

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Protocolo de Identificación Molecular de Especies de Tiburón Analizando
Muestras de Galápagos y Puerto López**

Carmen Estefanía Hidalgo Manosalvas

María de Lourdes Torres, Ph.D, Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, mayo de 2013

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Protocolo de Identificación Molecular de Especies de Tiburón Analizando Muestras de Galápagos y Puerto López

Carmen Estefanía Hidalgo Manosalvas

María de Lourdes Torres, Ph.D
Directora de la tesis y
Miembro del Comité de Tesis

Judith Denkinger, Ph.D
Codirectora de tesis y
Miembro del Comité de Tesis

Venancio Arahana, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.
Decana del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

Quito, mayo de 2013

© DERECHOS DE AUTOR

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

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Carmen Hidalgo

C. I.: 1719922377

Fecha: Quito, mayo de 2013

DEDICATORIA

Tú honras en mí al embajador de creencias, de costumbres, de amores personales. Si soy diferente de ti, lejos de herirte, yo te hago crecer... Si vuelvo a combatir, combatiré un poco por ti... Tengo necesidad de ayudarte a vivir.
(Saint-Exupéry)

Para Luis, Sonia y Juan; los seres que más amo en mi vida por llevarme por el camino del bien y junto conmigo cristalizar mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

A María de Lourdes Torres, Venancio Arahana y Judith Denkinger por la decidida colaboración del presente proyecto; a Kelly Swing por la ayuda brindada con esta investigación; a Cristina Salgado, Viviana Jaramillo, Bernardo Gutiérrez y Leandro Vaca por haberme guiado técnicamente en varios momentos a lo largo de este estudio; al Galápagos Institute for the Arts and Sciences (GAIAS) de la Universidad San Francisco de Quito y Carlos Mena por la Beca GSC-Chatham para Jóvenes Investigadores y el apoyo a esta investigación, y a mis amigos que representan mi alegría.

RESUMEN

En los últimos 20 años se ha tenido conocimiento de la disminución de poblaciones de tiburones ya sea por sobrepesca, mortalidad natural o, más grave aún, por prácticas de aleteo. Esta problemática sucede a escala global que incluye a Ecuador, haciendo necesario el obtener información específica que permita conocer la composición y la proporción de los tiburones capturados en el país. Esta información permitirá evaluar los efectos de la explotación y las necesidades de conservación.

El objetivo de este estudio fue estandarizar un protocolo de identificación de especies de tiburón mediante métodos moleculares. Para esto, se extrajo ADN de 102 muestras de aletas/piel húmedas encontradas en la embarcación FER MARY I, detenida en la Reserva Marina de Galápagos (RMG) y aletas/piel secas obtenidas en el mercado de Puerto López. La identificación molecular fue llevada a cabo mediante reacciones de PCR con múltiples primers especie-específicos basados en regiones ITS2 en una sola reacción para producir amplicones de diagnóstico y diferenciar de forma simultánea entre las especies.

Los resultados de identificación molecular coincidieron en 99% con la identificación morfológica realizada previa a la toma de muestras de aletas/piel. Por lo que se puede concluir que la estandarización del protocolo es confiable y útil para identificación de especies de tiburón cuando no es posible la identificación morfológica. Los resultados de este estudio revelaron que la proporción relativa de especies de tiburón capturadas en la embarcación FER MARY I en Junio del 2011 y aletas secas obtenidas en el mercado de Puerto López en el 2012 fue: 51,96% *Alopias pelagicus*, 21,57% *Carcharhinus falciformis*, 17,65% *Prionace glauca*, 6,86% *Sphyrna zygaena*, 0,98% *Isurus oxyrinchus* y 0,98% *Carcharhinus galapagensis*.

Esta investigación establece un protocolo preciso de identificación molecular de seis especies de tiburón. Esta herramienta es útil principalmente en el caso de aleteo en el que se dificulta la identificación morfológica. Por lo que este estudio sirve de base para aportar con información confiable sobre la problemática de tiburones en Ecuador y que a su vez será útil para sustentar políticas sobre el manejo de la pesquería y la conservación de tiburones en el país, así como para sincerar la venta de carne de tiburón en los mercados del Ecuador.

ABSTRACT

During the past 20 years, there has been the awareness of the decreasing shark populations due to over fishing, natural mortality or, even worse, the demand for shark fins. This issue occurs on a global scale which includes Ecuador, and therefore it makes necessary to obtain specific information that provides the composition and proportion of sharks captured within the country. This information will allow evaluating effects of exploitation and the conservation needs.

The aim of this research was to standardize an identification protocol for shark species through molecular methods. For this, DNA was extracted from 102 samples of wet fins/skin found in the ship FER MARY I, which was detained inside the Galapagos Marine Reserve (GMR), and dried fins/skin obtained at Puerto López market. The molecular identification was carried out by PCR reactions with multiple species-specific primers, based on nuclear ribosomal ITS2 in one reaction to produce diagnostic amplicons distinguishing between species simultaneously.

The molecular identification results coincided in 99% with the morphological identification that was made previous to the sample collection of fins/skin. As a conclusion, the standardization of the protocol is reliable and useful for the identification of shark species when a morphologic identification is not possible. The results of this study revealed that the relative proportion of captured shark species found in the ship “FER MARY I” in June 2011, and dried fins/skin from Puerto López market in 2012 was: 51,96% *Alopias pelagicus*, 21,57% *Carcharhinus falciformis*, 17,65% *Prionace glauca*, 6,86% *Sphyrna zygaena*, 0,98% *Isurus oxyrinchus* y 0,98% *Carcharhinus galapagensis*.

This research establishes a precise molecular identification protocol of six shark species. This tool is useful mainly in the case of shark finning, where morphological identification is difficult. This study provides a basis to contribute with reliable information about the sharks problematic in Ecuador which may be useful to support policies about fishing management and sharks conservation in the country, as well as to assess the sale of shark meat in Ecuadorian markets.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	12
1.1 Características generales de los tiburones	12
1.2 Pesca de tiburones en el mundo.....	13
1.3 Pesca de tiburones en el Ecuador	14
1.3.1 Marco legal, gestión y conservación de tiburones en el Ecuador.....	15
1.4 Formas de identificación de especies de tiburón capturadas en la pesquería mundial.....	17
1.4.1 Marcadores genéticos.....	17
1.4.1.1 Regiones ITS2	18
1.4.1.2 Identificación molecular de especies de tiburón basada en regiones ITS2	19
2. Objetivo general	21
3. Objetivos específicos	21
4. Área de estudio	21
5. Justificación	22
6. Materiales	23
6.1 Colección de muestras de aletas/piel de tiburón.....	23
6.2 Extracción de ADN de aletas/piel de tiburón	24
6.3 Cuantificación de ADN extraído a partir de aletas/piel de tiburón	24
6.4 Amplificación de regiones ITS2.....	24
6.5 Electroforesis en gel de Agarosa	24
7. Métodos	25
7.1 Colección de muestras de aletas/piel de tiburón.....	25
7.2 Extracción, cuantificación y determinación de la calidad de ADN extraído de aletas/piel de tiburón.....	26
7.3 Identificación de especies de tiburón mediante PCR múltiplex	27
7.3.1 PCR triplex	27
7.3.2 PCR Cuadriplex (<i>Alopias pelagicus</i>).....	29
7.3.3 PCR Pentaplex (Familia Sphyrnidae).....	29
7.3.4 PCR Pentaplex (Familia Carcharinidae).....	28
7.3.5 PCR Heptaplex (Orden Lámniformes).....	30
7.4 Electroforesis en gel de Agarosa	30
8. Resultados	30

8.1	Colección de muestras de aletas/piel de tiburón.....	31
8.2	Extracción, cuantificación y determinación de la calidad de ADN extraído de aletas/piel de tiburón.....	31
8.3	Identificación de especies de tiburón.....	32
8.3.1	Amplificación de regiones ITS2 (PCR Triplex).....	32
8.3.2	PCR Cuádruplex (<i>Alopias pelagicus</i>).....	35
8.3.3	PCR Pentaplex (Familia Sphyrnidae).....	35
8.3.4	PCR Pentaplex (Familia Carcharinidae)	35
8.3.5	PCR Hetaplex (Orden Lámniformes)	36
9.	Discusión	36
9.1	Extracción, cuantificación y determinación de la calidad de ADN extraído de aletas/piel de tiburón.....	36
9.2	Identificación de especies de tiburón (PCR Multiplex).....	37
9.3	Aplicaciones de monitoreo, gestión y conservación de tiburones.....	40
9.4	Composición y proporción relativa de las especies de tiburones capturadas en el Ecuador	42
9.5	Monitoreo y conservación de tiburones en el Ecuador.....	43
10.	Conclusiones	44
11.	Recomendaciones	45
12.	Bibliografía	46
13.	Tablas	49
14.	Figuras	51
15.	Anexos	58

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

Tabla 1.- Secuencias de primers para especies de tiburón	49
Tabla 2.- Lista de especies de tiburones recolectadas en Puerto López y Galápagos y analizadas en los ensayos de PCR multiplex	50
Figura 1.- Esquema representativo de la región ITS2 de rDNA de tiburón	51
Figura 2.- Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de muestras de ADN extraído a partir de aletas de tiburón	51
Figura 3.- PCR triplex para <i>Sphyrna zygaena</i> (aleta seca)	52
Figura 4.- PCR triplex para <i>Sphyrna zygaena</i> (aleta húmeda)	52
Figura 5.- PCR triplex para <i>Prionace glauca</i>	53
Figura 6.- PCR triplex para <i>Carcharhinus falciformis</i>	53
Figura 7.- PCR triplex para <i>Carcharhinus galapagensis</i>	54
Figura 8.- PCR triplex para <i>Isurus oxyrinchus</i>	54
Figura 9.- PCR triplex para <i>Alopias pelagicus</i>	55
Figura 10.- PCR cuádruplex para <i>Alopias pelagicus</i>	55
Figura 11.- PCR pentaplex (Familia Sphyrnidae)	56
Figura 12.- PCR pentaplex (familia Carcharinidae).	56
Figura 13.- PCR heptaplex (orden Lámniformes)	57
Figura 14.- Composición y proporción relativa de especies de tiburón capturadas en la embarcación Fer Mary I y obtenidas en el mercado de Pto. López.....	57
Anexo 1.- Decreto Ejecutivo 486	58
Anexo 2.- Decreto Ejecutivo 001	63
Anexo 3.- Cuantificación de ADN extraído de las 102 muestras de aletas de tiburón analizadas molecularmente.....	65

1. Introducción

1.1 Características generales de los tiburones

Los tiburones pertenecen a la clase Chondrichthyes, la cual está formada por el grupo de los elasmobranquios (llamados así por los septos interbranquiales que presentan), en el que se incluyen también las rayas y las quimeras (Compagno 1984 cit. en Abercrombie 204). Los tiburones son peces cartilaginosos (esqueleto formado de cartílago) que han habitado los mares de todo el mundo desde hace más de 400 millones de años. Presentan dentículos dérmicos que cubren todo su cuerpo y una fertilización interna a través de los apéndices copuladores externos de los machos (pterigopodios o clasper) (Llerena et al. 2009, cit. en Vaca 2011).

Según Castro *et al.* (1999), los tiburones se caracterizan por: crecimiento lento y maduración retrasada (10 años en promedio); largos ciclos reproductivos (de uno a dos años); baja fecundidad (de 4 a 30 embriones) y largos periodos de vida (se desconoce en la mayoría de los casos). Además, presentan un desarrollo embrionario que puede ser vivíparo placentado, vivíparo aplacentado u ovíparo (Santana et al., 2004).

Los tiburones varían en tamaño, es así que, el más pequeño, el tiburón enano (*Euprotomicrus bispinatus*) alcanza los 25 cm de longitud y el más grande, el enorme tiburón ballena (*Rhincodon typus*) excede los 12 metros de longitud. La gran mayoría de las especies son migratorias y viajan grandes distancias, como por ejemplo: el tiburón azul (*Prionace glauca*) y el tiburón punta blanca (*Carcharhinus longimanus*). Por otro lado, existen grandes diferencias en el comportamiento social de algunas especies. Así, podemos encontrar especies

solitarias como el tiburón zorro o rabón (*Alopias vulpinus* y *A. pelagicus*) y especies que forman grupos como los tiburones martillo (*Sphyrna* spp.) (Aguilar et al., 2005).

Los tiburones son depredadores tope en la cadena alimentaria, lo que los convierte en uno de los eslabones clave para el equilibrio del océano, ya que una de sus principales funciones es la de controlar las poblaciones de peces. Debido a sus hábitos alimenticios actúan como carroñeros, lo que ayuda a eliminar de las aguas los animales muertos y débiles (Llerena et al., 2009).

1.2 Pesca de tiburones en el mundo

En el ámbito mundial aproximadamente 100 millones de peces cartilaginosos (tiburones y sus especies congéneres) son capturados anualmente. En las últimas tres décadas, el tamaño de algunas poblaciones de estas especies se han reducido en más de un 80% y existe la posibilidad de que varias de ellas se extingan en el corto y mediano plazo (Aguilar et al., 2005). La captura total mundial de tiburones en el año 2000 fue de 828 364 toneladas. Esta es la mayor captura registrada en las últimas décadas, lo que presenta un incremento del 20% desde 1990 (FAO 2000 cit. en Aguilar et al., 2005). Las capturas de tiburones se han venido realizando por muchos años y el impacto a nivel general ha sido serio. Por ejemplo, en 1980 las poblaciones de casi todas las especies de tiburones capturados en el noroeste del Atlántico declinaron a un 50% con ciertos tiburones martillo y zorro que mostraron mayor decrecimiento que las otras especies (Baum 2003, cit. en Abercrombie 2004)

La demanda global para los productos de tiburón (especialmente aletas, cartílago y carne) durante las últimas dos décadas ha contribuido significativamente a una mayor

explotación de los tiburones en todo el mundo. El mayor problema es el comercio de aletas de tiburón sueltas para satisfacer la demanda de los mercados asiáticos. Por lo tanto, los problemas de vigilancia y comercio, así como la ejecución de las regulaciones (cuando existen) se ven obstaculizados por la dificultad de identificar con confiabilidad la especie o incluso la familia de las aletas sueltas (Clarke et al., 2006). Por otro lado, los limitados datos disponibles son a menudo difíciles de interpretar y no muestran con precisión las especies y regiones más afectadas por el comercio de aletas de tiburón (Abercrombie, 2004).

La pesca de tiburón a nivel mundial sigue siendo en gran parte no regulada, no monitoreada, ni administrada. Recientemente se han identificado complicaciones de salud en las poblaciones de tiburón y en los ecosistemas marinos donde ellos habitan, lo que ha motivado preocupación internacional para hacer frente a los problemas relacionados con la explotación del recurso tiburón (Shivji et al., 2002). Desde hace dos décadas, se ha tenido conocimiento de la disminución de poblaciones de tiburones ya sea por sobrepesca, mortalidad natural o, más grave aún por prácticas de aleteo (el cercenamiento y la retención de aletas de tiburón y el descarte del resto del cuerpo al mar). Esto ha traído consigo la reacción de la comunidad internacional en forma inmediata, tal como lo reseñan Coello (2005) y Fowler (2005) con respecto a las resoluciones adoptadas en la Sesión de las Naciones Unidas FAO Comité sobre Pesquerías (COEFI) en 1999. Donde se pide a los Estados miembros utilizar un reporte sobre la valoración del tiburón y con esta información poder implementar y desarrollar Planes de Acción Nacional o Planes Tiburón. Así, la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) adoptó la Resolución Conf. 12.6 “Conservación y Gestión de los Tiburones”, en la cual se llama la

atención de los Estados miembros para que se tomen medidas de acción nacional sobre el manejo y la conservación del recurso tiburón (Martínez et al., 2007).

1.3 Pesca de tiburones en el Ecuador

Según la FAO, para el área continental del Ecuador e insular de Galápagos se han reportado 23 familias de elasmobranquios, agrupados en 46 especies de tiburones y 22 de rayas, guitarras y torpedos (Aguilar et al., 2005). Coello (2005) señala que en el caso ecuatoriano, el tiburón es utilizado principalmente como recurso pesquero. En el país, desde 1979 hasta 2004 se estima que la cantidad de tiburones pescados en la parte continental de Ecuador fue de 7000 toneladas por año (Jacquet *et al.*, 2008). Las familias de tiburones que han sido principalmente reportadas en los desembarques industriales y artesanales son: Alopiidae, Carcharhinidae, Lamnidae, Sphyrnidae y Triakidae (Aguilar et al., 2005).

El sector pesquero ecuatoriano está conformado por dos subsectores, el industrial y el artesanal. En el subsector industrial operan las siguientes flotas: cerquera atunera, cerquera costera, arrastrera camaronera y la palangrera asociada. El subsector pesquero artesanal está compuesto por varios tipos de embarcaciones que van desde las balsas, canoas de madera, botes de fibra de vidrio, balandras y barcos (Coello, 2005).

1.3.1 Marco legal, gestión y conservación de tiburones en el Ecuador

En cuanto a las leyes del Ecuador se resumen a continuación las más importantes relacionadas con el manejo de tiburones. La práctica del aleteo de tiburón (es decir, captura de tiburones para la extracción exclusiva de sus aletas y el descarte del cuerpo al mar) está prohibida en el Ecuador continental (Artículo 5 del Decreto 486 - Anexo 1). La

comercialización y utilización de la carne de tiburón se podrá dar como producto único y exclusivo de la pesca incidental (Artículo 5 del Decreto 486 - Anexo 1). Además, en el Decreto 001 (Artículo 2 - Anexo 2) se establece el pago por concepto de autorizaciones para la pesca incidental del recurso tiburón, los derechos de actuación por comercialización y exportación en el Ecuador continental que presta la Subsecretaría de Recursos Pesqueros. Finalmente el Artículo 14 del Decreto 001 se menciona que El Parque Nacional Galápagos, con el apoyo de la Policía Ambiental y la Armada del Ecuador, aplicará medidas estrictas de control y vigilancia para hacer cumplir la Resolución No. 011-2000 de la Autoridad Interinstitucional de Manejo de la Reserva Marina de Galápagos (AIM) que prohíbe la captura, desembarco y comercialización de tiburones y las disposiciones pertinentes del Reglamento Especial de la Actividad Pesquera Artesanal en la Reserva Marina de Galápagos, e informará trimestralmente a la AIM a este respecto.

Dado lo importante de desarrollar iniciativas de planes de conservación y manejo de las pesquerías del recurso tiburón, en Ecuador se creó el Plan de Acción Nacional para Conservación y Manejo de Tiburones de Ecuador (PAT-Ec) (Martínez et al., 2007). El Plan responde a una necesidad de ordenamiento pesquero ecuatoriano que se plantea dentro del marco del “Plan de Acción Internacional para la Conservación y Ordenación de los Tiburones, PAI-Tiburones” de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y que se proyecta, asimismo, como una iniciativa que demanda acciones coordinadas entre los países ribereños del Pacífico Oriental (Coello, 2005).

1.4 Formas de identificación de especies de tiburón capturadas en la pesquería mundial

Las características morfológicas son la forma más usada para la identificación de especies de tiburón. Para la identificación taxonómica y comparación de las diferentes especies de tiburón se utilizan trabajos de investigación y guías de campo que proveen de claves dicotómicas usando las características morfológicas más útiles de diagnóstico como cabeza, dientes y aletas (Martínez et al., 2007). Sin embargo, la utilidad de las claves morfológicas, se ve limitada por las pequeñas diferencias en las aletas de especies estrechamente relacionadas y el daño físico de las aletas sueltas (por ejemplo, cambios de color, manchas, cortes defectuosos, quemaduras y daños por insectos) (Abercrombie, 2004).

El análisis genético ha sido utilizado con éxito para identificar con precisión muchas especies marinas, cuando la identificación morfológica es difícil (Shivji et al., 1996). Los primeros métodos desarrollados para la identificación de tiburones se basaron en marcadores moleculares RFLP (Restriction fragment length polymorphisms); pero, este método requiere de mucho trabajo y dinero (Pank et al., 2001). Posteriormente, Pank *et al.* (2001) y Shivji *et al.* (2002) desarrollaron un método basado en la amplificación de regiones ITS2, el cual es un enfoque más ágil y económico de identificación de especies de tiburón.

1.4.1 Marcadores genéticos

El nombre de marcador es aplicado a un segmento de ADN que tiene una ubicación física identificable en un cromosoma y que puede ser rastreado como un patrón hereditario. El marcador puede ser un gen o una sección de ADN que no tiene función conocida (Cubero, 2002 cit. en Salgado, 2011). Existen tres tipos de marcadores genéticos: morfológicos,

bioquímicos y moleculares. Los marcadores morfológicos se basan en fenotipos de fácil identificación visual, sin embargo son poco abundantes y sus características son influenciadas por el ambiente (Martínez et al., 2004). Los marcadores bioquímicos están basados en isoenzimas y aloenzimas, pero no permiten la cobertura total del genoma en mapeo genético (Martínez et al., 2004). Los marcadores moleculares son porciones de ADN que pueden asociarse con una característica en el organismo de interés (Vienne, 2002 cit. en Salgado, 2011). Diversas técnicas de biología molecular se encuentran disponibles para detectar variabilidad en la secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas y la hibridación son algunas de las técnicas que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares y cubrir la totalidad del genoma de un organismo (Martínez et al., 2004).

1.4.1.1 Regiones ITS2

En el transcrito de ARN ribosomal existen regiones codificantes llamadas exones y regiones no codificantes que deben ser eliminadas para su maduración, llamadas intrones. Los componentes codificantes del ARNr primario son: 28S, 18S y 5,8S. Entre los genes 28S y 18S se encuentra otro gen que es el 5.8S, que a su vez se encuentra flanqueado antes del splicing por dos secuencias ITS determinadas como ITS1 e ITS2. Estos espacios internos de transcripción son menos conservados que las regiones codificantes, generalmente varían lo suficiente para ser utilizados como herramienta para la discriminación de especies dentro de un género (Carlile, 2001 cit. en Salgado, 2011). El locus ITS2 tiene una baja variación intraespecífica, pero suficiente polimorfismo interespecífico para producir fuertes marcadores de diagnóstico, incluso para los taxa estrechamente relacionados (Shijvi et al., 1996).

1.4.1.2 Identificación molecular de especies de tiburón basada en regiones ITS2

El enfoque de Pank *et al.* (2001) y Shivji *et al.* (2002) utiliza múltiples primers especie-específicos (basados en regiones ITS2) en una sola reacción para producir amplicones de diagnóstico distinguiendo entre las especies de lamnidos (*Isurus oxyrinchus*, *Isurus paucus* y *Lamna nasus*) y carcarínidos (*Prionace glauca*, *Carcharhinus obscurus*, *Carcharhinus plumbeus* y *Carcharhinus falciformis*) de forma simultánea. Todo el proceso sólo requiere PCR sin la utilización posterior de enzimas de restricción o de secuenciación (Abercrombie *et al.*, 2005). Inicialmente, para probar cada primer de manera individual, se utiliza una combinación de tres primers: dos primers universales para tiburón (forward y reverse) que amplifican una región ITS conservada para todas las especies; y, un primer forward específico que solo amplifica la región correspondiente a cada especie. Por ejemplo, el primer (shortfin mako) para la especie de tiburón *Isurus oxyrinchus* produce dos amplicones: (1) un amplicón de 1350bp (control positivo) generado a partir de los dos primers universales de tiburón y (2) un amplicon de 771 pb para el diagnóstico específico de *I. oxyrinchus*, generado a partir del primer forward específico (shortfin mako) y el primer reverse universal de tiburón (Figura 1). Esta combinación de primers, al medirse con el ADN genómico de otras especies de tiburón, sólo produce la amplificación de la banda del control positivo (1350bp) y no de la segunda banda (771bp) debido a que el primer forward específico (shortfin mako) no puede hibridarse a los ADNs de otras especies (Shivji *et al.*, 2002).

En el estudio de Shivji *et al.* (2002) se desarrolló y evaluó un método de genética molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando primers especie-específicos, en un formato múltiple de ocho primers para discriminar simultáneamente entre seis especies de tiburones mundiales comunes provenientes de pesquerías pelágicas. Los

primers y el formato múltiple distinguen las especies con precisión y sensibilidad correspondientes a tres lamnidos (*Isurus oxyrinchus*, *Isurus paucus* y *Lamna nasus*) y tres carcarínidos (*Prionace glauca*, *Carcharhinus obscurus* y *Carcharhinus falciformis*). Los primers especie-específicos están basados en diferencias en la secuencia de ADN del locus ITS2. Además, el método desarrollado por Shivji *et al.* (2002) es un modelo base para el desarrollo de métodos genéticos de alto rendimiento para el diagnóstico de especies de tiburón como las especies protegidas (*Carcharodon carcharias*, *Cetorhinus maximus* y *Rhincodon typus*).

En el estudio de Abercrombie *et al.* (2005) también se presenta el desarrollo y aplicación del método molecular de cinco primers especie-específicos. Estos primers están basados en regiones ITS2 para las tres especies de tiburón martillo. La aplicación de este ensayo a las investigaciones del mercado de aletas confirmó la presencia de las aletas de martillo en el comercio internacional. El estudio en el mercado de aletas de tiburón de Hong Kong, reveló una alta concordancia entre tres categorías específicas propuestas por los comerciantes de aletas (“Bai Chum”, Chun Gui” y “Gu Pain) con la identificación molecular de tres especies (*S. lewini*, *S. zygaena* y *S. mokarran*).

En el presente estudio se estandariza un protocolo de identificación de especies de tiburón para: *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis*, *Prionace glauca*, *Carcharhinus galapagensis*, *Carcharhinus falciformis*, *Sphyrna zygaena* e *Isurus Oxyrinchus* usando muestras de aletas húmedas encontradas en la embarcación FER MARY I, detenida en la Reserva Marina de Galápagos (RMG) y aletas secas de tiburón obtenidas en el mercado de Puerto López.

2. Objetivo General

- Estandarizar un protocolo de identificación de especies de tiburón mediante métodos moleculares a partir de aletas húmedas encontradas en la embarcación FER MARY I, detenida en la Reserva Marina de Galápagos (RMG) y aletas secas de tiburón obtenidas en el mercado de Puerto López.

3. Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo eficiente de extracción de ADN de aletas de tiburón.
- Estandarizar la técnica de identificación de especies de tiburón a partir de aletas húmedas encontradas en la embarcación FER MARY I, detenida en la Reserva Marina de Galápagos (RMG) y aletas secas de tiburón obtenidas en el mercado de Puerto López, mediante la técnica de PCR múltiple, usando primers específicos basados en regiones ITS2.
- Confirmar la composición de especies y proporción relativa de las especies de tiburón de la embarcación FER MARY I, detenida en la Reserva Marina de Galápagos (RMG) y especies de tiburón obtenidas en el mercado de Puerto López.

4. Área de Estudio

Las aletas húmedas de tiburón analizadas en este estudio fueron colectadas por personal del GSC (Galápagos Science Center) y encontradas en la embarcación FER MARY I detenido el 18 de Julio del 2011, a unas 20 millas dentro de la Reserva Marina de Galápagos (RMG) en la posición 0°10.182'N y 89°21.884'W al sureste de la Isla Genovesa. Las aletas secas de

tiburón analizadas fueron obtenidas en Puerto López por Kelly Swing en el 2012. La extracción de ADN y análisis de todas las muestras de aletas secas y el 71% de las muestras de aletas húmedas colectadas se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales); Cumbayá - Ecuador. Mientras que la extracción de ADN y análisis molecular del 29% restante de las muestras colectadas de aletas húmedas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Galápagos Science Center; Galápagos - Ecuador.

5. Justificación

La dificultad para la identificación de muchos tiburones capturados comúnmente a nivel mundial han resultado en una escasez global de información sobre pesca y comercialización del recurso tiburón, haciendo casi imposible el poder realizar evaluaciones de los efectos de la explotación y de las necesidades de establecer medidas de conservación para las especies de tiburón afectadas (Shivji *et al.*, 2002). Es necesario estandarizar una metodología de identificación molecular de especies de tiburones que sea fácil y precisa, para obtener información rápida y correcta sobre lo que sucede en la pesca y en el mercado; principalmente, en el caso de aleteo en el que se dificulta la identificación morfológica (Sebastian *et al.*, 2008).

En Ecuador existe el Plan de Acción Nacional para Conservación y el Manejo de Tiburones de Ecuador (PAT-Ec). Sin embargo, no se tiene una base de información confiable específica de tiburones, ni se cuenta con personal especializado y tampoco existen alianzas estratégicas entre el sector oficial pesquero y las Universidades, Colegios de Profesionales y

Escuelas de Pesca afines a la temática de los recursos pesqueros. Además, el PAT – Ecuador menciona dentro de sus componentes la necesidad de establecer un sistema de información, monitoreo e investigación aplicada, debido a que la conservación y manejo de los tiburones requiere de la disponibilidad de una base científica sólida para ayudar a los administradores en la toma de decisiones (Martínez et al., 2007).

Este proyecto establece un protocolo de identificación molecular estandarizado de especies de tiburón que puede ser una herramienta precisa, fácil y ágil para determinar la composición y proporción relativa de las especies de tiburón capturadas en el país. De esta manera, se aportará con información confiable sobre la problemática de tiburones en Ecuador, que será de ayuda para sustentar las políticas sobre el manejo de la pesquería y la conservación de tiburones en el país.

6. Materiales

6.1 Colección de muestras de aletas/piel de tiburón

- Fundas plásticas ziploc
- Etanol al 95%
- Tubos eppendorf (1,5 ml)
- Bisturí
- Tijeras de disección

6.2 Extracción de ADN de aletas/piel de tiburón

- Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN Inc.)
- Etanol absoluto (96%)
- Vortex VWR Lab Dancer
- Cama de arena Thermo scientific 2052
- Centrifuga Eppendorf 5415D
- Balanza analítica Sartorius LA 230 S

6.3 Cuantificación de ADN extraído a partir de aletas/piel de tiburón

- NanoDrop Thermo scientific 1.0000 y 2000
- Buffer AE (Kit DNeasy Blood & Tissue QIAGEN Inc.)

6.4 Amplificación de regiones ITS2

- ADN de aleta de tiburón (20ng/μl)
- Buffer de reacción 1X (Invitrogen)
- 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen)
- 8 μM de dNTPs (Invitrogen)
- 2,5 pmol de cada primer (Tabla 1)
- DNA Taq polimerasa (Invitrogen)
- Termociclador Biometra T personal 6138

6.5 Electroforesis en gel de Agarosa

- Agarosa 1,2% (Invitrogen)
- TBE 1X (10,8 g/L Tris; 5,5 g/L Acido Bórico; 0,744 g/L EDTA)

- SYBR safe (10.000X, Invitrogen)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder de 100 bp (Axygen)
- Cámaras de electroforesis Labnet E1010-10 y E1015-15
- Fotodocumentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)

7. Métodos

7.1 Colección de muestras de aletas/piel de tiburón

Las 106 aletas húmedas provenientes del barco FER MARY I detenido en Galápagos se tomaron de tiburones encontrados en las bodegas de la embarcación. El personal del Galápagos Science Center (GSC) procedió a identificar morfológicamente a nivel de especie los tiburones encontrados. Cortaron muestras de aleta, músculo y vértebra; y las colocaron en un cooler para trasladarlas a los congeladores del laboratorio de Ecología Marina del GSC. Para llevar las muestras de tiburón al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ en Cumbayá se obtuvo un permiso de transporte de muestras otorgado por el Parque Nacional Galápagos (Permiso # PC-43-11). Se transportó las muestras en tubos eppendorf (1,5 ml) con etanol al 95% en un cooler con blue ice desde San Cristóbal a Quito. Finalmente se conservaron las muestras a -20 °C en el congelador del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.

Las 8 muestras de aletas/piel seca fueron obtenidas por Kelly Swing, profesor de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), en el mercado de Puerto López. Luego de que

los tiburones fueron faenados, Kelly Swing tuvo la oportunidad de identificar todos los ejemplares a nivel de género e incluso de especie, de acuerdo a las características morfológicas. Posteriormente, Swing cortó un trozo de aleta por preferencia (u otra parte de la piel), después de que los vendedores terminaron con las carcasas de los tiburones y las dejó secar al sol. Finalmente las muestras se transportaron hasta Quito, donde se las almacenó a -20 °C en fundas ziploc para los análisis moleculares en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.

Cada muestra colectada del barco FER MARY I y del mercado de Puerto López se codificó de acuerdo a la especie identificada morfológicamente y un número correspondiente a cada individuo. Así por ejemplo, la muestra PG/2 corresponde a *Prionace glauca* y el 2 representa el número de individuo identificado. En la Tabla 2 y Anexo 3, se incluyen la lista de especies que se identificó morfológicamente en el momento de la colección de las aletas y el número de individuos de cada especie que se utilizó en el presente estudio.

7.2 Extracción, cuantificación y determinación de la calidad de ADN extraído de aletas/piel de tiburón

La extracción de ADN genómico se hizo a partir de aletas húmedas y aletas/piel secas de tiburón, usando el Kit DNeasy Blood Tissue (QIAGEN Inc.). El procedimiento para la extracción se detalla a continuación. Se cortó 20 - 25 mg de tejido en trozos pequeños y se colocó en un tubo de micro centrífuga de 1,5 ml. Se añadió 180 µl de Buffer de lisis ATL (Kit DNeasy Blood Tissue). Posteriormente, se añadió 20 µl de proteinasa K, se mezcló mediante vortex por 10 a 15 segundos y se incubó a 56° C por 3 horas hasta que el tejido estuvo completamente degradado. Luego, se usó vortex por 15 segundos y se añadió 200 µl Buffer

AL (Kit DNeasy Blood Tissue) para proporcionar condiciones óptimas de unión del ADN a la columna DNeasy. Se mezcló sirviéndose de un vortex durante 10 segundos y se incubó la muestra a 56 ° C durante 10 minutos. Después, se añadió 200 µl de etanol absoluto y se mezcló por vortex durante 10 segundos. Se colocó la mezcla anterior dentro de la columna DNeasy que se encuentra en un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Se descartó el tubo de recolección y se cambió la columna a un nuevo tubo. Se añadió 500 µl Buffer de lavado AW1 (Kit DNeasy Blood Tissue) y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm. Se descartó el tubo de recolección y se colocó la columna en otro tubo. Se añadió 500 µl de Buffer de lavado AW2 (Kit DNeasy Blood Tissue) y se centrifugó durante 3 minutos a 14000 rpm. Se descartó el tubo de recolección y se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se eluyó el ADN mediante la adición de 200 µl de buffer AE (Kit DNeasy Blood Tissue). Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente (15 - 25 °C). Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm, se descartó la columna y la mezcla resultante se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se almacenó las muestras a -20 °C hasta ser usadas en las reacciones de PCR. Se cuantificó el ADN usando el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), y la calidad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (80V, 45min) y se visualizó las bandas usando el fotodocumentador GelDoc XR Imaging System (Biorad) (Figura 2).

7.3 Identificación de especies de tiburón mediante PCR múltiple

7.3.1 PCR Triplex

Cada primer especie-específico se ensayó para determinar su poder de amplificación (es decir, especificidad de especie y la facilidad de detección del amplicón) siguiendo la estrategia

de PCR multiplex detallada en Pank et al. (2001), Shivji et al. (2002), Abercrombie (2004) y Abercrombie et al. (2005). El ensayo consistió en probar cada primer especie específico en una reacción de 3 primers (PCR triplex; Figura 1), en la que se incluyó 2 primers universales de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) y un primer especie-específico. El ensayo de cada primer especie específico y los primers universales de tiburón (PCR triplex) fue probado contra cada especie objetivo (individuos identificados morfológicamente para cada primer especie-específico) y contra un control negativo (agua) y un control positivo (especie no objetivo) (Figuras 3 - 9). Las muestras IO/52, PG/10 y AP/20 se determinaron como controles positivos por presentar una banda clara y bien definida para los primers universales de tiburón.

La PCR se realizó en base a las condiciones de ciclos térmicos y concentración de reactivos descritos en Pank et al. (2001) y Shivji et al. (2002). El volumen final de la reacción fue de 10 μ l, conteniendo 20 ng/ μ l de ADN; 2,5 pmol de cada primer; 1 X de PCR buffer (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂; 8 μ M de dNTPs y 1 unidad de HotStar Taq DNA Polymerase (Invitrogen). El perfil de ciclos térmicos fue: denaturación inicial durante 15 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos, y un paso de extensión final de 5 minutos a 72 °C. Terminado el ciclaje, las muestras se mantuvieron a 4°C o - 20°C antes de ser analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, en busca de los productos de amplificación con los primers especie-específicos para cada especie en cuyo caso se asumió que la muestra analizada correspondía a la especie del primer especie-específico que había sido empleado.

7.3.2 PCR Cuadriplex (*Alopias pelagicus*)

Para confirmar en un 100% la identificación de esta especie de tiburón se realizó el ensayo de PCR con los dos primers de tiburón universales (FISH5.8S-F y FISH28S-R) y los primers pelagic thresher 1113F y common thresher 1048F (Tabla 1) reportados anteriormente por Abercrombie (2004) (Figura 10). Se mantuvieron las condiciones de ciclos térmicos y concentraciones de reactivos del PCR triplex.

7.3.3 PCR Pentaplex (Familia Sphyrnidae)

Para acelerar el ensayo de PCR y tener pruebas simultáneas para las tres especies de la familia de esfírnidos (Sphyrnidae), los tres primers especie-específicos se combinaron en una reacción de 5 primers (pentaplex) para probar su robustez de diagnóstico. Esta PCR pentaplex incluyó los dos primers universales de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) y los primers especie-específicos para *S. lewini* (ScHH401F), *S. mokarran* (GtHH123F), y *S. zygaena* (SmHH630F) (Tabla 1; Figura 11). Con excepción de los primers adicionales, todas las condiciones de ciclos térmicos y concentraciones de reactivos del PCR pentaplex fueron idénticas a las utilizadas para la PCR triplex.

7.3.4 PCR Pentaplex (Familia Carcharinidae)

Así mismo, se realizó un ensayo de PCR pentaplex para las tres especies pertenecientes a la familia de carcarrínidos (Carcharhinidae) usando los dos primers universales de tiburón y los primers especie-específicos para *P. glauca* (Primer blue), *C. falciformis* (Primer silky) y *C. galapagensis* (Primer dusky) (Tabla 1; Figura 12). En el caso del primer para *C. galapagensis* cabe recalcar que se utilizó este primer de especificidad de especie cercana, debido a que

también amplifica ADN de *C. obscurus* y *C. longimanus* (Clarke et al., 2006). Las condiciones de ciclos térmicos y concentraciones de reactivos fueron las mismas que las utilizadas en el ensayo de PCR triplex.

7.3.5 PCR Heptaplex (Orden Lámniformes)

Para las cuatro especies pertenecientes al orden de lámniformes se realizó un ensayo de PCR heptaplex utilizando los primers universales de tiburón y los primers especie-específico para *I. oxyrinchus* (Primer shortfin mako 575F), *A. vulpinus* (Common thresher 792F), *A. superciliosus* (Bigeye thresher 272F), *A. pelagicus* (Pelagic thresher 1113F) y el primer de especificidad de especie cercana Common thresher 1048F que amplifica *A. pelagicus* (fuertemente) y *A. superciliosus* (débilmente) (Tabla2; Figura 13). Se mantuvieron las condiciones de ciclos térmicos y concentraciones de reactivos del PCR triplex.

7.4. Electroforesis en gel de Agarosa

Para separar y visualizar los productos de amplificación en cada reacción de PCR, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,2%. Primero se colocó en un Erlenmeyer 100ml de TBE 1X y 1,2 g de agarosa. La mezcla se calentó en el horno microondas hasta que se homogenizó la solución. Posteriormente, se dejó enfriar hasta que la temperatura de la superficie del frasco fuera tolerable al tacto. Inmediatamente después, se agregó 3,5 µl de SYBR safe a la mezcla y se la vertió en un molde de solidificación. Para formar los pocillos del gel de agarosa se colocaron los peines plásticos en la parte superior del molde y se dejó solidificar por 15 minutos. Los productos de PCR a ser cargados en el gel fueron preparados añadiendo 2 µl de Blue Juice 10X (Invitrogen) a los 10 µl de la reacción de PCR. El ladder

utilizado fue de 100 pb (Axygen) y la electroforesis se realizó a 80 V por 50 minutos (Figuras 3 - 13).

8. Resultados

8.1 Colección de muestras de aletas/piel de tiburón

Un total de 106 muestras de aletas húmedas de tiburón provenientes del barco FER MARY I fueron colectadas en San Cristóbal para este estudio, de las cuales 99 fueron enviadas a Quito para los análisis moleculares respectivos en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Sin embargo, solo se obtuvo ADN de buena calidad de 94 muestras de aletas húmedas. En el mercado de Puerto López se colectaron 8 muestras de aleta/piel secas de tiburón para la identificación molecular en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Por lo tanto, un total de 102 muestras de aletas de tiburón colectadas fueron identificadas molecularmente en este estudio (Tabla 2).

8.2 Extracción, cuantificación y calidad de ADN extraído de aletas/piel de tiburón

Para la extracción de ADN se usó el Kit DNeasy Blood Tissue (QIAGEN Inc.). El protocolo de extracción se estandarizó con 20 – 25 mg de tejido de aleta/piel seca o húmeda de tiburón y 3 horas de incubación a 56° C para lisar el tejido con Buffer ATL y proteinasa K. El resto del protocolo de extracción se ajustó a lo que establece el manual del Kit de QUIAGEN.

Los valores de la cuantificación del ADN extraído a partir de aletas/piel secas o húmedas de tiburón analizadas, se presentan en el Anexo 3. Las concentraciones de ADN de las muestras oscilaron entre 15 ng/μl hasta 193,70 ng/μl. Para las reacciones de PCR se trabajó con 20 ng/μl. Todas las muestras analizadas en este estudio presentaron una relación A260/A280 mayor a 1.8, lo que indica un ADN de buena calidad.

En cuanto a la electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, se determinó como ADN de buena calidad a las muestras que presentaban una banda de alto peso molecular y bien definida en la parte superior del gel (Figura 2).

8.3 Identificación de especies de tiburón

8.3.1 Amplificación de regiones ITS (PCR Triplex)

La región ITS2 del ADN ribosomal nuclear y partes de la región 5.8S (aproximadamente 160 pb) y 28S (aproximadamente 60 pb) fueron amplificadas empleando los primers universales de tiburón FISH5.8SF (primer forward) y FISH28SR (primer reverse). El fragmento de PCR que amplifica los primers universales de tiburón para la familia Lamnidae (*Isurus Oxyrinchus*) es de aproximadamente 1350 pb, para la familia Carcharhinidae (*Prionace glauca*, *Carcharhinus falciformis*, *Carcharhinus galapagensis*) es de 1470 pb, para la familia Alopiidae (*Alopias pelagicus*) es de 1200 pb y para la familia Sphyrnidae (*Sphyrna zygaena*) es de 860 pb. Las secuencias de los primers universales y especie-específicos utilizados en este estudio para la identificación de las especies de tiburones; así como el tamaño de los amplicones producidos para cada especie se enumeran en la Tabla 1.

En los ensayos triplex (temperatura de annealing = 65 °C), los primers usados demostraron completa especificidad de especie (Figuras 3 - 9) con excepción del primer common thresher 1048F y el primer dusky. Las especies de tiburón objetivo de este estudio sometidas a prueba usando el formato triplex PCR y sus orígenes geográficos se enumeran en la Tabla 2.

Los resultados obtenidos para las diferentes especies analizadas se detallan a continuación. Para las 6 muestras de Puerto López reconocidas morfológicamente como *Sphyrna zygaena*, se identificaron todas como pertenecientes a esta especie con un amplicón de 860 pb de intensidades variables para los primers universales ITS2 y un amplicón de 249 pb para el primer forward especie-específico y el primer reverse universal (Figura 3). La única muestra de tiburón martillo de Galápagos identificada morfológicamente como *Sphyrna lewini*, a nivel molecular se la identificó como *Sphyrna zygaena* con un amplicón de 860 pb para los primers universales ITS2 y un amplicón de 249 pb para el primer forward especie-específico y el primer reverse universal (Figura 4). Las 18 muestras provenientes de Galápagos e identificadas morfológicamente como *Prionace glauca*, mediante el análisis molecular también se las identificó como *Prionace glauca*, presentando la banda de 1470 pb para el control positivo ITS2 en diferentes intensidades y la banda de 929 pb para el primer forward especie-específico y el primer reverse universal (Figura 5). En el caso de las 22 muestras de tiburón de Galápagos identificadas a nivel morfológico como *Carcharhinus falciformis*, después de los ensayos moleculares se las identificó como *Carcharhinus falciformis*, mostrando una banda de 1470 pb para el control positivo ITS2 con diversas intensidades y una banda de 1085 pb correspondiente al primer forward especie-específico y al primer reverse universal (Figura 6). Para la muestra de Galápagos identificada

morfológicamente como *Carcharhinus galapagensis*, mediante los análisis de PCR triplex se comprobó la amplificación de una banda de 1470 pb para el control positivo ITS2 y una banda de 480 pb producida por el primer forward de especificidad cercana y el primer reverse universal (Figura 7). Sin embargo, el primer utilizado para identificar esta especie no es 100% específico, ya que en el estudio de Shijvi et al. (2002) y Clarke et al. (2006) se lo utilizó para identificar a *C. obscurus* y además se reporta que este primer también amplifica a *C. galapagensis* y *C. longimanus*. Por lo que a nivel molecular no podemos decir con seguridad que se trate del tiburón Galápagos (*C. galapagensis*), pero a nivel morfológico fue identificado como *Carcharhinus galapagensis*. La muestra identificada a nivel morfológico como *Isurus oxyrinchus* se confirmó como perteneciente a esta especie después de los análisis moleculares. Se produjo una banda de 1350 pb para el control positivo ITS2 y una banda de 771 pb producida por el primer forward especie-específico y el primer reverse universal (Figura 8). Tanto las 2 muestras de Puerto López como las 51 muestras de Galápagos identificadas morfológicamente como *Alopias pelagicus*, después de los ensayos moleculares respectivos, (total 53 muestras) se confirmaron como pertenecientes a esta especie de *Alopias*. Se realizó un ensayo triplex, y se obtuvo el amplicón de 1200 pb para el control positivo ITS2 de diferentes intensidades y el amplicón de 385 pb producido por el primer forward de especificidad de especie cercana y el primer reverse universal (Figura 9). Para dar un diagnóstico 100% confiable se realizó un PCR cuádruplex con el primer especie-específico, el primer de especificidad cercana y los primers universales (ver Sección 8.3.2).

Un total de 102 muestras fueron identificadas exitosamente a nivel molecular, con excepción de la única muestra de tiburón Galápagos. De las cuales un 51,96% pertenecen a

Alopias pelagicus, 21,57% *Carcharhinus falciformis*, 17,65% *Prionace glauca*, 6,86% *Sphyrna zygaena*, 0,98% *Isurus oxyrinchus* y 0,98% *Carcharhinus galapagensis* (Figura 14).

8.3.2 PCR Cuádruplex (*Alopias pelagicus*)

Los resultados de muestras de tiburón analizados por PCR cuádruplex reconfirmaron la identificación morfológica de 53 individuos *Alopias pelagicus*, debido a que se obtuvo el amplicón de 1200 pb de diferentes intensidades producido por los primers forward y reverse universales; el amplicón de 385 pb producido por el primer forward de especificidad cercana de especie y el primer reverse universal; y el amplicón de 230 pb producto del primer forward especie-específico y el primer reverse universal. No hubo casos de falsos positivos de especie-específico, puesto que solo se produjo la banda de control positivo ITS2 de tiburón para la especie no objetivo (tiburón *Prionace glauca*) (Figura 10).

8.3.3 PCR Pentaplex (Familia Sphyrnidae)

Los resultados de muestras de tiburón analizados utilizando el PCR pentaplex fueron los mismos que los analizados para las pruebas de de PCR triplex. Los primers especie-específicos tuvieron especificidad completa con respecto a su especie objetivo (es decir tiburones *Sphyrna zygaena*). No hubo casos de falsos positivos, debido a que solo se produjo la banda de control positivo ITS2 de tiburón para las especies no objetivo (tiburón *Isurus oxyrinchus*) y no se produjo la banda especie-específica de *Sphyrna zygaena* (Figura 11).

8.3.4 PCR Pentaplex (Familia Carcharinidae)

Los resultados de muestras de tiburón analizados utilizando el PCR pentaplex que se obtuvieron fueron los mismos que los analizados para las pruebas de de PCR triplex. Todos

los primers especie-específicos de PCR tuvieron especificidad completa con respecto a su especie objetivo (*P. glauca*, *C. falciformis* y *C. galapagensis* respectivamente). La co-amplificación de la banda control positivo de tiburón (primers universales) se produjo en diversos grados de intensidad para todas las especies objetivo (*P. glauca*, *C. falciformis* y *C. galapagensis*). Es importante tomar en cuenta que para todas las especies no objetivo (tiburón *Alopias pelagiucs*), sólo la banda del control positivo ITS2 se produjo en cada caso, es decir, no hubo casos de falsos positivos (Figura 12).

8.3.5 PCR Heptaplex (Orden Lámniformes)

Los resultados de muestras de tiburón analizados utilizando el PCR heptaplex fueron los mismos que los analizados para las pruebas de de PCR triplex. Todos los primers especie-específicos de PCR mostraron especificidad completa con respecto a su especie objetivo (*I. oxyrinchus* y *A. pelagicus* respectivamente). La co-amplificación de la banda de control positivo de tiburón (primers universales) se produjo en diversos grados de intensidad para todas las especies objetivo (*I. oxyrinchus* y *A. pelagicus*) (Figura 13).

9. Discusión

9.1 Extracción, cuantificación y electroforesis de ADN de aletas/piel de tiburón

El protocolo de extracción de ADN de aletas secas y húmedas de tiburón se estableció eficientemente. No se vieron diferencias significativas entre la extracción de ADN de aletas

húmedas y aletas secas. En ambos casos, se obtuvo ADN de buena calidad y concentraciones suficientes para las reacciones de PCR (20 ng/μl).

Es importante recalcar que no se pudo obtener ADN de buena calidad de ocho muestras de aletas húmedas de la especie *Carcharhinus falciformis*. No se sabe con exactitud que sucedió en este caso, pero se presume que hubo mayor cantidad de piel en lugar de cartílago en estas muestras; a diferencia de las muestras en las que sí se pudo obtener ADN de buena calidad. De las 114 muestras involucradas en este estudio, se tuvo un total de 102 muestras (Tabla 2; Anexo 3) con ADN de buena calidad para el análisis molecular respectivo.

9.2 PCR Multiplex

En cada ensayo de PCR multiplex, cada primer especie-específico produjo un amplicón de diagnóstico para su especie objetivo cuando se utilizó en conjunto con el par de primers de tiburón universales ITS2. Además, los primers universales ITS2 amplificaron una banda de control positivo de tiburón en todas las especies objetivo y no objetivo de tiburón. Sin embargo, cuando se coamplificó el amplicón del primer especie-específico y el amplicón del control positivo para tiburón, se observó la producción inconsistente de la banda de diagnóstico para tiburón (control positivo) en las especies: *Prionace glauca*, *Carcharhinus falciformis* y *Alopias Pelagicus*. Este fenómeno ha sido observado antes por Pank et al. (2001), Shivji et al. (2002), Chapman et al. (2003) y Abercrombie (2004), quienes han especulado sobre la competición entre primers como un posible motivo, cuando el sitio de hibridación del primer forward especie-específico está relativamente cerca del sitio de hibridación del primer forward universal 5.8SF. Además, estos autores observaron que cuando se realizaban los ensayos de PCR sólo con los primers universales la banda del control

positivo amplificó eficientemente para las muestras de las especies analizadas de tiburón (*Prionace glauca*, *Carcharhinus falciformis* y *Alopias Pelagicus*). Es importante señalar, que la falta del amplicón de control positivo que se produce a partir de las especies de tiburón analizadas no restringe la utilidad de diagnóstico de cada primer especie-específico en la identificación de las especies de tiburón (Abercrombie, 2004). El propósito de incluir los 2 primers universales ITS2 en la PCR triplex es sólo para evitar resultados falsos negativos (ausencia de amplificación) en las muestras. Esta ausencia completa de amplicones se puede dar por ADN de mala calidad y/o por un error humano en el momento de preparar la reacción de PCR (Pank et al., 2001 y Shivji et al., 2002). En este estudio se determinaron tres muestras (IO/52, PG10/ y AP/20) como controles positivos en los diferentes ensayos de PCR realizados para comprobar la especificidad de los primers especie-específicos, y agua como control negativo para evitar falsos positivos. Así, por ejemplo en el ensayo de PCR triplex para *Sphyrna zygaena* (Figura 3), el control positivo utilizado fue la especie no objetivo (*Isurus oxyrinchus*; IO/52;) y un control negativo (agua). Por lo tanto, para la muestra IO/52 (especie no objetivo y control positivo de PCR) se observó en el gel una banda de 1350 pb para los primers universales de tiburón y no hubo una amplificación del primer especie-específico para *Sphyrna zygaena*. Mientras que las muestras de especie objetivo para *S. zygaena* amplificaron la banda de control positivo de tiburón (860 pb) y la banda de especie-específico (249 pb). El control negativo no tuvo bandas, lo que comprueba que no hubo errores humanos, ni contaminación de los reactivos.

Para mejorar la eficiencia del ensayo triplex, se combinan los primers especie-específicos junto con los primers universales en una sola reacción. Sin embargo, un problema con este enfoque es que los amplicones de diagnóstico en ocasiones pueden ser lo

suficientemente cercanos en tamaño por lo que una discriminación visual fácil se vuelve problemática en geles de agarosa estándar. Aunque un problema de este tipo se puede resolver en el futuro mediante el uso de diferentes tintes fluorescentes incorporados en los primers o por el uso de geles especiales con mayor poder de resolución (Abercrobie, 2004). Para evitar la problemática de visualización de los amplicones de diagnóstico de tamaños cercanos, en este estudio no se realizó una sola reacción de PCR con todos los primers especie-específicos listados en la Tabla 1. Se optó por realizar tres ensayos de acuerdo a la familia y orden de las especies de tiburones, y con amplicones de diagnóstico de tamaños no tan cercanos para poder visualizarlos sin ningún problema en el gel de agarosa al 1,2%, llegando como máximo a un heptaplex en el orden Lámniformes. Para el ensayo pentaplex de la familia Sphyrnidae se combinaron los primers especie-específicos de las especies *S. lewini*, *S. mokarran* y *S. zygaena*. En el ensayo pentaplex de la familia Carcharinidae se usaron los primers para las especies: *P. glauca*, *C. falciformis* y *C. galapagensis*. Finalmente en el ensayo para el orden Lamnidiformes se utilizaron primers para las especies: *I. oxyrinchus*, *A. vulpinus*, *A. superciliosus*, *A. pelagicus*. Los resultados obtenidos en estos ensayos fueron los mismos que los obtenidos en los ensayos de PCR triplex. Se encontró que los primers especie-específicos son 100% de diagnóstico para las especies objetivo, sin falsos negativos. A excepción del primer common thresher 1048F y el primer dusky (Tabla 1). El primer common thresher 1048F presenta especificidad de especie cercana, ya que amplifica ADN de *Alopias pelagicus* (fuertemente) y *Alopias supesuperciliosus* (débilmente) (Abercrobie, 2004). Sin embargo, para evitar ambigüedad en la identificación de *Alopias pelagicus* se utilizó el primer de especie-específico (Pelagic thresher 113F) en el ensayo cuádruplex. Por lo tanto, en futuros ensayos no será necesario utilizar el primer common thresher 1048F, bastará con utilizar el primer

especie-específico para *Alopias pelagicus* y los primers universales ITS2. El primer dusky reportado por Pank et al. (2001) utilizado para identificar *C. obscurus* en los estudios de Shijvi et al. (2002) y Clarke et al. (2006) mostró especificidad de especie cercana, ya que también amplifica dos de sus congéneres, el tiburón oceanic whitetip (*C. longimanus*) y el tiburón Galápagos (*C. galapagensis*), lo que puede dar lugar a cierta ambigüedad en la discriminación de las muestras de estas tres especies. Esta ambigüedad potencial se mejora por el hecho de que las carcacas de tiburón oceanic whitetip son relativamente fáciles de distinguir morfológicamente, ya que presentan aletas en forma de paleta con puntas redondeadas blancas (Castro 1993, cit. en Shijvi et al., 2002 y Clarke et al., 2006). En el caso *C. obscurus* y *C. galapagensis* la identificación morfológica de las aletas es complicada por ser dos especies sumamente cercanas y la identificación molecular se dificulta por la especificidad de especie cercana del primer dusky que amplifica las dos especies de tiburón (Clarke et al., 2006). En este estudio se utilizó el primer dusky para confirmar indirectamente la identificación morfológica de la única muestra de tiburón Galápagos.

9.3 Aplicaciones de monitoreo, gestión y conservación de tiburones

Los ensayos de PCR con primers especie-específicos son actualmente la técnica molecular más eficiente, versátil y fácil de usar para la identificación rápida de productos de fauna en el comercio (Shijvi et al., 2002 y Abercrombie et al., 2005). Por ejemplo, en la investigación de Sebastian *et al.* (2008), la identificación molecular de especies a partir de aletas demostró que al menos 10 especies de tiburones pelágicos estaban presentes en el comercio de la región centro-norte de Chile. Esto, en contraste con los registros oficiales del gobierno chileno que hacían referencia a sólo cuatro especies en los desembarques (Sebastian

et al. 2008). La exactitud de la identificación morfológica de aletas para una sola especie de tiburón por parte de los comerciantes sugiere que el monitoreo del comercio de aletas de Chile por los nombres del mercado proporcionará una idea bastante precisa del volumen de los tiburones capturados por especie, aunque en el caso del aleteo la identificación por parte del comerciante es complicada y difícil. Por lo tanto, la identificación molecular de especies de tiburón es de gran utilidad para controlar el monitoreo del comercio de aletas de Chile.

La técnica de PCR con primers especie-específicos proporciona medios eficaces para controlar simultáneamente el comercio de especies de tiburones no prohibidas y las especies prohibidas para maximizar los beneficios de la conservación y la gestión de cada grupo. Por ejemplo, La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), tiene prohibido la pesca comercial de tres especies de tiburones en los países miembros (entre ellos el Ecuador). Las especies prohibidas listadas en los apéndices II y III son: *Carcharodon carcharias*, *Cetorhinus maximus* y *Rhincodon typus* (CITES, 2012). Los primers especie-específicos ya se han desarrollado individualmente para estas especies en el estudio de Chapman et al., (2003) y se podrían utilizar en conjunto con los ensayos multiplex descritos en este estudio. Así, por ejemplo se puede utilizar en el ensayo heptaplex para el orden lámniformes para analizar grandes volúmenes de muestras de tiburón e identificar las cantidades de estas especies más comunes en el comercio. Por lo tanto, si una muestra produce un resultado de diagnóstico especie negativo, pero presenta un amplicón de control positivo de tamaño característico de un tiburón lámniforme (ca. 1350 pb), se pueden llevar a cabo pruebas adicionales con primers especie-específicos para identificar estas especies prohibidas.

9.4 Composición y proporción relativa de las especies de tiburones capturadas en el Ecuador

En el estudio realizado por Martínez *et al.* (2007) en la zona de Manta, Ecuador, durante septiembre 2003 y diciembre 2006, se identificaron a nivel morfológico las diferentes especies de tiburón de acuerdo a los desembarques de los pescadores de esta zona. Martínez *et al.* (2007) concluyeron que las principales especies de tiburones que se capturaron en el Ecuador fueron: tiburón rabón bueno (*Alopias pelagicus*) 36%; tiburón aguado-azul (*Prionace glauca*) 24%; tiburón mico (*Carcharhinus falciformis*) 15%; tiburón martillo o cachuda blanca (*Sphyrna zygaena*) 11%; tiburón martillo o cachuda roja (*Sphyrna lewini*) 5%; tiburón rabón amargo (*Alopias superciliosus*) 3%; y tiburón tinto (*Isurus oxyrinchus*) 1%, representando el 95% del desembarque total. En el presente estudio, donde se realizó la identificación molecular de las especies de tiburón capturadas en el barco FER MARY I detenido en Galápagos y de las especies obtenidas en el mercado de Puerto López se obtuvo un total de 102 muestras identificadas exitosamente con 100% de fiabilidad para discriminar entre las especies analizadas, con excepción de la una muestra de tiburón Galápagos, como se mencionó previamente. Para este estudio la proporción relativa de especies de tiburón capturadas fue: 51,96% *Alopias pelagicus*, 21,57% *Carcharhinus falciformis*, 17,65% *Prionace glauca*, 6,86% *Sphyrna zygaena*, 0,98% *Isurus oxyrinchus* y 0,98% *Carcharhinus galapagensis* (Figura 14). Los datos de la composición de especies de tiburón analizadas en el presente estudio son similares a los de la investigación de Martínez *et al.* (2007). Por lo tanto, la composición de especies de tiburón capturadas nos demuestra una abundancia relativa de estas poblaciones en aguas ecuatorianas.

9.5 Monitoreo y conservación de tiburones en el Ecuador

En el Decreto Ejecutivo 486 (2007; Anexo 1) se menciona que es necesario establecer medidas de manejo pesquero, que aseguren la sustentabilidad de las poblaciones de tiburones y que el Instituto Nacional de Pesca –INP- ha elaborado el Plan de Acción Nacional para la Conservación y Manejo de los Tiburones en el Ecuador. En este contexto, el protocolo de identificación molecular de especies de tiburón estandarizado en el presente estudio es una herramienta que permitirá tener una base de datos confiable para estimar las especies de tiburones sobreexplotados en el país, así como controlar y mejorar las medidas de manejo de tiburones en el Ecuador.

Además, los ensayos de PCR diseñados en este estudio pueden ser utilizados para detectar el etiquetado fraudulento de alimentos. Por ejemplo, la venta de carne de tiburones de menor valor comercial en lugar de especies de otros peces en el mercado (Abercrombie, 2004). Debido a que la carne de tiburón es frecuente en el comercio en formas difíciles de identificar (canales o filetes), muchas veces los consumidores de carne de pescado son engañados con la venta de carne de tiburón. Por lo que sería interesante realizar un estudio en los diferentes mercados del Ecuador para verificar si el tipo de carne que se vende es tiburón o se trata realmente de los pescados ofertados. De este modo se tendría una herramienta para el control y monitoreo de las especies de tiburón comercializadas en los mercados del país.

10. Conclusiones

No hubieron diferencias importantes en la eficiencia de extracción de ADN a partir de aletas / piel húmedas y secas de tiburón. Para los dos tipos de aletas se obtuvo ADN de buena calidad y en concentración suficiente para las reacciones de PCR.

Los resultados de la identificación molecular coincidieron en 99% con la identificación morfológica realizada previo a la toma de muestras de aletas de tiburón. El 1 % restante no coincidió con la identificación molecular debido a la dificultad de la identificación morfológica de la muestra de tiburón martillo, ya que el cadáver se encontró totalmente mutilado en el momento del reconocimiento de especie y colección de la muestra.

La amplificación de regiones ITS2 utilizando un ensayo de PCR con un primer especie-específico para cada especie de tiburón y los primers universales ITS2, arrojó los mismos resultados que el PCR con combinaciones diferentes de estos primers especie- específicos y los primers universales ITS2 en una sola reacción (triplex hasta heptaplex).

Como consecuencia de la conclusión anterior, la identificación de especies de tiburón utilizando un ensayo de PCR con varios primers especie-específicos y los primers universales ITS2 sería más rápida y eficiente para el diagnóstico de especies, ya que en una sola reacción de PCR se puede diferenciar e identificar simultáneamente varias especies.

11. Recomendaciones

Aumentar el área de muestreo para confirmar los resultados obtenidos en esta investigación, utilizando las pruebas de diagnóstico molecular de PCR múltiple basadas en regiones ITS2.

Realizar una investigación en los mercados del Ecuador para tener una idea más clara y real de la composición y proporción de las especies de tiburón que se están capturando en el país.

El método molecular estandarizado en este proyecto debería constituirse en una herramienta para el diseño de pruebas de diagnóstico molecular encaminados a vigilar el comercio de varias especies en sistemas terrestres y marinos del Ecuador.

Recomendar la implementación de esta técnica de identificación de tiburones por parte del Estado y de esta manera crear una base de datos de las especies de tiburón capturadas en el país que permita detectar el exceso de pesca de las diferentes especies de tiburón.

12. Bibliografía

- 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). MS Thesis. Nova Southeastern University Oceanographic Center, Dania Beach, Florida.
- Abercrombie, D. Clarke, S. Shivji, M. (2005). Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genetics* 6:775-788.
- Aguilar, F. Chalén, X. Villón, C. (2005). Plan de acción nacional de tiburones. Instituto Nacional de Pesca. Disponible en línea desde: <ftp://ftp.fao.org/fi/document/IPOAS/national/ecuador/PlandeAccionTiburonesPAT-Ec.pdf>
- Castro, J. Woodley, C y Brudek, R. (1999). A preliminary evaluation of the status of sharks species. FAO Fisheries Technical Paper. Roma. Disponible en línea desde: <http://www.fao.org/docrep/003/X2352E/x2352e06.htm#3.%20Biological%20characteristics%20and%20reproductive%20potential%20of%20sharks>
- Chapman, D. Abercrombie, D. Douady, C. Pikitch, E. Stanhope, M. Shivji, M. (2003). A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics* 4: 415-425.
- CITES. (2012). Apéndices I, II y III. Disponible en línea desde: <http://www.cites.org/esp/app/appendices.php>
- Clarke, S. Magnussen, E. Abercrombie, L. McAlister, M. Shivji, M. (2006). Identification of Shark Species Composition and Proportion in the Hong Kong Shark Fin Market Based on Molecular Genetics and Trade Records *Conservation Biology* Volume 20, No. 1, 201-211.
- Coello, S. (2005). La Administración de los Chondrichthyes en Ecuador. Aportes para el Plan Nacional de Tiburones. UICN, Quito, Ecuador: 42 pp.
- Decreto Ejecutivo 001. (2007). Regularización de la pesca incidental del recurso tiburón, su comercialización y exportación en el Ecuador continental. Disponible en línea desde: <http://www.viceministerioap.gob.ec/subpesca102-decreto-ejecutivo-001-regularizacion-de-la-pesca-incidental.html>
- Decreto Ejecutivo 486. (2007). Normas para la regulación de la pesca incidental del recurso tiburón, su comercialización y exportación en el Ecuador continental. Disponible en línea desde: <http://www.viceministerioap.gob.ec/subpesca28-decreto-ejecutivo-486-tiburon.html>

- Fowler, S. (2005). The international frameworks for conservation and management of sharks: Recommendations for Ecuador. Contribution to Ecuador's Draft National Plan of Action for the Conservation and Management of Sharks. IUCN, Quito, Ecuador. 48 pp.
- Jacquet, J. Alava, J. Pramod, G. Henderson, S. Zeller, D. (2008). In hot soup: sharks captured in Ecuador's waters. *Environmental Sciences*, 5:4,269 — 283.
- Llerena, Y. Murillo, J. Espinoza, E. 2009. Determinación de las áreas de crianza de tiburón punta negra *Carcharhinus limbatus* en las zonas costeras de manglar de la Isla San Cristóbal. Informe de Galápagos 2009 - 2010. Pp. 57 – 63.
- Martínez, M. Helguera, M. Carrera, A. (2004). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte II: Capítulo 5: Marcadores Moleculares. Editores: V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski. Ediciones INTA.
- Martínez, J. Galván, F. Carrera, M. Mendoza, D. Estupiñan, C. Cedeño, L. (2007). Abundancia Estacional de tiburones desembarcados en Manta – Ecuador. Disponible en línea desde: <http://issuu.com/telandweb/docs/tiburones-en-el-ecuador-casos-de-estudio>
- Pank, M. Stanhope, M. Natanson, L. Kohler, N. Shivji, M (2001) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus 47ersica47* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. *Marine Biotechnology* 3:231-240.
- Salgado, C. (2011). Identificación molecular de especies de *Monilinia* spp. que afectan la producción de durazno, *Prunus Pérsica*, en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. Tesis para la obtención del título licenciatura en Biotecnología. USFQ.
- Santana, O. Castillo, J. Sosa, O. Rodríguez, C. (2004). Catálogo de tiburones, rayas y quimeras (Chondrichthyes) que habitan en las aguas del norte del golfo de California. Disponible en línea desde: <http://biblioteca.cicese.mx/libros/cat-omar.pdf>
- Sebastian, H. Haye, P. Shivji, M. (2008). Characterization of the pelagic shark-fin trade in north-central Chile by genetic identification and trader surveys *Journal of Fish Biology* 73, 2293-2304.
- Shivji, M. Tagliaro, C. Natanson, L. Kohler, N. Rogers, S. Stanhope, M. (1996). Utility of ribosomal DNA ITS2 for deriving shark species-diagnostic identification markers. In: *Proceedings of the International Congress on the Biology of Fishes*, Donaldson, E.M., and MacKinlay, D.D. (eds.). San Francisco, Calif., 87±93.
- 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.
- Swing, K. (2012). Metodología de colección de muestras de tiburón en Puerto López. Entrevista personal. Profesor de la USFQ. (kswing@usfq.edu.ec).

Vaca, L. (2011). Peritaje Técnico- biológico B/P FER MARY I. San Cristóbal, Ecuador.

Vaca, L. (2012). Metodología de colección de muestras de tiburón en Galápagos. Entrevista personal. Coordinador de laboratorios del GSC. (lvaca@usfq.edu.ec).

13. Tablas

Tabla 1.- Secuencias de primers para especies de tiburón

Especie tiburón	Código del primer	Nombre común (ingles)	Nombre local	Secuencia del Primer	Tamaño amplicón (bp)	Referencia
<i>Prionace glauca</i>	Primer blue	Blue	Tiburón aguado	5'AGAAGTGGAGCGACTGTCTTCGCC3'	929	Shijvi et al. (2002)
<i>Carcharhinus falciformis</i>	Primer silky	Silky	Tiburón mico o sedoso	5' ACCGTGTGGGCCAGGGGTC 3'	1085	Shijvi et al. (2002)
<i>Carcharhinus galapagensis</i>	Primer dusky	Galapagos	Tiburón Galapagos	5'GTGCCTTCCCACCTTTTGGCG3'	480	Pank et al. (2001)
<i>Sphyrna lewini</i>	ScHH401F	Scalloped hammerhead	Tiburón martillo, cachuda roja	5'GGTAAAGGATCCGCTTTGCTGGA3'	445	Abercrombie et al. (2005)
<i>Sphyrna zygaena</i>	SmHH630F	Smooth hammerhead	Tiburón martillo, cachuda blanca	5'TGAGTGCTGTGAGGGCACGTGGCCT3'	249	Abercrombie et al. (2005)
<i>Sphyrna mokarran</i>	GtHH123F	Great hammerhead	Tiburón martillo	5'AGCAAAGAGCGTGGCTGGGGTTTCGA3'	782	Abercrombie et al. (2005)
<i>Alopias superciliosus</i>	Bigeye thresher 272F	Bigeye thresher	Tiburón rabón amargo	5'AGTGCTTGACCATTCCGGTGTGCGT3'	ca1000	Abercrombie (2004)
<i>Alopias vulpinus</i>	Common thresher 792F	Thresher	Tiburón rabón	5'TTCCGTCTCCTCCACACGTCGAGT3'	601	Abercrombie (2004)
<i>Alopias pelagicus</i>	Common thresher 1048F	Pelagic thresher	Tiburón rabón bueno	5'CCGGCCATGCCTTCTGCAACTTG3'	385	Abercrombie (2004)
<i>Alopias pelagicus</i>	Pelagic thresher 1113F	Pelagic thresher	Tiburón rabón bueno	5'CAAGCCTTGCACTTTTGAATGAAGC 3'	230	Abercrombie (2004)
<i>Isurus oxyrinchus</i>	Shortfin mako 575F	Shortfin mako	Tiburón tinto	5'AGGTGCCTGTAGTGTGGTAGACACA3'	771	Shijvi et al. (2002)
Universal FISH5.8SF	Universal FISH5.8SF	-	-	5'TTAGCGGTGGATCACTCGGCTCGT3'	F. Sphyrnidae (SZ): 860 F. Carcharinidae (PG/CF/CG): 1470	Pank et al. (2001)
Universal FISH28SR	Universal FISH28SR	-	-	5'TCCTCCGCTTAGTAATATGCTTAAATT CAGC3'	F. Lamnidae (IO): 1350 F. Alopiidae (AP): 1200	Pank et al. (2001)

Tabla 2.- Lista de especies de tiburones recolectadas en Puerto López y Galápagos y analizadas en los ensayos de PCR multiplex.

Espece tiburón	# Muestras colectadas e identificadas morfológicamente (Galápagos- aletas húmedas)	# Muestras colectadas e identificadas morfológicamente (Pto López-aletas secas)	# Muestras identificadas molecularmente (Galápagos- aletas húmedas)	# Muestras identificadas molecularmente (Pto López-aletas secas)	# Muestras Identificadas molecularmente
<i>Prionace glauca</i> (PG)	19	0	18	0	18
<i>Carcharhinus falciformis</i> (CF)	30	0	22	0	22
<i>Carcharhinus galapagensis</i> (CG)	1	0	1	0	1
<i>Sphyrna lewini</i> (SL)	1	0	0	0	0
<i>Sphyrna zygaena</i> (SZ)	0	6	1	6	7
<i>Alopias pelagicus</i> (AP)	54	2	51	2	53
<i>Isurus oxyrinchus</i> (IO)	1	0	1	0	1
Total de muestras colectadas	106	8	-	-	-
Total de muestras identificadas molecularmente	-	-	94	8	102

14. Figuras

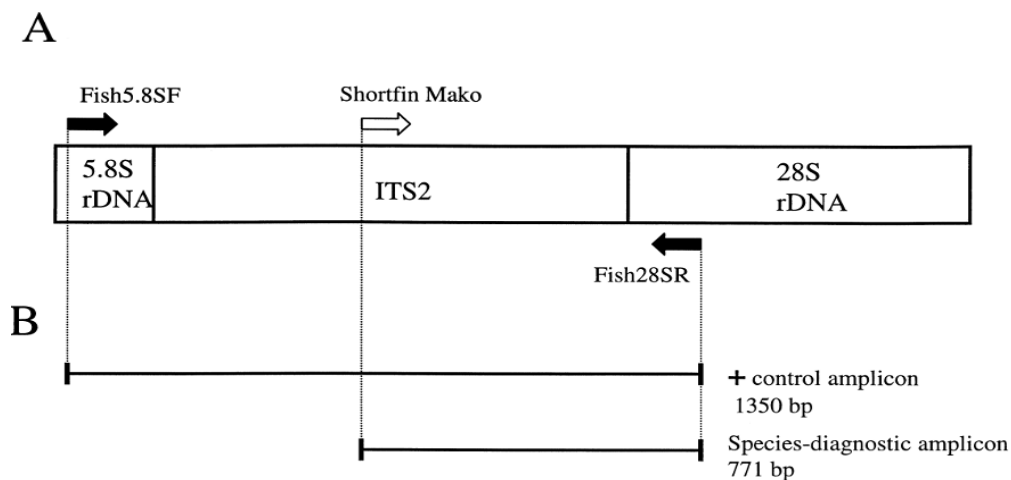


Figura 1.- Esquema representativo de la región ITS2 de rDNA de tiburón. Tomado de Shijvi (2002). (A) Representación esquemática de los genes nucleares ribosomales de tiburón 5.8S y 28S y el locus ITS2, mostrando los sitios de annealing y la orientación de los primers utilizados en los ensayos de PCR triplex. Los primers universales de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) se muestran con flechas negras. El primer de shortfin Mako (flecha blanca) es un ejemplo de un primer especie-específico. (B) Tamaño de los dos amplicones esperados para shortfin mako utilizando la combinación de los tres primers (2 universales y 1 especie-específico).

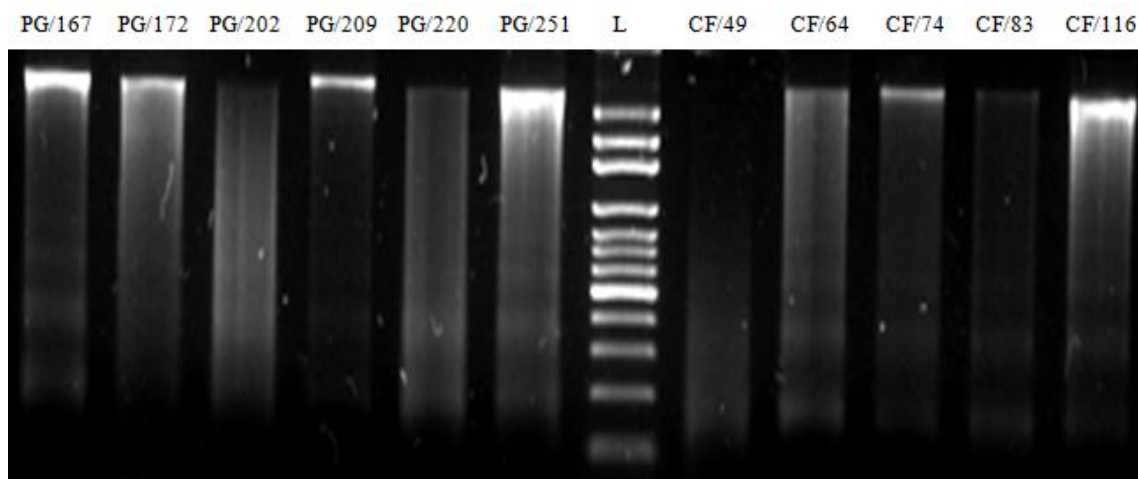


Figura 2. – Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de muestras de ADN extraído a partir de aletas de tiburón. Las muestras PG/167, PG/172, PG/209, PG/251, CF/64, CF/74, CF/83, CF/116 presentan una banda definida en la parte superior del gel de agarosa; y las muestras PG/202, PG/220 y CF/49 no presentan una banda definida. PG: *Prionace glauca*. CF: *Carcharhinus falsiformis*. L: Ladder 100bp (Axigen).

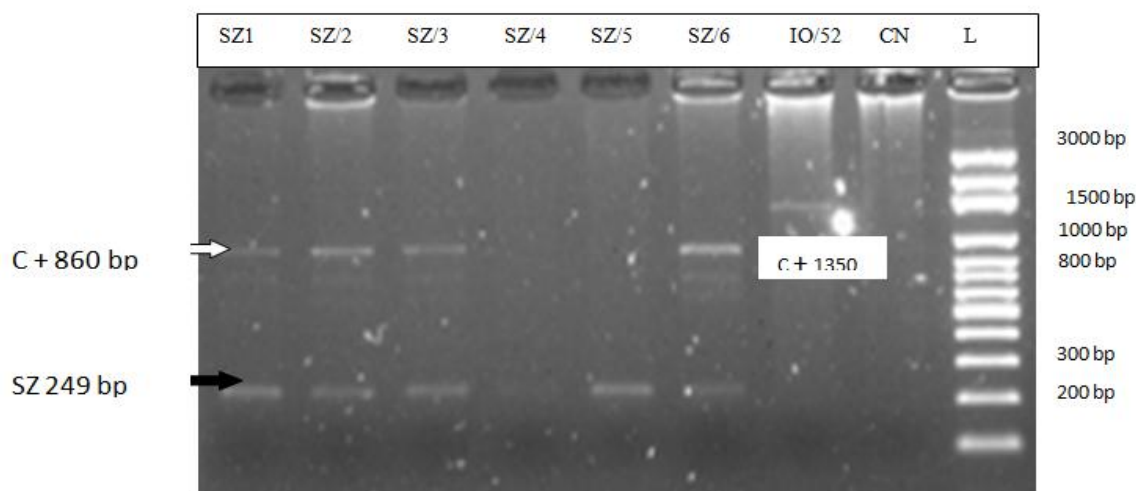


Figura 3.- PCR triplex para *Sphyrna zygaena* (aleta seca). Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación usando los primers universales ITS2 (860 pb), el primer forward especie-específico para *Sphyrna zygaena* y el primer reverse universal (249 pb). Carriles 1-6: muestras de tiburón (aleta seca), SZ: *Sphyrna zygaena*; 7: control positivo (IO/52), IO: *Isurus oxyrinchus*; 8: control negativo (CN - agua) y 9: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder.

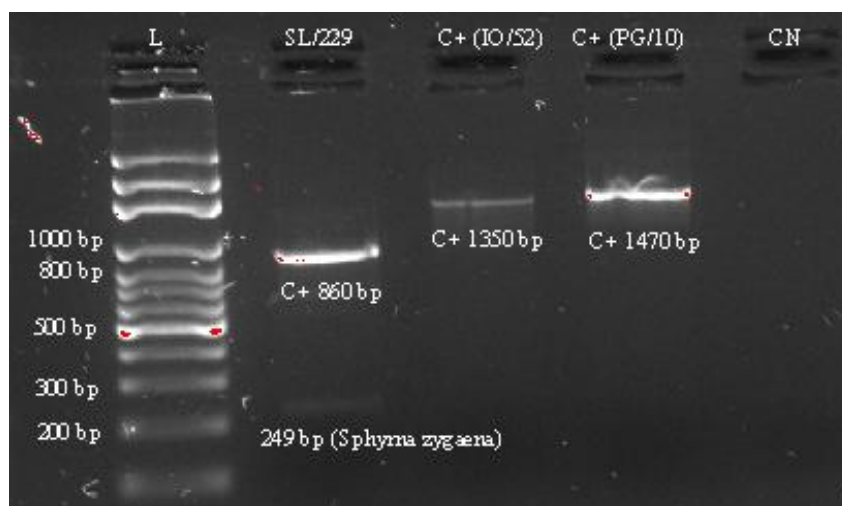


Figura 4.- PCR triplex para *Sphyrna zygaena* (aleta húmeda). Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación usando los primers universales ITS2 (860 pb), el primer forward especie-específico para *Sphyrna zygaena* y el primer reverse universal (249 pb). Carril 1: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder; 2: muestra de tiburón (aleta húmeda), SL: *Sphyrna lewini*; 3: control positivo (IO/52), IO: *Isurus oxyrinchus*; 4: control positivo (PG/10), PG: *Prionace glauca* y 5: control negativo (CN - agua).

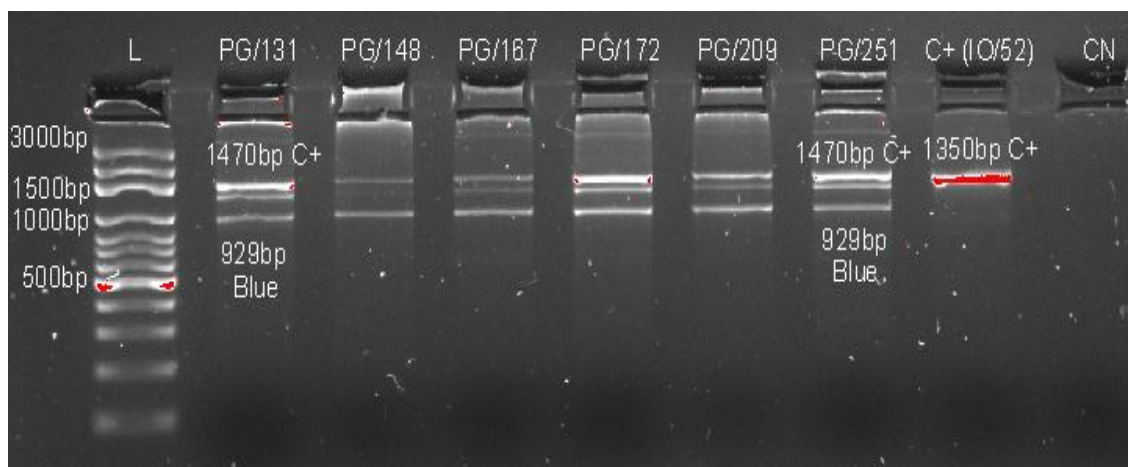


Figura 5.- PCR triplex para *Prionace glauca*. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación con los primers universales ITS2 (1470 pb) en diferentes intensidades, y con el primer forward especie-específico de *Prionace glauca* y el primer reverse universal (929 pb). Carril 1: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder; 2-7: muestras de tiburón (aleta húmeda), PG: *Prionace glauca*; 8: control positivo (IO/52), IO: *Isurus oxyrinchus* y 9: control negativo (CN - agua).

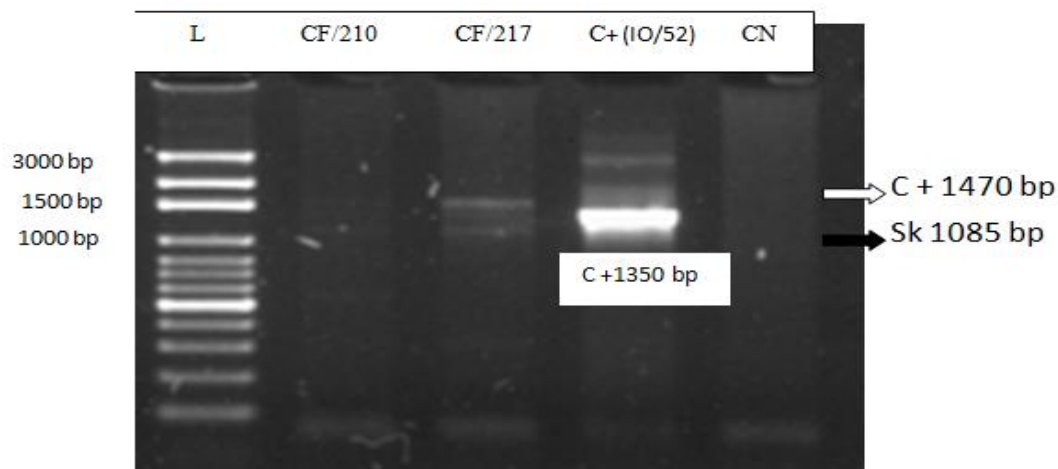


Figura 6.- PCR triplex para *Carcharhinus falciformis*. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación con los primers universales ITS2 (1470 pb) en diferentes intensidades, y con el primer forward especie-específico de *Carcharhinus falciformis* y el primer reverse universal (1085 pb). Carril 1: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder; 2-3: muestras de tiburón (aleta húmeda), CF: *Carcharhinus falciformis*; 4: control positivo (IO/52), IO: *Isurus oxyrinchus* y 5: control negativo (CN - agua).

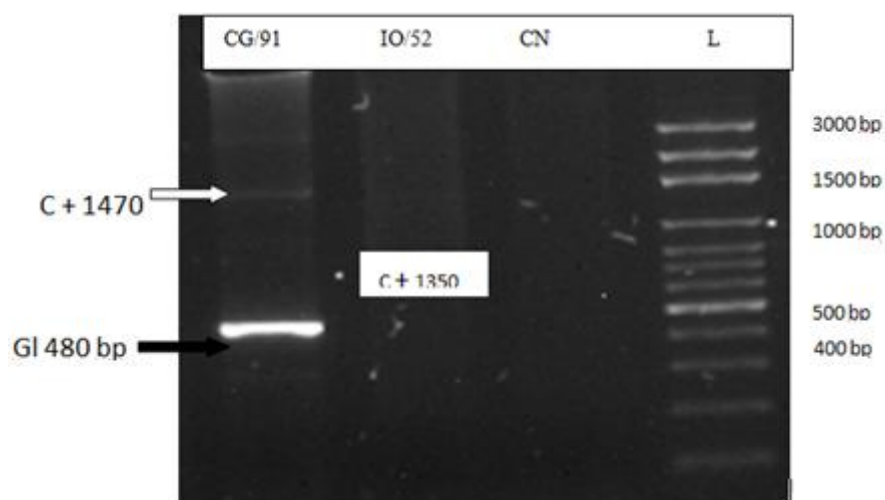


Figura 7.- PCR triplex para *Carcharhinus galapagensis*. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación con los primers universales ITS2 (1470 pb), con el primer forward de especificidad cercana para *Carcharhinus galapagensis* y el primer reverse universal (480 pb). Carril 1: muestra de tiburón (aleta húmeda), CG: *Carcharhinus galapagensis*; 2: control positivo (IO/52), IO: *Isurus oxyrinchus*; 3: control negativo (CN - agua) y 4: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder.

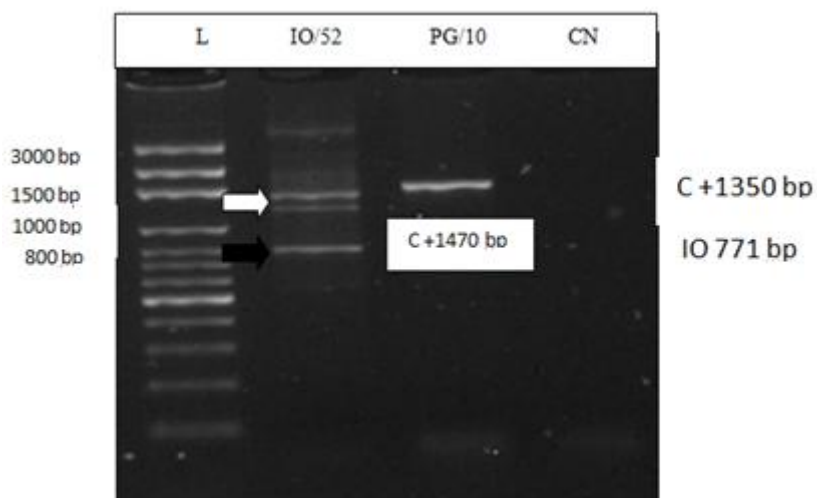


Figura 8.- PCR triplex para *Isurus oxyrinchus*. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación con los primers universales ITS2 (1350 pb), el primer forward especie específico para *Isurus oxyrinchus* y el primer reverse universal (771 pb). Carril 1: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder; 2: muestra de tiburón (aleta húmeda), IO: *Isurus oxyrinchus*; 3: control positivo (PG/10), PG: *Prionace glauca* y 4: control negativo (CN - agua).

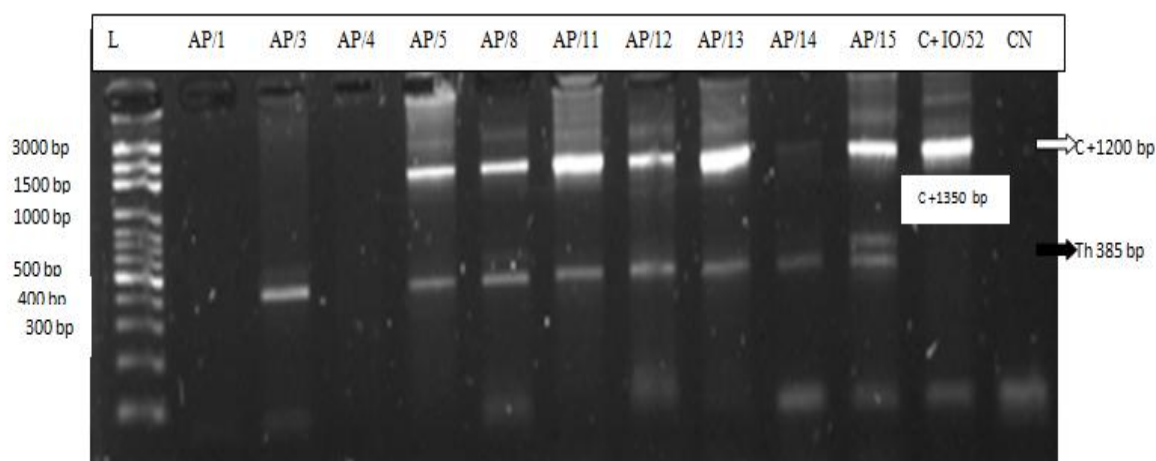


Figura 9.- PCR triplex para *Alopias pelagicus*. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación con los primers universales ITS2 (1200 pb) en diferentes intensidades, y el primer forward de especificidad cercana para *Alopias pelagicus* y el primer reverse universal (385 pb). Carril 1: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder; 2-11: muestras de tiburón (aleta húmeda), AP: *Alopias pelagicus*; 12: control positivo (IO/52), IO: *Isurus oxyrinchus* y 13: control negativo (CN - agua).

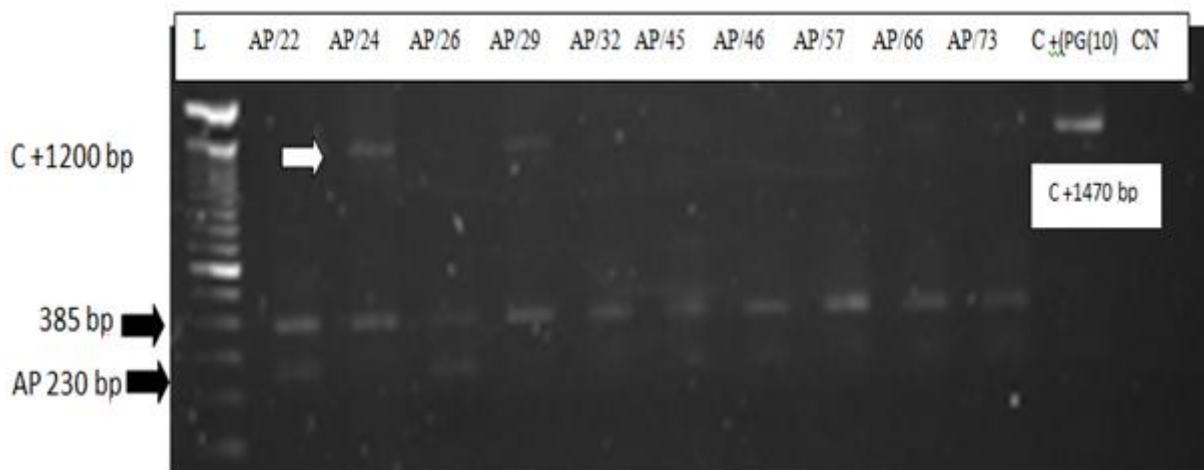


Figura 10.- PCR cuádruplex para *Alopias pelagicus*. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación utilizando los primers universales de tiburón (1200 bp) y los primers especie-específico para *Alopias pelagicus* (230 bp) y el primer de especificidad cercana common thresher 1048F (385 bp). Carril 1: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder; 2-11: muestras de tiburón (aleta húmeda), AP: *Alopias pelagicus*; 12: control positivo (PG/10), PG: *Prionace glauca* y 13: control negativo (CN - agua).

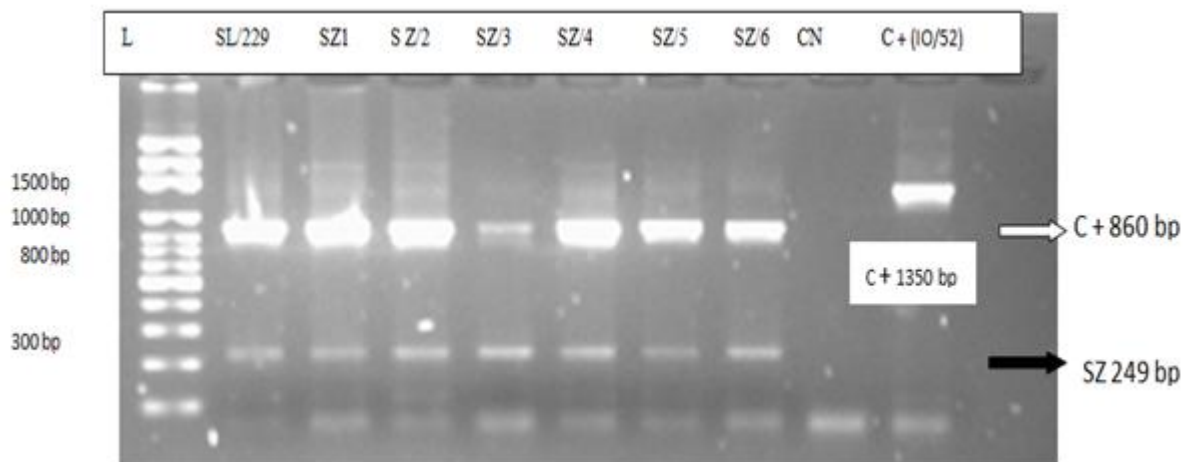


Figura 11.- PCR pentaplex (Familia Sphyrnidae). Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación utilizando los primers universales de tiburón y los primers especie-específicos para *S. lewini*, *S. mokarran*, y *S. zygaena*. Carril 1: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder; 2-8: muestras de tiburón (banda control positivo de tiburón 860 pb y la banda especie-específico para *S. zygaena* 249 pb), SL: *Sphyrna lewini*. SZ: *Sphyrna zygaena*; 9: control negativo (CN - agua) y 10: control positivo (IO/52), IO: *Isurus oxyrinchus*.

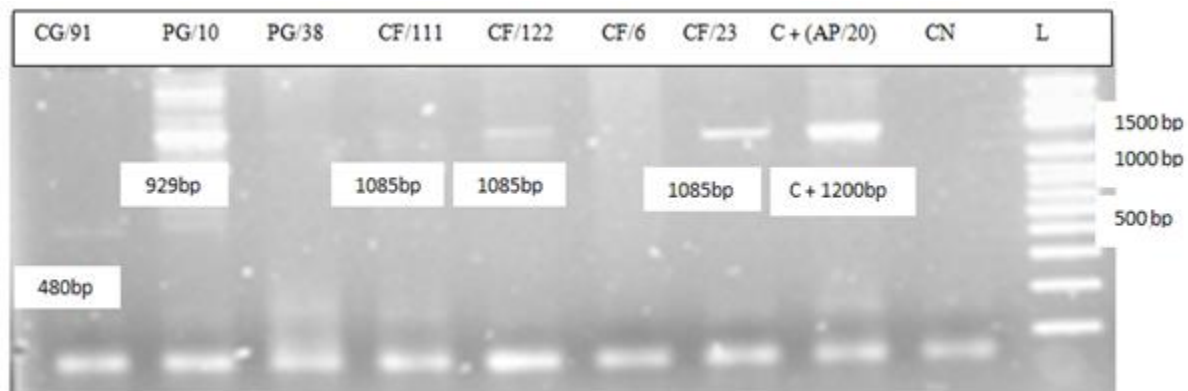


Figura 12.- PCR pentaplex (familia Carcharinidae). Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación utilizando los primers universales de tiburón y los primers especie-específicos para *P. glauca*, *C. falciformis* y el primer de especificidad cercana *C. galapagensis*. Carril 1: muestra de tiburón (banda de especificidad cercana para *C. galapagensis* 480 pb), CG: *Carcharhinus galapagensis*; 2-3: muestras de tiburón (banda control positivo de tiburón 1470 pb y banda de 929 pb para el primer especie-específico para *P. glauca*), PG: *Prionace Glauca*; 4-7: muestras de tiburón (amplificación de 1085 pb correspondientes al primer especie-específico para *C. falciformis*), CF: *Carcharhinus falciformis*; 8: control positivo (AP/20), AP: *Alopias pelagicus*; 9: control negativo (CN - agua) y 10: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder.

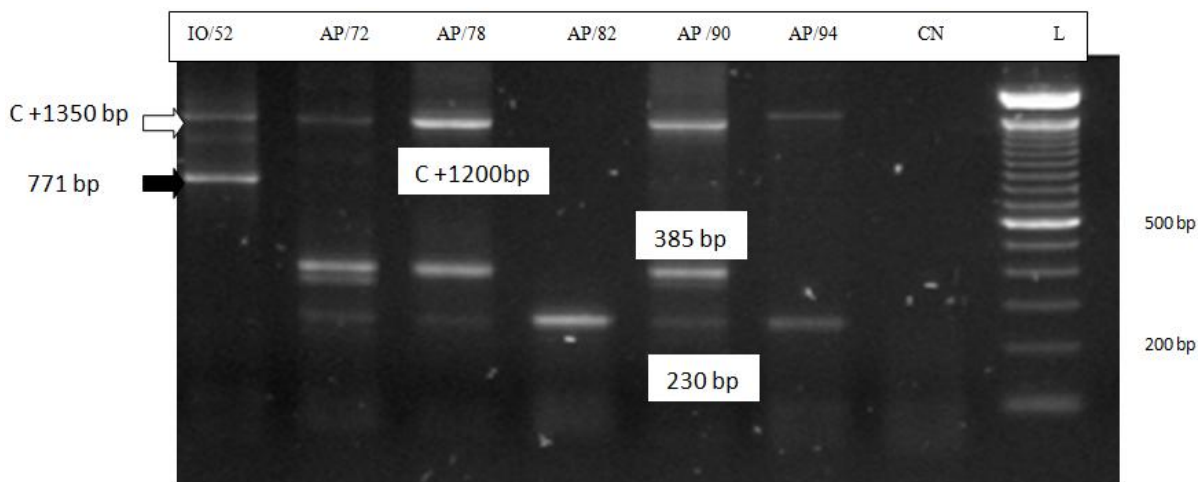


Figura 13.- PCR heptaplex (orden Lámniformes). Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los productos de amplificación utilizando los primers universales de tiburón y los primers especie-específicos para *I. oxyrinchus*, *A. vulpinus*, *A. superciliosus*, *A. pelagicus* y el primer de especificidad cercana Common thresher 1048F. Carril 1: muestra de tiburón (banda de 1450 bp correspondiente a los primers universales ITS2 y banda especie-específico para *Isurus oxyrinchus* 771 pb), IO: *Isurus oxyrinchus*; 2-6: muestras de tiburón (banda 1200 pb del control positivo de los primers universales ITS2, banda de 385 pb para el primer de especificidad cercana para *A. pelagicus* y banda de 230 pb para el primer especie-específico para *A. pelagicus*), AP: *Alopias pelagicus*; 7: control negativo (CN - agua) y 8: ladder 100pb (Axygen), L: Ladder.

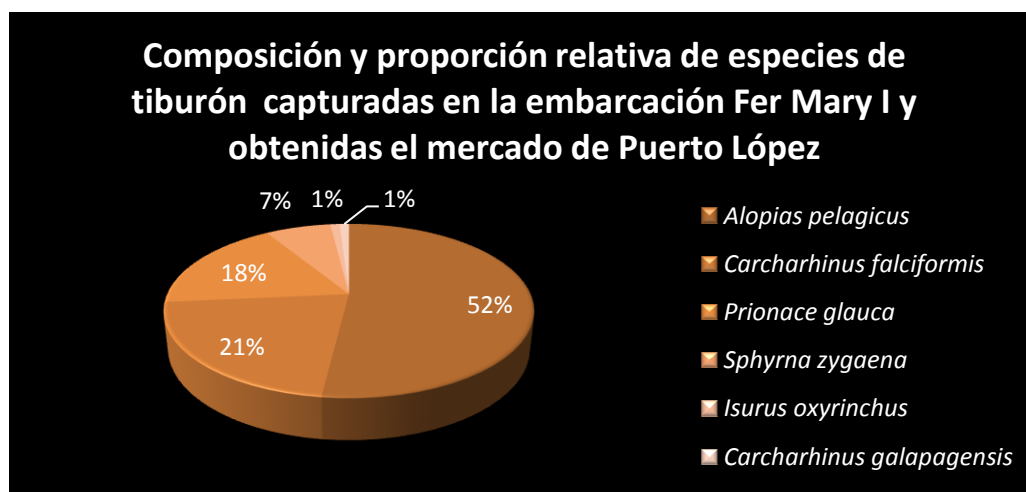


Figura 14.- Composición y proporción relativa de especies de tiburón capturadas en la embarcación Fer Mary I y obtenidas en el mercado de Puerto López. En esta figura se muestran los porcentajes de las diferentes especies identificadas molecularmente en este estudio.

15. Anexos

Anexo 1.- Decreto Ejecutivo 486

DECRETO EJECUTIVO 486
RAFAEL CORREA DELGADO
PRESIDENTE CONSTITUCIONAL DE LA REPÚBLICA

CONSIDERANDO:

Que de conformidad con el artículo 248 de la Constitución Política de la República, el Estado ecuatoriano tiene el derecho soberano sobre la diversidad biológica, y su conservación y utilización sostenible se hará con participación de las poblaciones involucradas cuando fuere del caso y de la iniciativa privada, según los programas, planes y políticas que los consideren como factores de desarrollo y calidad de vida; y de conformidad con los convenios y tratados internacionales;

Que de conformidad al numeral 1 del artículo 86 de la Carta Magna, se declaran de interés público y se regularán conforme a la ley: la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país;

Que el Ecuador, como parte contratante de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres – CITES -, adoptó la Resolución Conf.12.6 "Conservación y Gestión de los Tiburones";

Que el tiburón ballena (*Rhincodon typus*), el tiburón peregrino (*Cetorhinus maximus*) y el Tiburón blanco (*Carcharodon carcharias*) están inscritos en el apéndice 11 de la CITES;

Que el Instituto Nacional de Pesca -INP- ha elaborado el Plan de Acción Nacional para la Conservación y Manejo de los Tiburones en el Ecuador;

Que la Convención sobre la conservación de las especies migratorias de animales silvestres, en su resolución 6.2 sobre la captura incidental pide a todas las partes que refuercen las medidas adoptadas para proteger las especies migratorias contra la captura incidental mediante pesquerías;

Que el tiburón ballena (*Rhincodon typus*) y el tiburón peregrino (*Cetorhinus maximus*) están inscritos en el apéndice 11 de la Convención sobre la conservación de las especies migratorias de animales silvestres -CMS- y el tiburón blanco (*Carcharodon carcharias*) está inscrito en los apéndices I y II de la CMS;

Que la pesca incidental del tiburón, es una realidad existente en el ejercicio de la actividad pesquera en la costa continental ecuatoriana;

Que es necesario establecer medidas de manejo pesquero, que aseguren la sustentabilidad de las poblaciones de tiburones y que contribuyan a mejorar la calidad de vida de los pescadores y la

seguridad alimentaria de los pueblos, particularmente de aquellos que tienen como actividad fundamental la pesca artesanal;

Que el Reglamento Especial de la Actividad Pesquera Artesanal en la Reserva Marina de Galápagos prohíbe expresamente cualquier actividad pesquera o extractiva de tiburones y define el procedimiento a seguir con la pesca incidental;

Que la Autoridad Interinstitucional de Manejo de la Reserva Marina de Galápagos, mediante Resolución No. 011-2000 del 15 de noviembre del 2000, prohibió la captura, desembarco y comercialización de tiburón en el Archipiélago de Galápagos;

Que el Consejo Nacional de Desarrollo Pesquero en sesión extraordinaria de fecha 29 de octubre de 2004, acogió el pedido de la Federación Nacional de Cooperativas de Pescadores Artesanales del Ecuador (FENACOPEC), de reconsiderar la resolución de prohibición de exportar aletas de tiburón, tomada en sesión de este cuerpo colegiado, de fecha 10 de junio de 2004, resolviendo a favor de esta solicitud, y en su defecto implementar las recomendaciones dadas en el informe "ANÁLISIS DE LA PESCA DEL TIBURÓN EN LA COSTA CONTINENTAL ECUATORIANA", anexo al oficio INP/DG 04 0772 del 20 de octubre del 2004, dado por el Instituto Nacional de Pesca;

En ejercicio de las atribuciones que le confiere el numeral 5 del artículo 171 de la Constitución Política de la República del Ecuador,

DECRETA:

EXPEDIR LAS NORMAS PARA LA REGULACIÓN DE LA PESCA INCIDENTAL DEL RECURSO TIBURÓN, SU COMERCIALIZACIÓN Y EXPORTACIÓN EN EL ECUADOR CONTINENTAL.

Art.1.- Para los fines pertinentes, se define como pesca incidental a la captura involuntaria de especies bio acuáticas con artes o sistemas de pesca dirigidos a la captura voluntaria y planificada de otras especies bio acuáticas.

Art. 2.- Prohíbese en todo el territorio nacional la pesca cuyo objetivo específico sea el tiburón. Consecuentemente queda prohibido el uso de artes y sistemas de pesca que se empleen específicamente para capturar tiburones.

Art. 3.- Prohíbese en todo el territorio nacional el uso del arte de pesca denominado "palangre tiburonero", en el que se utilizan anzuelos #1/0 y/o 3/0 torcido de ojal normal y reinal de acero maleable, alambre o cadena.

Art. 4.- Prohíbese en todo el territorio nacional el uso de cable acerado o metálico – denominado comúnmente "huaya"- en la parte terminal de los reinales o líneas secundarias antes de la unión con el anzuelo, tanto en el palangre, espinel y/o longline que sirve para la captura del dorado (*Coryphaena hippurus*), del atún ojo grande (*Thunnus obesus*), del atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), de los picudos de la familia *Istiophoridae*, del pez espada (*Xiphias gladius*) y especies afines. Dicho cable o alambre metálico deberá ser reemplazado por material de poliamida monofilamento.

Los artes de pesca o los componentes a los que se refieren los artículos 3 y 4 del presente decreto que se encontraren a bordo de embarcaciones pesqueras así como los tiburones que se encontraren a bordo

de dichas embarcaciones, serán decomisados y se iniciarán las acciones legales pertinentes en contra del capitán y armador de la embarcación para que se establezcan las sanciones de rigor.

Art. 5.- Prohíbese la práctica del "aletea", definida como la captura del tiburón para la extracción exclusiva de sus aletas y el descarte del cuerpo al mar. Los cuerpos de los tiburones deberán ser utilizados íntegramente, para lo cual deberán contar con los respectivos permisos de comercialización emitidos por la autoridad competente.

Art. 6.- Quienes durante el ejercicio de la actividad pesquera, capturen tiburones, como producto único y exclusivo de la pesca incidental, podrán comercializar y utilizar íntegramente su carne.

Art. 7.- Se permitirá únicamente el desembarco de tiburones enteros procedentes de la pesca incidental efectuada por embarcaciones registradas en la Subsecretaría de Recursos Pesqueros y en las Capitanías de Puerto, ubicadas a lo largo de la costa continental, con la finalidad de proceder a su comercialización. La remoción de las aletas podrá efectuarse únicamente en tierra, en los puertos de desembarque ubicados a lo largo de la costa continental.

Si a bordo de las embarcaciones pesqueras se encontraren aletas de tiburón sin sus respectivos cuerpos, o separadas de los cuerpos de los tiburones, dichas aletas serán decomisadas y se iniciarán las acciones legales correspondientes en contra del capitán y armador de la embarcación. En caso de reincidencia, la autoridad pesquera suspenderá definitivamente el permiso de pesca de la embarcación y ésta no podrá ser destinada a actividades de la pesca o conexas.

Art. 8.- Las aletas de tiburón que sean decomisadas, no serán sujeto de donación, venta, subasta, ni podrán ser exportadas. Estas aletas serán custodiadas por la autoridad competente de la jurisdicción donde éstas hayan sido decomisadas, la que actuará, según el siguiente orden:

- a) Policía Ambiental;
- b) Subsecretaría de Recursos Pesqueros; y,
- c) Capitanías de Puerto.

Posteriormente, y luego de cumplir con los procedimientos de ley, se procederá a la incineración de las aletas decomisadas, lo cual lo hará la Subsecretaría de Recursos Pesqueros del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, con notificación previa a la Subsecretaría de Gestión Ambiental Costera del Ministerio del Ambiente.

Art. 9.- En el caso de que se efectúen capturas incidentales de ejemplares vivos o muertos de las siguientes especies: tiburón ballena (*Rhincodon typus*), del tiburón peregrino (*Cetorhinus maximus*), del tiburón blanco (*Carcharodon carcharias*), tiburón sardinero (*Lamna nasus*), Cazón Espinoso o Mielga (*Squalus Acanthias*), éstos deberán ser regresados inmediatamente al mar.

Art. 10.- Prohíbese la importación e internación de cualquier forma y trasbordo marítimo de tiburones enteros o aletas de tiburón en cualquier estado de conservación o procesamiento, aun cuando hayan sido capturados en aguas internacionales.

Art. 11.- Se permitirá el almacenamiento, comercialización, transporte y de aletas de tiburón provenientes de la pesca incidental realizada por embarcaciones registradas en la Subsecretaría de Recursos Pesqueros, y en las Capitanías de Puerto, y que sean desembarcadas en los puertos pesqueros de la costa continental.

La comercialización de las aletas de tiburón se hará conforme el siguiente procedimiento:

1.- Al arribo de las embarcaciones a los puertos pesqueros de la costa continental, cualquier miembro de la tripulación deberá reportar a la autoridad pesquera el producto de la captura incidental. La autoridad pesquera verificará esa información con la finalidad de otorgar al interesado el correspondiente "Certificado de Monitoreo de Pesca Incidental". Este documento contendrá:

- a) detalle de las especies;
- b) número y peso de cuerpos y aletas; y,
- c) cualquier otra información relevante a dicha captura.

2.- El comerciante, persona natural o jurídica legalmente registrado en la Subsecretaría de Recursos Pesqueros, que adquiriera el producto de la pesca incidental, deberá exigir el correspondiente certificado de monitoreo de dicha pesca.

3.- En el caso del transportista, este deberá obtener ante la autoridad pesquera la pertinente "Guía de Movilización de Pesca Incidental", que pretenda movilizar, documento que será otorgado de conformidad a los certificados de monitoreo de dicha pesca.

4.- En el caso del exportador, persona natural o jurídica, deberá obtener ante la autoridad pesquera pertinente, la autorización para la exportación, la misma que deberá estar avalizada por los certificados de monitoreo, y guías de movilización correspondientes.

5.- En todo caso, cualquier persona natural o jurídica, que tuviese en su poder aletas de tiburón, deberá justificarlas con cualquiera de los documentos referidos en los numerales que anteceden.

Si durante las acciones de control, se llegase a evidenciar que el producto de la pesca incidental de tiburón no se encuentra debidamente justificado, con los certificados, permisos, o autorizaciones mencionadas o descritas en este Decreto, se procederá de inmediato al decomiso e incineración de todo el producto de la pesca incidental, de conformidad al procedimiento establecido en el artículo 8.

La autoridad pesquera utilizara como criterios para el control, el peso o las unidades del producto de la pesca incidental.

En el caso de reincidencia, la autoridad pesquera suspenderá definitivamente el permiso de comercialización o autorización de exportación a la persona natural o jurídica, que incumpla con lo dispuesto en este Decreto, previo el procedimiento de ley.

Art. 12.- La Subsecretaría de Recursos Pesqueros, en el plazo de 30 días establecerá las condiciones necesarias para aplicar lo dispuesto en el Art. 11 de este Decreto.

Art. 13.- El Consejo Nacional de Desarrollo Pesquero -CNDP- analizará la respectiva información sobre la captura incidental de tiburón para asegurar la conservación y uso sustentable de dicho recurso.

Art. 14.- El Parque Nacional Galápagos, con el apoyo de la Policía Ambiental y la Armada del Ecuador, aplicará medidas estrictas de control y vigilancia para hacer cumplir la Resolución No. 011-

2000 de la Autoridad Interinstitucional de Manejo de la Reserva Marina de Galápagos (AIM) que prohíbe la captura, desembarco y comercialización de tiburones y las disposiciones pertinentes del Reglamento Especial de la Actividad Pesquera Artesanal en la Reserva Marina de Galápagos, e informará trimestralmente a la AIM a este respecto.

Art. 15.- Derógase el Decreto Ejecutivo 2130 publicado en el Registro Oficial 437 del 7 de octubre del 2004; el Decreto Ejecutivo 2662 del 12 de marzo del 2005; y, el Acuerdo Ministerial No. 097 publicado en el Registro Oficial 263 del 27 de agosto de 1993; y cualquier Decreto o Acuerdo que se contraponga al presente Decreto Ejecutivo.

Art. 16.- De la ejecución del presente Decreto Ejecutivo, que entrará en vigencia desde su publicación en el Registro Oficial, encárguese al Ministro de ganadería, Acuicultura y Pesca.

Art. 17.- Los artículos 6, 7, 8,9 y 11 tendrán un plazo de vigencia de seis meses a partir de la vigencia del presente Decreto Ejecutivo.

Dado en el Palacio Nacional, en Quito, a los 20 de julio de 2007

Rafael Correa Delgado
PRESIDENTE CONSTITUCIONAL DE LA REPÚBLICA

Carlos Vallejo López
MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA, ACUACULTURA
Y PESCA

Lunes, 23 de julio de 2007

Anexo 2.- Decreto Ejecutivo 001

**REPUBLICA DEL ECUADOR
MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA Y PESCA
EL SUBSECRETARIO DE RECURSOS PESQUEROS**

N° 001

CONSIDERANDO

Que mediante Decreto N° 486 de fecha 20 de julio del 2007 publicado en el Suplemento del Registro Oficial N° 137 del 30 de julio del 2007, se expiden las normas para la regularización de la pesca incidental del recurso tiburón, su comercialización y exportación en el Ecuador continental.

Que la Subsecretaría de Recursos Pesqueros emite los certificados de monitoreo, guía de movilización de pesca incidental, autorización para exportación de aletas en estado fresco y seco así como el cuerpo del tiburón, para lo cual tiene que realizar actividades de control, movilización de recursos humanos, materiales y económicos.

Que mediante Acuerdo Ministerial 155 expedido el 27 de agosto del 2007 se establecieron los costos por concepto de autorizaciones para la pesca incidental del tiburón.

Que se ha determinado que los costos para algunas especies resultan demasiados onerosos, lo que contribuye a la evasión del mismo.

Que es necesario incluir nuevos derechos de actuación por concepto de ingresos de autogestión generados por la Subsecretaría de Recursos Pesqueros por la prestación de sus servicios.

Que el artículo innumerado que se agrega después del Art. 17 de la Ley de Modernización del Estado faculta a las instituciones del Estado a establecer el pago de servicios de control, inspecciones, autorizaciones, permisos, licencias u otros de similar naturaleza, a fin de recuperar los costos en los que incurriere para este propósito.

En el ejercicio de las facultades establecidas en el literal e) del numeral 1 del Art. 77 de la Ley Orgánica de la Contraloría y literal a) del Art. 1 del Acuerdo N° 074 de fecha 3 de abril del 2007 publicado en el Registro Oficial N° 84 del 15 de mayo del 2007.

ACUERDA:

Art. 2 Establecer el pago por concepto de autorizaciones para la pesca incidental del recurso tiburón, los derechos de actuación por comercialización y exportación en el Ecuador continental que presta la Subsecretaría de Recursos Pesqueros de la siguiente forma:

CONCEPTO	DÓLARES
1.-Certificado de monitoreo de desembarque tiburón embarcaciones menos, botes/barcos nodrizas.	1,00
1.1 Por cada cuerpo de tiburón con aletas pegadas naturalmente al cuerpo.	
2.- Guías de movilización de tiburones (por lote)	20,00
2.1 Cuerpo de tiburones (por lote)	20,00
2.2 Aletas de tiburón (por lote)	
3.- Para exportar tiburón	100,00
3.1 Aletas húmedas y/o secas por kilo	1,00

Art. 3.- Toda guía de movilización tiene una validez de (cuarenta y ocho) 48 horas.

Art. 4.-Serán requisitos para la autorización de exportación de aletas de tiburón:

4.1.- Presentar todos los certificados originales de monitoreo debidamente cancelados y tanto del desembarque de tiburones como del pesaje de aletas realizado por un inspector de pesca; y guías de movilización que estén en concordancia con la trazabilidad del producto a exportarse.

Art. 5.- Todo comerciante y transportista de cuerpos y aletas de tiburón deberá contar obligatoriamente con su respectivo carné de comerciante mayorista/transportista otorgado por la Dirección General de Pesca.

Art. 6.- El presente Acuerdo entrará en vigencia a partir de la presente fecha sin perjuicio de su publicación en el Registro Oficial.

Comuníquese y publíquese.

Dado en Manta 07 enero del 2008.

Ing. Guillermo Morán Velásquez

SUBSECRETARIO DE RECURSOS PESQUEROS

Anexo 3.- Cuantificación de ADN extraído de las 102 muestras de aletas de tiburón analizadas molecularmente

Especie de tiburón identificada morfológicamente	Código de muestra analizada	Concentración de ADN (ng/μl)	A260A/280	A260/A230
<i>Prionace glauca</i>	RPG/2	15,3	1,75	3,47
<i>Prionace glauca</i>	RPG/9	25,20	2,04	5,80
<i>Prionace glauca</i>	PG/10	36,42	1,89	1,94
<i>Prionace glauca</i>	RPG/36	14,81	1,99	3,62
<i>Prionace glauca</i>	PG/38	103,13	1,88	2,22
<i>Prionace glauca</i>	PG/43	193,70	1,91	2,16
<i>Prionace glauca</i>	PG/75	85,37	1,88	2,37
<i>Prionace glauca</i>	PG/89	79,83	1,89	1,96
<i>Prionace glauca</i>	PG/106	62,78	1,84	1,68
<i>Prionace glauca</i>	PG/120	137,42	1,91	2,24
<i>Prionace glauca</i>	PG/131	54,43	1,89	2,22
<i>Prionace glauca</i>	PG/148	44,18	1,87	2,30
<i>Prionace glauca</i>	PG/167	104,26	1,85	1,95
<i>Prionace glauca</i>	PG/172	83,87	1,93	2,29
<i>Prionace glauca</i>	RPG/202	43,80	2,02	2,70
<i>Prionace glauca</i>	PG/209	83,33	1,86	2,07
<i>Prionace glauca</i>	GRPG/220	45,60	1,97	2,15
<i>Prionace glauca</i>	PG/251	139,81	1,91	1,87
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/41	54,79	1,75	1,73
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/64	58,48	1,76	2,32
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/74	54,57	1,95	2,03
<i>Carcharhinus falciformis</i>	RCF/83	25,25	1,96	2,17
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/102	88,10	1,96	1,93
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/111	23,4	1,86	2,29
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/116	64,56	1,80	2,01
<i>Carcharhinus falciformis</i>	RCF/119	38,90	1,97	9,86
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/122	70,41	1,84	1,88
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/126	42,59	1,89	2,10
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/129	51,89	1,85	2,08
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/142	128,11	1,87	2,22
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/149	54,73	1,81	1,72
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/152	101,59	1,78	1,93
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/153	67,65	1,78	1,56
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/154	17,42	1,75	1,79
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/156	30,60	1,80	2,12
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/217	16,29	1,80	0,88
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/226	30,79	1,80	2,35
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/243	48,50	1,83	2,13
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/254	41,86	1,87	1,64
<i>Carcharhinus falciformis</i>	CF/259	75,72	1,90	2,01
<i>Carcharhinus galapagensis</i>	CG/91*	52,03	1,92	2,01
<i>Sphyrna lewini</i>	SL/229	65,41	1,93	1,87
<i>Sphyrna zygaena</i>	SZ/1	112,10	1,86	2,12
<i>Sphyrna zygaena</i>	SZ/2	68,18	1,92	1,20
<i>Sphyrna zygaena</i>	SZ/3	37,77	2,10	2,03
<i>Sphyrna zygaena</i>	SZ/4	79,44	1,97	1,91
<i>Sphyrna zygaena</i>	SZ/5	46,89	1,99	1,79
<i>Sphyrna zygaena</i>	SZ/6	51,52	2,06	2,07
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/3	89,80	1,90	1,97
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/5	78,17	1,94	2,32

<i>Alopias pelagicus</i>	AP/8	52,44	2,10	1,81
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/11	55,96	1,91	2,13
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/12	18,36	1,58	1,59
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/13	77,95	1,94	1,75
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/14	57,31	2,02	31,80
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/15	78,00	2,02	5,98
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/16	65,65	1,86	10,03
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/17	50,98	1,85	-64,61
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/18	94,48	1,97	5,74
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/19	119,94	1,92	4,78
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/20	113,18	1,92	5,11
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/22	41,84	2,11	1,62
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/24	74,04	1,94	1,88
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/25	50,51	1,95	1,89
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/26	56,83	2,05	1,78
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/27	42,03	1,88	1,31
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/28	54,48	1,96	1,97
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/29	31,35	1,89	1,63
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/30	108,09	1,86	1,94
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/31	18,09	2,02	0,78
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/32	306,97	1,88	2,29
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/33	38,57	1,95	1,71
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/34	154,26	1,87	2,20
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/35	54,58	1,98	2,72
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/37	110,56	1,93	1,95
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/39	155,41	1,98	2,39
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/40	133,85	1,90	2,05
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/42	118,92	1,97	2,45
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/44	57,88	1,91	2,13
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/45	41,13	1,92	2,17
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/46	22,56	2,09	2,64
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/47	36,67	1,95	1,86
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/48	144,99	2,02	2,39
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/50	46,98	1,95	2,38
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/57	14,57	2,75	0,71
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/63	14,53	2,59	0,66
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/72	57,78	2,10	2,93
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/78	62,40	2,02	2,98
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/82	71,05	2,11	1,10
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/90	116,99	1,96	2,41
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/94	19,86	2,19	1,33
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/95	42,58	2,23	2,05
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/66	14,9	1,79	2,11
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/73	15,1	1,99	1,35
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/96	15,7	1,75	1,86
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/222	19,7	1,78	1,25
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/108	15,2	1,87	1,45
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/114	15,2	2,3	2,45
<i>Alopias pelagicus</i>	AP/117	14,7	2,33	1,74
<i>Isurus oxyrinchus</i>	IO/52	86,80	1,87	2,08