martínez, J., Galván, F., Carrera, M., Mendoza, D., Estupiñán, C., & Cedeño, L. (2007). Abundancia estacional de tiburones desembarcados en Manta-Ecuador. *Tiburones en el Ecuador: Casos de estudio*, 9-27.
- Martínez, J., & Galván, F. (2007). *Tiburones en el Ecuador: Casos de estudio*. Fundación Escuela de Pesca del Pacífico Oriental, Programa de Manejo de Recursos Costeros, Manta.
- Martínez-Ortiz, J., Aires-da-Silva, A. M., Lennert-Cody, C. E., & Maunder, M. N. (2015). The Ecuadorian artisanal fishery for large pelagics: species composition and spatio-temporal dynamics. *PLoS One*, 10(8), e0135136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135136>.
- Mateo, M. J. (2014). *¿Comemos tiburón? identificación molecular de carne de tiburón de venta en mercados y pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito* (Bachelor's thesis, Quito, 2014).
- Motivarash Yagnesh, B., Fofandi Durga, C., Dabhi Raj, M., Makrani Rehanavaz, A., & Tanna Poojaben, D. (2020). Importance of sharks in ocean ecosystem. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(1), 611-613.
- Mull, C. G., Pacoureaux, N., Pardo, S. A., Ruiz, L. S., García-Rodríguez, E., Finucci, B., ... & Dulvy, N. K. (2022). Sharkipedia: a curated open access database of shark and ray life history traits and abundance time-series. *Scientific Data*, 9(1), 559. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01655-1>.
- Pacoureaux, N., Rigby, C. L., Kyne, P. M., Sherley, R. B., Winker, H., Carlson, J. K., ... & Dulvy, N. K. (2021). Half a century of global decline in oceanic sharks and rays. *Nature*, 589(7843), 567-571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03173-9>.
- Pank, M., Stanhope, M., Natanson, L., Kohler, N., & Shivji, M. (2001). Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. *Marine Biotechnology*, 3, 231-240. <https://doi.org/10.1007/s101260000071>.
- Pazartzi, T., Siaperopoulou, S., Gubili, C., Maradidou, S., Loukovitis, D., Chatzisprou, A., ... & Imsiridou, A. (2019). High levels of mislabeling in shark meat—Investigating patterns of species utilization with DNA barcoding in Greek retailers. *Food Control*, 98, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.019>.

- Pinhal, D., Shivji, M. S., Nachtigall, P. G., Chapman, D. D., & Martins, C. (2012). A streamlined DNA tool for global identification of heavily exploited coastal shark species (genus *Rhizoprionodon*). *PLoS One*, 7(4), e34797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034797>.
- Saubi Oriol, M. (2018). Situación del fraude en pescado a nivel mundial. Universidad Autónoma de Barcelona: https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2018/hdl_2072_365418/TFM_msaubioriol.pdf.
- Shivji, M., Clarke, S., Pank, M., Natanson, L., Kohler, N., & Stanhope, M. (2002). Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology*, 16(4), 1036-1047. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01188.x>.
- Thermo Fisher Scientific. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual*. Thermo Fisher Scientific Inc. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-UserManual-EN.pdf>.
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *NanoDrop One: User Guide*. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>.
- WWF (2019). *Tiburones en el mediterráneo: Una llamada de atención*. WWF Mediterranean: https://d80g38vowjyp.cloudfront.net/downloads/informe_wwf_2019_tiburonesmediterraneo_
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

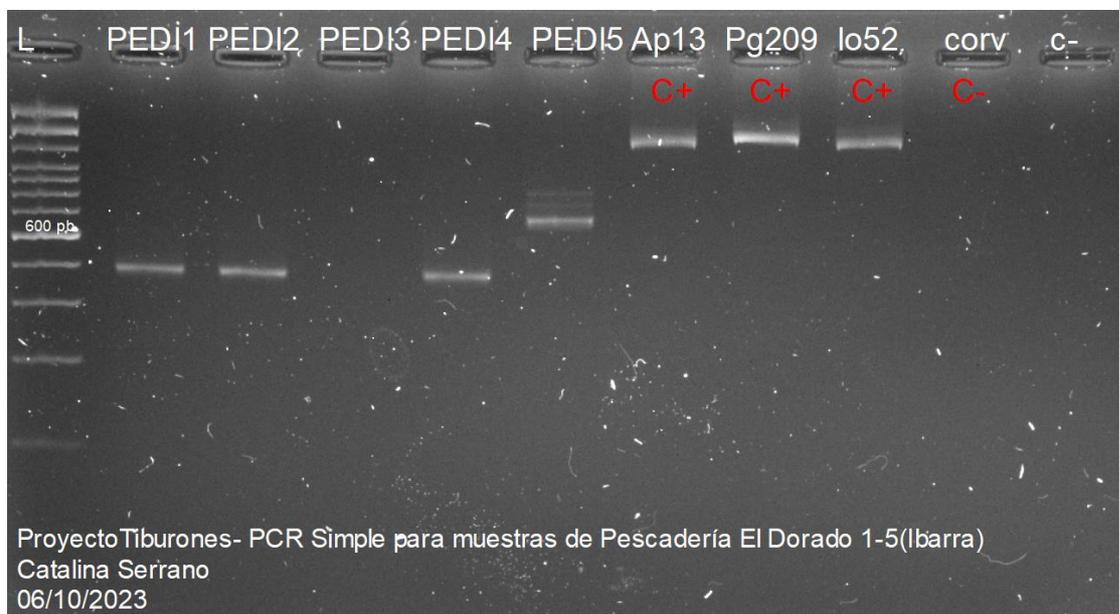
ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación y determinación de la calidad de ADN de las muestras recolectadas

Muestra	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/280	A260/230
MIQ1	344.2	1.95	1.19
MIQ2	1178.6	2.03	1.77
MIQ3	898.6	1.95	2.08
MIQ4	893.2	1.92	1.33
MIQ5	1460.7	1.94	1.8
MAQ1	97.3	1.88	2.38
MAQ2	94	1.92	2.09
MAQ3	135.5	1.98	1.83
MAQ4	90.9	1.94	2.04
MAQ5	210.4	1.86	1.87
MCQ1	945.8	2.11	1.29
MCQ2	2331.1	2.12	1.32
MCQ3	1231	2.13	1.38
MCQ4	1838.7	2.33	1.95
MCQ5	829.6	2.1	1.45
MS9G1	269.1	1.92	1.39
MS9G2	353.3	1.86	1.41
MS9G3	130.2	1.66	0.58
MS9G4	90.7	1.71	0.68
MS9G5	177.7	1.91	1.62
MCG1	96.4	1.78	1.44
MCG2	62.1	1.63	0.73
MCG3	269.6	1.89	1.31
MCG4	253.9	1.84	1.31
MCG5	576.7	2.02	1.71
MEG1	305.8	1.86	1.51
MEG2	941.8	1.93	2.23
MEG3	83.5	1.83	1.33
MEG4	708.5	1.97	1.76
MEG5	1201.7	1.78	1.03
MLPI1	1675.2	1.9	2.02

MLPI2	2386.4	1.98	2.01
MLPI3	688.7	2	1.47
MLPI4	1050.1	1.91	1.89
MLPI5	978.3	1.94	1.82
MLPI6	1041.9	1.96	1.92
MLPI7	2039.3	1.97	1.93
MLPI8	1435.3	1.91	1.99
MLPI9	8540.7	1.95	2.16
MLPI10	1757	1.94	1.95
MSDI1	242.8	1.89	1.11
MSDI2	600.7	1.99	1.5
MSDI3	537.1	2.05	1.33
MSDI4	1274.6	1.95	1.86
MSDI5	574.1	2.03	1.35
PEDI1	121.6	1.61	1.09
PEDI2	88.8	1.73	1.09
PEDI3	33.7	0.19	1.23
PEDI4	214.9	1.97	1.16
PEDI5	603.6	1.85	1.26
Promedio	879.708	1.8894	1.559

Anexo 2. PCR simple de muestras que amplificaron banda a pesar de no ser tiburón de la pescadería El Dorado, Ibarra.



Este ejemplo es de PCR simple realizada con los primers universales de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) para la muestra de la Pescadería El Dorado, Ibarra. El gel se observa de derecha a izquierda, donde el pocillo “L” es el Ladder 100 pb (Invitrogen). Seguido de esto están las muestras con menos de 700 pb. Los controles positivos son Ap13, Io52 y Pg209, que indican 3 posibles familias: Alopiidae, Lamnidae y Carcharinidae, respectivamente. Las bandas de las muestras no pertenecen a tiburón al tener tamaños inferiores a las 4 familias analizadas. Los controles negativos son C- (control master mix) y la corvina.