

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Licenciatura en Biología con énfasis en Biología Molecular y Biotecnología

**Validación de dos metodologías moleculares
para la identificación del pez Vela (*Istiophorus
platypterus*), pez espada (*Xiphias gladius*), marlines
(*Makaira nigricans*, *Kajikia* sp.) y Atún (*Thunnus
sp.*) en Costa Rica**

Proyecto Final de Graduación

Cipriano Manuel Ardón Quesada
A40428

San José, Diciembre 2017

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de Graduación presentado a la Escuela de Biología como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Biología Molecular y Biotecnología

Elaborado por:

Cipriano Manuel Ardón Quesada

Aprobado por:

Dr. Javier Trejos Zelaya
Presidente del Tribunal Examinador

Ph. D. Eric Fuchs Castillo
Director del Proyecto

M. Sc. Juan Miguel Cordero Solórzano
Asesor del Proyecto

Ph. D. Gustavo A. Gutiérrez Espeleta
Asesor del Proyecto

Dra. Helena Molina Ureña
Miembro del Tribunal Designado

RESUMEN

Se ha visto una disminución en las poblaciones de picudos durante los últimos años en las costas de Costa Rica, como respuesta, el gobierno ha prohibido la pesca comercial y la exportación de la especie más afectada, el pez vela (*Istiophorus platypterus*). Aún tras dicha prohibición, se cree que la exportación ilegal del pez vela continúa tras la dificultad de identificar a la especie una vez fileteada y procesada, por lo que el control sobre estas ilegalidades se hace difícil con las metodologías convencionales. Surge entonces la necesidad de métodos más eficientes, exactos y que puedan ser utilizados en un juzgado como evidencia válida. Para poder solucionar este problema se tiene como objetivo en este estudio el reconocimiento y análisis de dos metodologías de identificación molecular para esta especie y especies afines de mayor abundancia e interés comercial. Se utilizó un PCR Multiplex de la región control mitocondrial (D-Loop) y un PCR RFLP para el gen mitocondrial de la subunidad I de la enzima citocromo *c* oxidasa (COI), donde se planteó como estándar oro la secuenciación del gen COI. Ambas metodologías resultaron ser idóneas con el 100% de muestras identificadas correctamente para *I. platypterus*, *X. gladius*, *M. nigricans*, *Kajikia* sp. y *Thunnus* sp., pero con marcadas diferencias en cuanto a costos y tiempo de procesamiento. Se seleccionó al PCR Multiplex como la metodología recomendada debido a su menor costo de tiempo y dinero. El estudio filogenético mostró una concordancia con la clasificación taxonómica aceptada actualmente y no se obtuvieron subgrupos. Tanto el PCR Multiplex como el PCR RFLP se validaron como herramienta de identificación para su posible uso en un juzgado en casos de exportación ilegal.

Palabras clave: *Istiophorus platypterus*, PCR Multiplex, PCR RFLP, COI, D-Loop, validación de metodologías, identificación molecular, picudos.

DEDICATORIA

A mis padres, que siempre me impulsaron
y tuvieron fe en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, personas ejemplares y únicas, por estar siempre ahí conmigo; por enseñarme, impulsarme, ayudarme, y tener fe en mí. A mis hermanos por siempre estar presentes de una u otra forma, tratarme como un hermano más y toda su ayuda a lo largo de mi vida. A Andrea Induni Vizcaíno que me ha apoyado incondicionalmente; ella me ha enseñado mucho durante estos años y ha sido paradigma de consecuencia y calidad humana estando a mi lado en todo momento, siempre comprensiva y amorosa.

También agradezco a mis profesores y amigos que tanto me han enseñado y me han acompañado en todos estos años. A todos los miembros de mi comité, en especial a Eric Fuchs Castillo cuyas correcciones fueron muy importantes.

A todas las personas de SENASA que hicieron esto posible, especialmente a todo el personal del Laboratorio de Bioseguridad, que me ayudaron tanto y que pasaron de ser compañeros de trabajo a amigos de siempre. Debo destacar a Bernal León Rodríguez, a quien considero una persona dedicada, comprometida e incansable; quien me dio la oportunidad de realizar este proyecto y de formar parte de este grupo de personas excepcionales. De igual manera, extendiendo un cordial reconocimiento para Juan Miguel Cordero Solórzano, quien ha estado conmigo a cada paso de esta investigación, siempre enseñándome con paciencia y buen humor, lo admiro como profesional y como amigo.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1. Revisión de literatura	6
1.1. Historia Evolutiva y Filogenia	6
1.2. Distribución Geográfica	10
1.3. Hábitat y Nicho Ecológico	11
1.4. Morfología	12
1.5. Impacto Económico	13
1.6. Situación Actual	14
1.7. Problemática Actual	16
1.8. Identificación de especies	17
1.8.1. Identificación mediante Secuenciación	19
1.8.2. Identificación mediante PCR Multiplex	21
1.8.3. Identificación mediante el análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)	22
1.9. ADN mitocondrial (ADNmt)	23
1.9.1. Región control (D-Loop)	24
1.9.2. Gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI)	25
Capítulo 2. Justificación del estudio	26
Capítulo 3. Objetivos	27
3.1. Objetivo General	27
3.2. Objetivos específicos	27

Capítulo 4. Materiales y métodos	28
4.1. Recolección de muestras	28
4.2. Extracción de ADN.....	29
4.3. PCR Universal.....	29
4.4. Secuenciación.....	30
4.4.1. Amplificación	30
4.4.2. Purificación	31
4.4.3. Reacción de Secuenciación.....	31
4.4.4. Secuenciación y Análisis	32
4.5. PCR Multiplex	33
4.6. PCR RFLP	34
Capítulo 5. Resultados.....	40
5.1. PCR Multiplex	40
5.2. PCR RFLP	42
5.3. Secuenciación.....	44
5.4. Comparación entre Metodologías	49
Capítulo 6. Discusión	50
6.1. PCR Multiplex	50
6.2. PCR RFLP	52
6.3. Secuenciación.....	53
Capítulo 7. Conclusiones y Recomendaciones	55
Bibliografía	57

ANEXOS.....	68
Anexo 1. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos a partir de tejido animal y protocolo de lavado y elución del kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).....	68
Anexo 2. Cuantificación de ADN	69
Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa.....	69
Anexo 3.1. Para PCR Universal.....	69
Anexo 3.2. Para PCR Multiplex	70
Anexo 3.3. Para PCR RFLP	70
Anexo 4. Protocolo de extracción de Gel por microcentrífuga QIAquick (Qiagen).	71
Anexo 5. Protocolo del Big Dye Terminator Purification Kit (Applied Biosystems).	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores del gen COI utilizados en el PCR universal.	29
Cuadro 2. Perfil térmico de la reacción de PCR para la amplificación de COI.	30
Cuadro 3. Perfil térmico para la reacción de secuenciación.	32
Cuadro 4. Secuencia y características de los iniciadores a utilizar en el PCR Multiplex.	33
Cuadro 5. Perfil térmico del PCR multiplex para la amplificación de fragmentos específicos de la región control (D-Loop).	34
Cuadro 6. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para <i>Istiophorus platypterus</i>	35
Cuadro 7. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para <i>Xiphias gladius</i>	35
Cuadro 8. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para <i>Makaira nigricans</i>	35
Cuadro 9. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para <i>Kajikia audax</i>	36
Cuadro 10. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para <i>Kajikia albida</i>	36
Cuadro 11. Perfil térmico de digestión para las 7 enzimas utilizadas en el PCR RFLP.	38
Cuadro 12. Secuencias del gen COI para las cinco especies de picudo.	44
Cuadro 13. Comparación entre éxito, costo y tiempo de las 3 técnicas de identificación en el estudio.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organigrama para identificación del grupo o especie mediante PCR RFLP.....	37
Figura 2. Patrones de bandas de la región D-Loop por PCR Multiplex para todos los grupos...41	41
Figura 3. Patrones de bandas de la región D-Loop por PCR Multiplex para todos los grupos...42	42
Figura 4. Patrones de bandas para cada grupo/especie del gen COI por PCR RFLP.	43
Figura 5. Patrones de bandas para cada grupo/especie del gen COI por PCR RFLP.	43
Figura 6. Análisis filogenético del pariente más cercano (NJ) de las secuencias obtenidas y de referenciadel gen COI, basado en el parámetro de distancia K2P.....	48

INTRODUCCIÓN

Los peces de pico o picudos, son depredadores grandes que pertenecen al grupo de peces con aletas radiadas (clase Actinopterygii), estos a su vez pertenecen al suborden Xiphoidei, compuesto por dos familias: Istiophoridae y Xiphiidae. La familia Xiphiidae contiene un único género y una única especie (*Xiphias gladius*). Esta se caracteriza por una prominente mandíbula superior y la formación de un rostro o pico cuya sección transversal es plana en Xiphiidae y circular en Istiophoridae (García-Cortés, 2010). Las mismas familias incluyen seis géneros: *Istiophorus*, *Makaira*, *Istiompax*, *Kajikia*, *Tetrapturus* y *Xiphias*, a partir de los cuales se diferencian cuatro tipos de peces: el pez vela, los marlines, los peces aguja y el pez espada (Collete, 2006). Son todas ellas especies díocicas y cuentan como distinción única entre sí con una diferencia notoria de tamaño, donde generalmente la hembra es de mayor tamaño que el macho (Hanner, 2011).

Los picudos son considerados entre los peces más rápidos, ampliamente migratorios y capaces de realizar movimientos trans-oceánicos (Collette, 2010). Aun cuando sus respectivas áreas de distribución son diferentes, estas son especies predominantemente intertropicales y subtropicales (García-Cortés, 2010), que pueden tolerar amplios rangos de temperatura, aunque prefieren aguas cálidas para el desove (Graves & McDowell, 2003).

A nivel mundial estos peces han adquirido una gran importancia económica, sobretodo en la industria pesquera, principalmente por su amplia distribución geográfica, su tamaño y calidad de la carne (McDowell & Graves, 2002; Hyde, 2005). Además, por ser especies epipelágicas de nado rápido, se ha impulsado la práctica de la pesca deportiva en varios países (McDowell & Graves, 2002). Por ejemplo, solo en Estados Unidos, se estima que en pesca deportiva general se gastan más de \$2 mil millones de dólares anuales (Hanner, 2011).

Las poblaciones de todas las especies de peces de pico han disminuido en los últimos años debido a los altos niveles de explotación humana. Las organizaciones internacionales de manejo pesquero han expuesto la ineludible necesidad de una mayor información sobre la pesca y biología básica de estas especies, incluyendo un mejor seguimiento de los desembarques por especies, así como la identificación de los hábitats de desove, para ayudar a la gestión y conservación de los peces de pico a nivel mundial (Hanner, 2011). En el caso de Centroamérica, en los últimos años se ha observado una disminución en las poblaciones de picudos (Ehrhardt & Fitchett, 2006), uno de los factores más importantes es la pesca comercial indiscriminada de la que han sido objeto, esto debido a la pesca con palangre, que es incapaz de distinguir entre los peces objetivo y los picudos (Galeana, 2008). El principal problema es el tipo de anzuelos que se utilizan, pues diversos autores señalan que una vez que el espécimen se engancha al anzuelo es poco probable que sobreviva (Graves & McDowell, 2006; Galeana, 2008).

El sistema de pesca con palangre es ampliamente utilizado en Costa Rica. Consiste en una línea madre con pequeñas líneas a todo su largo provistas de un anzuelo en la parte terminal. Este tipo de pesca se concentra en Atunes y otros miembros de la familia Scombridae (Paine, 2007). Sin embargo, por sus características y por realizarse en ambientes epipelágicos, la pesca tipo palangre es multiespecífica (Eslava, 2003), de manera que puede ocasionar la captura incidental de otras especies, tales como el pez vela, el marlín azul, el marlín rayado y el pez dorado (Galeana, 2008). En Costa Rica, el problema de la explotación indiscriminada de los peces de pico se ha incrementado ya que en los últimos 15 años se incorporaron un gran número de flotas con palangre (artesanal, semi-industrial e industrial) que incrementan la explotación de picudos como el pez vela y diferentes especies de marlín (Vega-Araya, 2008).

El artículo 76 de la “Ley de Pesca y Acuicultura” de Costa Rica declara al marlín azul (conocido como marlín blanco), al marlín rosado, al pez vela y al marlín negro como especies de interés turístico-deportivo. Por su parte, el Acuerdo No. A.J.D.I.P/090-2009 establece que la pesca de explotación comercial especialmente dirigida a la captura del pez vela está prohibida. Esta legislación ha sido de vital importancia, pues se ha demostrado que el impacto económico de la pesca turístico-deportiva es mucho mayor al de la pesca comercial dado que es la primera la que genera mayor cantidad de divisas al país (Soto, 2010) y, dentro de la misma, el principal atractivo lo constituye el pez vela.

Además de generar mayores ganancias, la pesca deportiva permite un desarrollo sostenible pues genera ingresos por la pesca del animal, que posteriormente es liberado. Gracias a las técnicas con ciertos tipos de anzuelo (anzuelos circulares), los especímenes liberados presentan porcentajes considerables de supervivencia de hasta un 100%. Por lo tanto, las poblaciones no se ven muy afectadas, se promueve la conservación de las mismas y se genera un beneficio económico importante (Pine, 2008).

La identificación de las diversas especies se lleva usualmente a cabo mediante la distinción de sus características morfológicas, de manera que una vez que el espécimen ha sido fileteado, procesado, o congelado, es casi imposible identificar una especie de las otras (Bangma, 2006; Hsieh, 2007). Lo descrito anteriormente permite la confusión o el enmascaramiento de la carne ilegal por la de otras especies semejantes y de similar manejo como otros tipos de picudos y atún. La fiable y precisa identificación de los diversos peces y de su tejido tiene gran importancia en muchas situaciones, incluyendo la detección de sustituciones de mercado en las que el pescado se vende bajo un nombre de especie incorrecto; sea para aumentar los beneficios, sea encubrir capturas ilegales (Wong & Hanner, 2008). De igual manera, el mismo

reconocimiento permite dar seguimiento a los desembarques de pesca, evaluar los “stocks” y sus gestiones pertinentes, analizar las primeras fases de vida de las especies y realizar una investigación científica en general (Hanner, 2011).

Por esto, el desarrollo de nuevas metodologías de identificación se presenta como una necesidad para el reconocimiento de la carne ya procesada de estas especies. Las metodologías más utilizadas son las técnicas moleculares basadas en el ADN mitocondrial. Dentro de estas técnicas se encuentran, en primer lugar, el PCR-RFLP (del inglés “*Restriction Fragment Length Polymorphisms*”), por medio del cual se han identificado especies como *I. platypterus*, *X. gladius*, *M. nigricans*, *Istiompax indica*, *T. pfluegeri* y *T. angustirostris* (Hsieh, 2007; McDowell & Graves, 2002); el uso de esta tecnología junto con las técnicas de secuenciación, ha permitido reconocer casi todas las especies de peces de pico (Hyde, 2006; Shivji, 2006; Hsieh, 2007; Kawakami, 2010; Hanner, 2011). La segunda técnica utilizada se denomina PCR-Multiplex (Hyde, 2005), cuyo uso ha sido menor.

Estas técnicas de identificación se han centrado principalmente en análisis de regiones del ADN mitocondrial debido a las ventajas que este presenta sobre el ADN nuclear (Paine, 2007), como una tasa de mutación mayor y alto número de copias por célula. Recientemente en Costa Rica, Álvarez (2012) estandarizó una prueba de PCR Multiplex para las especies de interés en este proyecto, la cual aún no ha sido validada o legitimada para una prueba basada en PCR-RFLP; aspecto necesario para una posible utilización de estas dos técnicas en procesos penales.

El genoma mitocondrial de los vertebrados posee 37 genes, pero no toda la molécula es codificante, esta contiene una región no codificante de tamaño variable llamada región control o D-Loop (del inglés “*Displacement-loop containing region*”). La región control posee una tasa de

mutación de dos a cinco veces mayor que la tasa de los genes mitocondriales, convirtiéndola en una región ampliamente utilizada como marcador molecular (Rocha, 2005).

El gen COI, que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa es una de las regiones del ADN mitocondrial más ampliamente utilizado en identificación y ha sido utilizado en el proyecto de “*Barcoding*” Internacional (iBOL), pues a pesar de ser un gen muy conservado se cree que tiene suficientes regiones polimórficas como para la identificación de especies (Herbert, 2003). Este gen ya ha sido utilizado con éxito en la identificación de las especies del suborden Xiphoidei (Hanner, 2011).

El uso de técnicas como PCR-RFLP y PCR-Multiplex con ADN mitocondrial es amplia y estas se emplean para diferenciar muchos otros tipos de peces y otras especies marinas, como gádidos, salmónidos, carcharinidos, escómbridos y bivalvos (Apostolidis, 2008; Rasmussen 2008; Mendonça et al, 2009). La técnica de PCR-Multiplex también es aprovechada para la identificación de los diferentes tipos de pez guitarra (familia *Rhinobatidae*) en Brasil (De-Franco, 2010). Fuera del ámbito acuático, el uso del PCR-RFLP se ha extendido hasta la identificación a especie de diversos tipos de carnes de consumo como lo son la carne de res, pollo, cerdo, pavo, oveja, búfalo, camello y burro (Haider, 2011).

Capítulo 1. Revisión de literatura

1.1. Historia Evolutiva y Filogenia

El origen de los istiophoriformes data del Cretácico Tardío, con la división de los peces espada e istiophoridos hace aproximadamente 71 Ma (millones de años), se sugiere un largo aislamiento evolutivo de estos dos linajes, lo cual se evidencia también en restos fósiles de antepasados de los xiphiidos del Eoceno Temprano (55.9 – 55.7 Ma). La radiación de los actuales marlines, peces vela y peces aguja, es mucho más reciente, empezando en el Mioceno temprano (aprox. 18 Ma), con la separación entre los parientes más cercanos de la mayoría de las especies al inicio del Plioceno (aprox. 5 Ma) (Santini & Sorenson, 2013).

Los peces de pico poseen un amplio registro fósil, que se extiende hasta el Eoceno temprano, el cual ha sido utilizado en análisis fósiles y moleculares (Santini & Sorenson, 2013). Además, según Santini & Sorenson (2013), de las dos familias existentes de peces de pico (Istiophoridae y Xiphiidae), se conocen tres familias extintas: Hemingwayidae (con una especie), Palaeorhynchidae (cuatro géneros, aprox. 24 especies) y Blochiidae (un género, tres especies).

Un número de taxones fósiles se han asignado a las dos familias de picudos que sobreviven: por lo menos 10 especies que datan del Eoceno de Europa, Egipto y EE.UU. Fierstine (2006), comenta que las mismas están actualmente asignadas al género *Xiphiorhynchus*, que ha sido sugerido como el taxón hermano del existente *Xiphias* (Fierstine & Monsch, 2002; Monsch & Bannikov 2011); por su parte, el registro fósil de *Xiphias* se extiende hasta el Mioceno Medio de Polonia (Fierstine, 2006).

El registro fósil de Istiophoridae incluye "*Istiophorus*" *solidus* del Eoceno superior de Bélgica, un fósil muy incompleto y mal conservado con una morfología única de colocación filogenética actualmente desconocida (Fierstine, 2006), así como fósiles actualmente asignados a

todos los géneros existentes que datan del Mioceno tardío (*Istiophorus*), Mioceno Medio (*Makaira*) y Plioceno temprano (*Tetrapturus*) (Fierstine, 2006; Santini & Sorenson, 2013).

Muchos de estos taxa fósiles probablemente ya habitaban las aguas cálidas y los hábitats pelágicos, lo que sugiere que probablemente los peces picudos han ocupado su actual papel de depredadores pelágicos dominantes durante la mayor parte del Cenozoico, quizás en respuesta a la desaparición de muchos teleósteos pelágicos grandes hacia el fin del Cretácico (Friedman, 2009). La evolución de los peces picudos, como en el caso de los atunes, incluye la evolución convergente de marlines azules y negros de tamaño gigante durante los pasados ~ 10 Ma, que pudo haber sido posible gracias al inicio de los regímenes modernos de surgencia a través de los océanos del mundo. Estos eventos pueden haber dado lugar a una reorganización de las comunidades pelágicas y el aumento de la disponibilidad de presas para estos depredadores pelágicos de natación rápida (Santini & Sorenson, 2013).

Los peces picudos son importantes habitantes de los ecosistemas pelágicos y a lo largo de la historia han sido clasificados de diversas formas y en diversos grupos. Según un número de estudios morfológicos (Collette et al, 1984; Johnson, 1986; Carpenter et al, 1995), se estimó que los picudos estaban estrechamente relacionados con los atunes y las caballas, por lo que fueron incluidos en el suborden de perciformes Scombroidei (Nelson, 2006); de esta manera, se acomodaron en una superfamilia denominada Xiphioidae, compuesta por las familias Istiophoridae y Xiphiidae dentro de dicho suborden (Carpenter, 1995).

Por otra parte, Finnerty & Block (1995) secuenciaron un fragmento del gen mitocondrial de la citocromo b y con base en sus resultados, apoyaron los resultados obtenidos por Potthoff (1986), en donde las familias Istiophoridae y Xiphiidae no formaban parte de los escómbridos. En la actualidad, Block (1993) Orrell (2006), Li (2009), Little (2010) y Betancur (2013) han

demostrado concluyentemente que los peces picudos y atunes pertenecen a dos linajes morfológicamente muy convergentes de grandes depredadores pelágicos (Santini & Sorenson, 2013).

Por tanto, el suborden Xiphoidei se encuentra compuesto actualmente por dos familias: Istiophoridae y Xiphiidae. Inicialmente, con base en características morfológicas se establecieron cuatro géneros que se mantienen: *Istiophorus*, *Makaira*, *Tetrapturus* y *Xiphias*, de los cuales los primeros tres han sufrido reacomodos y cambios (Collette, 2006; Fierstine, 2006; Nakamura, 1985).

Dentro de la familia Istiophoridae, el género *Istiophorus* se dividía en 2 especies las cuales se identificaban debido al tamaño de sus aletas caudales y pectorales y a su peso, siendo estas *I. albicans*, conocido como pez vela del Atlántico, el cual no superaba los 60 kg y presentaba aletas pectorales y caudales más largas, e *I. platypterus*, conocido como pez vela del Indo-Pacífico, con pesos que rondaban los 100 kg y aletas relativamente más cortas con respecto a su especie hermana (Nakamura, 1985).

Asimismo, los análisis moleculares más recientes que han utilizado ADN mitocondrial y nuclear, concluyeron que existen diferencias entre el pez vela del Atlántico y el del Indo-Pacífico, pero estas diferencias no son significativas para tomarlas como especies distintas, por lo que actualmente se conoce al pez vela como *I. platypterus* y este conforma el género monotípico *Istiophorus* (Graves & McDowell, 2003; Bagma, 2006).

Algo similar ocurrió en el género *Makaira*, al cual pertenecían *M. indica* o marlín negro, *M. nigricans* y *M. mazara*, conocidos comúnmente como marlín azul Atlántico y marlín azul Indo-Pacífico, los cuales, según su patrón de la línea lateral, habían sido clasificados como especies distintas (Nakamura, 1985). Sin embargo, los estudios de ADN mitocondrial y nuclear

no han encontrado diferencias significativas que apoyen la separación de estas últimas 2 especies. Conforme a lo anterior, la especie *M. nigricans* se conoce actualmente como marlín azul; en estudios realizados posteriormente se comprobó que el género *Makaira* no es un género monofilético, según lo cual *M.indica* se clasificó en un género distinto denominado *Istiompax*, con *I. indica* como única especie (Collette, 2006).

Con respecto al género *Tetrapturus*, conformado por 6 especies: *T. audax* y *T. albidus*, conocidos como marlín rayado y marlín blanco respectivamente, y 4 especies de peces aguja, *T. pfluegeri* (pez aguja de trompa larga), *T. angustirostris* (pez aguja de trompa corta), *T. belone* (pez aguja del Mediterráneo) y *T. georgii* (Nakamura, 1985); se concluyó mediante análisis moleculares que el marlín rayado y el marlín blanco no poseen un nivel de similitud con los peces aguja como para clasificarlos dentro del mismo género, pero si son similares entre sí, por lo que estas 2 especies ahora conforman el nuevo género *Kajikia* (Collette, 2006).

A saber del género *Xiphias*, no se han hecho cambios desde la clasificación de Nakamura (1985), el cual solo está compuesto por la especie *X. gladius* o pez espada (Collette, 2006).

Muy recientemente se dio un cambio de orden, de perciformes a istiophoriformes por Nelson et al (2016), por lo que actualmente la clasificación taxonómica de los picudos se resume así:

Orden: Istiophoriformes

Suborden: Xiphoidei

Familia Istiophoridae

Género *Istiophorus*

I. platypterus (pez vela)

Género *Makaira*

M. nigricans (marlín azul)

Género *Istiompax*

I. indica (marlín negro)

Género *Kajikia*

K. audax (marlín rayado)

K. albida (marlín blanco)

Género *Tetrapturus*

T. pfluegeri (pez aguja de trompa larga)

T. angustirostris (pez aguja de trompa corta)

T. belone (pez aguja del mediterráneo)

T. georgii

Familia Xiphiidae

Género *Xiphias*

X. gladius (pez espada)

(Collette, 2006, Integrated Taxonomic Information System, 2015, Nelson et al, 2016)

Cabe aclarar que en Costa Rica los nombres locales de 2 especies de marlín difieren de los establecidos internacionalmente. El marlín rayado (*K. audax*), es conocido a nivel nacional como marlín rosado, mientras que el marlín azul (*M. nigricans*) es comúnmente llamado marlín blanco (Soto, 2010; Álvarez, 2012).

1.2. Distribución Geográfica

La distribución de las especies de picudos es generalmente bastante amplia, al ser especies muy migratorias, el pez vela (*I.platypterus*) se encuentra en el oeste y este del Océano Atlántico y en el este e Indo-pacífico oeste del Océano Pacífico, esta distribución la comparte

con el pez espada (*X.gladus*) y con el marlín azul (*M.nigricans*). El marlín rayado (*K.audax*), el marlín negro (*I. indica*) y el pez aguja de trompa corta (*T. angustirostris*) se encuentran en la región este e Indo-oeste del Océano Pacífico. Por otra parte, el marlín (*K. albida*), el pez aguja (*T. georgii*), otra especie de pez aguja (*T. belone*) y el pez aguja de trompa larga (*T. pfluegeri*), habitan en el Oeste y Este del Atlántico (ITIS, 2015).

No todas las especies se encuentran en las costas de Costa Rica, y solamente el marlín rosado o rayado (*K.audax*), el pez vela (*I.platypterus*), el pez espada (*X.gladus*) y el marlín azul, conocido como marlín blanco (*M.nigricans*), son de importancia económica en el país (Ley de pesca y Acuicultura, 2005).

1.3. Hábitat y Nicho Ecológico

Los ecosistemas pelágicos representan algunos de los más grandes hábitats de nuestro planeta sólo superados por las profundidades del mar, en el volumen general (Santini & Sorenson, 2013). El ambiente pelágico se extiende desde la línea de la marea baja hacia mar adentro y su extensión en profundidad es variable (Nahle, 2008). Este se divide en 2 regiones: Nerítico y Oceánico. El Nerítico es el más cercano a la plataforma continental, que comprende alrededor de 150km mar adentro y unos 150 metros de profundidad. Por otra parte, el Oceánico se encuentra más allá de los 150km mar adentro y posee mayores profundidades, hasta de 14000 metros en las fosas oceánicas. Estos ecosistemas se subdividen en zonas biológicas según la profundidad: Epipelágica o Eufótico, la cual comprende desde la superficie del mar hasta aproximadamente los 100 metros de profundidad; el ambiente fótico de transición, que abarca hasta los 200 metros y corresponde al límite que alcanza la luz; acto seguido, los ambientes sin luz o (afóticos), los cuales se segmentan en mesopelágico, que va desde los 200 hasta los 1000 metros, seguido por el batipelágico, que comprende entre los 1000 hasta los 4000 metros de

profundidad y el abisopelágico, que se extiende desde los 4000 metros hasta el fondo marino (Nahle, 2008).

El pez vela y otras especies de picudos habitan comúnmente en la zona epipelágica en aguas neréticas. Estos peces nadan regularmente en aguas cuya temperatura varía de entre 21 a 28 oC. Son especies piscívoras, pero también se alimentan de calamares y otros invertebrados a su disposición (Bangma, 2006). A su vez, la especie presenta reproducción durante casi todo el año, con temporadas más marcadas de desove entre marzo y junio y entre agosto y setiembre. De forma similar especies de marlín presentan periodos extensos de reproducción, de junio a octubre. En el caso del pez espada se han identificado períodos de desove entre julio y agosto (Ariza 2015, Sevilla 2013, Claramunt 2009).

1.4. Morfología

En su estadio larval los miembros de la familia Istiophoridae son fácilmente distinguibles por características anatómicas y patrones de coloración de las larvas de la familia Xiphiidae. Por otra parte, los Istiophoridos jóvenes son muy similares en sus etapas de desarrollo, por lo que es difícil de identificar las larvas nivel de especie basada en solo características morfométricas y métricas (Bangma, 2006). Por esto, se utilizan preferiblemente análisis moleculares, como el PCR RFLP, para su correcta identificación (Luthy, 2005).

La identificación de los especímenes adultos es más simple gracias al rostro o pico, característica importante para la diferenciación, el cual se forma debido a la extensión de la mandíbula superior con respecto a la inferior. En la familia Istiophoridae, el rostro es semejante a la sección transversal de una lanza y con punta más redondeada que el rostro de la familia Xiphiidae, similar a la sección transversal de la hoja de una espada; a su vez es más puntiagudo (Goujon, 2011). Ambas familias tienen dos aletas dorsales, la primera de ellas posee, como

soporte, espinas; la segunda está compuesta por rayos blandos. Todos los picudos presentan dos aletas pectorales, una aleta anal, una aleta caudal, ubicada en el final del pedúnculo caudal y un par de aletas pélvicas, ausentes únicamente en los peces espada (Goujon, 2011). Los últimos se caracterizan también por la ausencia de escamas, por sus aletas dorsales que se encuentran bien separadas y por poseer una sola quilla caudal media, que proveen estabilidad y soporte a la aleta caudal (Goujon, 2011).

Los Istiophoridos poseen aletas pélvicas largas y rígidas. Sus cuerpos están cubiertos con escamas óseas pequeñas y elongadas. Su primera aleta dorsal tiene una larga base y termina cerca del origen de la segunda aleta dorsal, y poseen además un par de quillas caudales pequeñas en el centro del pedúnculo caudal (Goujon, 2011).

1.5. Impacto Económico

En el marco mundial los peces de pico representan especies de interés económico pesquero comercial y recreativo por su amplia distribución geográfica, su tamaño y la calidad de la carne (Hyde, 2005; McDowell & Graves, 2002). En Centroamérica la industria de pesca deportiva de picudos ha sido un motor importante en el desarrollo, tanto en el ámbito económico como social de comunidades y pequeñas empresas, el cual se enfoca principalmente en la pesca y liberación de las especies de interés, de manera que se de un desarrollo sostenible de estos recursos y se asegure así la continuidad de las especies (Ehrhardt & Fitchett, 2006).

Los marlines, pez vela y pez espada se encuentran dentro de las especies más capturadas por la flota pesquera costarricense. Estudios de INCOPESCA en la costa pacífica en el año 2007 corroboran esto, con sumas de captura de 1 106 toneladas métricas (Tm) de marlines, 631 Tm de pez vela y 178 Tm de pez espada (Puentes, 2012). A su vez, en Costa Rica se ha explotado de manera importante la pesca deportiva de picudos, esto debido a la fama que tiene

internacionalmente el país por sus riquezas naturales y la cantidad de turistas que lo visitan, por tanto, el turismo sobresale como la principal actividad generadora de divisas y la pesca turístico-deportiva una de las actividades de mayor difusión internacional (Soto, 2010). Cabe agregar que el artículo 76 de la “Ley de Pesca y Acuicultura” de Costa Rica declara al marlín azul (*M. nigricans*), al marlín rayado (*K. audax*), al pez vela (*I. platypterus*) y al marlín negro (*I. indica*) como especies de interés turístico-deportivo.

Los datos que se obtuvieron en un estudio realizado por el Instituto de Investigaciones en Ciencias Económicas en conjunto con *The Billfish Foundation* (Soto, 2010), muestran como en el año 2008 el impacto de la pesca turístico-deportiva en la actividad económica del país fue mayor que el impacto de la pesca comercial de las diversas especies de picudos. En este aspecto, la pesca deportiva generó 599.1 millones de dólares, lo cual equivale al 2.13% del PIB de dicho año, mientras que la pesca comercial generó 527.8 millones de dólares, con solo un 1.88% del PIB. Por lo tanto en el año 2008 la pesca turístico-deportiva generó aproximadamente 70 millones de dólares más que la pesca comercial de picudos.

Por esto, los picudos son especies de gran importancia para la pesca comercial y turístico-deportiva, principalmente el pez vela; por ende, la presencia de estas especies en el área marítima costarricense es clave para la llegada de una gran cantidad de turistas y para la adquisición de ingresos al país, así como para la conservación y el equilibrio de sus ecosistemas.

1.6. Situación Actual

Debido a los grandes beneficios económicos que se obtienen como producto de las actividades comerciales con los picudos, en los últimos años, los peces de pico se han vuelto objeto de la pesca comercial indiscriminada, lo que ha provocado una disminución significativa de las poblaciones de picudos a nivel mundial y por lo tanto también en las costas

centroamericanas (Álvarez, 2012; Hanner, 2011; Ehrhardt & Fitchett, 2006). La evidencia se observa en la reciente clasificación del marlín azul (*M. nigricans*) y al marlín blanco (*Kajikia albida*) como especies en estado de vulnerabilidad por la IUCN (Collette, 2011).

Gracias a que las ganancias obtenidas por la pesca turístico-deportiva son mayores que las obtenidas por la pesca comercial y a que la práctica deportiva no disminuye las poblaciones de estos animales en las costas de Costa Rica (Soto, 2010), se ha buscado promover por parte de las autoridades gubernamentales este tipo de pesca más sostenible y de mayor beneficio. La creación del acuerdo A.J.D.I.P./476-2008 en el año 2008 y la posterior corrección A.J.D.I.P.090-2009 en el año 2009, en el que se dice que “se prohíbe la pesca dirigida al pez vela, utilizando palangre de superficie adaptada para ese fin y con carnada viva como arte de pesca, en todas las aguas marinas jurisdiccionales costarricenses, a la flota comercial no turística-deportiva” son esfuerzos del gobierno costarricense para la conservación de la especie, la cual es el principal atractivo de este tipo de pesca. Una disminución significativa de la población de pez vela en aguas costarricenses va acompañado de una disminución sustancial de las capturas, lo que impacta de forma negativa a la economía local puesto que disminuye la pesca turístico-deportiva.

La pesca comercial con palangre o “*longline*” es ampliamente utilizada en el mundo para la captura de especies pelágicas grandes (Galeana, 2008). Este tipo de pesca consiste en la utilización de una línea madre con pequeñas líneas a todo su largo provistas de un anzuelo en la parte terminal. Su principal blanco son los miembros de la familia Scombridae, como lo son los atunes (Paine, 2007), pero por las características que esta línea posee y por utilizarse en ambientes epipelágicos resulta ser un tipo de pesca multiespecífica (Eslava, 2003) que captura especies desde el pez vela, pez espada y dorado hasta los diversos marlines (Galeana, 2008). Diversos autores señalan que el tipo de anzuelo utilizado es muy importante, pues una vez que el

espécimen se engancha al anzuelo es poco probable que sobreviva (Galeana, 2008; Graves & McDowell, 2006). Algunos de los anzuelos utilizados en la pesca con palangre se sabe que presentan una baja probabilidad de supervivencia del pez una vez enganchado, como lo son los anzuelos convencionales de forma recta; otros pueden disminuir la mortalidad considerablemente, como lo es el anzuelo circular (Pine, 2008).

En Costa Rica, la explotación indiscriminada de los picudos se ha incrementado, pues durante los últimos 15 años se han sumado un gran número de flotas pesqueras que utilizan el método de pesca con palangre (artesanal, semi-industrial e industrial); esto ha ocasionado la sobreexplotación de picudos como el pez vela y diferentes especies de marlín (Vega-Araya, 2008). El impacto de dicho fenómeno crea, sobre las poblaciones de estos animales y su abundancia, una disminución en la concurrencia de pescadores turístico-deportivos, y un decline económico importante para el país.

1.7. Problemática Actual

El principal problema asociado a la sobrepesca lo presenta el pez vela (*I. platypterus*), del cual, según dice la ley, en el acuerdo A.J.D.I.P.090-2009 se prohíbe la exportación del pez vela; además, en el artículo octavo se expone: “En caso de producirse pesca incidental de pez vela en la actividad de pesca comercial no turística, sin que hubiese sido posible la devolución al mar del ejemplar aún vivo; se permitirá la comercialización del producto en estado fresco o congelado para consumo humano exclusivamente en el mercado nacional”. Esta prohibición se sospecha la evaden algunas empresas que exportan pez vela de manera ilegal, etiquetándolo como marlín, pez espada, atún, entre otros; los cuales sí pueden ser exportados de manera legal. Se han realizado decomisos a causa de estos intentos, como lo fue el caso en mayo del 2011, cuando inspectores del Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPECA) y del Servicio

Nacional de Salud Animal (SENASA), decomisaron 7.000 kilogramos de pez vela que iban a ser exportados a Perú, cuando en la declaración se había reportado el producto como marlín rosado (Delgado, 2011). Otro caso se dio en julio del 2012, en el cual SENASA decomisó 8.000 kilogramos de pez vela a una empresa nacional que planeaba exportarlos a República Dominicana (Servicio Nacional de Salud Animal, 2015).

A pesar de que los picudos, los atunes y otras especies similares son fáciles de diferenciar en estado adulto, una vez que estos han sido procesados, se hace mucho más difícil la identificación y en casos determinados casi imposible (Bangma, 2006; Hsieh, 2007), lo cual dificulta mucho el control de su exportación y encubre exportaciones ilegales. Un método utilizado para confundir o engañar a las autoridades es la utilización de monóxido de carbono, el cual tiene un efecto coadyuvante que estabiliza los colores de la carne, que al unirse con el hierro y al sustituir el oxígeno de la mioglobina; como resultado, la carne se torna de color rojo brillante y puede ser confundida como atún u otra especie (Comisión Europea, 2001; Restrepo-Flórez & Patiño, 2008).

Para combatir esta deficiencia en la identificación de la carne de exportación, se deben desarrollar o implementar técnicas alternas de identificación que no dependan únicamente de las características morfológicas y que no se vean afectadas por el procesamiento o fileteado de la carne.

1.8. Identificación de especies

La identificación de los peces de pico se ha realizado principalmente por las características morfológicas, como lo son la forma, tipo de aletas, coloración, tamaño del cuerpo, posición de las alteras, entre otras. Pero debido a la dificultad de la correcta identificación del producto pesquero en base a sus características morfológicas una vez que este ha sido fileteado y

procesado, se han ido desarrollando diversas metodologías alternativas, que permitan una correcta y precisa identificación de la carne ya procesada o alterada físicamente.

Dentro de las primeras técnicas utilizadas para la identificación de alimentos, entre ellos los diversos tipos de carnes, se encuentran los siguientes análisis de proteínas: la electroforesis, como lo es el SDS-PAGE; la cromatografía, como la cromatografía de capa fina (HPLC); o técnicas inmunológicas como la inmunodifusión y el ELISA (Asencio, 2007; Hsieh, 2007). Sin embargo, las proteínas son fácilmente desnaturalizadas por procesos en los alimentos, como lo es el tratamiento térmico, además, las proteínas pierden su actividad biológica después de la muerte del animal debido a cambios tanto en su estructura como su presencia, e inclusive, cabe agregar que cada tipo de célula tiene sus características propias; por tanto, las técnicas basada en proteínas no han resultado ser las más aptas para la identificación. (Asencio, 2007; Hsieh, 2007; Teletchea, 2009).

Las nuevas técnicas de identificación han surgido para sustituir a aquellas basadas en proteínas debido a sus ventajas y eficiencia; estas se basan en los ácidos nucleicos, los cuales son mucho más fáciles de obtener puesto que se encuentran en casi todas las células, su material puede ser extraído más fácilmente a partir de muestras pequeñas, son más termoestables y proporcionan mayor información genética (Teletchea, 2005).

Existen diversas técnicas basadas en ADN para la identificación de organismos, como lo es la secuenciación, la hibridación ADN-ADN o ADN-ARN y la más utilizada debido a su especificidad, sensibilidad y simpleza; la técnica de PCR (*“Polymerase chain reaction”*), la cual realiza una amplificación específica de fragmentos de ADN de interés (Asencio, 2007). De ella, se basan diversas metodologías como lo son el PCR-Multiplex y el PCR-RFLP.

1.8.1. Identificación mediante Secuenciación

La secuenciación es el método de identificación molecular por excelencia, pues es el más exacto, preciso y además, brinda una gran cantidad de información; esta técnica se ha convertido en el método estándar para la validación de otras técnicas de identificación moleculares, así como para análisis filogenéticos y poblacionales a pesar de ser más costo y laboriosidad (Bagma, 2006; Asensio, 2007; Teletchea, 2009; Kawakami, 2010; Santini & Sorenson, 2013).

Los métodos de secuenciación han avanzado considerablemente en los últimos años con el surgimiento de nuevas técnicas y equipos que son capaces de secuenciar más rápidamente y de forma masiva, sin embargo, la secuenciación capilar basada en el método de Sanger sigue siendo aún la más utilizada.

La secuenciación de Sanger se basa en la utilización de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), los cuales son análogos a los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) comunes. Los ddNTPs carecen del grupo OH del extremo 3' del azúcar desoxirribosa a diferencia de los dNTPs. Gracias a la carencia del OH, una vez que se incluye uno de estos ddNTPs en la reacción de amplificación (PCR), no se puede formar el enlace fosfodiéster, y por lo tanto se para la extensión, lo cual da como resultado amplicones de diversas longitudes (Sanger, 1977). Estos ddNTPs se encuentran marcados con fluorescencia, lo que permite analizar los amplicones mediante una electroforesis capilar, en la cual el material genético va migrando debido al campo eléctrico y de forma proporcional a su tamaño, para que luego un láser incida sobre estos promoviendo así la fluorescencia. Esta fluorescencia es recibida por un detector de luz, digitalizada y posteriormente analizada por un “*software*” especializado (Magaña, 2009).

La rápida evolución en cuanto a programas informáticos especializados para el ensamblaje y edición de secuencias, además del desarrollo de herramientas como el BLAST (del

inglés “*Basic Local Alignment Search Tool*”), permiten la comparación contra secuencias de referencia, facilita de manera considerable la interpretación de la información que se obtiene y es una gran ventaja para esta técnica. Asimismo, la existencia de bases de datos de referencia de acceso público, como lo son EMBL/DDBJ/GenBank, favorece el uso de la secuenciación como una metodología eficiente para la identificación de especies (Kawakami, 2010).

Se han logrado identificar diversas especies de la familia Istiophoridae mediante esta metodología. El ADN mitocondrial ha sido el más utilizado, debido a que se hereda vía materna, por lo que no está sujeto a recombinación, y además acumula cambios más rápidamente que el ADN nuclear; de este ADN mitocondrial el gen de la citocromo b es uno de los más utilizados, con el cual se han identificado diversas especies de picudos como: *I. platypterus*, *M. nigricans*, *I. indica*, *K. audax*, *T. angustirostris*, *T. georgii* y *T. pfluegeri* y *X. gladius* (Hsieh, 2005; Hyde, 2006; Shivji, 2006; Hsieh, 2007). De igual manera se utilizan otros genes mitocondriales como el gen de la subunidad I de la citocromo C oxidasa, con el cual se han logrado identificar cinco especies de picudos (Hanner, 2011), el gen para la subunidad 16S del ARN ribosomal, con el cual se ha identificado a *I. platypterus*, *T. angustirostris* y *X. gladius* (Kawakami, 2010) y la región control (D-Loop), con la cual se ha identificado a *I. platypterus*, *M. nigricans*, *K. audax* e *I. indica* (Graves & McDowell, 2006; McDowell & Graves, 2008).

Mediante este método se obtienen las secuencias completas de las muestras, las cuales nos permiten la construcción de árboles filogenéticos para su agrupación y análisis. Dentro de las metodologías de construcción de árboles filogenéticos, se encuentra el método del pariente más cercano (del inglés “Neighbor-joining”), el principio de este método es encontrar pares de unidades taxonómicas operacionales (OTUs “Operational Taxonomic Units” [= vecinos]) que minimicen la longitud total de la rama en cada etapa de agrupación de los vecinos comenzando

con un árbol en forma de estrella (Saitou & Nei, 1987). Este método es complementado por el parámetro de distancia Kimura 2-parameter (K2P) el cual toma en cuenta 2 parámetros con tasas de sustitución diferentes, las sustituciones transicionales (cambios A-G y C-T), las cuales se ha observado son las más frecuentes y transversiones (todos los demás tipos de cambios) para la búsqueda de similitudes entre las secuencias de nucleótidos (Kimura, 1980).

1.8.2. Identificación mediante PCR Multiplex

El PCR-Multiplex es una técnica basada en PCR la cual ha sido poco utilizada para la identificación de peces, aun cuando esta resulta ser menos laboriosa, más rápida y es lo suficientemente precisa por lo cual puede llegar a ser muy útil si se diseña correctamente (Hyde, 2005). Esta técnica, gracias al conocimiento previo de la secuencia completa de las especies por identificar, consiste en diseñar un par de iniciadores sintéticos específicos para cada especie de interés que posean temperaturas de alineamiento (T_m) similares, que no interactúan entre sí y que generen productos (amplicones) de tamaños distintos. Además, se utiliza un par de iniciadores, o iniciador, no específicos que amplifiquen un fragmento común entre las especies, y crear así un control interno. Una vez amplificados los fragmentos de interés, se realiza una electroforesis en gel y se visualizan las bandas de cada muestra que da como resultado la identificación de cada una (Asensio, 2007; Rasmussen, 2008).

El PCR-Multiplex ha sido utilizado para identificar especies del suborden Xiphoidei con éxito, como es el caso de las investigaciones realizadas por Simms (2010) y Rooker (2012), en las cuales identificaron con esta metodología larvas de marlín blanco, marlín azul y pez vela. Anteriormente, Hyde (2005) ya había utilizado esta técnica para identificar 6 especies de picudos: *I. platypterus*, *M. nigricans*, *K. audax*, *X. gladius*, *I. indica* y *T. angustirostris*.

Asimismo, se conoce que dicha técnica ha sido utilizada para la identificación de carcharinidos, salmónidos y serranidos (Mendonça et al, 2009; Rasmussen 2008). Otro ejemplo claro de su uso lo ejecutó De-Franco (2010) en Brasil para identificar diferentes tipos de pez guitarra (Familia Rhinobatidae). Esta técnica disminuye el tiempo necesario para la identificación, es más barata y disminuye riesgos de contaminación o confusión de muestras en comparación con otras técnicas como el PCR RFLP, debido principalmente a que todos los iniciadores se encuentran en la misma reacción lo que minimiza la manipulación (Hyde, 2005).

1.8.3. Identificación mediante el análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

La técnica del PCR-RFLP (del inglés “*Restriction Fragment Length Polymorphisms*”), basada en el PCR y la digestión enzimática, ha sido una de las más utilizadas en la identificación de especies de peces y mariscos (Rasmussen, 2008); adicionalmente, Wu (2008) la ha utilizado con éxito en la identificación de productos de pescado fresco, procesado y cocinado.

El PCR-RFLP consiste en la amplificación por medio de PCR de un fragmento de interés, el cual posteriormente es cortado con enzimas de restricción preseleccionadas (endonucleasas tipo II) que realizan cortes en zonas específicas de la doble banda de ADN; este aspecto produce un patrón de fragmentos específico, que al ser visualizados en un gel por electroforesis, hace posible la distinción entre las especies debido a sus diferencias genéticas (Hsieh, 2004; Rasmussen, 2008; Teletchea, 2009).

Esta metodología es menos costosa, más simple y más apta para análisis de rutina en laboratorio, en comparación a técnicas como la secuenciación; además, es relativamente rápida, reproducible y robusta que no requiere de aparatos caros (Rasmussen, 2008), por lo cual se ha utilizado ampliamente en la identificación de especies. No obstante, presenta ciertas desventajas,

las cuales generan resultados equívocos como la posibilidad de que ocurran digestiones incompletas y posibles cambios intraespecíficos de las regiones de corte en el ADN que pueden afectar el patrón de corte, alterando la cantidad o lugar de los sitios de reconocimiento para el corte enzimático (Asencio, 2007).

Los diferentes estudios en los que se ha empleado esta técnica han logrado identificar especies como *I. platypterus*, *X. gladius*, *M. nigricans*, *I. indica*, *T. pfluegeri* y *T. angustirostris*; a partir de tejido fresco, congelado y cocinado. En el caso de *K. audax* y *K. albida* no se demostró posible la diferenciación por PCR-RFLP, debido a que estas especies presentan corta divergencia evolutiva y genética (McDowell & Graves, 2002; Hsieh, 2007). Dentro de las regiones que han sido utilizadas para la identificación en picudos se encuentra el locus MN32-2 de ADN nuclear y de ADN mitocondrial el locus ND4 y el gen de la citocromo b (cyt b) debido a su fácil amplificación entre taxones y su bajo nivel de variación (McDowell & Graves, 2002; Hsieh, 2005; Hsieh, 2007).

1.9. ADN mitocondrial (ADNmt)

El genoma mitocondrial de los vertebrados posee 37 genes: dos ARN ribosomal, trece proteínas, y veintidós ARN de transferencia circular. Está conformado aproximadamente de 16000 pares de bases, unas cinco veces más pequeño que el genoma nuclear, cada célula presenta varias copias de ADNmt (en contraste con el ADN nuclear que se puede encontrar 1 o 2 copias), es haploide y no posee intrones (Hsieh, 2005; Rocha, 2005). Además es normalmente de herencia materna y no sufre recombinación, debido a esto tiende a ser más conservado a lo largo de distancias evolutivas, convirtiéndolo en una herramienta muy útil en la diferenciación filogenética (Hsieh, 2007; Rocha 2005).

Las técnicas de identificación se han centrado principalmente en el análisis de regiones del ADN mitocondrial (cyt *b*, ND4, 16S ARNr, COI, D-Loop) debido a las ventajas que este presenta sobre el ADN nuclear (Paine, 2007). Dentro de las principales ventajas se encuentra una tasa de mutación mayor que el ADN nuclear, lo que permite que en menos generaciones se observen variaciones entre secuencias de especies muy relacionadas, así como facilita la identificación de las mismas. Además, la capacidad de identificación de muestras deterioradas o procesadas que presentan degradación de ácidos nucleicos facilita la amplificación de un fragmento específico por PCR (Paine, 2007; Teletchea, 2009).

1.9.1. Región control (D-Loop)

No toda la molécula de ADNmt es codificante, esta contiene una región no codificante de tamaño variable llamada región control o D-Loop (del inglés “*Displacement-loop containing region*”), este segmento no codificante contiene motivos conservados, el origen de replicación de cadena pesada, y ambos sitios de iniciación de transcripción de cadena pesada y liviana. El bloque central se encuentra flanqueado por dos zonas hipervariables. La región control posee una tasa de mutación de dos a cinco veces mayor que la tasa de los genes mitocondriales, aspecto que la convierte en una región ampliamente utilizada como marcador molecular (Rocha, 2005; Morris, 2010).

Gracias a las características que posee esta región de ADNmt, ha sido ampliamente utilizada en estudios de identificación de especies de picudos de manera efectiva (Bagma, 2006; Collette, 2006; Graves & McDowell, 2006). La problemática reside únicamente en la distinción entre especies del género *Kajikia*, de forma similar al gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (Graves & McDowell, 2003; Hanner, 2011).

1.9.2. Gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI)

El gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa es uno de los más conservados en todo el genoma mitocondrial debido a que es fundamental para la respiración celular y por lo tanto, para la producción de energía, por lo que esta importancia funcional limita su evolución (Paine, 2007). Sin embargo, a pesar de ser un gen muy conservado se cree que tiene suficientes regiones polimórficas como para la identificación y diferenciación interespecífica.

Debido a lo anterior, el gen COI es una de las regiones del ADN mitocondrial más ampliamente usadas en la identificación; se ha determinado que un fragmento del gen COI de 658 pb permite la identificación de muchas especies, por lo que ha sido utilizado en el proyecto de “Barcoding” Internacional (iBOL) (Herbert, 2003).

Este gen ya ha sido utilizado con éxito en la identificación de diversas especies de peces y de miembros del suborden Xiphioidei (Paine, 2007; Hubert, 2008; Hanner, 2011). Se ha observado su empleo exitoso en cinco de las diez especies de picudos que existen, pero ha sufrido de problemas para diferenciar entre tres especies de los peces aguja (*T. angustirostris*, *T. belone* y *T. pfluegeri*) y entre marlín rayado y marlín blanco (*K. audax* y *K. albida*, respectivamente). Se piensa que no es capaz de diferenciar estas especies debido justamente a que es un gen muy conservado y a que estas especies divergieron hace muy poco tiempo, por lo que no se han acumulado las suficientes mutaciones para producir la suficiente variación genética (Hanner, 2011).

Capítulo 2. Justificación del estudio

Las metodologías de PCR RFLP y PCR Multiplex se seleccionaron para evaluar su capacidad en la identificación de peces picudos por su facilidad, bajos requerimientos de equipo, al igual que un menor costo y tiempo de procesamiento produciendo resultados fiables. Estas son una buena alternativa de la secuenciación, una técnica más precisa pero de mucho mayor costo, situación que genera un ahorro en tiempo y dinero para el estado en el procesamiento de las muestras. La secuenciación directa del gen COI se utilizará como el estándar para comparar la efectividad de las dos técnicas. Además, se elaborará un árbol filogenético del gen COI como método confirmatorio, con el cual también se podrá detectar algún posible subgrupo, y brindará una ayuda a posibles estudios filogenéticos más extensos en el futuro.

Lo mencionado anteriormente concuerda con las necesidades de un laboratorio con recursos económicos y de tiempo limitados; de igual manera ofrece una solución rápida a la necesidad de análisis de identificación molecular para pez vela y marlines, como lo es el laboratorio de Bioseguridad del Servicio Nacional de Salud Animal (LANASEVE). Este laboratorio de Bioseguridad ha sido asignado como el encargado de procesar las muestras que lleguen de denuncias o decomisos con sospecha de ilegalidad en el país.

La validación de estas técnicas (PCR RFLP y PCR Multiplex) es importante pues se necesita que sus resultados tengan una validez legal para que puedan ser usados en los tribunales como evidencia de peso y así juzgar con certeza el delito, si se incurrió en él. De esta forma, la validación de estos procesos podrían contribuir a un eficiente control de la pesca ilegal de pez vela en el país. La utilización de estas técnicas en el marco legal, mediante un ente estatal para el control de las exportaciones ilegales del pez vela, no han sido implementadas en otros países hasta la fecha.

Capítulo 3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Validar dos métodos moleculares: PCR Multiplex y PCR-RFLP para la identificación del pez vela (*Istiophorus platypterus*), otras especies de picudos y atún, utilizando la secuenciación del gen COI como método de referencia.

3.2. Objetivos específicos

Obtener las 20 muestras necesarias por especie o grupo para la validación de los métodos moleculares, de pez vela (*Istiophorus platypterus*), pez espada (*Xiphias gladius*), marlín azul (*Makaira nigricans*), atún (*Thunnus sp.*) y en un mismo grupo marlín blanco y marlín rayado (*Kajikia sp.*); para un total de 100 muestras.

Comparar las tres metodologías moleculares analizando todas las muestras por PCR Multiplex, PCR-RFLP y la secuenciación del gen COI.

Realizar un análisis filogenético del gen COI con base en las secuencias obtenidas y secuencias de referencia, como método de confirmación y detección de posibles subgrupos dentro de las especies.

Capítulo 4. Materiales y métodos

Todos los análisis fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, en el Laboratorio de Bioseguridad de Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), MAG.

4.1. Recolección de muestras

Para la validación de las metodologías se recolectaron 20 muestras de cada una de las especies de picudos (Rabenau, 2007), para un total de 100 muestras. Las muestras necesarias de las diferentes especies de picudos fueron facilitadas por INCOPECA y SENASA, ellos también proveyeron las muestras de atún (*Thunnus* sp.). El atún se incluyó por el aspecto similar de su carne con la de las especies de picudos, a la pesca y manejo común de estas especies. Las muestras fueron previamente identificadas por los inspectores de INCOPECA quienes utilizaron sus características morfológicas, su experiencia y conocimiento previo de las especies; estos criterios fueron claves para el envío de las muestras requeridas para este proyecto donde no se tomarán como correctas estas identificaciones. En el caso de ser incorrecta esta identificación, se nos facilitarán nuevas muestras hasta tener las 20 necesarias por especie. El 87% de las muestras fueron recolectadas en la zona del pacífico.

La especie *Istiompax indica* no se incluyó en el estudio debido a su baja pesca, lo cual hace difícil la obtención de las muestras necesarias. Cabe agregar que los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Bioseguridad que forma parte del Laboratorio de Servicios Veterinarios (LANASAVE), este a su vez forma parte del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). Las muestras se recolectaron directamente de los muelles en las diversas zonas de país, tanto la zona Atlántica como Pacífica, luego se transportaron congeladas al laboratorio de SENASA donde se almacenaron a -80 °C.

4.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN de tejido muscular se realizó utilizando el *kit High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche), que sigue el protocolo del fabricante para la extracción de los ácidos nucleicos de tejido animal (Anexo 1). Las muestras extraídas fueron almacenadas a -80 °C.

La cantidad de ADN extraído se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific) que utiliza la absorbancia de los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260nm (Anexo2). Los datos de concentración de ADN (ng/μl) en relación de absorbancia 260/280 y absorbancia 260/230 se utilizaron como indicadores de calidad y pureza del ADN extraído.

4.3. PCR Universal

En el PCR Universal se utilizó el gen de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI). Los iniciadores utilizados fueron los seleccionados como los más idóneos por Álvarez 2012 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Iniciadores del gen COI utilizados en el PCR universal.

Nombre del iniciador	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto de PCR (pb)
vf2_t1	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC	704
fishr2_t1	ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA	704

Fuente: Álvarez (2012).

La mezcla de reacción utilizada fue de un volumen total de 50μl, el cual estaba compuesto de 14,5μl de agua libre de nucleasas, 25μl de HotStart Green Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 1,25μl de cada iniciador (20 μM) y 8μl de muestra. Las mezclas de

reacción se colocaron posteriormente en un termociclador (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) para su amplificación. El programa utilizado en la amplificación se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Perfil térmico de la reacción de PCR para la amplificación de COI.

Paso	Temperatura(°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	7min	1
Desnaturalización	95	45s	40
Apareamiento	58	10s	
Extensión	72	35s	
Extensión final	72	5min	1
Almacenamiento	4	∞	1

Fuente: propia

Los productos del PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v. El gel se corrió por 40 minutos con un voltaje constante de 125V, luego se visualizaron los resultados en un transiluminador de luz ultravioleta (Anexo3.1)

4.4. Secuenciación

4.4.1. Amplificación

Para la secuenciación se utilizó la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI) amplificada en el paso anterior, con los iniciadores universales vf2_t1 y fishr2_t1. Todas las muestras fueron secuenciadas en el analizador genético 3130 de Applied Biosystems®.

El PCR consistió en una mezcla de reacción de 50µl de volumen total, compuesta por 14,5µl de agua libre de nucleasas, 25µl de HotStart Green Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 1,25µl de cada iniciador (20 µM) y 8µl de muestra. Las mezclas de reacción se colocaron

posteriormente en un termociclador (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) para su amplificación. El programa para la amplificación utilizado es el mismo del PCR Universal (Cuadro 2).

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2% m/v, por 40 minutos con voltaje constante de 125V (Anexo 3.1). Una vez finalizada la electroforesis, las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y luego se cortaron, las bandas fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1,5ml para su posterior purificación.

4.4.2. Purificación

La purificación de las bandas en el gel de las 100 muestras se realizó con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), según el protocolo de purificación del fabricante (Anexo 4). Posterior a la purificación, se cuantificó cada muestra con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), se utilizó como blanco el buffer de elución (buffer EB) del kit de Qiagen y un volumen de 1,5µl para la lectura, tanto del blanco como de cada muestra. Los resultados se obtuvieron en concentración de ADN (ng/µl), con una relación de absorbancia de 260/280 y 260/230.

4.4.3. Reacción de Secuenciación

Para la reacción de secuenciación se utilizó el kit “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems) y se secuenció en ambas direcciones.

Las mezclas de reacción se componen de 3,5µl de agua libre de nucleasas, 2µl de Ready Reaction Premix (2,5X), 3µl de Sequencing Buffer (5X), 1,5µl del iniciador y 10µl de muestra, para un volumen total de 20µl. Cada muestra se colocó en un termociclador (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) utilizando el perfil térmico que se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Perfil térmico para la reacción de secuenciación.

Paso	Temperatura(°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96	2min	1
Desnaturalización	96	10s	
Apareamiento	50	5s	30
Extensión	60	4min	
Almacenamiento	4	∞	1

Fuente: propia

4.4.4. Secuenciación y Análisis

Las secuencias se purificaron con el “Big Die Xterminator Purification Kit” (Applied Biosystems) según el protocolo de fábrica (Anexo 5). Mediante un analizador genético ABI3130 (Applied Biosystems), se secuenciaron todas las muestras, en un secuenciador de capilar de 80cm. Con el programa “3130 Data Collection v3” se analizó la corrida utilizando el modulo estándar para ese capilar.

Las curvas cromatografías se observaron con el software “Sequencing Analysis 5.2” (Applied Biosystems) y el ensamblaje de secuencias se hizo con el software “SeqScape v2.6” (Applied Biosystems). Todas las secuencias consenso obtenidas se compararon con secuencias de referencia de la base de datos GenBank, mediante la herramienta BLAST (del inglés “Basic Local Alignment Search Tool”).

Se elaborará además, un árbol filogenético al pariente más cercano (del inglés “Neighbor-joining”) (Saitou & Nei, 1987) como método de agrupamiento de las secuencias, utilizando el parámetro de distancia de Kimura 2-parameter (K2P, Kimura, 1980), se utilizará “bootstrapping” como método de remuestreo, realizando 1 000 “bootstraps” para observar la varianza de los nodos y se definió al género *Thunnus* como el “Outgroup”. El árbol será utilizado como método confirmatorio y para la diferenciación y detección de posibles subgrupos o variaciones dentro de

las muestras. El árbol se elaborará con todas las muestras secuenciadas y con secuencias de referencia por grupo tomadas de la base de datos GenBank. Para la elaboración del árbol se utilizó el programa MEGA 6.

4.5. PCR Multiplex

Para el PCR multiplex se utilizó la mezcla de iniciadores de amplificación de la región D-Loop del ADN mitocondrial seleccionada por Álvarez (2012) (Cuadro 4), que se compone de Iplat-F, Xiph-F, Billf-R y Thun-F a concentración de 0,5µM, Kaji-F a concentración 0,2µM y Thun_R5 a concentración 0,7µM, estas últimas concentraciones son diferentes debido a problemas de inhibición y amplificación. Para la mezcla de reacción del PCR Multiplex se empleó: 6,25µl de HotStart Green Master Mix (2X)(Thermo Scientific), 0,3125 µl de Iplat-F, Xiph-F, Billf-R y Thun-F (20µM), 0,125 µl de Kaji-F (20µM), 0,4375µl de Thun_R5, 2µl de muestra y 3µl de agua libre de nucleasas, para un volumen total de 12,5µl. Una vez preparadas las mezclas, se colocaron en un termociclador (*Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems*) con un perfil térmico que se describe en el cuadro 5. Asimismo, se corrieron las muestras en gel de agarosa al 2% m/v, por 1 hora (Anexo 3.2), se observó el patrón de bandas específico para cada grupo o especie y se analizaron mediante el software “UVIBand v15.03” (UVISoft).

Cuadro 4. Secuencia y características de los iniciadores a utilizar en el PCR Multiplex.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Tm (°C)	Amplicón (pb)
Iplat-F	GTG ATA GTG YGC ATG GAC TG	65.8	580
Xiph-F	AAC TGG TCC TTC CTC ACT C	67.2	355
Billf-R	TTT TCA GGA GTG TTA GYR ATC TC	63.0	435
Thun-F	TAA ATC GTC TAA GCC ATA CCA AGT	62.9	545
Thun_R5	TTT ACA GGA GTG TTA ATG ATA TC	58.1	-
Kaji-F	ATT AAG GAG ACC AGG RCA TG	63.1	610

Fuente: propia

Cuadro 5. Perfil térmico del PCR multiplex para la amplificación de fragmentos específicos de la región control (D-Loop).

Paso	Temperatura(°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	4min	1
Desnaturalización	95	45s	
Apareamiento	58	10s	35
Extensión	72	35s	
Extensión final	72	5min	1
Almacenamiento	4	∞	1

Fuente: propia

4.6. PCR RFLP

Para el PCR RFLP se usó el gen COI, se manipuló la menor cantidad de enzimas de restricción posible, las cuales resultaron en un patrón de bandas específico para cada grupo y disponibles comercialmente, por tanto, se seleccionaron 7 enzimas de restricción y se probaron *in silico* mediante la página “RestrictionMapper.org”; cada enzima con su sitio/s de corte y los tamaños de fragmento producidos por especie se muestran en los cuadros del 6 a 10. El tamaño total del fragmento es de 704pb (pares de bases), además se realizó un esquema para facilitar la identificación de cada grupo dependiendo de los fragmentos producidos por cada enzima de restricción (Figura1). El género *Thunnus* se excluyó de la prueba debido a que el fragmento de COI difiere mucho con respecto al de los picudos.

Cuadro 6. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para *Istiophorus platypterus*.

Enzima	Sitio de corte	Tamaño de fragmentos
AlwI	510 617	87 107 510
BseNI	-	-
TaaI	357	347 357
Tsp509I	83 131 191	48 60 83 513
FokI	362	342 362
Kpn2I	-	-
BbvI	483 570	87 134 483

Fuente: propia

Cuadro 7. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para *Xiphias gladius*.

Enzima	Sitio de corte	Tamaño de fragmentos
AlwI	445 649 662	13 42 204 445
BseNI	-	-
TaaI	357 613	91 256 357
Tsp509I	213 221 542 590 615	8 25 48 89 213 321
FokI	136 646	58 136 510
Kpn2I	-	-
BbvI	483 570	87 134 483

Fuente: propia

Cuadro 8. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para *Makaira nigricans*.

Enzima	Sitio de corte	Tamaño de fragmentos
AlwI	598	106 598
BseNI	-	-
TaaI	357	347 357
Tsp509I	83 131 191	48 60 83 513
FokI	-	-
Kpn2I	322	322 382
BbvI	483 570	87 134 483

Fuente: propia.

Cuadro 9. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para *Kajikia audax*.

Enzima	Sitio de corte	Tamaño de fragmentos
AIwI	216 598 617 649	19 32 55 216 382
BseNI	-	-
TaaI	357	347 357
Tsp509I	83 131 191 542	48 60 83 162 351
FokI	-	-
Kpn2I	-	-
BbvI	483 570	87 134 483

Fuente: propia

Cuadro 10. Sitios de corte y tamaño de fragmentos producidos por cada enzima para *Kajikia albida*.

Enzima	Sitio de corte	Tamaño de fragmentos
AIwI	216 598 617 649	19 32 55 216 382
BseNI	190	190 514
TaaI	217 357	140 217 357
Tsp509I	83 131 542	48 83 162 411
FokI	-	-
Kpn2I	-	-
BbvI	483 570	87 134 483

Fuente: propia.

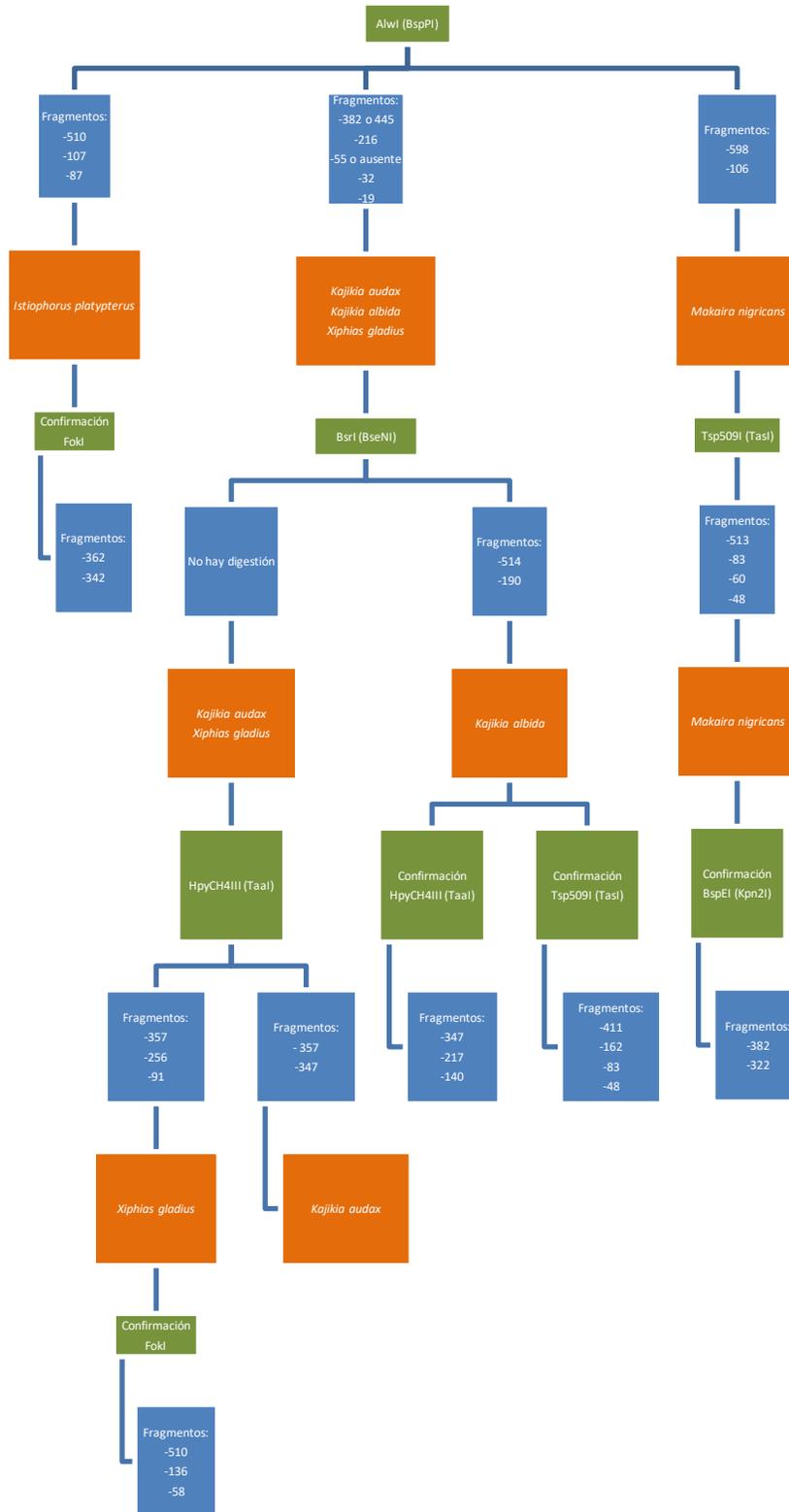


Figura 1. Organigrama para identificación del grupo o especie mediante PCR RFLP.

La amplificación de las muestras se realizó mediante un PCR Universal, luego se realizó la digestión enzimática sobre la cual se preparó para cada muestra siete Eppendorf de 0,2ml, uno para cada enzima de restricción por muestra. La mezcla de digestión se compone para AlwI de: 9µl de agua libre de nucleasas, 1µl de *Buffer Tango (Thermo Scientific)*, 0,5µl de enzima (*Thermo Scientific*) y 5µl de muestra amplificada, para un volumen total de 15,5µl. Para todas las demás enzimas, la mezcla de digestión se compone de: 8,5µl de agua libre de nucleasas, 1µl de *Green Buffer (Thermo Scientific)*, 0,5µl de enzima (*Thermo Scientific*) y 5µl de muestra amplificada, para un total de 15µl. El perfil térmico de digestión se divide según su temperatura en tres grupos: la enzima AlwI conforma el primer grupo, el segundo lo forman BseNI, TaaI y Tsp509I y el tercero FokI, Kpn2I y BbvI; los perfiles térmicos se describen en el cuadro 11. La digestión se realizó en un termociclador (*Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems*).

Cuadro 11. Perfil térmico de digestión para las 7 enzimas utilizadas en el PCR RFLP.

Grupo	Enzima	Temperatura de digestión enzimática (°C)	Temperatura de inactivación enzimática (°C)	Temperatura de almacenaje (°C)
1	AlwI	55	80	4
2	BseNI	65	80	4
2	TaaI	65	80	4
2	Tsp509I	65	80	4
3	FokI	37	80	4
3	Kpn2I	37	80	4
3	BbvI	37	80	4

Fuente: propia.

Posteriormente se realizó una electroforesis con las muestras digeridas. Para la enzima AlwI se requirió agregar buffer de carga, situación no necesaria para las demás enzimas dado que su mezcla de reacción ya viene con este incluido. La electroforesis se corrió en gel de

agarosa al 2%, a voltaje constante de 125V y por un tiempo de 1 hora (Anexo 3.3). Las bandas se observaron y analizaron mediante el software “UVIBand v15.03” (UVISoft).

Capítulo 5. Resultados

5.1. PCR Multiplex

En el PCR Multiplex se determinaron de manera confiable, las diferencias en los patrones de bandas de la amplificación de la región D-Loop para las 100 muestras requeridas para la validación de la técnica molecular. Los tamaños de las bandas diagnósticas son: *para Istiophorus platypterus*, una banda de 580pb, para *Xiphias gladius* una de 355pb, para *Kajikia* sp. de 610pb, para *Makaira nigricans* una de 435pb y para *Thunnus* sp., una única banda de 545pb. Los patrones de bandas específicas para cada grupo se observan en las Figuras 2 y 3.

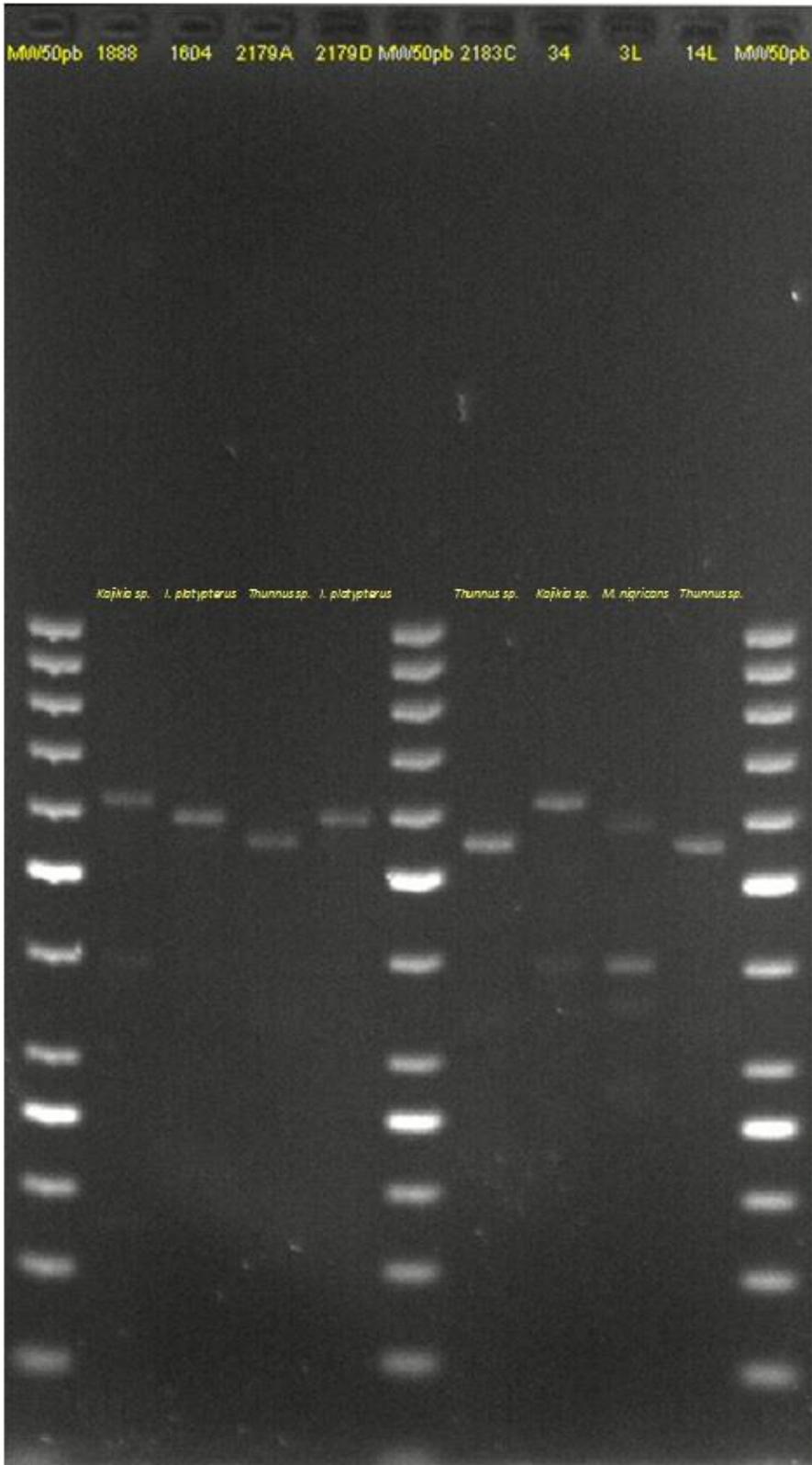


Figura 2. Patrones de bandas de la región D-Loop por PCR Multiplex para todos los grupos.

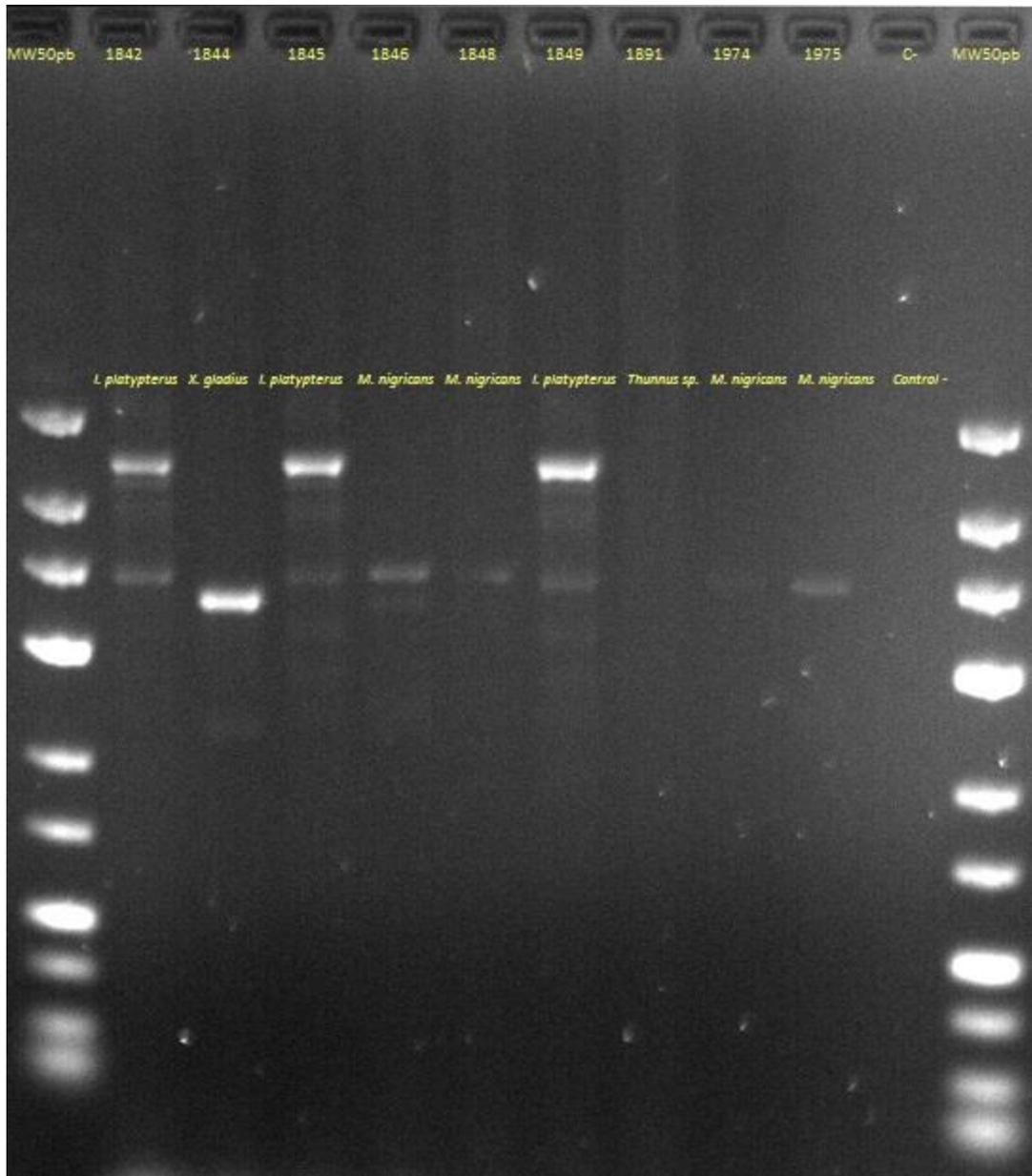


Figura 3. Patrones de bandas de la región D-Loop por PCR Multiplex para todos los grupos.

5.2. PCR RFLP

Para el PCR RFLP, una vez utilizado el gen COI se obtuvo patrones totalmente específicos para cada grupo, concordantes con las pruebas *in silico* de cada enzima de

restricción; debido a esto, el 100% de las muestras se lograron identificar exitosamente. Los patrones que se obtuvieron para cada grupo, se pueden visualizar en las Figuras 4 y 5.

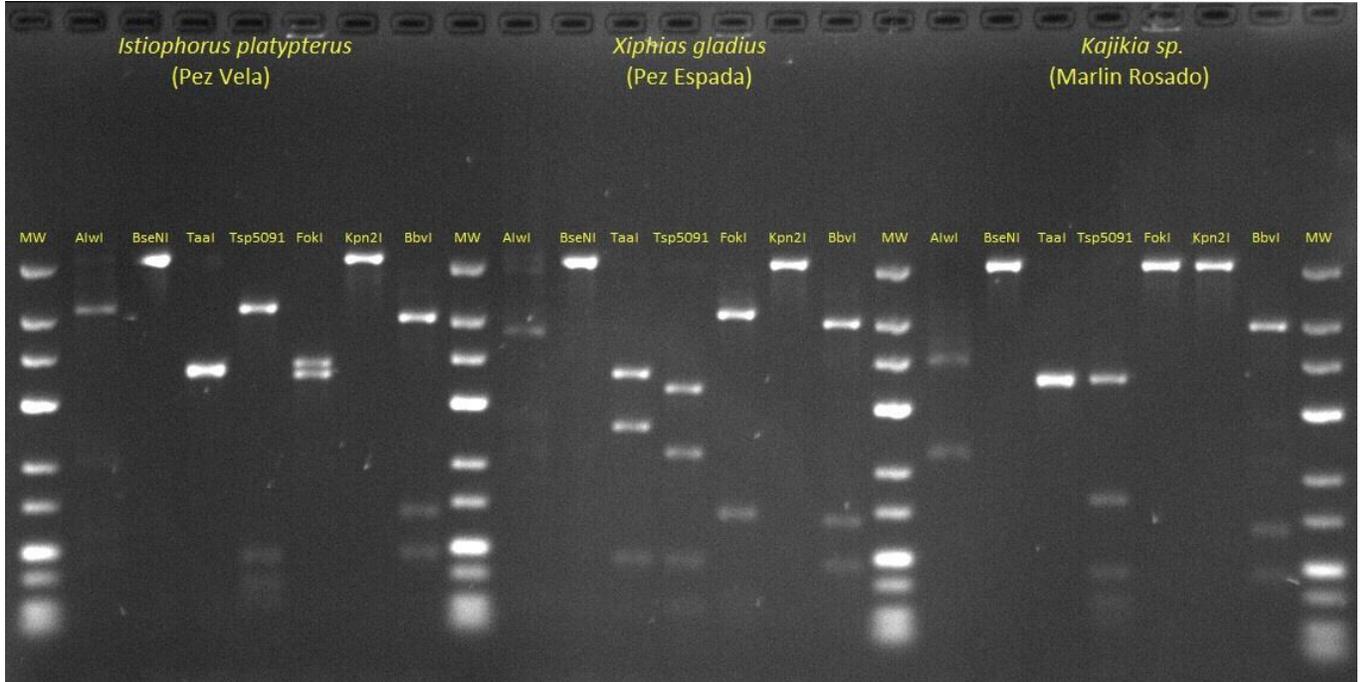


Figura 4. Patrones de bandas para cada grupo/especie del gen COI por PCR RFLP.

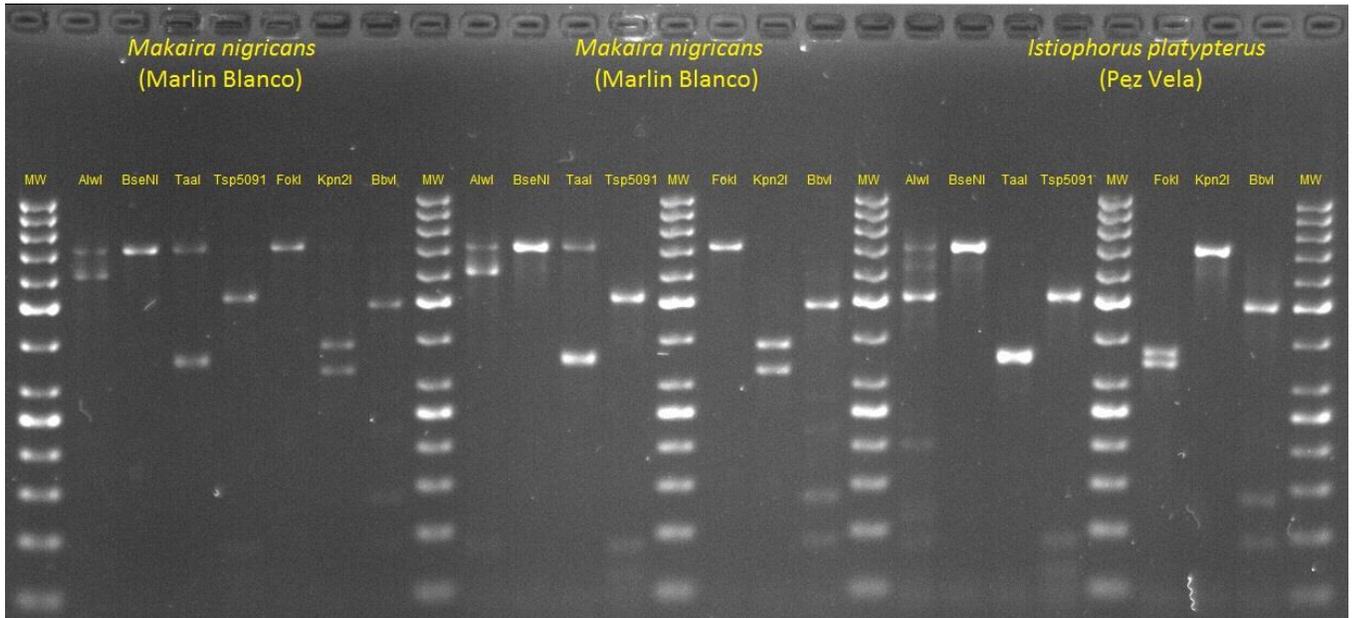


Figura 5. Patrones de bandas para cada grupo/especie del gen COI por PCR RFLP.

5.3. Secuenciación

La secuenciación se utilizó como estándar oro para las otras dos pruebas, se secuenciaron las 100 muestras y se obtuvo una totalidad de concordancia con los resultados de ambas pruebas moleculares, el PCR Multiplex y el PCR RFLP, con los resultados de la secuenciación. Todas las secuencias consenso presentaron una concordancia de identidad del 99-95% y un Valor E de 0.0 con respecto a las secuencias de referencia en la base de datos del GenBank que se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Secuencias del gen COI para las cinco especies de picudo.

Istiophorus platypterus GenBank: AB470306.1	<p>1 TCGACCAATC ACAAAGACAT CGGCACCCTC TATCTAGTAT TTGGTGCTTG AGCCGGAATG</p> <p>61 GTGGGCACTG CCCTGAGCCT TCTAATTCGA GCTGAACTTA GCCAACCTGG CGCTTTACTA</p> <p>121 GGCGATGATC AAATTTATAA CGTAATCGTT ACAGCCCACG CCTTCGTAAT AATCTTCTTT</p> <p>181 ATAGTAATGC CAATTATGAT TGGAGGTTTC GGAAACTGAC TGATTCTCT AATGATCGGA</p> <p>241 GCCCCAGACA TGGCCTTCCC TCGAATAAAC AACATGAGCT TTTGACTACT CCCTCCCTCA</p> <p>301 TTCCTTCTAC TCCTCGCCTC CTCCGGGGTT GAAGCCGGAG CCGGTACAGG ATGAACCGTC</p> <p>361 TACCCCCCTC TAGCAGGAAA CCTAGCCCAC GCAGGAGCAT CTGTTGACCT AACTATTTTC</p> <p>421 TCCCTCCACC TAGCTGGTAT TTCTTCCATC TTAGGAGCTA TCAACTTTAT CACTACCATC</p> <p>481 ATTAACATGA AACCAGCTGC CGTTTCAATG TACCAGATCC CCCTATTCGT CTGAGCAGTA</p> <p>541 CTGATTACAG CTGTCCTTCT ACTCCTTTCT CTACCCGTCC TAGCTGCTGG AATACAATG</p> <p>601 CTTCTCACGG ATCGTAATCT TAACACTGCC TTCTTCGACC CAGCCGGGGG TGGTGACCCA</p> <p>661 ATCCTTTATC AACACCTATT CTGATTCCTT GGGCACCCAG AGGT</p>
--	---

<p>Makaira nigricans GenBank: AB470304.1</p>	<p>1 TCGACCAATC ACAAAGACAT CGGCACCCTC TATCTAGTAT TCGGTGCTTG AGCCGGAATG</p> <p>61 GTGGGCACTG CCCTGAGCCT TCTAATTCGA GCTGAACTTA GCCAACCTGG CGCTTTACTA</p> <p>121 GGCGATGATC AAATTTATAA CGTAATCGTT ACAGCCCACG CCTTCGTAAT AATCTTCTTT</p> <p>181 ATAGTAATGC CAATTATGAT TGGAGGTTTC GGAAACTGAC TGATTCCCTCT AATGATCGGA</p> <p>241 GCCCCAGACA TGGCCTTCCC TCGAATAAAC AACATGAGCT TTTGACTGCT CCCTCCCTCA</p> <p>301 TTCCTTCTTC TCCTCGCCTC CTCCGGAGTT GAAGCCGGGG CCGGCACAGG GTGAACCGTT</p> <p>361 TACCCACCTC TAGCAGGTAA CCTAGCCCAC GCAGGAGCAT CTGTTGACCT AACTATTTTC</p> <p>421 TCCCTCCATC TAGCTGGTAT TTCTTCCATC TTAGGAGCTA TCAACTTTAT CACTACCATC</p> <p>481 ATTAACATGA AACCAGCTGC CGTTTCAATG TACCAAATCC CCCTATTCGT CTGAGCAGTA</p> <p>541 CTGATTACAG CTGTCCTTCT ACTCCTTTCT CTGCCCGTCC TAGCTGCTGG GATCACAATG</p> <p>601 CTCTCACAG ATCGCAATCT TAACACTGCC TTCTTCGACC CAGCAGGGGG TGGTGACCCA</p> <p>661 ATCCTTTATC AACACCTATT CTGATTCCTT GGCACCCAG AGGT</p>
<p>Kajikia audax GenBank: AB470302.1</p>	<p>1 TCGACCAATC ACAAAGACAT CGGCACCCTC TATCTAGTAT TTGGTGCTTG AGCCGGAATG</p> <p>61 GTGGGCACTG CCCTGAGCCT CCTAATTCGA GCTGAACTTA GCCAACCTGG CGCTTTACTA</p> <p>121 GGCGATGATC AAATTTATAA CGTAATCGTT ACAGCCCACG CCTTCGTAAT AATCTTCTTT</p> <p>181 ATAGTAATGC CAATTATGAT TGGAGGTTTC GGAAACTGAC TGATCCCTCT AATGATCGGA</p> <p>241 GCCCCAGACA TGGCCTTCCC TCGTATAAAC AACATGAGCT TTTGACTGCT CCCTCCTTCA</p> <p>301 TTCCTTCTAC TCCTCGCCTC CTCCGGGGTT GAAGCCGGGG CCGGCACAGG GTGAACTGTT</p> <p>361 TACCCGCTC TAGCAGGTAA CCTAGCCCAC GCAGGAGCAT CTGTTGACCT</p>

	<p style="text-align: center;">AACTATTTTC</p> <p>421 TCTCTCCATC TAGCTGGTAT TTCCTCCATC TTAGGAGCTA TCAACTTTAT CACTACCATC</p> <p>481 ATTAACATGA AACCAGCTGC CGTTTCAATG TACCAAATCC CCCTATTCGT CTGAGCAGTA</p> <p>541 CTAATTACAG CTGTCCTTCT ACTCCTTTCT CTGCCCCTCC TAGCTGCTGG GATCACAATG</p> <p>601 CTTCTCACGG ATCGAAATCT TAACACTGCC TTCTTCGACC CAGCAGGGGG TGGTGATCCA</p> <p>661 ATCCTTTATC AACACCTATT CTGATTCTTC GGACACCCAG AGGT</p>
<p>Kajikia albida GenBank: HM071012.1</p>	<p>1 TCGACCAATC ACAAAGACAT CGGCACCCTC TATCTAGTAT TTGGTGCTTG AGCCGGAATG</p> <p>61 GTGGGCACTG CCCTGAGCCT CTAATTCGA GCTGAACTTA GCCAACCTGG CGCTTTACTA</p> <p>121 GGCGATGATC AAATTTATAA CGTAATCGTT ACAGCCCACG CCTTCGTAAT AATCTTCTTT</p> <p>181 ATAGTAATGC CAGTTATGAT TGGAGGTTTC GGAAACTGTC TGATCCCTCT AATGATCGGA</p> <p>241 GCCCCAGACA TGGCCTTCCC TCGTATAAAC AACATGAGCT TTTGACTGCT CCCTCCTTCA</p> <p>301 TTCCTTCTAC TCCTCGCCTC CTCCGGGGTT GAAGCCGGGG CCGGCACAGG GTGAACCGTT</p> <p>361 TACCCGCCTC TAGCAGGTAA CCTAGCCCAC GCAGGAGCAT CTGTTGACCT GACTATTTTC</p> <p>421 TCTCTCCATC TAGCTGGTAT TTCCTCCATC TTAGGAGCTA TCAACTTTAT CACTACCATC</p> <p>481 GTTAACATGA AACCAGCTGC CGTTTCAATG TACCAAATCC CCCTATTCGT CTGAGCAGTA</p> <p>541 CTAATTACAG CTGTCCTTCT ACTCCTTTCT CTGCCCCTCC TAGCTGCTGG GATCACAATG</p> <p>601 CTTCTCACGG ATCGAAATCT TAACACTGCC TTCTTCGACC CAGCAGGGGG TGGTGATCCA</p> <p>661 ATCCTTTATC AACACCTATT CTGATTCTTC GGACACCCAG AGGT</p>

Xiphias gladius GenBank: AP006036.1	1 TCGACCAATC ACAAAGACAT CGGCACCCTC TATCTAGTAT TTGGTGCTTG AGCCGGTATA
	61 GTAGGCACAG CCCTAAGTCT ACTAATCCGA GCAGAACTCA GCCAACCTGG CGCCCTACTA
	121 GGGGATGACC AGATTTACAA CGTAATCGTT ACAGCTCACG CCTTTGTAAT GATCTTCTTT
	181 ATAGTAATGC CAATCATGAT TGGAGGGTTC GGAAATTGAC TAATTCCCCT AATGATTGGA
	241 GCCCCCGATA TAGCATTCCC TCGAATGAAT AACATAAGCT TCTGACTCCT CCCTCCATCA
	301 TTCCTCCTCC TCCTTGCTTC TTCTGGAGTT GAAGCTGGCG CTGGAACCGG GTGAACTGTC
	361 TACCCTCCTC TAGCAGGTAA CCTAGCCCAC GCAGGTGCAT CTGTTGACCT TACCATCTTC
	421 TCCCTTCACC TAGCTGGGAT CTCCTCTATT CTGGGGGCAA TCAACTTCAT CACAACTATT
	481 ATCAATATAA AACCAGCTGC CGTTTCTATG TACCAGATTC CTCTGTTCGT GTGAGCCGTA
	541 CTAATTACAG CTGTCCTCCT TCTCCTCTCC CTTCCCGTTC TAGCTGCCGG AATTACCATG
	601 CTCTTAACAG ACCGTAATTT AAACACCGCC TTCTTTGACC CTGCAGGAGG TGGGGATCCC
	661 ATCCTCTACC AACACCTGTT CTGATTCTTC GGCCACCCCG AAGT

Fuente: Las secuencias se obtuvieron de la base de datos GenBank.

Sobre el parámetro de distancia de Kimura (K2P, Kimura, 1980) (Figura 6). Dentro del árbol se obtuvo una consistente agrupación de las secuencias identificadas y las secuencias de referencia del GenBank en los diversos clados. Para *I. platypterus* y *Kajikia sp.* el valor de remuestreo es de 44%, en el caso de *Makaira*, *Istiophorus* y *Kajikia* el valor es del 85%, *X. gladius* se muestra conformando un grupo separado con un valor de del 99%. Por otra parte el grupo *Thunnus* presenta un valor de remuestreo del 99% con respecto a los picudos en general. La muestra de *Kajikia* “specimen 35” y la de *Istiophorus* “specimen 11L” presentaron una variación en la asociación, sin embargo esto no afecta la agrupación dentro de la especie o género.

5.4. Comparación entre Metodologías

Se realizó una comparación entre los tres métodos de identificación molecular para una selección de la metodología más eficiente y asequible. El cuadro 13 presenta la comparación de las diferentes técnicas en cuanto al tiempo completo necesario, desde la extracción de la muestra hasta el resultado final, además de los costos que conlleva el análisis completo de cada muestra, donde se toma en cuenta los reactivos, los equipos y operarios, según los datos aportados por el LANASEVE.

Cuadro 13. Comparación entre éxito, costo y tiempo de las 3 técnicas de identificación en el estudio.

	PCR Multiplex	PCR RFLP	Secuenciación
Tiempo	Aprox. 2 1/2 horas	Aprox. 4 horas	Aprox. 7 horas
Costo en colones	17454	24642	32425
Éxito de identificación	100%	100%	100%

Fuente: propia.

Capítulo 6. Discusión

Durante los últimos años la necesidad de metodologías de identificación eficientes, rápidas y precisas ha impulsado el empleo de los métodos moleculares, los cuales se utilizan hoy en todo el mundo tanto en la industria como en diagnóstico e investigación. Asimismo, el empleo de estas técnicas como evidencia en procesos penales se practica ampliamente, su uso requiere de la validación del método, lo cual conlleva el análisis de cierta cantidad de muestras para determinar la repetitividad, eficiencia y exactitud. Con base en lo anterior, este proyecto realizó el análisis de manera satisfactoria, según lo determinado por Rabenau (2007) para la correcta validación de métodos moleculares.

Adicionalmente, el presente estudio logró determinar que ambas técnicas moleculares fueron exitosas en la identificación de cada especie o grupo. Las 100 muestras se pudieron identificar sin problemas, lo cual cumple con lo necesario establecido para la validación de ambas metodologías; gracias a esto, el PCR Multiplex y el PCR RFLP podrían ser utilizadas en casos legales de decomisos o denuncias de exportaciones ilegales, o cualquier otro problema que incumba lo que plantea la ley de Costa Rica (“Acuerdo No. A.J.D.I.P/090-2009”, 2009). La inclusión del género *Thunnus* fue necesaria, pues es una de las especies con más movimiento en el mercado pesquero y una vez fileteado o procesado se hace difícil la diferenciación con especies de picudos.

6.1. PCR Multiplex

La técnica PCR Multiplex ha sido utilizada poco para la identificación de especies de la suborden Xiphoidei, conocidos como los peces picudos. Su principal uso en especies de este suborden ha sido en la identificación por medio de las larvas (Hyde, 2005; Simms, 2010). Se

seleccionó esta técnica para este estudio debido a su confiabilidad, así como sus requerimientos bajos de tiempo y de labor.

La técnica de PCR Multiplex, que utiliza la región D-Loop del ADN mitocondrial, resultó ser idónea para la identificación de los 4 géneros de picudos y el género *Thunnus* (Atunes), debido a su bajo costo, menor tiempo requerido y exactitud. Los iniciadores utilizados para la amplificación funcionaron correcta y eficientemente según los parámetros utilizados, aspecto que amplifica de manera específica la especie o género objetivo, según lo comprobado por Álvarez (2012) en la estandarización de la prueba. Lo anterior fue corroborado mediante la secuenciación de las muestras, en esta prueba la buena migración de las bandas en la electroforesis en gel de agarosa es importante pues algunas de las bandas como la de *I. platypterus* y la de *Kajikia sp.*, son de tamaño parecido y puede existir la posibilidad de confusión en su identificación si esta no se realiza de forma precisa y clara; este error no se dio en el estudio. Por tanto, se recomienda el uso de un software para la lectura del gel y así minimizar alguna posible lectura errónea, como lo es el software “UVIBand v15.03” (UVISoft), utilizado en el estudio.

Por otra parte, la técnica resulta ser mucho menos laboriosa y la más barata en comparación con la secuenciación y al PCR RFLP, donde su eficiencia devela el resultado en aproximadamente 2.5 horas y con una reducción de costos de prácticamente la mitad que secuenciar y un 30% más barata que el PCR RFLP (Cuadro 13), pues no requiere de enzimas de restricción ni de períodos de digestión como el PCR RFLP, o de purificaciones y preparaciones más complejas como la secuenciación. Su posible limitante es la fabricación de los iniciadores y su estandarización, la cual depende de los parámetros necesarios para el correcto funcionamiento de cada iniciador, pero una vez estandarizado, resulta una técnica muy sencilla. Esta técnica al

ser relativamente rápida y de bajo costo también se ha utilizado para la identificación de diversas especies marinas de interés comercial en diversos estudios en todo el mundo (Rasmussen, 2009). Debido a esto, se selecciona en este caso el PCR Multiplex como la opción más viable, pues produce resultados fiables a un menor costo de tiempo y dinero, que es lo que se requiere en un laboratorio que maneja una gran cantidad de análisis diarios y requiere optimizar sus metodologías y protocolos (Cuadro 13).

6.2. PCR RFLP

El PCR RFLP demostró ser una técnica muy confiable y con diferencias claras en los patrones de bandas en gel, pero requiere de más pasos. En relación al PCR Multiplex, este proceso se extiende por aproximadamente 1.5 horas más debido a los períodos de digestión enzimática y corte del ADN, empero tarda 3 horas menos que la secuenciación; la comparación de las pruebas señala al PCR Multiplex como la técnica óptima en cuanto al ahorro de tiempo.

En otro aspecto, el método PCR RFLP resulta ser una prueba más costosa en relación al multiplex (Cuadro 13), pues se deben adquirir las enzimas de restricción y en general consume más reactivos y materiales en su preparación. No obstante, se considerada una técnica de identificación fácil, rápida y relativamente barata (Hsieh, 2007).

Respecto a su uso, pudo observarse que la técnica PCR RFLP es la más utilizada para la identificación de especies mediante la muestra fresca o productos ya procesados (Wu, 2008). La preferencia radica en la versatilidad que dicho método ofrece gracias a la gran cantidad de enzimas de restricción que cuentan con la capacidad de formar patrones de identificación de bandas específicos en muchas especies (Pingoud, 2001). Cabe agregar que, aunque existe una gran cantidad de enzimas de restricción, no todas son disponibles comercialmente, así, en caso

de necesitar su producción la técnica conllevaría a un mayor consumo tiempo y recursos, y por ende, podría complicar su aplicación rutinaria.

Ambas pruebas son alternativas totalmente viables a la secuenciación, capaces de identificar de manera confiable, menos laboriosa y costosa que secuenciar. Aunque viable, se catalogó al PCR RFLP como una segunda opción para los fines de esta investigación, esto dada su dificultad y costo en relación con el PCR Multiplex sin proporcionar ventajas significativas para la identificación (Cuadro 13).

6.3. Secuenciación

Se utilizó el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI) ya que este es uno de los genes mitocondriales más conservados, debido a que codifica una proteína crítica para la respiración celular, que forma parte del complejo IV en la cadena de transporte de electrones y por lo tanto vital en la producción de energía (Paine, 2007). El diseño de iniciadores universales robustos como Vf2_t1 y fishr2_t1 y su combinación según Álvarez (2012) amplificó satisfactoriamente la región de interés en todos los grupos utilizados en este estudio. Con el gen COI confirmamos la identificación de todas las muestras recolectadas.

El árbol filogenético demostró la concordancia de las muestras con su identificación y propuso un agrupamiento congruente con estudios más completos y vigentes realizados por Collette (2006). En la ramificación superior de *I. platypterus* y *Kajikia sp.* el valor de remuestreo obtenido no permitió confirmar de manera fiable su separación, lo que evidencia la necesidad de incluir otro gen para poder determinar con mayor confianza esta agrupación, diferente es el caso de *Makaira*, *Istiophorus* y *Kajikia*, en el que se apoya la agrupación de estos en un clado común. Por otra parte, con *X. gladius* se confirma la clara distinción del pez espada con los otros picudos (Istiophoridae), siendo consistente con la clasificación de estos en otra familia (Xiphidae).

Gracias a diversos estudios de Nakamura (1985), Finnerty (1995), Collette (2006), Orrell (2006), entre otros, se ha demostrado que los picudos no pertenecen al mismo taxón de los escómbridos, lo que ha sido corroborado en este estudio, debido a que el género *Thunnus* se agrupa en un clado totalmente diferente, esto demuestra que los picudos no comparten las suficientes similitudes genéticas con los escómbridos, lo cual apoya la separación de los picudos del grupo (Figura 6). Como lo señaló Álvarez (2012) en su estudio, la utilización del gen COI permitió la distinción entre géneros de picudos, presentando las suficientes variaciones para que esto fuera posible, pero no permitió la diferenciación entre las especies de cada género, lo cual no es problema para la finalidad del estudio, pues no se requiere su identificación a nivel de especie. Esta imposibilidad del COI para la diferenciación entre especies del género *Kajikia* es concordante también, con lo reportado por Hanner (2011).

Debido a que estas especies divergieron recientemente, la distinción entre estas se vuelve más compleja, ya que no se han acumulado las variaciones necesarias para poder identificarlas correctamente utilizando un único gen, como lo es COI. Para estas especies es necesario un análisis más complejo usando varios genes u otro gen que demuestre haber acumulado las suficientes variaciones y además ser suficientemente conservado. Evidentemente COI al ser un gen tan conservado, debido a lo importante que es su función, no ha acumulado las variaciones necesarias en tan corto periodo de tiempo de manera que permita la diferenciación de estos marlines.

Capítulo 7. Conclusiones y Recomendaciones

Estas metodologías (PCR Multiplex y PCR-RFLP), son nuevas herramientas que buscan velar por la protección del pez vela y otras especies de picudos, que además, son de gran importancia en una actividad sostenible como lo es la pesca turístico-deportiva, que contribuye sustancialmente en la economía del país.

Ambas metodologías se validaron como pruebas confiables para su uso en un juzgado como evidencia, aptas para la resolución de conflictos legales por sospechas de importaciones o pescas ilícitas.

Tanto el PCR RFLP como el PCR Multiplex son metodologías aptas para la identificación de los picudos, proporcionando una alternativa eficiente y menos costosa que la secuenciación.

El PCR Multiplex resultó ser la técnica más rápida, barata y confiable, para ser utilizada como protocolo en la identificación molecular de los picudos.

Las agrupaciones filogenéticas concuerdan con la filogenia vigente, lo que confirma la correcta identificación de las muestras y abre paso a posibles estudios más a profundidad sobre las poblaciones de picudos en aguas costarricenses.

Para lograr una identificación a nivel de especie en el género *Kajikia*, se requiere el uso de otro u otros genes, además de COI, pues este es insuficiente. El uso de D-Loop podría ser una opción viable.

Este estudio sugiere herramientas eficientes y de bajo costo para identificar especies de picudo que pueden servir para reducir la exportación ilegal y la suplantación de estas especies. Para que sean efectivas se requiere además un esfuerzo conjunto con los peritos e investigadores que realizan los controles rutinarios en las zonas de desembarco, procesamiento y distribución, y

en aduanas para la exportación e importación. Así como la participación de la guardia y la policía para brindar un mejor control costero y vigilancia de irregularidades, como lo son muelles clandestinos o transportes ilegales. De no ser así, la pesca y exportación ilegal seguirán siendo un problema vigente, sin un control real y efectivo.

Bibliografía

- Acuerdo No. A.J.D.I.P/090-2009. (2009, 12 de marzo). Diario oficial La Gaceta, No 69. Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica. Abril 08, 2009.
- Álvarez, M. (2012). *Identificación molecular mediante secuenciación y PCR multiplex del pez vela (Istiophorus platypterus: Istiophoridae) en Costa Rica*. Tesis de graduación en Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
- Apostolidis, A. P., Loukovitis, D. & Tsigenopoulos, C. S. (2008). *Genetic characterization of brown trout (Salmo trutta) populations from the Southern Balkans using mtDNA sequencing and RFLP analysis*. *Hydrobiologia* 600(1): 169-176.
- Ariza, L. A., Núñez, J. G., Narváez, M., Medina, M. & Arocha, F. (2015). *Aspectos reproductivos del pez vela (Istiophorus albicans) en el mar caribe suroriental y aguas adyacentes del Océano Atlántico: un análisis preliminar*. *Collective Volume of Scientific Papers* 71(5): 2217-2231.
- Asensio, L. (2007). *PCR-based methods for fish and fishery products authentication*. *Trends in Food Science and Technology* 18(11): 558-566.
- Bangma, J. (2006). *Contemporary population structure and historical demography of sailfish (Istiophorus platypterus) in the Atlantic Ocean*. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad de Texas A&M, Estados Unidos.
- Betancur, R. R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C., ..., Ortí, G. (2013). *The tree of life and a new classification of Bony fishes*. *PLOS Currents Tree of Life*.
- Blaiklock, P. (2015). Restriction mapper. (www.restrictionmapper.org).

- Block, B. A., Stewart, A. F. & Kidd, J. (1993). *Evolution of endothermy in fish: Mapping physiological traits on a molecular phylogeny*. *Science* 260:210–214.
- Carpenter, K., Collette, B. & Russo, J. (1995). *Unstable and stable classifications of scombroid fishes*. *Bulletin of Marine Science* 56(2): 379-405.
- Claramunt, G., Herrera, G., Donoso, M. & Acuna, E. (2009). *Período de desove y fecundidad del pez espada (Xiphias gladius) capturado en el Pacífico suroriental*. *Latin American Journal of Aquatic Research* 37(1): 29-41.
- Collette, B. (2010). *Reproduction and development in epipelagic fish*. En: *Reproduction and Sexuality in Marine Fish: Patterns and Processes*, K. Cole. (Ed) University of California Press. California, USA. 21- 63.
- Collette, B., Carpenter, K. E., Polidoro, B. A., Juan-Jordá, M. J., Boustany, A., Die, D. J., ..., Yáñez, E. (2011). *High value and long life-Double jeopardy for Tunas and Bilfishes*. *Science* 333: 291-292.
- Collette, B., McDowell, J. & Graves, J. (2006). *Phylogeny of recent billfishes (Xiphiidae)*. *Bulletin of Marine Science* 79(3): 455-468.
- Collette, B., Potthoff, T., Richards, W., Uevangi, S., Russo, J. & Nishikawa, Y. (1984). *Scombroidei: development and relationships*. En Moser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall, A.W., Jr., y Richardson, S.L., (Eds). *Ontogeny and Systematics of fishes: Based on An International Symposium Dedicated to the Memory of Elbert Halvor Ahlstrom*. (591-620). New York, USA: American Society of Ichthyologists and Herpetologists.

Comisión Europea. Opinion of the Scientific Committee on Food on the use of carbon monoxide as component of packaging gases in modified atmosphere packaging for fresh meat (adopted on 13 December 2001).

De-Franco, B., Mendonça, F. F., Hashimoto, D. T., Porto-Foresti, F., Oliveira, C. & Foresti, F. (2010). *Forensic identification of the guitarfish species Rhinobatos horkelli, R. percellens and Zapteryx brevirostris using multiplex-PCR*. *Molecular Ecology Resources* 10: 197–199.

Delgado, D. (2011). Autoridades decomisan 7000 kilos de pez vela. *La Nación: Sección Sucesos*, San José, CR. Abril 02, p18A. Consultado en <http://www.nacion.com/sucesos/Autoridades-decomisan-kilos-pez-vela_0_1186881345.html>

Ehrhardt, N. M. & Fitchett, M. D. (2006). *On the seasonal dynamic characteristics of the sailfish, Istiophorus platypterus, in the eastern pacific off Central America*. *Bulletin of Marine Science* 79(3): 589-606.

Eslava, N., González, L. & Gaertner, D. (2003). *Asociación de la abundancia y la distribución vertical de atunes y peces de pico en el sureste del Mar Caribe*. *Revista Biología Tropical* 51(1): 213-220.

Fierstine, H. L. (2006). *Fossil history of billfishes (Xiphoidei)*. *Bulletin of Marine Sciences* 79: 433-453.

Fierstine, H. L., Monsch, K. A. (2002). *Redescription and phylogenetic relationships of the family Blochiidae (Perciformes: Scombroidei), Middle Eocene, Monte Bolca, Italy*. *Studie Recherche sui Giacimenti Terziari di Bolca Museo Civico di Storia Naturale di Verona* 9: 121-63.

- Finnerty, J. & Block, B. (1995). *Evolution of cytochrome b in the Scombroidei (Teleostei): molecular insights into the billfish (Istiophoridae and Xiphiidae) relationships*. Fishery Bulletin 93(1): 78-96.
- Friedman, M. (2009) *Ecomorphological selectivity among marineteleost fishes during the end-Cretaceous extinction*. Proceedings of the National Academy of Sciences 106:5218–5223.
- Galeana, I., Galván, F., Gómez, R. (2008). *Influencia del tipo de anzuelo y la profundidad de pesca en la captura con palangre de tiburones y otras especies pelágicas al noroeste del Pacífico mexicano*. Revista de Biología Marina y Oceanografía 43(1): 99-110.
- García-Cortés, B., Fernández, J., Ramos-Cardelle, A. & Mejuto, J. (2010). *Prevalence of Istiophorids (Fam. Istiophoridae) on the basis of observations of the Spanish surface longline fleet targeting swordfish (Xiphias gladius) in the Atlantic Ocean*. Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT 65(5): 1797-1823.
- Graves, J. & McDowell, J. (2003). *Stock structure of world's Istiophorid billfishes: a genetic perspective*. Marine and Freshwater Research 54(4): 287-298.
- Graves, J. & McDowell, J. (2006). *Genetic analysis of white marlin (Tetrapturus albidus) stock structure*. Bulletin of Marine Science 79(3): 469-482.
- Goujon, M., Majkowski, J. (2011). *38 Biological characteristics of tuna*. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Consultado el 11 de agosto del 2015. Disponible en: <<http://www.fao.org/fishery/topic/16082/en>>
- Haider, N., Nabulsi, I. & Al-Safadi, B. (2011). *Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene*. Meat Science 90(2): 490-493.

- Hanner, R., Floyd, R., Bernard, A., Collette, B. & Shivji, M. (2011). *DNA barcoding of billfishes*. *Mitochondrial DNA* 22(S1): 27-36.
- Herbert, P., Cywinska, A., Ball, S. & Waard, R. (2003). *Biological identification through DNA barcodes*. *Proceedings of the Royal Society B*. 270(1512): 313-321.
- Hsieh, Y. & Hwang, D. (2004). *Molecular phylogenetics relationships of puffer fish inferred from partial sequences of cytochrome b gene and restriction fragment length polymorphism analysis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52 (13): 4159-4165.
- Hsieh, H., Chai, T. & Hwang, D. (2005). *Rapid PCR-RFLP method for the identification of 5 billfish species*. *Journal of Food Science* 70 (4): 246-249.
- Hsieh, H., Chai, T. & Hwang, D. (2007). *Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfishes meats*. *Food Control* 18 (4): 369-374.
- Hyde, J., Lynn, E., Humphreys, R., Musyl, M., West, A. & Vetter, R. (2005). *Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish, and wahoo*. *Marine Ecology Progress Series* 286: 269-277.
- Hyde, J., Humphreys, M., Lynn, E. & Vetter, R. (2006). *A Central North Pacific spawning ground for striped marlin, *Tetrapturus audax**. *Bulletin of Marine Science* 79(3): 683-690.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N., Taylor, E., Burrdge, M., Bernatchez, L. (2008). *Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes*. *PLoSone* 3(6): 2490-2497.
- Integrated Taxonomic Information System. [ITIS] (2015). Consultado el 23 de octubre del 2015.
- Disponible en: <<http://www.itis.gov/>>

- Ivanova, N., Zemlak, T., Hanner, R. & Herbert, P. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7(4): 544-548.
- Johnson, D. (1986). Scombroid phylogeny: an alternative hypothesis. *Bulletin of Marine Science* 39 (1): 1-41.
- Kawakami, T., Aoyama, J. & Tsukamoto, K. (2010). *Morphology of pelagic fish eggs identified using mitochondrial DNA and their distribution in waters west of the Mariana Islands*. *Environmental Biology of Fishes* 87(3): 221-235.
- Kimura, M. (1980). *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Ley de Pesca y Acuicultura. Ley No 8436. (10 de Febrero, 2005). Diario Oficial La Gaceta, No 78. Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica. Abril 25, 2005.
- Li, B., Dettai, A., Cruaud, C., Couloux, A., Desoutter-Meniger, M. & Lecointre, G. (2009). *RNF213, a new nuclear marker for acanthomorph phylogeny*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50:345–363.
- Little, A.G., Loughheed, S. C., Moyes, C. D. (2010). *Evolutionary affinity of billfishes Xiphiidae and Istiophoridae and flat fishes Pleuronectiformes, independent and trans-subordinal origins of endothermy in teleost fishes*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:897–904.
- Luthy, S., Cowen, R., Serafy, J. & McDowell, J. (2005). *Toward identification of larval sailfish (*Istiophorus platypterus*), white marlin (*Tetrapturus albidus*), and blue marlin (*Makaira nigricans*) in the western North Atlantic Ocean*. *Fishery Bulletin* 103(4): 588-600.

- Magaña, J., Arenas, M. & Gómez, R. (2009). *La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico*. Revista médica de Chile 137 (7): 946-956.
- McDowell, J. & Graves, J. (2002). *Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes*. Fishery Bulletin 100(3): 537-544.
- McDowell, J. & Graves, J. (2008). *Population structure of striated marlin (*Kajikia audax*) in the Pacific Ocean based on analysis of microsatellite and mitochondrial DNA*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 65(7): 1037-1320.
- Mendonça, F. F., Hashimoto, D. T., Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Gadig, O. B. F., & Foresti, F. (2009). *Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques*. Molecular Ecology Resources 9: 771–773.
- Monsch, K. A., Bannikov, A. F. (2011). *New taxonomic synopses and revision of the scombroid fishes (Scombroidei, Perciformes), including billfishes, from the Cenozoic of territories of the former USSR*. Transactions of the Royal Society of Edinburgh: Earth Sciences 102: 253–300.
- Nahle, N. (2008). *Ambientes Marinos*. Biology Cabinet Organization. Consultado el 05 de septiembre del 2015. Disponible en: <http://www.biocab.org/Ambientes_Marinos.html>
- Nakamura, I. (1985). *FAO Species Catalogue: Vol.5. Billfishes of the World, An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date*. FAO Fisheries Synopsis 5(125): 3-9
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world*. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.

- Nelson, J. S., Grande T., Wilson M. V. H. (2016). *Fishes of the world*. 5th ed. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Orrell, T. M., Collette, B. B. & Johnson, G. D. (2006). *Molecular data support separate clades for Scombroidei (tunas and relatives) and Xiphoidei (billfishes)*. *Bulletin of Marine Science* 79: 505-519.
- Rabenau, H. F., Kessler, H. H., Kortenbush, M., Steinhorst, A., Raggam, R. B. & Berger, A. (2007). *Verification and validation of diagnostic laboratory test in clinical virology*. *Journal of Clinical Virology* 40: 93-98.
- Rasmussen, R. S. & Morrissey, M. T. (2008). *DNA-Based methods for the identification of commercial fish and seafood species*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7: 280-295.
- Rasmussen, R. S. & Morrissey, M. T. (2009). *Application of DNA-Based Methods to Identify Fish and Seafood Substitution on the Commercial Market*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8: 118-154.
- Restrepo-Flores, C. E. & Patiño, J. H. (2008). *Efecto del monóxido de carbono (CO) en el envasado bajo atmosferas modificadas de carne roja fresca*. Fundación INTAL. Colombia.
- Rocha, A., Garber, N., Garber, A. & Stuck, K. (2005). *Structure of the mitochondrial control region and flanking tRNA genes of Mugil cephalus*. *Hidrobiológica* 15(2): 139-149.
- Rooker, J., Simms, J., Wells, R., Holt, S., Holt, G., Graves, J., Furey, N. (2012). *Distribution and habitat associations of billfish and swordfish larvae across mesoscale features in the Gulf of Mexico*. *PLoS ONE* 7(4): e34180.

- Pingoud, A. & Jeltsch, A. (2001). *Structure and function of type II restriction endonucleases*. Nucleic Acids Research, 29(18): 3705–3727.
- Paine, M., McDowell, J. & Graves, J. (2007). *Specific identification of Western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene region sequences*. Bulletin of Marine Science 80 (2): 353-367.
- Paine, M. & McDowell, J. (2008). *Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island*. Ichthyological Research 55(1): 7-16.
- Pine, W. E., Martell, S. J. D., Jensen, O. P., Walters, C. J. & Kitchell, J. F. (2008). *Catch-and-release and size limit regulations for blue, white, and striped marlin: the role of postrelease survival in effective policy design*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 65: 975-988.
- Potthoff, T., Kelley, S. & Javech, J. (1986). *Cartilage and bone development in scombroid fishes*. Fishery Bulletin 84 (3): 647-678.
- Puentes, V. & Moncaleano, A. (Eds.). (2012). *Sistema de gestión regional para el uso sostenible de los recursos pesqueros del corredor marino del Pacífico Este Tropical (CMAR)*. Resultados de gestión en Costa Rica. Fundación Malpelo y otros Ecosistemas Marinos. 108.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular Biology and Evolution 4 (4): 406-425.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74(12): 5463-5467.

- Santini, F. & Sorenson, L. (2013). *First molecular time tree of billfishes (Istiophoriformes: Acanthomorpha) shows a Late Miocene radiation of marlin and allies*. Italian Journal of Zoology 80: 481-489.
- Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). (2015). Consultado el 13 de agosto del 2015. Disponible en: <<http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/index.php/subsecciones/view/219>>
- Sevilla, H. (2013). *Ciclo reproductivo del marlín rayado (Kajikia audax) en Cabo San Lucas, Bajo California Sur, Mexico*. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Shivji, M., Magnussen, J., Beerkircher, L., Hinteregger, G., Lee, D., Serafy, J., et al. (2006). *Validity, identification, and distribution of the round scale spearfish, Tetrapturus georgii (Teleostei: Istiophoridae): morphological and molecular evidence*. Bulletin of Marine Science 79(3): 483-491.
- Simms, J., J. Rooker, Holt, S., Holt, G. & Bangma, J. (2010). *Distribution, growth, and mortality of sailfish (Istiophorus platypterus) larvae in the northern Gulf of Mexico*. Fishery Bulletin 108 (4): 478-490
- Soto, M., Yong, M., Gutiérrez, A., Fernández, C., Lucke, R., Rojas, F., et al. (2010). *Un análisis de la contribución económica de la pesca deportiva y comercial a la economía de Costa Rica*. Instituto de Investigaciones en Ciencias Económicas, Universidad de Costa Rica.
- Teletchea, F., Maudet, C. & Hanni, C. (2005). *Food and forensic molecular identification: update and challenges*. TRENDS in Biotechnology 23(7): 359-366.
- Teletchea, F. (2009). *Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications*. Reviews of Fish Biology and Fisheries 19(3): 265-293.

- Vega-Araya, E. (2008). *Potencial de la pesca en el Pacífico costarricense*. Ambientico: Revista mensual sobre la actualidad ambiental. 173: 14-15. ISSN 1409-214X
- Wong, E. H-K. & Hanner, R. (2008). *DNA barcoding detects market substitution in North American seafood*. Food Research International 41: 828 –837.
- Wu, Y., Hsieh, C., Chen, H. & Hwang, D. (2008). *Identification of six common species of processed filefish using cytochrome b gene sequence and PCR-RFLP analysis*. The Raffles Bulletin of Zoology 19: 151-158.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos a partir de tejido animal y protocolo de lavado y elución del kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

Protocolo de extracción de ácidos nucleicos a partir de tejido animal:

En un tubo de microcentrífuga de 1.5ml se adicionaron, aproximadamente, 25mg de la muestra de tejido cortada en pequeños pedazos, se agregaron 200µL del buffer de lisis y 40µL de proteinasa K e inmediatamente se agitó e incubó a 55°C por una hora o hasta que el tejido se lisara completamente.

Finalizada la incubación se adicionaron 200µL del “binding buffer”, se agitó e incubó por diez minutos a 70°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 100µL de isopropanol y se agitó vigorosamente.

A continuación, se colocó una columna en un tubo de recolección, se transfirió la muestra a la parte superior de la columna y se centrifugó por un minuto a 8000rpm. Las muestras fueron almacenadas a -80°C.

Protocolo de lavado y elución:

Luego de centrifugar, se descartó el tubo de recolección y se colocó la columna en un nuevo tubo recolector. Seguidamente, se adicionaron 500µL del “inhibitor removal buffer” a la parte superior de la columna y se procedió a centrifugar por un minuto a 8000rpm.

Se descartó el tubo recolector y la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección. Posteriormente, se añadieron 500µL del “wash buffer” y se centrifugó por un minuto a 8000rpm. Este paso se repitió una segunda vez.

Consecutivamente, se descartó el flujo que pasó a través de la columna y se centrifugó una vez más a máxima velocidad por diez segundos.

Para la elución del ADN se procedió a colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml, agregar en la columna 200 μ L del “elution buffer” precalentado a 70°C e incubar por cinco minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación se centrifugó por un minuto a 8000rpm, se tomó el flujo y este se colocó de nuevo en la columna para incubar una vez más, por dos minutos a temperatura ambiente. Finalmente, transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó por un minuto a 8000rpm y las muestras se almacenaron a -20°C.

Anexo 2. Cuantificación de ADN

Para la cuantificación se tomaron 1.5 μ L del producto de la extracción de ADN de cada muestra. Se colocó la gota (1.5 μ L) en el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

De la lectura realizada con el software (NanoDrop 2000) se obtuvieron los datos de concentración de ADN (ng/ μ L), relación absorbancia 260/280 y absorbancia 260/230, siendo estos dos últimos datos utilizados como indicadores de calidad para evaluar la pureza del ADN extraído.

Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa

Anexo 3.1. Para PCR Universal

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v en buffer TBE 1X. El gel se tiñó con 6 μ L de GelRed y se utilizó buffer TBE 1X como buffer de corrida. Se agregó a la

muestra amplificada 2 μL de buffer de carga (6X DNA Loading Buffer, Thermo Scientific). Se agregó 25 μL de muestra por duplicado para montar en el gel, cada muestra ocupando 2 posos, para un total de 50 μL de muestra. Se utilizó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), del cual se montó 0.3 μL . Finalmente, se realizó la electroforesis durante 40 minutos con un voltaje constante de 125 V.

Anexo 3.2. Para PCR Multiplex

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v en buffer TBE 1X. El gel se tiñó con 6 μL de GelRed y se utilizó buffer TBE 1X como buffer de corrida. Se agregó 1 μL de muestra para montar en el gel. Se utilizó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), del cual se montó 0.3 μL . Finalmente, se realizó la electroforesis durante 60 minutos con un voltaje constante de 125 V.

Anexo 3.3. Para PCR RFLP

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v en buffer TBE 1X. El gel se tiñó con 6 μL de GelRed y se utilizó buffer TBE 1X como buffer de corrida. Solo para la enzima AlwI, las muestras se prepararon mezclando el volumen de reacción (aproximadamente 12.5 μL) con 2 μL de buffer de carga (6X DNA Loading Buffer, Thermo Scientific) y de dicha mezcla se tomaron 1.5 μL para montar en el gel. Se utilizó el marcador de tamaño molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific) del cual se montó 0.3 μL . Finalmente, se realizó la electroforesis durante 45 minutos con un voltaje constante de 125 V.

Anexo 4. Protocolo de extracción de Gel por microcentrífuga QIAquick (Qiagen).

1. Se cortaron las bandas de ADN del gel de agarosa y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.

2. Se pesó el pedazo de gel y para todas las muestras se trabajó con un peso de 300 mg. Se añadieron 3 volúmenes del buffer QG por cada volumen del gel (100mg ~ 100µL), por lo cual se agregaron 900 µL de dicho buffer.

3. Seguidamente, se incubó por 10 minutos a 50 °C o hasta que el gel se hubiese disuelto por completo. Además, durante la incubación se agitó, ocasionalmente, de forma manual.

4. Finalizado el período de incubación, se adicionó lo equivalente a un volumen del gel de isopropanol, por lo cual se agregaron 300 µL de este y se agitó vigorosamente.

5. Se colocó una columna del kit en un tubo de recolección de 2 ml, y para unir el ADN a la columna se añadió la muestra (máximo 800 µL), se centrifugó por un minuto a 14000rpm y se descartó el remanente en el fondo del tubo colector. Una vez que todo el volumen de muestra se hizo pasar por la columna, se adicionaron 500 µL del buffer QG, se centrifugó por un minuto a 14000rpm y nuevamente se descartó el líquido que pasó a través de la columna.

6. Posteriormente, para el lavado se agregaron 700 µL del buffer PE y se procedió a centrifugar por un minuto a 14000rpm. Así mismo, el filtrado en el fondo del tubo colector fue descartado.

7. Una vez descartado el filtrado, se centrifugó en seco la columna por un minuto a 14000rpm.

8. La columna se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y para la elución del ADN se adicionaron 30 µL del buffer EB y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Trascurrido el período de incubación se centrifugó las muestras por un minuto a 14000rpm y el

filtrado se colocó de nuevo en la columna dejándolo a temperatura ambiente por 3 minutos más. Finalmente, se centrifugó un minuto a 14000rpm se descartó la columna y las muestras se almacenaron a -20 °C.

Anexo 5. Protocolo del Big Dye Terminator Purification Kit (Applied Biosystems).

El procedimiento que se utilizó fue el especificado por el fabricante pero se trabajó con una cuarta parte del volumen establecido para cada uno de los reactivos de trabajo.

1. En tubos eppendorf de 0.2 ml se adicionaron 5 μ L del reactivo XTerminator solution.
2. Seguidamente, se agregaron 22.5 μ L de SAM solution.
3. A continuación, se añadieron 5 μ L del volumen de reacción de cada muestra.
4. Posteriormente, las muestras fueron agitadas en un vortex por 30 minutos a máxima velocidad.
5. Finalizada la agitación, las muestras fueron centrifugadas por 1 minuto a 3000rpm, lo cual provocó la separación en dos fases, una superior transparente y una inferior de apariencia viscosa.
6. Se tomaron 10 μ L de la fase superior de cada muestra, los cuales fueron colocados en la placa del secuenciador, se centrifugó la placa y se colocó en el equipo para realizar la corrida de secuenciación.