

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

¿Comemos tiburón?: Identificación molecular de carne de tiburón de venta en mercados y pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito

María José Mateo Calderón

Venancio Arahana, Ph.D., Director de Tesis

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

Quito, mayo de 2014

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

¿Comemos tiburón?: Identificación molecular de carne de tiburón de venta en mercados y pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito

María José Mateo Calderón

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

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

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

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

Quito, mayo de 2014

© 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: María José Mateo Calderón

C. I.: 0919118810

Fecha: Quito, mayo de 2014

DEDICATORIA

“La madurez comienza a manifestarse cuando sentimos que nuestra preocupación es mayor por los demás que por nosotros mismos”. (Alberto Einstein)

Para mis padres, hermanas, mi tía, y Henry; a quienes amo y agradezco por llevarme por el camino del bien y ayudarme a alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A María de Lourdes Torres, Venancio Arahana y Judith Denkinger por la decidida colaboración del presente proyecto; a Jenny Fiallos, Estefanía Rojas, Viviana Jaramillo, Bernardo Gutiérrez y Mercedes Cobo por haberme guiado técnicamente en varios momentos a lo largo de este estudio; al Chancellor's Grant por haberme dado la oportunidad de realizar el proyecto, y a mi familia y amigos que han sido mi fuerza a lo largo del camino.

Resumen

La pesca de tiburón ha sido parte de la historia de la humanidad desde tiempos ancestrales. Gran cantidad de productos se han obtenido a partir de este recurso y por esto su pesca ha aumentado significativamente desde los años 80. Esto ha provocado que las poblaciones de diferentes especies de tiburón disminuyan y varios ecosistemas marinos en el Ecuador y en el mundo se han visto afectados.

El objetivo de este estudio fue identificar mediante métodos moleculares, el porcentaje de carne de tiburón que se vende en 11 mercados y 3 pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito. Para esto, se extrajo ADN de 154 muestras de tejido muscular obtenidas en los mercados vendidas bajo nombres como: corvina, picudo, atún, cherna, tollo y tinto. La identificación molecular fue llevada a cabo mediante reacciones de PCR con múltiples primers especie-específicos basados en regiones ITS2 del ADN ribosomal. Se realizó la identificación de carne de tiburón y su especie por PCR simple. Posteriormente se realizó PCR múltiple para producir amplicones de diagnóstico y diferenciar de forma simultánea entre las diferentes especies de tiburón encontradas en la muestra analizada.

Los resultados de la identificación molecular mostraron que el 26,67% de las muestras de pescado colectadas pertenecieron a distintas especies de tiburón. Las especies identificadas fueron *Prionace glauca* (60%), *Carcharhinus falciformis* (7,5%), y *Alopias pelagicus* (32,5%). Con esto se confirma que la venta de carne de tiburón bajo otro nombre se está llevando a cabo en el Distrito Metropolitano de Quito.

El protocolo de identificación molecular de especies de tiburón, es una herramienta confiable y útil para identificación de especies de tiburón cuando no es posible la identificación morfológica. La metodología utilizada en el presente estudio ayudará a generar bases confiables sobre el uso de tiburones en Ecuador y a su vez será útil para sustentar políticas sobre el manejo de la pesquería y la conservación de tiburones en el país. Así también, ayudará a sincerar la venta de carne de tiburón en los mercados del Ecuador y posiblemente a regularizarla.

Abstract

Shark fishing has been part of the mankind history since ancient times. Lots of products have been obtained from this resource and their catch has increased significantly since the 80 's. This has caused a decline in the population of different shark species, and several marine ecosystems have been affected in Ecuador and the world.

The aim of this study was to identify shark meat by molecular methods, sold in 11 markets and 3 fisheries in the Metropolitan District of Quito. DNA was extracted from 154 fish samples bought in markets labeled as: white sea bass, “picudo”, tuna, wreckfish, dogfish and “tinto”. Molecular identification was performed through PCR reactions using species specific primers targeting the ITS2 region of ribosomal DNA. Identification was initially made by simple PCR and then multiple PCR was performed to produce diagnostic amplicons; this last technique allows for a simultaneous differentiation between shark species found in the analyzed sample.

The molecular identification results showed that 26.67% of the fish samples belonged to 3 different species of shark. The species identified were *Prionace glauca* (60%), *Carcharhinus falciformis* (32.5%), and *Alopias pelagicus* (7.5%). With this information, it can be confirmed that shark meat is being sold under another names in the Metropolitan District of Quito.

The protocol for molecular identification of shark species is a reliable and useful tool to characterize shark species when morphological identification is not possible. The methodology used in this study will help to generate reliable information about the use of sharks in Ecuador. This will in turn support policies on fisheries management and conservation of sharks in the country. Also, it will help to confirm the sale of shark meat in Ecuador’s markets and support regularization.

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción.....	13
1.1	Características generales de los tiburones	13
1.2	Historia de la pesca del tiburón.....	14
1.3	Pesca de tiburones en el mundo	15
1.3.1	Pesca de tiburones en el Ecuador	17
1.4	Utilización y comercio del tiburón	18
1.5	Formas de identificación de tiburones.....	18
1.5.1	Identificación morfológica.....	19
1.5.2	Identificación molecular	19
2	Objetivos	21
2.1	Objetivo General	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	Área de estudio	21
4	Justificación	22
5	Materiales.....	23
5.1	Colección de muestras de tejido en mercados y pescaderías.....	23
5.2	Extracción de ADN de muestras de pescado tomadas de los mercados y pescaderías	23
5.3	Cuantificación de ADN de muestras de pescado extraído de tejido muscular.....	24
5.4	Amplificación de regiones ITS2	24
5.5	Electroforesis en gel de Agarosa	24
6	Métodos	25
6.1	Colección de muestras de tejido muscular de pescado en mercados y pescaderías.	25
6.2	Extracción de ADN de muestras de pescado tomadas de los mercados y pescaderías.	25
6.3	Identificación de tiburón en las muestras mediante PCR	26
6.3.1	PCR simple	26
6.3.2	PCR Triple	27
6.3.3	PCR Cuádruple	28
6.3.4	PCR Quintuple	28
6.4	Electroforesis en gel de Agarosa	28
6.5	Visualización e identificación de bandas pertenecientes a las especies de tiburón.	29
7	Resultados	29
7.1	Colección de muestras de tejido en mercados y pescaderías.....	29
7.2	Extracción, cuantificación y calidad de ADN extraído de tejido de pescado..	30
7.3	Amplificación de regiones ITS	30
7.3.1	Identificación de tiburones con primers universales.....	30
7.3.2	Identificación de especies de tiburón con primers especie específicos	31
7.3.3	PCR Triple (<i>Alopias pelagicus</i>)	31
7.3.4	PCR Cuádruple (<i>Prionace glauca</i> , <i>Carcharhinus falciformis</i>).....	32
7.3.5	PCR Quintuple (<i>Prionace glauca</i> , <i>Carcharhinus falciformis</i> , <i>Alopias pelagicus</i>).....	32

8	Discusión	33
8.1	Extracción, cuantificación y determinación de la calidad de ADN de las muestras.....	33
8.2	Identificación de especies de tiburón	34
8.3	PCR Simple para identificación de tiburones y especies de tiburón	35
8.4	PCR múltiple para identificación de especies de tiburón	36
8.4.1	PCR triple.....	37
8.4.2	PCR cuádruple	38
8.4.3	PCR quintuple	38
8.5	Aplicaciones de monitoreo, gestión y conservación de tiburones	41
8.6	Composición y proporción relativa de las especies de tiburones capturadas en Ecuador.....	42
8.6.1	Características nutricionales de la carne de tiburón.....	42
9	Conclusiones	44
10	Recomendaciones	45
11	Bibliografía	46
12	Tablas	49
13	Figuras	51
14	Anexos	58

Índice de Tablas

Tabla 1 Secuencias de primers para especies de tiburón	49
Tabla 2 Lista de los mercados de Quito de donde se obtuvieron las muestras de carne de pescado para la investigación organizadas por grupos. Los grupos se realizaron en base a su ubicación en el Distrito Metropolitano de Quito (Norte, Centro, Sur)	50
Tabla 3 Fechas de colección de muestras de carne de pescado de los distintos grupos de mercados de Quito.	50

Índice de Figuras

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 genómico extraído a partir de tejido muscular de pescado.	51
Figura 3 PCR simple con los primers universales ITS2.....	52
Figura 4 PCR simple para <i>Prionace glauca</i>	52
Figura 5 PCR simple para <i>Carcharhinus falciformis</i>	53
Figura 6 PCR simple para <i>Alopias pelagicus</i>	53
Figura 7 PCR triple para <i>Alopias pelagicus</i>	54
Figura 8 PCR cuádruple para <i>Carcharhinus falciformis</i> y <i>Prionace glauca</i>	54
Figura 9 PCR quintuple para las especies <i>Alopias pelagicus</i> (primer Common Thresher 1048F), <i>Carcharhinus falciformis</i> y <i>Prionace glauca</i>	55
Figura 10 PCR quintuple para las especies <i>Alopias pelagicus</i> (primer Pelagic Thresher 1113F), <i>Carcharhinus falciformis</i> y <i>Prionace glauca</i>	55
Figura 11 PCR quintuple para las especies <i>Alopias pelagicus</i> , <i>Carcharhinus falciformis</i> y <i>Prionace glauca</i> con el primer resintetizado Pelagic Thresher 1113F (annealing 68°C).....	56
Figura 12 Proporción de especies de tiburón encontradas entre las muestras colectadas de los 11 mercados y 3 pescaderías del DMQ.	56
Figura 13 Proporción de los nombre bajo los cuales se vendió la carne de tiburón en los 11 mercados y 3 pescaderías del DMQ.....	57

Índice de Anexos

Anexo 1 Decreto Ejecutivo 486	58
Anexo 2 Decreto Ejecutivo 001	63
Anexo 3 Código de las muestras colectadas en los 11 mercados y 3 pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito.	65
Anexo 4 Cuantificación y determinación de calidad de ADN de las muestras colectadas.....	71

1 Introducción

1.1 Características generales de los tiburones

Los tiburones, junto con las rayas y las quimeras, pertenecen a la clase Condrictios conformada por el grupo de elasmobranquios (por presentar septos interbranquiales) que incluyen más de 100 especies (Abercrombie, 2004). Los tiburones han habitado la Tierra por más de 400 millones de años y han sobrevivido 3 extinciones masivas. Comprenden el 4% del total de los peces existentes al presentar 34 familias y 403 especies (Nelson, 2006).

Tienen distintos tamaños, el más pequeño mide 25 cm de longitud, el tiburón enano (*Euprotomicrus bispinatus*) y el más grande puede llegar a medir más de 12 metros, el tiburón ballena (*Rhincodon typus*) (Aguilar et al., 2005). Presentan dentículos dérmicos en todo su cuerpo, lo que les confiere protección y les proporciona una superficie con un mínimo de arrastre superficial maximizando la eficiencia natatoria (González, et al., 2013). Tienen fertilización interna a través de apéndices copuladores en los machos llamados clasper (Vaca, 2011). Son peces longevos (30-70 años) que crecen y maduran de manera lenta. Tienen pocas crías a lo largo de su vida, y por tanto tienen poca capacidad de adaptarse frente a la pesca (Tyus, 2012).

Algunas especies de tiburón son migratorias y viajan grandes distancias como el tiburón azul (*Prionace glauca*); mientras que otras se mueven en áreas pequeñas desde el fondo hasta la superficie (Vega, 2012). El comportamiento social varía entre especies, algunas pueden ser solitarias (*Alopias pelagicus*), y otras suelen agruparse sobre todo para atacar cardúmenes de peces (Tricas et al., 1997). Algunos tiburones pelágicos recurren a las costas debido a la abundancia de comida que hay en ellas (Tyus, 2012; Vega, 2012). La mayoría de especies son oceánicas epipelágicas y se encuentran normalmente en altamar

en aguas cálidas entre 18-28°C. Se distribuyen mundialmente en aguas tropicales y subtropicales entre 20° de latitud Norte y 20° de latitud Sur, pero también puede encontrarse a 30° de latitud Norte y Sur durante el verano. En el océano Pacífico se distribuyen en el área que va desde California hasta Perú. Por esto, se especula que puede haber un criadero en aguas de altura sobre esta plataforma continental (CITES, 2010).

Los tiburones son uno de los predadores más exitosos a nivel trófico, cuyos rivales se reducen a algunos mamíferos y peces depredadores (Tyus, 2012). Éstos son importantes en los ecosistemas marinos ya que varias especies de tiburón se alimentan de animales enfermos o heridos, como el mero, lo que ayuda a mantener limpio el océano de enfermedades y fortalecen las poblaciones de sus presas (Smith, 2011; Aguilar, et al., 2005; CITES, 2010). La disminución de depredadores tope como el tiburón, produce un aumento en el número de otros depredadores como las rayas y mantarrayas las cuales a su vez harán que reduzca la población de sus presas como ostiones y otros moluscos comercialmente valiosos lo que perjudica el mercado de estos productos (Myers et al., 2007).

1.2 Historia de la pesca del tiburón

Los tiburones han tenido un papel importante en la historia de la humanidad. Por ser un recurso extremadamente útil por la gran cantidad de productos que pueden obtenerse de él, ha sido un ícono de reverencia para varias culturas como la Polinesia y en la tradición judeo-cristiana. Han sido cazados desde la prehistoria y utilizados por algunas culturas para fabricación de instrumentos musicales, armas, herramientas y por supuesto para alimento (Tricas et al., 1997).

Muchos productos provenientes de este animal se han generado para satisfacer las necesidades humanas. Durante los años 30's y 40's, se utilizó el aceite del hígado del

tiburón como suplemento de vitamina A, pero este mercado colapsó cuando se sintetizó artificialmente la vitamina. Incluso las partes no comestibles del tiburón se han utilizado como fertilizantes o como alimento para animales domésticos. Desde los años 80, el aumento en la demanda de productos provenientes del tiburón provocó la disminución de especies de en más de un 90% (Abercrombie et al., 2005; Vega, 2012).

Hoy en día existe principal interés en las aletas del tiburón en el mercado asiático por considerarse un alimento afrodisíaco (Barbutto, et al., 2010). La sopa de aleta de tiburón ha sido un plato afrodisíaco desde 1368 (Dinastía Ming) y por esto, suele tener un alto valor en el mercado. Sin embargo, la carne del animal no se la considera del mismo valor y no representa un ingreso significativo para los pescadores, por esto el aleteo es común en varias partes del mundo (Tricas et al., 1997; Shivji et al, 2002).

El precio de la aleta de tiburón puede llegar hasta los 700 dólares americanos en el mercado de Hong Kong, dependiendo de la especie (Clarke, 2004 en Abercrombie et al., 2005). También se utiliza su hígado para fabricar vitaminas y fármacos; mientras que el cartílago y componentes sanguíneos del tiburón son usados para fabricar suplementos alimenticios (Tricas et al., 1997).

1.3 Pesca de tiburones en el mundo

El estado actual de la población mundial de especies de tiburón es poco conocido, y por tanto las regulaciones y medidas de conservación no son suficientes para la sustentabilidad de este recurso a largo plazo. Existe poco interés en la gestión y financiación de investigación de los tiburones principalmente por la concepción errónea del público al considerarlos “devoradores de hombres”. Por esto no es tomado en cuenta al momento de realizar estudios para la conservación de especies marinas. (Shivji et al., 2002).

Antiguamente, se pensaba que los recursos marinos eran inexhaustibles y que podrían alimentar a toda la humanidad por un largo tiempo (Daniel et al., 1954). Sin embargo, la pesca y las actividades antropogénicas, han disminuido inmensamente la población de peces en el océano de manera que muchas poblaciones han colapsado (Tyus, 2012). La demanda de productos generados a partir del tiburón aumentaron con a la caída en la pesca de atún y de pez espada. Esta caída se dio principalmente por la pesca excesiva de ambas especies debido al cambio en la demanda de peces en el mercado (MacKenzie et al., 2009;). Un ejemplo claro se dio en el mercado japonés de pescado, en el que se cambió la pesca de la albacora por la del atún para satisfacer la demanda de “sashimi” en el mercado (Mayers, 2003). Así, la demanda de aletas, carne y cartílago de tiburón en el mercado (Shivji, et al, 2002), han provocado la disminución de individuos en todo el mundo como respuesta a la presión pesquera. (Tricas et al., 1997).

Existen pesquerías que se enfocan en la captura del tiburón (Bonfil et al., 2004). Una de ésta se encuentra en Italia donde muchas de las actividades pesqueras se enfocan en la especie *Mustelus mustelus* también conocido como “palombo”. Sin embargo, la mayoría de países ha prohibido la pesca directa del tiburón y solo se acepta la pesca incidental de este. Las especies pelágicas tropicales son las más comúnmente capturadas durante las actividades pesqueras, pero no todas son reportadas a la CICAA (Comisión Internacional para la conservación del Atún del Atlántico), por lo que puede que las cifras en las bases de datos de esta institución excedan hasta 50 veces su valor (CITES, 2010).

Aproximadamente 100 millones de peces cartilaginosos son capturados anualmente en el mundo (Aguilar et al, 2005). La presión pesquera ha aumentado significativamente en los últimos años. Algunas especies se han reducido hasta en un 80% y no se descarta la posibilidad de una próxima extinción de alguna de ellas (Vega, 2012).

1.3.1 Pesca de tiburones en el Ecuador

La Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), desarrolló un plan de manejo para la conservación de tiburones en 1998, al cual se adhirió Ecuador. Con esto, se pretende reducir las capturas provenientes de la pesca indirecta. Se aspira a determinar y prestar atención especial a poblaciones vulnerables de tiburones, fomentar el aprovechamiento integral de los tiburones muertos y facilitar la identificación y comunicación de datos biológicos y de comercio de cada especie de tiburón (Aguilar et al., 2005). Sin embargo, al momento de mostrar los resultados sobre la gestión de los tiburones para promover el desarrollo y aplicación de planes nacionales de acción para la conservación a la Secretaría de la CITES (Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora), se señalaron varios problemas que obstaculizaron la aplicación del Plan de Acción Internacional para los tiburones (PAI). Entre ellos figuraban la falta de información sobre la población biológica y captura de tiburones. Estos datos son necesarios para informar la situación de la pesca del tiburón y la falta de políticas eficaces y prácticas institucionales para su conservación (Vasconcellos et al., 2008).

Una práctica cruel pero común es la del aleteo, el cual consiste en cortar las aletas del animal y descartar el cuerpo al océano cuando éste sigue aún con vida. Una de las razones por la que no se aprovecha todo el individuo, es que en la barca no suele haber suficiente espacio para transportar tantos cuerpos de tiburón y además la carne del animal no es tan valiosa como sus aletas. El aleteo es prohibido en el Ecuador, pero la pesca incidental no lo es (Decreto ejecutivo 486, Anexo 1). Desde el año 2007 hasta el 2011 se han pescado 37'609.063 kilogramos de tiburones (Subsecretaría de recursos pesqueros, 2012). Tomando en cuenta que el tiburón promedio pesa 50 kilogramos (Tricas, et al.,

1997), este valor representa 752.181 tiburones durante este período. Quiere decir que el promedio de tiburones pescados al año, es de 188.045 individuos. Hay que tomar en cuenta, que este valor es el registrado por la Subsecretaría de Recursos Pesqueros. Debido a que no todos los tiburones capturados son registrados es probable que la cifra real sea aún mayor.

1.4 Utilización y comercio del tiburón

En naciones como Australia, Brasil, Canadá, y Colombia entre otras, se ha prohibido la práctica del aleteo (Shark Coalition, 2010). Por lo tanto, para no descartar el cuerpo, éste es utilizado para consumo humano. La carne de tiburón suele venderse en los mercados locales de cada país (Tricas et al., 1997).

Las aletas de tiburón pueden llegar a costar entre 45 y 85 dólares americanos por Kg en Estados Unidos, mientras que en Asia puede llegar a costar 500 euros por Kg; lo que lo hace un recurso muy rentable para los pescadores (CITES, 2010). Hong Kong, es uno de los principales consumidores de tiburón para el año 2008 se importaron alrededor de 10'000.000 Kg de aletas de tiburón provenientes de 87 países del mundo (Oceana, 2008).

En el arancel de aduanas no se documenta la información sobre el comercio internacional de tiburones a nivel de especie por lo que no hay datos verdaderos sobre la cantidad o el valor de las importaciones o exportaciones. Los datos sobre importaciones de los principales consumidores, es una buena fuente de información sobre la verdadera venta del recurso tiburón (CITES, 2010).

1.5 Formas de identificación de tiburones

Uno de los principales obstáculos para implementar planes de conservación de los tiburones, es la dificultad de identificar las especies que están siendo capturadas. La dificultad para la identificación de muchos tiburones capturados, incluyendo sus partes del

cuerpo, ha llevado a una escasez de información sobre la captura y comercialización de estos animales. Esto ha dificultado la realización de evaluaciones de los efectos de la explotación y de las necesidades de conservación (Shivji, et al., 2002).

1.5.1 Identificación morfológica

Para la identificación de tiburones se han determinado varias metodologías siendo común la identificación morfológica. Los tiburones son peces fácilmente distinguibles de los demás peces marinos sobretodo por la forma de su cuerpo y la estructura de sus aletas. También se pueden distinguir por el color de su cuerpo que suele ser bronce azulado o gris, con el dorso blanquecino o amarillento dependiendo del lugar geográfico que ocupe (CITES, 2010).

Este tipo de identificación resulta difícil cuando el animal se encuentra sin aletas y sin cabeza, es decir cuando está listo para ser transportado a los mercados. Por esto es importante tener técnicas adicionales de identificación para poder monitorear de mejor manera el manejo de este recurso.

1.5.2 Identificación molecular

Los métodos moleculares pueden resultar más útiles para determinar la especie de origen de partes del cuerpo de tiburón y así controlar el mercado de este recurso para realizar evaluaciones y desarrollar planes de conservación (Shivji et al., 2001).

Para la identificación de especies, se solía realizar amplificaciones por PCR de un locus específico, seguido por un análisis de restricción hecho con endonucleasas. También se solía realizar reconstrucción filogenética para determinar la relación entre secuencias de ADN desconocido y secuencias conocidas (Dizon et al, 2000). Sin embargo, estos métodos suelen consumir tiempo y pueden resultar costosos. Hoy en día, las técnicas moleculares,

como el código de barras de ADN (Barbuto, et al., 2010) y la amplificación de distintas regiones del genoma (Caballero et al., 2012; Shivji et al., 2002; Abercrombie et al., 2005) por medio de primers previamente diseñados, han resultado ser útiles para la identificación de especies de tiburón.

Estudios se han realizado para la amplificación de la región del citocromo oxidasa I (COI) del ADN mitocondrial (Caballero et al., 2012), pero la amplificación de la región ITS2 del ADN ribosomal es más común para la identificación molecular de tiburones (Figura 1). La región ITS2 es altamente divergente entre taxones por sobre el nivel de género, y por esto es muy poco probable que los primers amplifiquen ADN de especies poco relacionadas (Shivji et al., 2002).

Para realizar el análisis de manera más rápida, técnicas de PCR múltiple se han estandarizado donde se puede identificar varias especies de tiburón simultáneamente (Hidalgo, 2013). Este tipo de PCR es una variante de un PCR común pero al que se han adicionado más de un par de primers por lo que tienen más de una secuencia target de amplificación. La PCR múltiple es posible cuando la secuencia de los primers son lo suficientemente distintas para generar amplicones fácilmente diferenciables unos de otros, cuando la probabilidad de formar dímeros entre ellos es baja, y cuando las interacciones no específicas son mínimas (Markoulatos et al., 2002). En este estudio se utilizaron los primers descritos en la Tabla 1.

La PCR múltiple se ha utilizado para identificación de especies para distinto propósitos. En este caso, se pretendió utilizarla para identificar carne de tiburón en venta en varios mercados del Distrito Metropolitano de Quito bajo distintos nombre. Así, se determinaron las especies de tiburón más comercializadas en la ciudad y se confirma la

utilidad de la PCR múltiple para generar bases de datos confiables para poder implementar adecuadamente el Plan de Conservación de Tiburones.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

- Determinar mediante métodos moleculares la presencia de carne de tiburón en muestras de pescado de mercados y pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de carne de tiburón en 11 mercados y 3 pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito, mediante análisis por PCR de la región del ADN ribosomal ITS2 con primers universales para tiburón.
- Determinar las especies de tiburón encontradas en las muestras analizadas mediante PCR simple y múltiple con primers especie-específico.
- Establecer el porcentaje de carne de tiburón que se comercializa bajo el nombre de otro tipo de pescado en las muestras estudiadas.

3 Área de estudio

Se realizó el muestreo de tejido muscular de pescados en 11 mercados y 3 pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito. Se dividieron los mercados en grupos (Tabla 2) de acuerdo a su ubicación geográfica para facilitar la toma de muestras. Fechas de recolección de muestras se especifican en la Tabla 3. Estas se determinaron principalmente por los días de llegada del pescado fresco a los mercados de la ciudad.

Los análisis moleculares se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

4 Justificación

En el Ecuador existen decretos que prohíben la pesca directa de tiburones, pero que permite la pesca incidental y comercialización de los tiburones capturados en ella (Decreto Ejecutivo 001, Anexo 2). Con este estudio, se pretende concientizar a la sociedad sobre la pesca de estos animales de los cuales muchos están en grave peligro de extinción en el país y en el mundo. Ya que el Ecuador es un importante proveedor de aletas de tiburón al mercado asiático, es poco probable que la pesca incidental de tiburones sea la única fuente de las aletas que están siendo comercializadas. Por tanto, se especula que se está pescando directamente al recurso tiburón, se exportan sus aletas y se vende su carne para consumo dentro del país bajo otros nombres de pescado, aún cuando se ha prohibido la explotación de especies en ecosistemas sensibles y protegidos (Artículo 16, Ley Orgánica de la Soberanía Alimentaria).

La técnica molecular de PCR múltiple fue introducida anteriormente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito y éste estudio muestra la aplicación útil del protocolo estandarizado para la identificación molecular de tiburones (Hidalgo, 2013). Con esto se pretende confirmar la venta de carne de tiburón en 11 mercados y 3 pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito y así presentar a la PCR múltiple como una herramienta para mejorar las bases de datos y ayudar a la implementación del Plan de Acción Nacional para la conservación de tiburones.

Los tiburones son importantes en los ecosistema marinos ya que son un depredador tope en la cadena alimenticia y controla de manera significativa el volumen de las

poblaciones de sus presas. Algunos tiburones, por alimentarse de peces enfermos o heridos mantienen al océano limpio y libre de enfermedades (Tyus, 2012). Sin embargo, además de tener un impacto ecológico, los tiburones tienen un impacto económico ya que influyen en las poblaciones de peces y moluscos importantes para la pesca del país. Estudios han demostrado que la disminución de tiburones en el mar ha causado una disminución en la pesca del atún por el aumento de los predadores de estos peces (Vega, 2012). Por esto es importante tener una herramienta molecular que permita identificar especies de tiburón lo que puede contribuir al manejo y conservación de este recurso.

5 Materiales

5.1 Colección de muestras de tejido en mercados y pescaderías

- Carne de pescado
- Fundas plásticas Ziploc
- Balanza analítica Sartorius LA 230 S
- Bisturí
- Pinzas

5.2 Extracción de ADN de muestras de pescado tomadas de los mercados y pescaderías

- Carne de pescado
- Buffer de lisis (10mM NaCl, 10mM Tris, 25mM EDTA, ph=8)
- Proteinasa K (Invitrogen)
- Incubadora con agitación (Barnstead)
- Tubos Eppendorf (1,5 ml)

- Acetato de amonio 7,5M
- Centrifuga refrigerada Eppendorf 5415 D
- Etanol al 95%
- Cámara de flujo (Labconco)
- TE 1X (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0).

5.3 Cuantificación de ADN de muestras de pescado extraído de tejido muscular

- NanoDrop (Thermo Scientific 1.0000 y 2000)
- TE 1X (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0).
- Agua desionizada

5.4 Amplificación de regiones ITS2

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

5.5 Electroforesis en gel de Agarosa

- Agarosa 1,5% (Invitrogen)
- TBE 1X (10,8 g/L Tris; 5,5 g/L ácido 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
- Foto-documentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)

6 Métodos

6.1 Colección de muestras de tejido muscular de pescado en mercados y pescaderías.

Se eligieron 11 mercados en las regiones norte, centro y sur del Distrito Metropolitano de Quito (Tabla 2). Adicionalmente se aumentaron 3 pescaderías en el norte y centro de la ciudad, y en el valle de Cumbayá. Se realizaron 3 visitas a cada mercado y 2 visitas a cada pescadería. En cada establecimiento se tomo 5 muestras de los pescados disponibles y vendidos bajo los nombres de corvina, picudo, cherna, atún, tinto o tollo.

Se colocó cada muestra de tejido muscular de pescado en fundas Ziploc rotuladas con el nombre del mercado del que fue obtenida, el nombre del etiquetado bajo el que fue comprada y la fecha de recolección. Se trasladaron las muestras de pescado recolectadas en una hielera al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ en Cumbayá y se almacenaron a -20°C.

A cada muestra se le dio un código indicando en nombre del mercado de donde proviene, el número de visita y el etiquetado bajo en cual fue comprado (Anexo 3).

6.2 Extracción de ADN de muestras de pescado tomadas de los mercados y pescaderías.

La extracción de ADN genómico de la carne de tiburón se hizo siguiendo el protocolo establecido por Kashiwagi et al.(1995). Se cortó 0,1 gr de carne de pescado en

trozos pequeños y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se añadió buffer de lisis y 5 ul de proteinasa K. Se mezcló por vortex 10 segundos y se incubó 16 horas a 56°C hasta que la mayor parte del tejido fue lisado. Una vez que transcurrieron 16 horas, se colocó 250 ul de acetato de amonio frío y se mezcló por inversión repetida de los tubos. Luego se centrifugó 20 minutos a 13200 rpm a una temperatura de 4°C.

Se transfirió el sobrenadante de los tubos centrifugados a los nuevos tubos Eppendorf. Se añadió 750 ul de etanol al 95% frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó por 20 minutos, a 13200 rpm a 4°C. Se observó un pellet en el fondo del tubo Eppendorf. Se removió el sobrenadante y se añadió 500 ul de etanol frío al 95%. Se lavó el pellet suavemente, y se centrifugó durante 20 minutos, a 13200 rpm y 4°C.

Por último, con la micropipeta se eliminó todo el etanol posible de los tubos Eppendorf y se los colocó en la cámara de flujo para que se evaporen los residuos de alcohol. Se re suspendió el ADN en 50 ul de TE 1X y se almacenó a -20 °C hasta ser usado en las reacciones de PCR.

Se cuantificó el ADN usando un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Se determinó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% (80V, 45 min) y se fotografió el gel usando el foto-documentador GelDoc (Biorad) (Figura 2).

6.3 Identificación de tiburón en las muestras mediante PCR

6.3.1 PCR simple

Se utilizaron los 2 primers universales para tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) (Pank et al., 2001) para amplificar la región ITS2 en todas las muestras colectadas de los mercados y pescaderías para identificar cuales de ellas pertenecían a tiburones. Como control positivo, se incluyeron las muestras de tiburón IO/52, PG/10, CF/23, y AP/20

utilizadas en el estudio realizado por Hidalgo, 2013. La PCR se realizó en base a las condiciones de ciclos térmicos y concentración de reactivos descritos en Hidalgo (2013), Pank et al. (2001) y Shijvi et al. (2002). El volumen final de la reacción fue de 10 ul y consistió en 20 ng/ul de ADN, 12,5 pmol de cada primer, 1X de Buffer de PCR (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂; 8 uM de DNTPs y 1 unidad de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). El perfil de ciclos térmicos fue: denaturación inicial durante 15 minutos a 94°C seguidos por 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 65°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Terminado el ciclaje, se mantuvieron las muestras a 4°C o -20°C.

Una vez identificadas las muestras que correspondían a tiburones, se procedió a identificar la especie de tiburón a la que pertenecían. Se probaron los primers especie específicos descritos en la Tabla 1. La PCR se realizó en base a las condiciones de ciclos térmicos y la concentración de reactivos descritos en Hidalgo (2013), Pank *et al.* (2001) y Shijvi *et al.* (2002) utilizado en el ensayo anterior.

6.3.2 PCR Triple

Se siguieron los detalles de la PCR multiple detallado en Hidalgo (2013), Pank et. al (2001), Shivji et al. (2002), Abercrombie (2004) y Abercrombie et al (2005). Las condiciones de ciclos térmicos y concentraciones de reactivos fueron las mismas que se utilizaron en la PCR simple. El ensayo consistió en probar el primer Common Thresher 1048F (385 pb) junto con los primers universales de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR). Se probó contra la especie objetivo, aquellas ya identificadas como *A. pelagicus*, y especies no objetivo, es decir aquellas identificadas como una especie distinta a *A. pelagicus* como *P. glauca* o *C. falciformis*. Se utilizó un control negativo, un control positivo para el primer específico (Common Thresher 1048F), y otro para los primer universales de tiburón

(FISH5.8SF y FISH28SR). Para el control positivo del primer Common Thresher 1048F se utilizó la muestra AP/20, y para control positivo de los primers universales (FISH5.8SF y FISH28SR) se utilizó la muestra IO/52 empleados en Hidalgo (2013).

6.3.3 PCR Cuádruple

Se realizó PCR con 4 primers para realizar de manera más rápida la identificación de especies de tiburón. Para esto se utilizaron los primers para las especies *P. glauca* (primer blue) y *C. falciformis* (primer silky); y los primers universales (FISH5.8SF y FISH28SR). Las condiciones de ciclos térmicos y concentraciones de reactivos fueron las mismas que se utilizaron en la PCR simple.

6.3.4 PCR Quíntuple

Se realizó PCR con 5 primers pertenecientes a las especies *Alopias pelagicus* (primer pelagic thresher 1113F y primer common thresher 1048F), *P. glauca* (primer blue) y *C. falciformis* (primer silky); y los primers universales (FISH5.8SF y FISH28SR). Las condiciones de ciclos térmicos y concentraciones de reactivos fueron las mismas utilizadas en la PCR simple.

6.4 Electroforesis en gel de Agarosa

Para visualizar los productos de las amplificaciones por PCR, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Se colocó en un Erlenmeyer, 100 ml de TBE 1X y 1,5 gr de agarosa. Se calentó la mezcla en el horno microondas hasta que la agarosa se disolvió completamente. Se dejó enfriar hasta que fue tolerante al tacto. Posteriormente se agregó 3 ul de SYBR Safe a la mezcla y se la vertió en un molde de solidificación. Este último fue armado previamente con los peines de plástico en la parte superior y se dejó solidificar por 15 minutos. A los productos de PCR (10 ul) se añadió 2ul de Blue Juice

10X (Invitrogen). Se utilizó el ladder de 100 pb (Axygen) y se corrió el gel por 50 minutos a 80 V.

6.5 Visualización e identificación de bandas pertenecientes a las especies de tiburón.

Se colocó el gel en el fotodocumentador Gel Doc XR (Biorad) y se visualizó bajo luz ultra violeta las bandas en el gel. Se determinó la presencia o ausencia de bandas en las electroforesis en gel de agarosa de la PCR realizada con los primers universales (FISH5.8SF y FISH 28SR) para identificar los tiburones presentes en las muestras de pescado, utilizando controles positivos (ADN de tiburón) para su comparación.

Para la identificación de especies de tiburón se realizó el mismo procedimiento, pero se utilizaron controles positivos para cada primer especie-específico. Se comparó el tamaño de banda de los controles positivos con las bandas de las muestras de tiburón encontradas y se identificó la especie.

7 Resultados

7.1 Colección de muestras de tejido en mercados y pescaderías.

Se obtuvo un total de 154 muestras de tejido muscular de distintas especies de pescados vendidos bajo los nombres de corvina, atún, picudo, tinto, tollo, gata, cherna, cazón blanco y dorado de 11 mercados y las 3 pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito (Anexo 3).

7.2 Extracción, cuantificación y calidad de ADN extraído de tejido de pescado.

Los valores de la cuantificación del ADN extraído de tejido de pescado se presentan en el Anexo 4. Las concentraciones de ADN de las muestras oscilaron entre 11,3 ng/ul hasta 2364,4 ng/ul. Para realizar la PCR, se diluyeron las muestras hasta alcanzar una concentración de 20 ng/ul. Todas las muestras presentaron una relación A260/A280 mayor a 1,7 lo que indica buena calidad del ADN analizado.

En la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, se determinó como ADN de buena calidad a las muestras que presentaban una banda bien definida en la parte superior del gel (Figura 2).

7.3 Amplificación de regiones ITS

7.3.1 Identificación de tiburones con primers universales

Para la amplificación de la región ITS2 del ADN ribosomal, se utilizó los primers FISH5.8SF (primer forward) y FISH28SR (primer reverse) a un temperatura de annealing de 65°C. Para cada familia de tiburones, se ha mencionado un distinto tamaño de amplicón (Hidalgo, 2013). Para la familia Carcharhinidae, el amplicón es de 1470 pb, para la familia Alopiidae es de 1200 pb, para la familia Sphyrnidae es de 860 pb, y para la familia Lamnidae es de 1350 pb aproximadamente. El tamaño de los amplicones producidos por los primers especie- específicos se detallan en la Tabla 1.

En el screening global, se logró identificar 40 tiburones en las 150 muestras recolectadas (Figura 3). Esto indica que el 26,67% de las muestras de pescado colectadas correspondían a tiburones. Se generaron 27 amplicones de 1470 pb, lo que indicó que la mayoría de las muestras identificadas como tiburón pertenecieron a la familia

Carcharinidae. Así también, se obtuvieron 13 amplicones de 1200 pb, perteneciente a la familia Alopiidae. Posteriormente se identificó la especie de cada uno de los individuos.

7.3.2 Identificación de especies de tiburón con primers especie específicos

De las 40 muestras de tiburón identificadas, 24 tiburones pertenecieron a la especie *Prionace glauca*, 3 a *Carcharhinus falciformis* y 13 a *Alopias pelagicus*. Para los 24 tiburones de la especie *Prionace glauca*, se obtuvo un tamaño de banda de 929 pb intensa que coincidía con el tamaño de banda del control positivo PG/10 (Figura 4). Las 3 muestras identificadas como *Carcharhinus falciformis* mostraron un tamaño de banda de 1085 pb que coincidía con el tamaño de banda del control positivo CF/23 (Figura 5). Por último los 13 tiburones pertenecientes a la especie *Alopias pelagicus* presentaron una banda clara de 385 bp producido por el primer Common Thresher 1048F (para *A. pelagicus*) de especificidad de especie cercana y el primer reverse universal (FISH 28SR). El primer Common Thresher 1048F presenta especificidad de especie cercana, ya que amplifica ADN de *Alopias pelagicus* (fuertemente) y *Alopias superciliosus* (débilmente) (Abercrobie, 2004). Sin embargo, se realizó la identificación de especies siguiendo el orden de primers detallado en la Tabla 1 por lo que el primer especie-específico Bigeye thresher 272F (para *A. superciliosus*) fue utilizado en la identificación de especies de tiburón antes que el primer Common thresher 1048F, y no amplificó en ninguna de las muestras de tiburones. Se puede concluir entonces que las muestras identificadas durante este ensayo pertenecieron a la especie *A. pelagicus*. En el gel se pueden ver bandas de 385 pb que coinciden con el tamaño del control positivo AP/20 (Figura 6).

7.3.3 PCR Triple (*Alopias pelagicus*)

En la Figura 7, se ve como la especie *Alopias pelagicus* (385 pb) se distingue de las muestras no objetivo, al presentar 2 bandas bien definidas. Las muestras que presentan una

banda superior, pero no inferior, indica que son tiburones, pero que no pertenecen a la especie *A. pelagicus*. Las bandas de los amplicones generados por el primer especie específico Pelagic Thresher 1113F y el primer universal FISH28SR son intensas y claras mostrando un diagnóstico confiable a la identificación de la especie de tiburón *A. pelagicus*. El tamaño de banda de los amplicones generados por los primers universales FISH5.8SF (primer forward) y FISH28SR (primer reverse), es de 1200 pb para aquellas muestras que pertenecen a la especie *Alopias pelagicus*.

Se identificaron 13 tiburones como *A. pelagicus* lo que representa el 32.5% del total de tiburones encontrados. Las muestras identificadas como *A. pelagicus* por PCR simple, coincidieron con aquellas identificadas por PCR triple.

7.3.4 PCR Cuádruple (Prionace glauca, Carcharhinus falciformis)

Los resultados muestran que el PCR cuádruple reconfirma la identificación hecha por PCR simple de 9 muestras identificadas previamente como *Prionace glauca* y *Carcharhinus falciformis* (Figura 8). Se ve las bandas de los primers blue (para *P. glauca*) y silky (para *C. faciformis*) en los tamaños 929 pb y 1085 pb, respectivamente. Las bandas generadas por los amplicones de los primers universales son tenues pero se observan de un tamaño de 1470 pb.

7.3.5 PCR Quíntuple (Prionace glauca, Carcharhinus falciformis, Alopias pelagicus)

Al realizar el PCR quíntuple se observó las bandas pertenecientes a las especies *Prionace glauca* (929 pb), *Carcharhinus falciformis* (1089 pb), *Alopias pelagicus* (385 pb) y las bandas de 1200 pb y 1470 pb generada por los primers universales FISH5.8SF y FISH28SR (Figura 9). La banda de 385 pb generada por el par de primers Common

Thresher 1048F (para *A. pelagicus*) y FISH28SR (primer reverse), está presente en todas las muestras mostrando mayor intensidad en aquellas pertenecientes a la especie *A. pelagicus* y *C. faciformis*.

Debido a la tendencia del primer Common Thresher 1048F a ser inespecífico, se realizó el mismo ensayo con los primers Pelagic Thresher 1113F y FISH28SR. Esto dio como resultado una banda de 230 pb (específica para *A. pelagicus*) en todas las muestras de tiburón siendo más intensa en las especies identificadas como *A. pelagicus* y *C. faciformis* (Figura 10). Las muestras de tiburón identificadas como *P. glauca* mostraron la banda generada por el primer especie específico para esta especie (Primer Blue) de 929 pb y las identificadas como *C. faciformis* mostraron la banda de 1085 pb generada por el primer especie específico Silky.

8 Discusión

8.1 Extracción, cuantificación y determinación de la calidad de ADN de las muestras

El protocolo de extracción de ADN a partir de tejido muscular de pescado por Kashiwagi et al. (1995), resultó útil para la investigación.

Se obtuvo ADN de buena calidad y en concentraciones suficientes para las reacciones de PCR (20 ng/ul). Sin embargo, en 4 de las 154 muestras se vio degradación de ADN. No se sabe la causa de esto, pero pudo suceder debido a fallas en la manipulación durante la extracción de ADN. Las 150 muestras con buena calidad de ADN fueron utilizados para el análisis molecular por PCR.

8.2 Identificación de especies de tiburón

El 26,67% de las muestras de pescado colectadas de los mercados y pescaderías fueron identificados como tiburones. En tanto a las muestras positivas para tiburón, las especies encontradas *P. glauca* (60%), *C. falciformis* (7,5%), y *A. pelagicus* (32,5%) coinciden con aquellas reportadas como las más capturadas en el puerto de Manta siendo *P. glauca* y *A. pelagicus* las que encabezan la lista (Henderson et al., 2010). Ya que los puertos de Manabí son uno de los principales proveedores de pescado a los mercados del DMQ, se confirma que la cantidad de tiburones mayormente capturados y por tanto lo que más se comercializan en el Distrito Metropolitano pertenecen a estas dos especies (*P. glauca* y *A. pelagicus*) (Moya, 1984). Especies como *Sphyrna zygaena* y *Squatina californica* también han sido reportadas como altamente pescadas en Puerto López y Santa Rosa (Henderson et al., 2010). Sin embargo, en la muestra analizada no hubo presencia de estas especies.

C. falciformis es una especie que se encuentra a menudo en los arrecifes de aguas profundas cerca de las pendientes insulares y son muy susceptibles a la pesca palangrera siendo la tercera especie más capturada durante estas actividades (Martínez et al., 2011; CITES, 2010). Se ha reportado que aproximadamente el 21% de la pesca palangrera suele corresponder a esta especie (CITES, 2010). Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo solo el 7,5% del total de tiburones encontrados entre las muestras analizadas.

En estudios realizados en países cercanos, como Colombia, se ha reportado una alta cantidad de tiburones capturados de la especie *A. pelagicus* en sus costas (Caballero et al., 2012), mientras que en Chile, del año 2006-2008, se reportó un desembarque anual de 164,399 Kg de tiburones de los cuales el 25% perteneció a la especie *P. glauca* y el 75% a la especie *Isurus oxyrinchus* (tiburón mako ó tiburón de aleta corta) (Vega, 2012).

Con los resultados obtenidos se puede determinar que las principales especies en venta en los mercados estudiados del DMQ son pelágicas (*P. glauca* y *A. pelagicus*) ya que son las más propensas a caer en las redes durante las actividades de pesca del atún y del pez espada (Vega, 2012).

8.3 PCR Simple para identificación de tiburones y especies de tiburón

Durante la identificación de tiburones presentes en las muestras de pescado colectadas de los mercados y pescaderías, se pudo observar la banda producto de la amplificación de los primers universales FISH5.8SF y FISH28SR en las muestras de tiburón y ausencia en las muestras de pescado. Esta combinación de primers genera distinto tamaño de amplicón dependiendo de la familia a la que pertenece el tiburón (Tabla 1). Una vez identificada la familia se puede proceder a la identificación de especies por PCR múltiple utilizando la combinación de primers estandarizada en Hidalgo (2013) realizada para evitar la problemas de visualización de los amplicones de diagnóstico de tamaños cercanos.

En este estudio se observaron 27 amplicones de 1470 pb, lo que sugirió una PCR múltiple con la combinación de primers de la familia Carcharinidae (*P. glauca*, *C. falciformis* y *Carcharhinus galapagoensis*) (Hidalgo, 2013). Ya que se hizo la identificación de especie de tiburón probando cada uno de los primers especie específico (Tabla 1) por separado, y se obtuvieron 2 especies de tiburón pertenecientes a esta familia (*P. glauca* y *C. falciformis*), se combinaron estos primers (primer blue y primer silky) junto con los primers universales FISH5.8SF y FISH28SR para la PCR múltiple.

Los 13 amplicones de 1200 pb indicaron la presencia de especies de tiburón de la familia Alopiidae. Para esta familia, la combinación de primers sugerida fue: Shortfin mako 575F (*I. oxyrinchus*), Common Thresher 792F (*A. vulpinus*), Bigeye Thresher 272F (*A. superciliosus*), y Pelagic Thresher 1113F (*A. pelagicus*) ya que pertenecen al orden Lamnidae (Hidalgo, 2013). Debido a que se encontró solamente una especie de esta familia (*A. pelagicus*) entre las muestras de tiburón, se combinó el primer específico para esta especie (Pelagic Thresher 1113F) con los primers universales FISH5.8SF y FISH28SR para una reacción de PCR triple. Se comparó los resultados obtenidos de la PCR simple para esta especie (*A. pelagicus*) con los resultados de la PCR múltiple y se vio que coincidían. Por lo tanto la información brindada por el primer específico Pelagic Thresher 1113F fué confiable.

8.4 PCR múltiple para identificación de especies de tiburón

En cada ensayo de PCR múltiple, 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 (FISH5.8SF y FISH28SR). Además, los primers universales ITS2 amplificaron una banda de control en todas las especies de tiburón incluyendo las especies no objetivo de los primers específicos. Las especies no objetivo son aquellos tiburones que no pertenecieron a la especie de tiburón que se está analizando con los primers especie específicos.

Se ha recomendado realizar PCR múltiple con primers que den como producto amplicones con tamaños distintos entre sí para facilitar la interpretación de los resultados. (Shivji et al., 2002) 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 y *Carcharhinus falciformis*. 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 competencia 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.

8.4.1 PCR triple

Para el ensayo de PCR triple se combinó el primer de especificidad cercana para *A. pelagicus* (Common thresher 1048F) con los primers universales ITS2 (FISH5.8SF y FISH28SR) en una misma reacción. El propósito de incluir los 2 primers universales ITS2 en la PCR triple es sólo para evitar resultados falsos negativos (ausencia de amplificación) en las muestras (Hidalgo, 2013). Los resultados mostraron la amplificación de 2 bandas para aquellas muestras identificadas como *A. pelagicus* y solo una banda para las muestras no objetivo del primer Common thresher 1048F (Figura 7). En el ensayo se incluyeron muestras de otras especies de tiburón para contrastar con las muestra pertenecientes a la especie *A. pelagicus*. Al comparar los resultados de la PCR múltiple con la PCR simple para el primer Common thresher 1048F, se determinó que coincidían en la identificación de especie. Sin embargo, se vió amplificación de la banda específica para *A. pelagicus* en la muestra de tiburón *C. faciformis* (CF/23). Sin embargo, la muestra R3TL, la cual fue identificada como esta misma especie (*C. faciformis*) en la PCR simple no presentó ninguna banda por lo que se sugiere que la muestra CF/23 tuvo algún problema. La muestra IO/52 perteneciente a la especie *Isurus oxyrinchus*, fue incluida en la PCR triple para confirmar la presencia de la banda generada por los primers universales ITS2 (FISH5.8SF y FISH28SR). Se logró detectar la amplificación de dicha banda lo que confirma que el ensayo fue efectivo.

8.4.2 PCR cuádruple

En el PCR cuádruple se pueden ver las bandas pertenecientes a las especies *Prionace glauca* y *Carcharhinus falciformis*, pero no se distinguen las bandas pertenecientes al amplicón generado por los primers universales ITS2 (ver sección 8.4) (Figura 8). En estudios anteriores los primers blue (*P. glauca*) y silky (*C. falciformis*) han demostrado ser lo suficientemente discriminantes debido a que la región del genoma amplificada es altamente conservada dentro de las especies de tiburón y lo suficientemente variable entre congéneres (Shivji et al.,2002). Se utilizó la muestra IO/52 perteneciente a la especie *Isurus oxyrinchus* para confirmar la presencia de la banda generada por los primers universales ITS2 la cuál amplificó sin presencia de ninguna banda especie-específica lo que comprobó la efectividad del ensayo. Por esto, la falta del amplicón generado por los primers universales en las muestras de *Prionace glauca* y *Carcharhinus falciformis* no restringe la utilidad de diagnóstico de cada primer especie-específico en la identificación de las especies de tiburón (Abercrombie, 2004).

8.4.3 PCR quintuple

En el ensayo quintuple se puede ver en todas las muestras, la amplificación de la banda de 385 pb perteneciente al amplicón generado por el primer Common Thresher 1048F (para *A. pelagicus*) y el primer FISH 28SR universal (Figura 9). En un inicio, se consideró la posibilidad de contaminación del primer Common Thresher 1048F, pero el control negativo no presentó ninguna banda lo que indicó que la contaminación del primer era poco probable.

Para hacer más específico el ensayo, se utilizó el primer Pelagic Thresher 1113F (para *A. pelagicus*) en vez del primer Common Thresher 1048F (para *A. pelagicus* y *A. superciliosus*) y se usó como control positivo de los primers universales ITS2 la muestra

de *I. oxyrinchus* (1350 pb) identificada morfológicamente. Todas las muestras presentaron la banda perteneciente al amplicón generado por el primer Pelagic Thresher 1113F (para *A. pelagicus*) de 230 pb incluyendo el control positivo (Figura 10). El control negativo (agua) no tuvo presencia de bandas lo que indica que no hubo contaminación de los reactivos. Markoulatos et al. (2002) menciona que este tipo de fenómenos puede darse por la existencia de un sitio de unión adicional del primer (Pelagic Thresher 113F en este caso), que da lugar al amplicón adicional en todas las muestras. Por esto, para mejorar la especificidad del primer se aumentó la temperatura de annealing de la PCR múltiple en un ensayo de gradiente de 65°C a 68°C. Al aumentar la temperatura, se dificulta la formación de puentes de hidrógeno del primer con la hebra de ADN de tiburón y por esto se esperó que aumente la especificidad del primer. Al realizar el ensayo de gradiente, se mantuvo la banda específica para Pelagic Thresher 1113F en todas las muestras. Por esto, se consideró la posibilidad de contaminación del primer especie específico Pelagic Thresher y se mandó a sintetizar de nuevo el primer.

Los resultados del ensayo de gradiente realizado con el nuevo primer Pelagic Thresher 1113F mostraron la banda de *A. pelagicus* (230 pb) en todas las muestras (Figura 11) lo que descartó la posibilidad de contaminación del primer Pelagic Thresher 1113F. El aumento de la temperatura de annealing provocó que la banda de Pelagic Thresher se desvanezca en las muestras no objetivo pero nunca se logró eliminarla por completo. Se ha sugerido que para lograr la amplificación específica del primer Pelagic Thresher 1113F, se podría cambiar la concentración de este primer colocándolo en menor cantidad. La concentración podría reducirse hasta 0,04µM ya que es la mínima concentración de primer recomendada para realizar la PCR múltiple (Markoulatos, 2002).

Con estos resultados se puede especular sobre una región conservada entre las especies *A. pelagicus*, *C. faciformis* y *P. glauca*. Sin embargo, Caballero et al. (2012), indica en un árbol filogenético que existe poca relación entre *A. pelagicus* y la familia Carcharhinidae (*C. faciformis* y *P. glauca*) por lo que se sugiere inespecificidad del primer en esta combinación (primer blue, silky, pelagic thresher 1113F). Posiblemente la inespecificidad se deba a la presencia de secuencias similares que se encuentren en las 3 especies. Por esto se recomienda realizar un alineamiento de la región ITS2 de las 3 diferentes especies, enfocándose en el sitio de unión del primer Pelagic Thresher 1113. De esta manera, si se encuentra esta similitud se podrá confirmar los resultados obtenidos.

La combinación de primers para *A. Pelagicus*, *C.falciformis*, *P.glauca* no se había utilizado anteriormente ya que no se había dado la necesidad de hacerlo (Abercrombie, 2014). Debido a la presencia de la banda inespecífica en todas las muestras de tiburón, se recomienda no combinar los primers para *A. Pelagicus*, *C.falciformis*, *P.glauca* en una misma reacción de PCR para evitar resultados erróneos durante la identificación de especie. Se sugiere realizar los ensayos de PCR múltiple de acuerdo al estudio realizado por Hidalgo (2013) en el cual se hacen combinaciones de primers de acuerdo a la familia u orden al que pertenecen. Ya que *P. glauca* y *C. faciformis* pertenecen a la familia Carcharinidae, se recomienda utilizarlos juntos ya que no habrá interferencia entre ellos y generará un diagnóstico confiable. Así mismo, *A. pelagicus* pertenece al orden Lamnidiformes, por lo que se recomienda utilizarlos con primers de las especies *I.oxyrinchus*, *A.vulpinus*, y *A.superciliosus* pertenecientes a este mismo orden (Hidalgo, 2013).

8.5 Aplicaciones de monitoreo, gestión y conservación de tiburones

El protocolo de identificación molecular de especies de tiburón basado en la región ITS2 del ADN ribosomal, es una herramienta eficiente para detectar las especies de tiburón de venta en los mercados del DMQ y contribuir al Plan de Acción Nacional para la conservación de tiburones (Hidalgo, 2013; Abercrombie, 2004). Con la técnica de PCR múltiple se podrá obtener información precisa sobre las especie de tiburones que están siendo capturadas y comercializados en el país.

Utilizando la identificación molecular por PCR múltiple, se demostró que la mayoría de tiburones encontrados en venta en los mercados del Distrito Metropolitano de Quito pertenecieron a especies pelágicas. Esto indica que la pesca ya no solo se está realizando en aguas costeras sino también en agua abiertas (Godin et al. 2011). Los pescadores tienden a ir más lejos para capturar suficiente mercancía para costear sus operaciones (Swing, 2011). Una investigación llevada a cabo por López et al. (2008), indicó que por lo menos 10 especies de tiburones pelágicos estaban presentes en el comercio de la región centro norte de Chile, pero los registros mostraban que solo 4 especies estaban presentes en los desembarques. Puede que algo parecido ocurra en Ecuador ya que no se suelen registrar todos los tiburones capturados aunque esto sea requisito para su comercialización (Martínez et al., 2007).

La carne de tiburón suele venderse bajo nombres como corvina, atún, o picudo por ser los más atractivos al consumidor. Durante el estudio, la carne de tiburón identificada, fue comprada bajo distintos nombres siendo corvina y atún los más comunes (Figura 12). El producto vendido no presenta mayor diferencia de los demás pescados principalmente en el sabor. Sin embargo, la textura del tejido es considerablemente distinta ya que la carne de tiburón suele ser más dura que la de otros pescados (Sanz et al., 2007). Por esto los

restaurantes prefieren esta carne para las recetas de pescado apanado o asado por se de más fácil manipulación en el preparado (Dizon et al., 2000)

8.6 Composición y proporción relativa de las especies de tiburones capturadas en Ecuador.

Según Martínez et al. (2007), la mayor cantidad de especies de tiburón capturadas en el Ecuador son: 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 supercilosus*) 3%; y tiburón tinto (*Isurus oxyrinchus*) 1%. Este estudio se realizó en base a identificación morfológica realizada por expertos, de las especies de tiburón capturadas en los puertos de la provincia de Manabí. Debido a que la mayoría de pescados que llegan al Distrito Metropolitano de Quito son provenientes de esta provincia, se esperaría que una proporción parecida se encuentre en venta en los mercados y pescaderías de la ciudad.

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 la carne de estas especies en venta en los mercados del Distrito Metropolitano de Quito.

8.6.1 Características nutricionales de la carne de tiburón

Las características de la carne de tiburón pueden determinarse a partir del porcentaje de proteínas, grasa, humedad y ceniza. También se puede determinar su calidad en base a la concentración de amonio y mercurio presente en el tejido. Según Sanz et al. (2007) no hay diferencias significativas entre las características de la carne de las especies de tiburón

P. glauca, *C. faciformis*, y *A. pelagicus* en cuanto a porcentaje de grasa, proteína y concentraciones de amonio.

El tejido muscular del tiburón ha mostrado acumulación de elemento traza como mercurio, arsénico, y plomo. Esto se da por procesos de bio-acumulación por ser predadores que encabezan la cadena trófica (Lopez et al., 2013). El contenido de mercurio en la carne de ninguna especie de tiburón utilizadas en el estudio de Sanz et al (2007) sobrepasó el límite permisible de mercurio indicado por la FDA de 1 mg/L (Sanz et al., 2007). De igual manera la concentración de amonio en la carne de estas especies son en general mínimas. Sin embargo, se ha mencionado que la concentración de amonio aumenta a partir del 4 día de muerto el animal. Así se pudo determinar que *Prionace glauca* es la especie que tiende a deteriorarse más rápidamente y por esto su carne es de bajo valor comercial (Sanz et al., 2007).

El porcentaje de grasa en las 3 especies resulta bajo, haciendo que su carne sea considerada magra ya que es menor al 2.5%. El valor proteico de la carne oscila entre 12,78% y 17,79%. Contreras et al. (1994) indica que en términos nutricionales, el pescado aporta con la misma cantidad de proteínas que la carne de mamífero, pero que su digestibilidad es mayor (Sanz et al., 2007).

Esta carne ha resultado ser una fuente barata de proteínas para comunidades costeras dependientes de la pesca para su subsistencia (Vannuccini, 1999). Por esto, la FAO, dentro de su Plan de Acción para la Conservación y Ordenación de los Tiburones, considera el aspecto nutricional y socioeconómico donde reconoce que en algunas regiones la pesca del tiburón es una fuente importante de alimento, empleo e ingresos (Aguilar et al., 2005). Por esto, propone una pesca sostenible para no perjudicar a dichas regiones y ayudar a la recuperación de las poblaciones de tiburones. La técnica molecular de PCR múltiple

resulta ser una herramienta válida ya que ayudará a la identificación de especies de tiburón capturadas y contribuirá a la generación de bases de datos que ayuden a la implementación del plan de conservación.

9 Conclusiones

La investigación realizada confirmó la venta de carne de tiburón en los mercados del Distrito Metropolitano de Quito bajo distintos nombres. La identificación molecular, mostró que el 26,67% de las muestras de pescado colectadas fueron tiburones de las especies *P. glauca* (60%), *C. faciformis* (7,5%), y *A. pelagicus* (32,5%).

La amplificación de regiones ITS2 utilizando ensayos simples de PCR con un primer especie- específico para cada especie de tiburón y el primer universal FISH28SR, arrojó los mismos resultados que la PCR con combinaciones diferentes de estos primers especie- específicos y los primers universales ITS2 en una sola reacción (triple hasta quintuple). Esto demuestra que el método de identificación molecular de especies de tiburón por PCR múltiple es una herramienta eficiente y útil para la identificación de carne de tiburón que se encuentran en venta en el país.

La conservación de los tiburones es importante ya que regulan poblaciones de peces que se alimentan de una gran cantidad de organismos marinos de importancia ecológica y económica. El protocolo utilizado demuestra que la carne de tiburón de venta en los mercados del DMQ y del Ecuador puede ser identificada fácilmente. Esto ayudará a generar bases de datos sobre la captura de tiburones en el país y tomar medidas para evitarla o controlarla.

10 Recomendaciones

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

Se recomienda realizar las PCR múltiple con la combinación de primers descrita en Hidalgo (2013) para obtener resultados confiables de manera más rápida.

El método molecular utilizado en el estudio (PCR múltiple) debería incluirse en el Plan Nacional de Conservación del Tiburón para el diseño de pruebas de diagnóstico molecular encaminados a la vigilancia del comercio de especies de tiburón.

Recomendar la técnica molecular de PCR múltiple a la Subsecretaría de Recursos Pesqueros del Ecuador para mejorar las bases de datos más confiables y que permitan detectar la pesca directa y excesiva del tiburón.

11 Bibliografía

- Abercrombie, D. (2004). Efficient PCR-based identification of shark products in global trade: Application for the management and conservation of commercially important mackerel sharks (Family Lamnidae), thresher sharks (Family Alopiidae) and hammerhead shark (Family Sphyrnidae). *MS Thesis* .
- Abercrombie, D. L., Clarke, S. C., & Shivji, M. S. (2005). Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genetics* , 775-788.
- Abercrombie, D. (20 de Marzo de 2014). Primer combination. (M. J. Mateo, Entrevistador)
- Aguilar, F., Chalén, X., & Villón, C. (2005). *PLAN DE ACCIÓN NACIONAL DE TIBURONES*. Instituto nacional de pesca.
- Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P., y otros. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of "palombo" (*Mustelus* spp.). *Food Research International* , 376-381.
- Bonfil, R., & Abdallah, M. (2004). *Field Identification guide to the sharks and rays of the Red Sea and Gulf of Aden*. Rome: FAO species identification guide for fishery purposes.
- Caballero, S., Cardeñosa, D., Soler, G., & Hyde, J. (2012). Application of multiplex PCR approaches for shark molecular identification: feasibility and applications for fisheries management and conservation in the Eastern Tropical Pacific. *Molecular Ecology Resources* , 233-237.
- Chapman, D., Abercrombie, D., Doudy, 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* , 415-425. .
- CITES. (2010). *Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre*. CITES, Decimoquinta reunión de la conferencia de las partes. Qatar: CITES.
- Coello, S. (2005). *La Administración de los Chondrichthyes en Ecuador. Aportes para el Plan Nacional de Tiburones*. Quito, Ecuador: UICN.
- Contreras, E. (1994). *Bioquímica de pescados e invertebrados*. Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Santiago de Chile: Universidad de Santiago de Chile.
- Daniel, H., & Minot, F. (1954). *The inexhaustible sea*. Dodd, Mead.
- Dizon, A., Baker, C. S., Cipriano, F., Lento, G., Palsboll, P., & Reeves, R. (2000). Molecular genetic identification of whales, dolphins and porpoises: proceedings of a workshop on the forensic use of molecular techniques to identify wildlife products in the marketplace. *NOAA Technical Memorandum* , 286.

- Godin, A. C., & Morgan, A. (2011). *Pesca incidental de tiburones: Alternativas de mitigación*. Washington DC: PEW Environmental Group.
- González, C. G., alayón, P. P., Dominguez, J. B., Lorencio, C. G., Couñago, A. A., Hernández, M., y otros. (2013). *Tiburones, Rayas, Quimeras, Lampreas y Mixínidos de la Península Ibérica y ...* España: Diaz de Santos.
- Henderson, S., & Hearn, A. (2010). *Informe sobre el estado de los tiburones del Pacífico Este Tropical*. ETPS, Perspectivas Regionales e Informes Nacionales. Biotelemetry.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., & Vogt, P. (Septiembre de 1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques* , 504-511.
- Hidalgo, C. (2013). *Protocolo de Identificación Molecular de Especies de Tiburón Analizando Muestras de Galápagos y Puerto López* . Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Quito.
- Kashiwagi, A. (1995). Peroxisomal enzyme activity changes in the tail of anuran tadpoles during metamorphosis. *Compar. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* , 483–489.
- Lopez, S. A., Abarca, N. L., & Meléndez, R. (2013). Heavy metal concentrations of two highly migratory sharks (*Prionace glauca* and *Isurus oxyrinchus*) in the southeastern Pacific waters: comments on public health and conservation. *Tropical Conservation Science* , 1, 26-137.
- MacKenzie, B. R., Mosegaard, H., & Rosenberg, A. (2009). Impending collapse of bluefin tuna in the northeast Atlantic and Mediterranean. *Conservation Letters* , 26–35.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Polymerase chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of clinical Laboratory Analysis* , 47-51.
- Martínez Ortiz, J., García Domínguez, M., Cevallos García, A., Ávila Zambrano, E., Daza Bermeo, C., Zambrano Zambrano, R., y otros. (2011). *Tiburones del Pacífico Oriental*. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, Subsecretaría de Recursos Pesqueros. La Jolla, California: Comisión Interamericana de Atún Tropical.
- Martínez, J., & Galván, F. (2007). *Tiburones en el Ecuador: Casos de estudio*. Fundación Escuela de Pesca del Pacífico Oriental, Programa de Manejo de Recursos Costeros, Manta.
- Mayers, R., & Worm, B. (2003). *Decline of Pacific tuna populations exaggerated?* Nature.
- Ministerio de Industrias y Productividad. (s.f.). *Programa de Protección de Defensa del Consumidor*. Recuperado el 2 de Abril de 2014, de Industrias: <http://www.industrias.gob.ec/programa-de-proteccion-de-defensa-del-consumidor/>
- Moya, L. d., & D'Artois, P. C. (1984). *Los mercados y ferias de Quito*. Centro Ecuatoriano De Investigación Geográfica, Aspectos Geográficos de su Dinamismo. Quito: <http://horizon.documentation.ird.fr/>.

- Myers, R., Baum, J., Shepherd, T., Powers, S., & Peterson, C. (2007). Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science* , 1846-1850.
- Nelson, J. (2006). *Fishes of the World*. Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Oceana. (2008). *Comercio de las aletas de Tiburón*. Oceana. Oceana.org.
- Pank, M., Stanhope, M., Natanson, L., Kohler, N., & Shivji, M. (2001). Rapid and Simultaneous Identification of Body Parts from the Morphologically Similar Sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) Using Multiplex PCR. *Marine Biotechnology* , 231-240.
- Sanz, L. D., & Cadena, C. D. (2007). Estudios Bromatológico y de calidad de cuatro especies de tiburones desembarcados en Manta, Ecuador. *EPESPO* , 78-82.
- Shark Coalition. (2010). *Coalicion tiburones*. Recuperado el 26 de Marzo de 2014, de Shark Coalition: http://www.coaliciontiburones.org/?page_id=157&lang=es
- Shivji, M., Clarke, S., Pank, M., Natanson, L., Kohler, N., & Stanhope, M. (5 de Septiembre de 2002). Genetic Identification of Peagic Shark Body Parts for Conservation and Trade Monitoring. *Conservation Biology* , 1036-1047.
- Smith, R. S. (2011). *Ecología para el rescate de la Tierra*. Libros en Red.
- Soberanía Alimentaria. (27 de Diciembre de 2010). *Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria*. Recuperado el 27 de Abril de 2014, de Conferencia Plurinacional e Intercultural de Soberanía Alimentaria: http://www.soberaniaalimentaria.gob.ec/?page_id=132#sthash.d6PtuvXn.dpuf
- Subsecretaría de recursos pesqueros. (4 de Mayo de 2012). *Peces pelágicos grandes y tiburones*. Recuperado el 17 de Abril de 2014, de Estadísticas de Pesca Globales de Todos los Puertos del Ecuador: <http://tiburon.viceministerioap.gob.ec/tiburon-ecuador/estadisticas-globales-por-mes-todos-los-puertos-264.html>
- Swing, K. (2011). *¿Estamos acabando con los tiburones?* Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Quito.
- Tricas, T., Deacon, K., Last, P., McCosker, J. E., Walker, T., & Taylor, L. (1997). *Sharks & Rays*. Londres, UK: Harper Collins Publishers.
- Tyus, H. (2012). *Ecology and Conservation of Fishes*. Boca Raton, Florida, USA: Taylor and Francis Group.
- Vaca, L. (2011). *Peritaje Técnico- biológico B/P FER MARY I*. San Cristóbal, Ecuador.
- Vannuccini, S. (1999). *Shark utilization marketing and trade*. FAO Fisheries Technical Paper No.389. Roma: FAO.
- Vasconcellos, M., & Cardia, F. (2008). *Desarrollo de capacidades - Tiburones*. Recuperado el 27 de Abril de 2014, de Departamento de Pesca y Acuicultura: <http://www.fao.org/fishery/topic/16380/es>
- Vega, R. (2012). *Explotación de tiburones pelágicos: Pesca incidental y práctica de aleteo*. Chile: Oceana.

12 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'AGAAAGTGG AGCGACTGT CTTCGCC3'	929	Shijvi et al. (2002)
<i>Carcharhinus falciformis</i>	Primer silky	Silky	Tiburón mico o sedoso	5'ACCGTGTG GGCCAGGGG TC 3'	1085	Shijvi et al. (2002)
<i>Carcharhinus galapagensis</i>	Primer dusky	Galapagos	Tiburón Galapagos	5'GTGCCTTC CCACCTTTG GCG3'	480	Pank et al. (2001)
<i>Sphyrna lewini</i>	ScHH401F	Scalloped hammerhead	Tiburón martillo, cachuda roja	5'GGTAAAGG ATCCGCTTT GCTGGA3'	445	Abercrombie et al. (2005)
<i>Sphyrna zygaena</i>	SmHH630F	Smooth hammerhead	Tiburón martillo, cachuda blanca	5'TGAGTGCT GTGAGGGCA CGTGGCCT3'	249	Abercrombie et al. (2005)
<i>Sphyrna mokarran</i>	GtHH123F	Great hammerhead	Tiburón martillo	5'AGCAAAGA GCGTGGCTG GGGTTTCGA 3'	782	Abercrombie et al. (2005)
<i>Alopias superciliosus</i>	Bigeye thresher 272F	Bigeye thresher	Tiburón rabón amargo	5'AGTGCTTG ACCATTCGG TGTGCGT3'	ca1000	Abercrombie (2004)
<i>Alopias vulpinus</i>	Common thresher 792F	Thresher	Tiburón rabón	5'TTCCGTCTC CTTCCACAC GTCGAGT3'	601	Abercrombie (2004)
<i>Alopias pelagicus</i>	Common thresher 1048F	Pelagic thresher	Tiburón rabón bueno	5'CCGGCCAT GCCTTCTGC AACTTG3'	385	Abercrombie (2004)
<i>Alopias pelagicus</i>	Pelagic thresher 1113F	Pelagic thresher	Tiburón rabón bueno	5'CAAGCCTT GCACTTTCG AATGAAGC 3'	230	Abercrombie (2004)
<i>Isurus oxyrinchus</i>	Shortfin mako 575F	Shortfin mako	Tiburón tinto	5'AGGTGCCT GTAGTGCTG GTAGACACA 3'	771	Shijvi et al. (2002)
<i>Universal FISH5.8SF</i>	Universal FISH5.8SF	-	-	5'TTAGCGGT GGATCACTC GGCTCGT3'	F. Sphyrnidae (SZ): 860	Pank et al. (2001)
<i>Universal FISH28SR</i>	Universal FISH28SR	-	-	5'TCCTCCGC TTAGTAATA TGCTAAAT TCAGC3'	F. Carcharinidae (PG/CF/CG): 1470 F. Lamnidae (IO): 1350 F. Alopiidae (AP): 1200	Pank et al. (2001)

Tabla 2 Lista de los mercados de Quito de donde se obtuvieron las muestras de carne de pescado para la investigación organizadas por grupos. Los grupos se realizaron en base a su ubicación en el Distrito Metropolitano de Quito (Norte, Centro, Sur)

Mercados y Pescaderías				
Grupo 1	Iñaquito (I)	Santa Clara (St)		
Grupo 2	Cotocollao (C)	Kennedy (K)	Rumiñahui (R)	
Grupo 3	Central (Ce)	América (A)	Magdalena (Mg)	San Roque (SR)
Grupo 4	Carapungo (Car)	Calderón (Cal)		
Pescadería	Cotocollao (PC)	América (PA)	Cumbayá (PCu)	

Tabla 3 Fechas de colección de muestras de carne de pescado de los distintos grupos de mercados de Quito.

Grupo	Colecta 1	Colecta 2	Colecta 3
Grupo 1	2013-05-21	2013-06-23	2013-07-21
Grupo 2	2013-05-26	2013-06-30	2013-07-21
Grupo 3	2013-06-09	2013-07-07	2013-07-28
Grupo 4	2013-06-13	2013-07-14	2013-08-04
Pescaderías	2013-09-11	2013-09-18	

13 Figuras

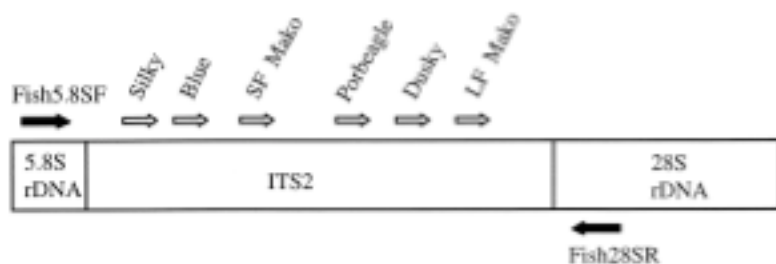


Figura 1 Esquema representativo de la región ITS2 de rDNA de tiburón. Representación esquemática de los genes nucleares ribosomales de tiburón 5.8S y 28S y el locus ITS2, mostrando los sitios de annealing y la orientación de los primers utilizados en los ensayos de PCR. Los primers universales de tiburón (FISH5.8SF y FISH28SR) se muestran con flechas negras. El primer de silky (flecha blanca) es un ejemplo de un primer especie-específico. Tomado de Shijvi et al. (2002).

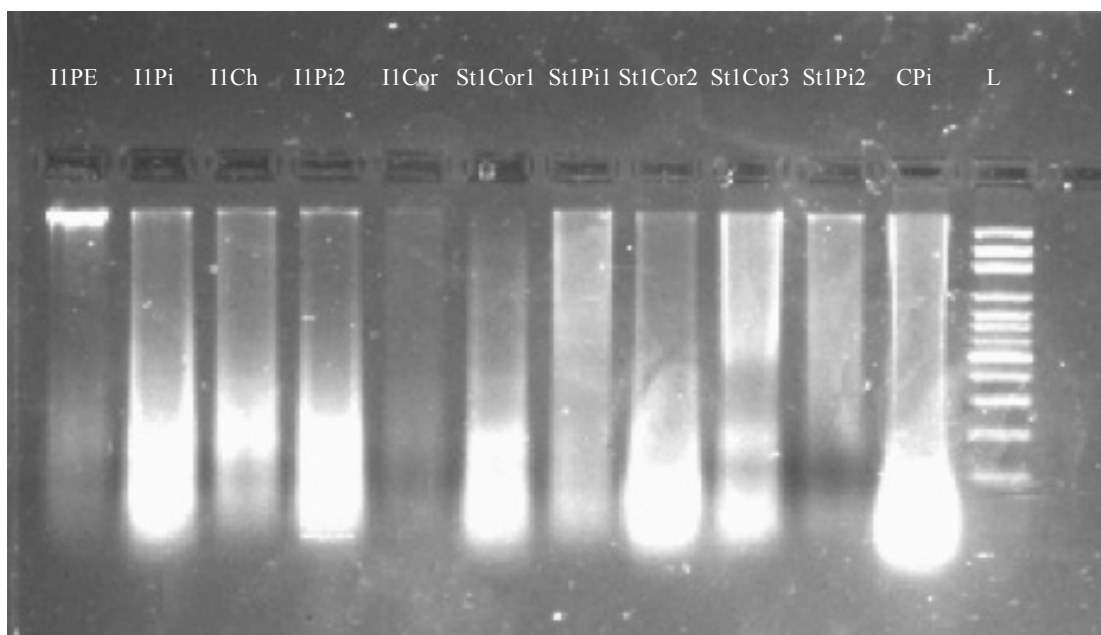


Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de muestras de ADN genómico extraído a partir de tejido muscular de pescado. Las muestras I1PE, I1Pi, I1Ch, I1Pi2, St1Pi1, St1Cor3, y St1Pi2 presentan una banda definida en la parte superior del gel de agarosa; y las muestras I1Cor, St1Cor1, St1Cor2 y CPi no presentan una banda definida. I: mercado Iñaquito; St: mercado Santa Clara; C: mercado Cotocollao; PE: pez espada; Pi: picudo; Ch: cherna; Cor: corvina. L: Ladder 100bp (Invitrogen).

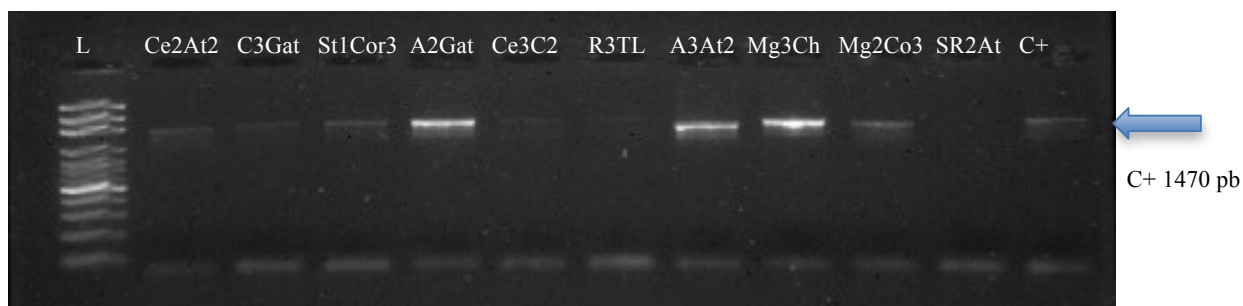


Figura 3 PCR simple con los primers universales ITS2. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación con los primers universales ITS2 (FISH 5.8SF y FISH 28SR) se observan diferentes intensidades. Carril 1: L, ladder 100pb (Invitrogen), 2-11: muestras de carne de pescado. Carril 12: control positivo.

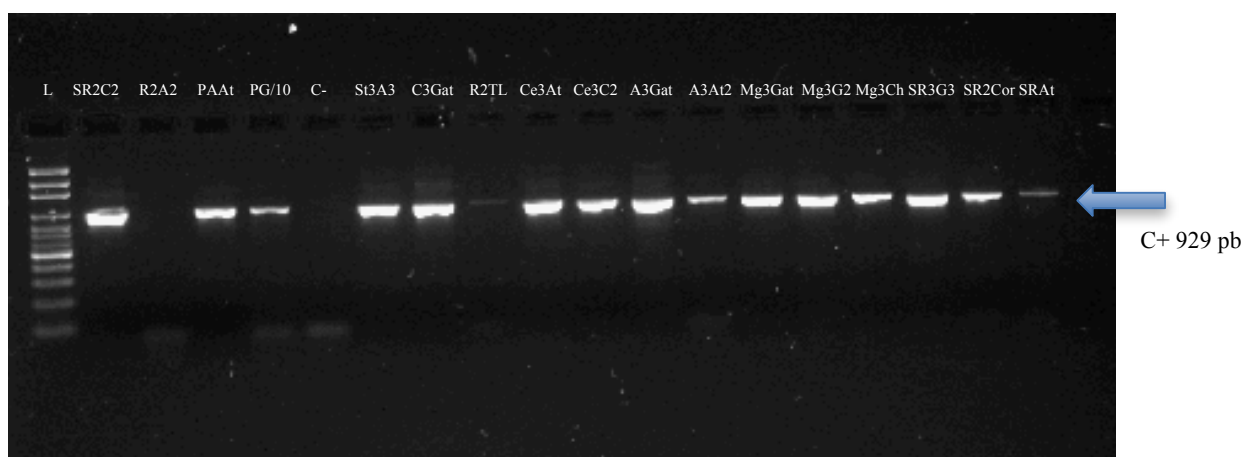


Figura 4 PCR simple para *Prionace glauca*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación con el primer Blue (929 pb) y el primer FISH 28SR universal. Se observa diferentes intensidades de bandas para los productos de amplificación. Carril 1: L, ladder 100pb (Invitrogen). Carril 5: control positivo PG/10. Carril 6: C-, control negativo, agua. Muestras identificadas como *P. glauca*: SR2C2, PAAAt, St3A3, C3Gat, R2TL, Ce3At, Ce3C2, A3Gat, A3At2, Mg3Gat, Mg3G2, Mg3Ch, SR3G3, SRCor, SRAAt.

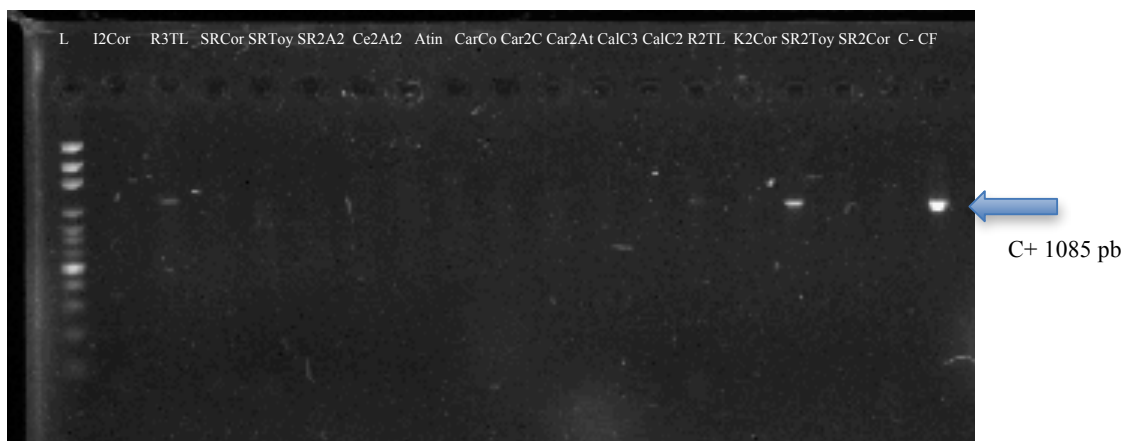


Figura 5 PCR simple para *Carcharhinus falciformis*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación con los primers Silky (1085 pb) y el primer FISH 28SR universal se observa diferentes intensidades. Carril 1: L, ladder 100pb (Invitrogen), Carriles: 2-17: Muestras de tiburón. Carril 18: control negativo, agua. Carril 19: control positivo, CF/23 Muestra de tiburón perteneciente a la especie *C. faciformis*:R3TL, SR2Toy.

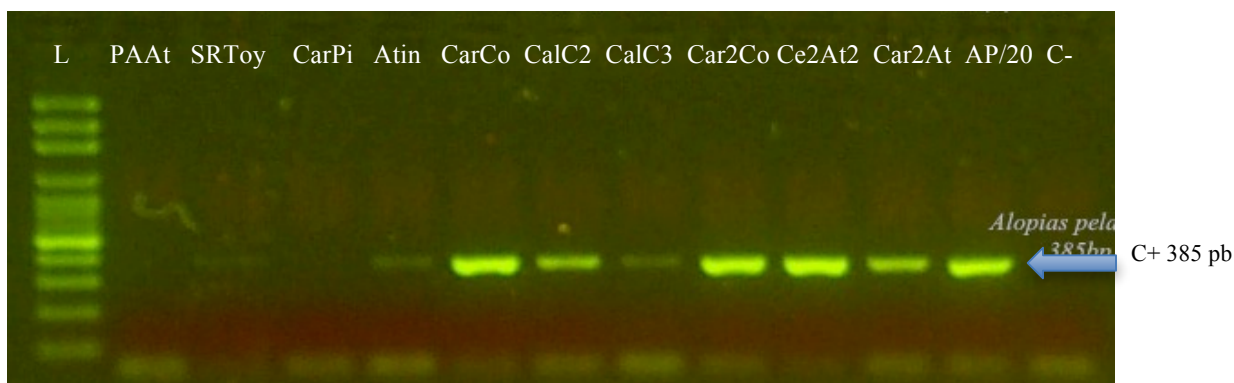


Figura 6 PCR simple para *Alopias pelagicus*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación con el primer Common Thresher (385 pb) y el primer FISH 28SR universal en diferentes intensidades. Carril 1: L; ladder 100pb (Invitrogen), Carriles 2-11: Muestras de tiburón; Carril 12: Control positivo, AP/20. Carril 13: Control negativo, agua. Muestras pertenecientes a *A. pelagicus*: SRTToy, Atin, CarCo, CalC2, CalC3, Car2Co, Ce2At2, Car2At.

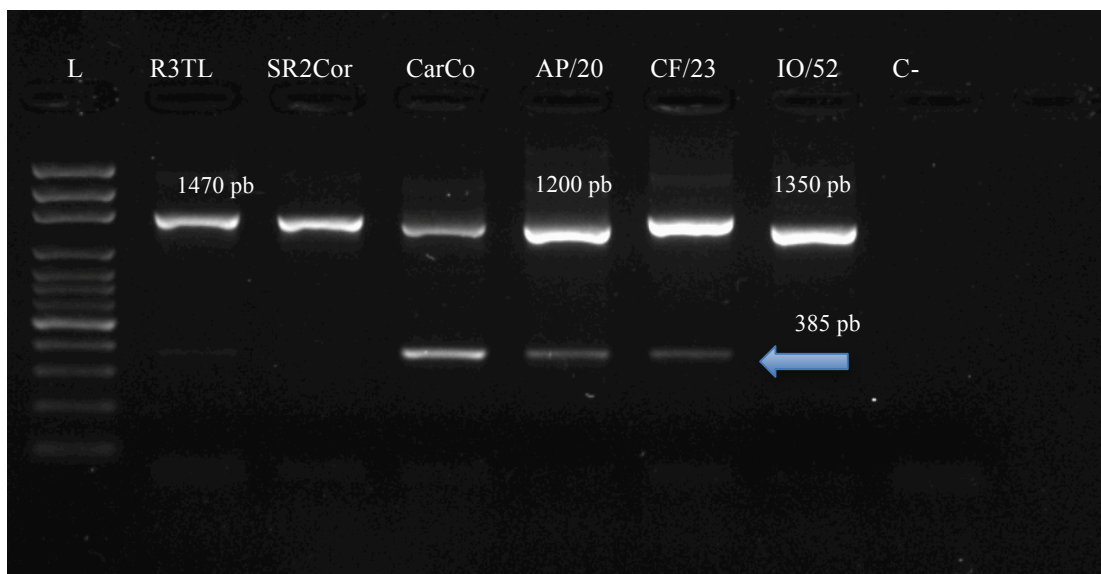


Figura 7 PCR triple para *Alopias pelagicus*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación con los primers universales ITS2 (1200 pb), y del primer forward de especificidad cercana para *Alopias pelagicus* junto con el primer reverse universal (385 pb). Carril 1: L, ladder 100pb (Invitrogen), Carriles 2-4: muestras de tiburón. Carril 5: control positivo para *A. pelagicus*, AP/20. Carril 6: control positivo para especie *C. faciformis*, CF/23. Carril 7: control positivo para primers universales, IO/52. Carril 8: control negativo, agua. Muestras identificadas como tiburones: R3TL, SR2Cor, y CarCo. Muestras identificadas como *A. pelagicus*: CarCo.



Figura 8 PCR cuádruple para *Carcharhinus falciformis* y *Prionace glauca*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación utilizando los primers universales de tiburón (1470 bp) y los primers especie-específico para *Carcharhinus falciformis* (1085 pb) y *Prionace glauca* (929 bp) Carril 1: ladder 100pb (Invitrogen); 2-8: Muestras de tiburón. Carril 9: Control positivo para *Carcharhinus falciformis*, CF/23. Carril 10: control positivo para primers universales, IO/52. Carril 11: control positivo para *Prionace glauca*, PG/10. Muestras identificadas como *P. glauca*: KCo, St1Co3. Muestras identificadas como *C. faciformis*: SR2Toy, R3TL y PC2Dor.

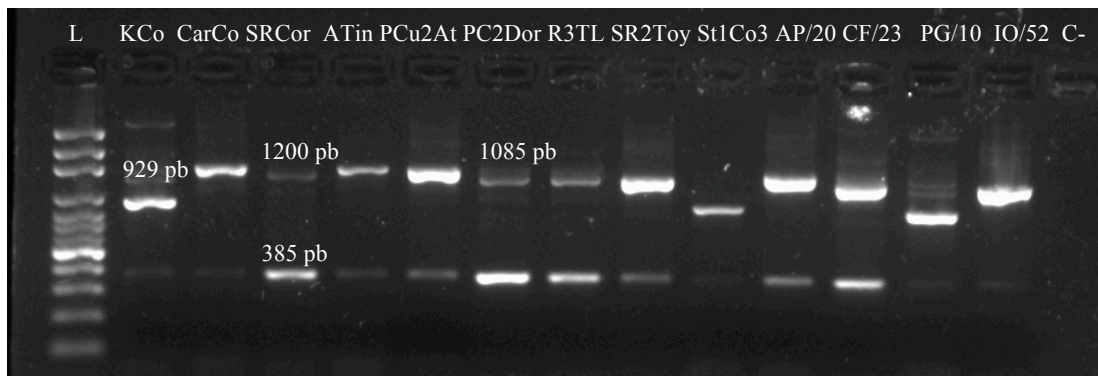


Figura 9 PCR quintuple para las especies *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis* y *Prionace glauca*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación utilizando los primers universales de tiburón y los primers especie-específicos para (Common thresher) *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis* y *Prionace glauca*. Carril 1: ladder 100pb (Invitrogen). Carriles 2-10: muestras de tiburón. Carril 11: control positivo para *A. pelagicus*, AP/20. Carril 12: control positivo para *C. faciformis*, CF/23. Carril 13: control positivo para *P. glauca*, PG/10. Carril 14: control positivo para primers universales, IO/52. Carril 15: control negativo, agua. Muestras identificadas como *P. glauca*: KCo, St1Cor3. Muestras identificadas como *C. faciformis*: PC2Dor, R3TL, y SR2Toy. Muestras identificadas como *A. pelagicus*: CarCo, SRCor, y ATin.

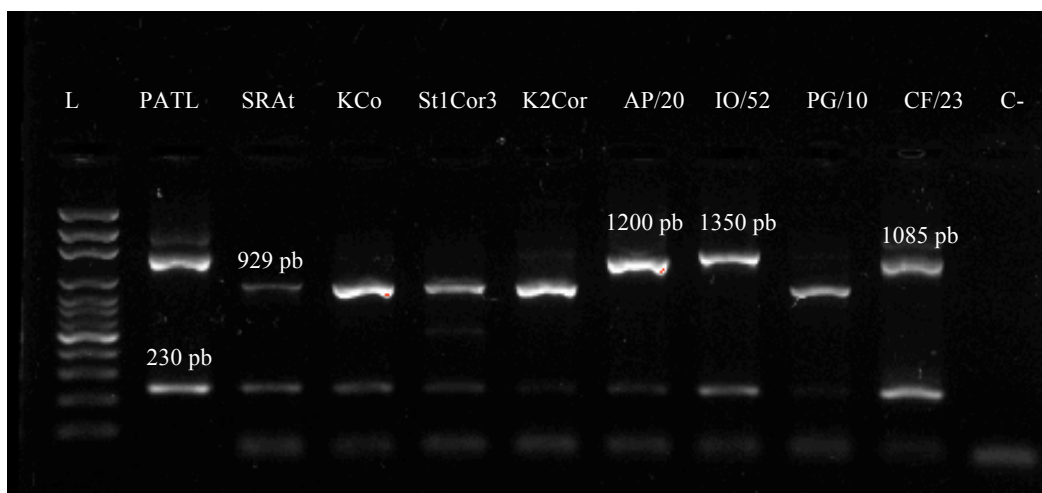


Figura 10 PCR quintuple para las especies *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis* y *Prionace glauca*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación utilizando los primers universales de tiburón y los primers especie-específicos para (Pelagic thresher) *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis* y *Prionace glauca*. Carril 1: ladder 100pb (Invitrogen). Carriles 2-6: muestras de tiburón. Carril 6: control positivo para *A. pelagicus*, AP/20. Carril 7: control positivo para primers universales, IO/52. Carril 8: Control positivo para *P. glauca*, PG/10. Carril 9: control positivo para *C. faciformis*, CF/23. Carril 10: Control negativo, agua. Muestras identificadas como *P. glauca*: SRAt, KCo, St1Cor3, y K2Cor. Muestras identificadas como *C. faciformis*: ninguna. Muestras identificadas como *A. pelagicus*: PATL.

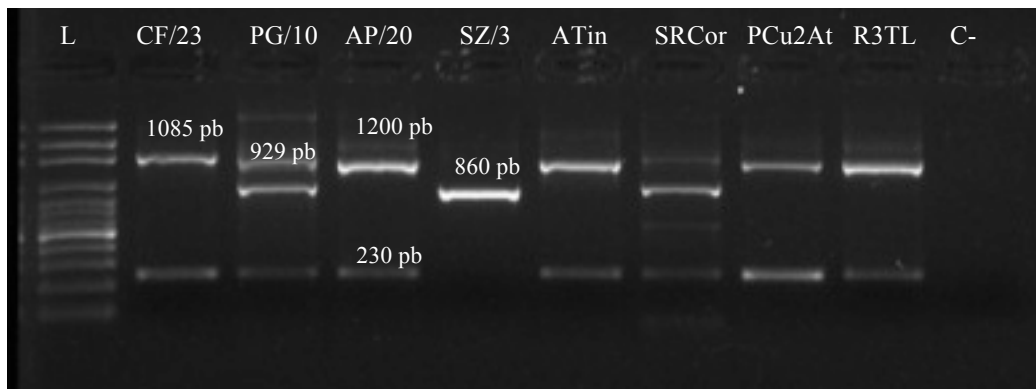


Figura 11 PCR quíntuple para las especies *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis* y *Prionace glauca* con el primer resintetizado Pelagic Thresher 1113F (annealing 68°C). Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación utilizando los primers universales de tiburón y los primers especie-específicos para (Pelagic thresher) *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis* y *Prionace glauca*. Carril 1: ladder 100pb (Invitrogen). Carril 2: control positivo para *C. falciformis*, CF/23; Carril 3: Control positivo para *P. glauca*, PG/10; Carril 4: control positivo para *A. pelagicus*, AP/20; Carril 5: control positivo para primers universales, SZ/3. Carril 6-9: muestras de tiburón. Carril 10: Control negativo, agua. Muestras identificadas como *P. glauca*: SRCor. Muestras identificadas como *C. faciformis*: PCu2At y R3TL. Muestras identificadas como *A. pelagicus*: ATin.

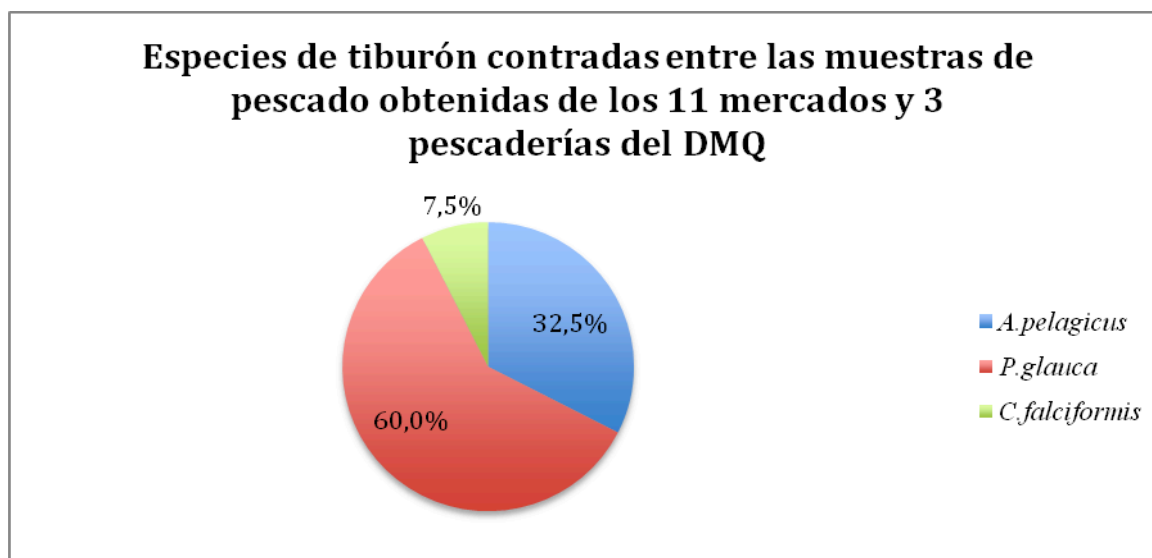


Figura 12 Especies de tiburón encontradas entre las muestras colectadas de los 11 mercados y 3 pescaderías del DMQ.

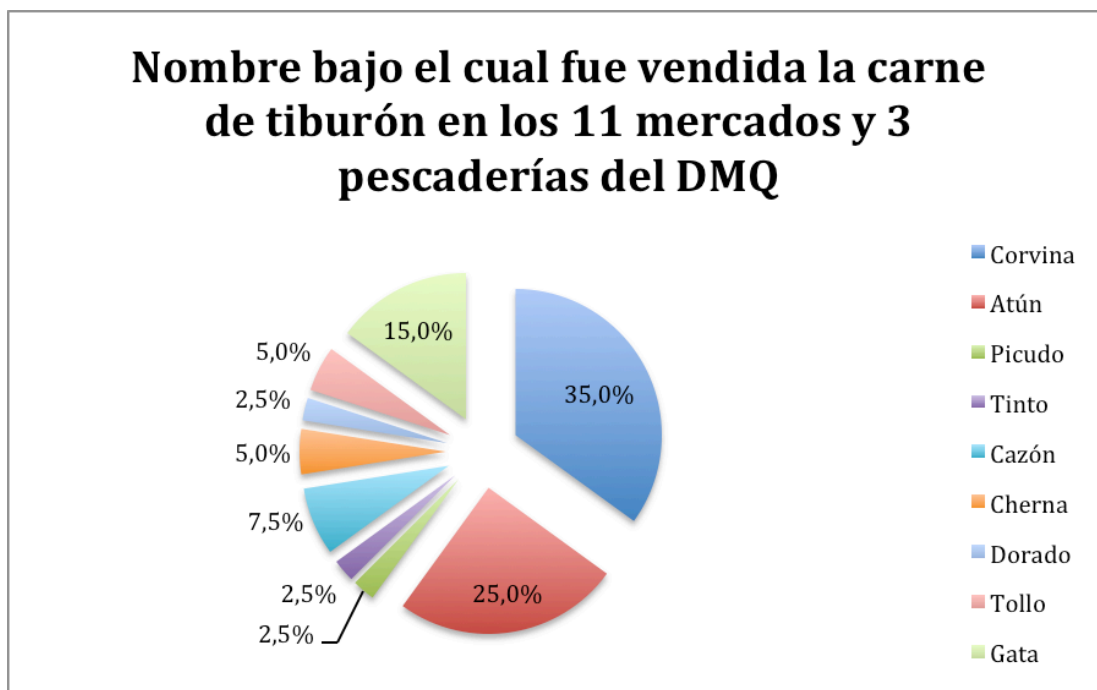


Figura 13 Proporción de los nombres bajo los cuales se vendió la carne de tiburón en los 11 mercados y 3 pescaderías del DMQ.

14 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 adquiera 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 Código de las muestras colectadas en los 11 mercados y 3 pescaderías del Distrito Metropolitano de Quito.

	Mercado	Visita	Código de muestra	Etiquetado	Especie de tiburón
1	Iñaquito	1	I1PE	Pez espada	
2			I1Pi	Picudo	
3			I1Ch	Cherna	
4			I1Pi2	Picudo	
5			I1Cor	Corvina	
6		2	I2Cor	Corvina	
7			I2Cor2	Corvina	
8			I2Ch	Cherna	
9			I2Pi	Picudo	
10		3	I3Cor	Corvina	
11			I3C2	Corvina	
12			I3C3	Corvina	
13			I3Pi	Picudo	
14			I3P2	Picudo	
15	Santa Clara	1	St1Cor1	Corvina	
16			St1Pi1	Picudo	
17			St1Cor2	Corvina	
18			St1Cor3	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
19			St1Pi2	Picudo	
20		2	St2Cor	Corvina	
21			St2Co2	Corvina	
22			St2Co3	Corvina	
23			St2Pi	Picudo	

24		3	St3At	Atún	
25			St3A2	Atún	
26			St3A3	Atún	<i>Prionace glauca</i>
27			St3Pi	Picudo	
28			St3P2	Picudo	
29	Cotocollao	1	CPi	Picudo	
30			CCo	Corvina	
31			CCo2	Corvina	
32			CPi2	Picudo	
33		2	C2Pi	Picudo	
34			C2Cor	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
35			C2Ch	Cherna	<i>Prionace glauca</i>
36			C2Cor2	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
37		3	C3At	Atún	
38			C3A2	Atún	
39			C3Gat	Gata	<i>Prionace glauca</i>
40			C3Pi	Picudo	
41			C3P2	Picudo	
42	Kennedy	1	Kco	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
43			KPS	Pez espada	
44		2	K2Gat	Gata	
45			K2Cor	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
46		3	K3Cor	Corvina	
47			K3At	Atún	
48	Rumiñahui	1	Rat	Atún	
49			Rpi	Picudo	
50		2	R2TL	Cazón	<i>Prionace glauca</i>
51		3	R3TL	Cazón	<i>Carcharhinus</i>

					<i>falciformis</i>
52			R3At	Atún	
53			R3A2	Atún	
54	América	1	Atin	Tinto	<i>Alopias pelagicus</i>
55			Atoy	Tollo	
56			Acor	Corvina	
57			ATB	Cazón	
58		2	A2Cor	Corvina	
59			A2Pi	Picudo	
60			A2P2	Picudo	
61			A2At	Atún	
62			A2At2	Atún	
63		3	A3At	Atún	
64			A3At2	Atún	<i>Prionace glauca</i>
65			A3TL	Cazón	
66			A3Pi	Picudo	
67			A3Gat	Gata	<i>Prionace glauca</i>
68	Central	1	CeCo	Corvina	
69			CeAt	Atún	
70		2	Ce2At	Atún	
71			Ce2Cor	Corvina	
72			Ce2Pi	Picudo	
73			Ce2At2	Atún	<i>Alopias pelagicus</i>
74			Ce2At3	Atún	
75		3	Ce3Cor	Corvina	
76			Ce3C2	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
77			Ce3At	Atún	<i>Prionace glauca</i>
78			Ce3A2	Atún	

79			Ce3A3	Atún	
80	Magdalena	1	MaCh	Cherna	
81			MaCo	Corvina	
82		2	Mg2At	Atún	
83			Mg2Pi	Picudo	
84			Mg2Cor	Corvina	
85			Mg2Co2	Corvina	
86			Mg2Co3	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
87		3	Mg3Gat	Gata	<i>Prionace glauca</i>
88			Mg3G2	Gata	<i>Prionace glauca</i>
89			Mg3Pi	Picudo	
90			Mg3Ch	Cherna	<i>Prionace glauca</i>
91			Mg3At	Atún	
92	Calderón	1	CalCo	Corvina	
93			CalC2	Corvina	<i>Alopias pelagicus</i>
94			CalC3	Corvina	<i>Alopias pelagicus</i>
95			CalPi	Picudo	
96		2	Cal2Pi	Picudo	
97			Cal2Pi2	Picudo	
98			Cal2Pi3	Picudo	
99			Cal2Cor	Corvina	
100			Cal2Co2	Corvina	
101		3	Cal3Pi	Picudo	
102			Cal3At	Atún	
103			Cal3Cor	Corvina	
104			Cal3Dor	Dorado	
105			Cal3An	Angelote	
106	Carapungo	1	CarCo	Corvina	<i>Alopias pelagicus</i>

107			CarH	Huajú	
108			CarC2	Corvina	
109			CarPi	Picudo	<i>Prionace glauca</i>
110		2	Car2At	Atún	<i>Alopias pelagicus</i>
111			Car2Co	Corvina	<i>Alopias pelagicus</i>
112			Car2Pi	Picudo	
113			Car2Pi2	Picudo	
114			Car2H	Huajú	
115		3	Car3Pi	Picudo	
116			Car3At	Atún	
117			Car3A2	Atún	
118			Car3A3	Atún	
119			Car3Gat	Gata	
120	San Roque	1	SRGat	Gata	<i>Prionace glauca</i>
121			SRToy	Tollo	<i>Alopias pelagicus</i>
122			SRAt	Atún	<i>Prionace glauca</i>
123			SRPi	Picudo	
124			SRCor	Corvina	<i>Alopias pelagicus</i>
125		2	SR2Cor	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
126			SR2C2	Corvina	<i>Prionace glauca</i>
127			SR2At	Atún	
128			SR2A2	Atún	<i>Alopias pelagicus</i>
129			SR2Toy	Tollo	<i>Carcharhinus falciformis</i>
130		3	SR3Pi	Picudo	
131			SR3Cor	Corvina	
132			SR3Gat	Gata	
133			SR3G2	Gata	

134			SR3G3	Gata	<i>Prionace glauca</i>
135	Pescadería Condado	1	PCPi	Picudo	
136			PCCher	Cherna	
137			PCCor	Corvina	
138			PCDor	Dorado	
139		2	PC2Dor	Dorado	<i>Carcharhinus falciformis</i>
140			PC2At	Atún	<i>Alopias pelagicus</i>
141			PC2Pi	Picudo	
142			PC2PEs	Pez espada	
143	Pescadería Cumbayá	1	PCuPi	Picudo	
144			PCuPEs	Pez espada	
145			PCuCor	Corvina	
146		2	PCu2At	Atún	<i>Alopias pelagicus</i>
147			PCu2ATB	Atún	
148			PCu2Pi	Picudo	
149	Pescadería América	1	PATL	Cazón	<i>Alopias pelagicus</i>
150			PAPi	Picudo	
151			PAAt	Atún	<i>Prionace glauca</i>
152		2	PA2At	Cazón	
153			PA2TL	Cazón	
154			PA2Pi	Picudo	

Anexo 4 Cuantificación y determinación de calidad de ADN de las muestras colectadas

Código de muestra	Concentración de ADN (ng/ul)	A260/A280	A260/A230
I1PE	23,5	1,77	1,12
I1Pi	19,1	2,02	0,53
I1Ch	16,5	2,18	2,24
I1Pi2	12,8	2,27	2,14
I1Cor	22,1	2,09	0,93
ST1Cor1	11,3	2,06	2,19
ST1Pi1	75,1	2	1,5
ST1Cor2	20,7	2,13	1,72
ST1Cor3	21,5	2,06	1,36
ST1Pi2	19,5	2,04	1,23
CCO	94,1	2,13	8,28
CPi2	387,6	2,08	2,34
CCo2	198,6	2,13	3,68
CPi	120,4	2,12	6,9
KPS	231,3	2,15	2,25
KCO	55,3	2,28	1,95
RAT	285,9	1,99	2,21
RPi	151,7	2,09	5,99
MACH	751,6	1,99	1,69
Atin	502,6	1,98	1,55
MaCo	292,3	2,01	1,49
CeCo	858,4	2,02	1,83
ACor	918,5	2,06	1,72
Atoy	476	2,05	1,77

ATB	1128,4	2,03	1,78
CeAt	776,7	1,94	1,66
CalPi	180,3	2,07	2,11
CalC3	37,4	2,03	1,84
CarH	363,7	2,1	1,96
CarCo	165,8	1,99	1,84
CarC2	151,7	2,06	1,97
CarPi	1348	2,06	1,96
CalC2	306,9	2,02	1,92
CalCo	411,4	2,01	1,63
St2Cor	39	2,05	1,7
St2Co3	37,8	2,03	2,1
I2Pi	370,5	2,07	1,94
I2Co2	104,5	2,05	1,94
I2Cor	85	2,04	1,79
St2Pi	93,9	2,05	1,95
St2Co2	379,3	1,97	1,69
I2Ch	325	2,09	2,2
C2Pi	257,6	2,1	2,23
C2Cor	1771,7	2,07	2,02
C2Cor2	1696,6	2,01	1,96
C2Ch	560,1	2,03	1,99
K2Cor	778,4	2,05	2,17
K2Gat	943,5	2,06	2,08
R2TL	1103,6	2,11	2,36
SRToy	1305,7	2,09	2,11
SRCor	481,4	2,1	2,15
SRPi	777,3	2,01	1,86

SRGa	272,3	2,07	2,24
SRA _t	156,2	2,06	1,98
Ce ₂ At	2031,3	2,09	2,02
Ce ₂ At ₂	86,4	2,15	1,46
Ce ₂ Cor	1695,3	2,08	1,84
Ce ₂ Pi	295,4	2,15	1,84
Ce ₂ At ₃	147,1	2,15	1,79
A ₂ Cor	448,4	2,01	1,21
A ₂ Pi	137,3	2,09	0,92
A ₂ P ₂	890,8	2,07	1,28
A ₂ At	113,8	2,07	0,71
A ₂ At ₂	189	2,08	1,54
Mg ₂ Cor	205	2,09	1,46
Mg ₂ At	152,5	2,05	1,39
Mg ₂ Pi	332,9	1,96	0,99
Mg ₂ Co ₃	335,2	2,01	1,18
Mg ₂ Co ₂	2364,4	2,09	1,95
Ca ₂ Cor	295,2	2,07	1,12
Ca ₂ Pi	602,6	2,09	1,31
Ca ₂ Co ₂	464	2	1,35
Ca ₂ Pi ₂	281,5	2,09	1,51
Ca ₂ Pi ₃	677,9	2,02	1,42
Ca ₂ Co	85,1	1,95	0,72
Ca ₂ Pi	179,8	1,73	0,77
Ca ₂ Pi ₂	496,9	2,21	1,08
Ca ₂ At	254,4	1,94	0,88
Ca ₂ H	368,9	1,98	0,95
I ₃ Cor	47,1	1,77	0,28

I3C2	882,4	2,11	1,5
I3C3	2234,5	2,13	1,97
I3Pi	1046,6	2,12	1,54
I3P2	1020,1	2,13	1,73
St3At	498,6	2,16	1,32
St3A2	452,8	2,14	1,84
St3A3	779,9	2,13	1,75
St3Pi	600,1	2,03	1,57
St3P2	722,1	2,15	1,67
C3At	1701	2,13	2,09
C3A2	1823,7	2,15	2,1
C3Gat	789,6	1,96	1,61
C3Pi	1025,2	2,1	1,78
C3P2	724,6	2,15	1,58
K3Cor	1151,9	2,12	2,07
K3At	789,2	2,15	1,35
R3TL	1650,4	2,07	1,95
R3At	675,9	2,12	2,12
R3A2	780,8	2,09	1,67
A3At	317,7	1,89	0,74
A3At2	629,4	1,97	1,55
A3TL	1217,7	2,1	1,51
A3Pi	1006,6	1,96	0,99
A3Gat	797,6	2,1	1,73
Ce3At	1606,4	2,09	1,81
Ce3Cor	1304,7	1,84	0,95
Ce3A3	1531,4	1,91	0,98
Ce3A2	1340,1	2,04	1,39

Ce3C2	784,4	1,91	1,08
Mg3Gat	989,6	2	1,22
Mg3Ch	706,3	1,95	1,31
Mg3Pi	499,8	1,84	0,76
Mg3At	696,8	1,92	1,2
Mg3G2	884,6	1,92	1,07
SR2C2	854,1	2,01	1,6
SR2At	547,6	2,06	1,37
SR2Cor	907,7	1,95	1,21
SR2Toy	878,5	1,96	1,29
SR2A2	331,3	1,8	0,84
SR3Pi	553,1	1,86	0,85
SR3Cor	1084,7	1,99	1,26
SR3Gat	671,3	2,02	1,39
SR3G2	557	2,11	2,17
SR3G3	250,6	1,98	1,03
Car3Pi	392	1,26	0,43
Car3At	387,6	1,85	0,9
Car3A2	320,3	1,86	0,74
Car3A3	209,2	1,82	0,69
Car3Gat	622,7	1,82	0,93
Cal3Pi	621,7	2,13	1,15
Cal3At	625,8	1,9	0,92
Cal3Cor	602,7	2,16	0,91
Cal3Dor	800,7	2,02	1,26
Cal3An	302,9	1,76	0,53
PCuPi	1614	2,11	1,99
PCuPEs	709,4	1,97	1,18

PCuCor	261,2	1,91	0,79
PCPi	1095,1	2,04	1,34
PCCher	388,6	2,13	1,69
PCCor	364,9	1,97	1,03
PCDor	249,9	1,94	1,02
PATL	1343,1	2,09	1,69
PAPi	580	1,9	0,71
PAAt	362,7	2,11	1,19
PCu2At	891,3	2,09	1,82
PCu2ATB	517,5	1,95	1,2
PCu2Pi	413,1	2	0,64
PA2At	373	2,11	1,31
PA2TL	653	2	1,25
PA2Pi	431,1	2,15	1,49
PC2Dor	737,2	2,15	2,15
PC2At	493,5	2,1	1,61
PC2Pi	530,3	2,11	1,77
PC2PEs	554,2	2,03	1,62