

Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

Título: Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

Title: Molecular identification of *Cynoscion* and *Merluccius* species by qPCR for authentication fish products

Autores: Marcela MORA CHIÒ^{a1}, Liseth Lucero HUAMANCHA PULIDO^b, Carlos SHIVA RAMAYONI^c y Armando HUNG CHAPARRO^d.

Afiliación:

- a. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú. marcela.mora.c@upch.pe
- b. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú. liseth.huamancha@upch.pe
- c. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú. carlos.shiva@upch.pe
- d. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú. armando.hung@upch.pe

Declaraciones de interés: Ninguna

Autor correspondiente:

Marcela Mora Chiò, MSc(c).
Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú.
Phone: +05113190000 Ext. 239257
E-mail: marcela.mora.c@upch.pe

RESUMEN

El uso de técnicas moleculares para la identificación de ayanque y merluza peruana en productos hidrobiológicos procesados o filetes congelados de difícil identificación morfológica es de gran utilidad. El

qPCR validado permite detectar ADN de fragmentos pequeños o altamente degradado debido a los procesos de cocción y pasteurización. Para la detección molecular de las especies se diseñó primers de regiones conservadas, gen ATPase 6 y regiones control, que amplifiquen secuencias cortas por debajo de 150 bp. El qPCR SYBR Green I es un método rápido, altamente sensible y específico que permite detectar en un periodo corto de tiempo bajas concentraciones de ADN: se llegó a un límite de detección de $0.00116 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN para *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus*, $0.00149 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN para *Cynoscion analis* siendo 100% sensible y específico. El método desarrollado es de fácil uso, no requiere de personal altamente especializado y puede ser empleado para la autenticación o detección de adulteración en productos hidrobiológicos como conservas o productos congelados.

PALABRAS CLAVE: ayanque, merluza, qPCR, productos hidrobiológicos.

ABSTRACT

The use of molecular techniques for the identification of weakfish and peruvian hake in processed hydrobiological products or frozen fillets of difficult morphological identification is very useful. The validated qPCR allows the detection of DNA from small fragments or DNA highly degraded due to the high temperature and pasteurization processes. DNA detection was achieved by designing primers from conserved regions, ATPase 6 and control regions, for both species by amplifying short sequences below 150 bp. El qPCR SYBR Green I is a fast, highly sensitive and specific method that allows the detection of DNA at very low concentrations in a short period of time: a detection limit of $0.00116 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ of DNA was reached for *Merluccius gayi gayi* and *Merluccius gayi peruanus*, $0.00149 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ DNA for *Cynoscion analis* being 100% sensitive and specific. The developed method is easy to use, does not require highly specialized personnel and can be used for the authentication or detection of adulteration in hydrobiological products such as preserves or frozen products.

INTRODUCCIÓN

Según la FAO en el 2016 el consumo mundial de pescado per cápita supera por primera vez los 20 kilogramos anuales. El pescado proporcionó el 6,7 por ciento de todas las proteínas consumidas por los seres humanos. Los países en desarrollo exportaron pescado por valor de 80 000 millones de dólares, lo que supuso ingresos comerciales netos más elevados que los de la carne, tabaco, arroz y azúcar en conjunto. Aumentando en un 87% la producción mundial de pescado debido a mejoras en la eficiencia de la cadena de

Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

suministro y el procesado del pescado en diferentes subproductos desde la harina de pescado, colágeno para la industria cosmética entre otros. Esto ha llevado a una sobreexplotación de las especies de peces con valores comerciales como el ayanque, merluza, atún, bonito, jurel, considerándose que se capturan con intensidad biológicamente insostenible y alarmante y son difíciles de identificar y realizar la trazabilidad una vez procesado.

Según la normativa peruana, la anchoveta (*Engraulis ringens*) es el principal y único insumo que debe ser usado en la harina de pescado, regulando la prohibición de procesar los recursos hidrobiológicos como sardina, jurel y caballa (Decreto Supremo N° 015-2007-PRODUCE). Empresas harineras y pescadores no cumplen la regulación utilizando diversas especies de peces entre ellas ayanque y merluza. El pescado y sus derivados juegan un rol importante en la nutrición del ser humano, pero también puede ser un potente alimento alérgico (Aas et al. 1969; De Martino et al. 1990; Bernhisel-Broadbent et al. 1992; Helbling et al. 1999; Kuehn et al., 2010) por lo que productos alterados o etiquetas genéricas poco específicas como descripción del producto es un gran problema económico y de salud pública. Existen varias técnicas para la detección de las especies utilizadas en productos procesados como la microscopía clásica con un límite de detección menor al 0.1%, espectroscopía del infrarrojo acoplado al microscopio (NIRM), permite detectar componentes de origen animal, sin embargo, presenta dificultades para llegar a detectar la especie animal de la muestra analizada. La prueba de ELISA y tiras reactivas determina la presencia de proteínas específicas. Sin embargo, presentan casos de falsos negativos debido a la pérdida de sensibilidad de proteínas que pasaron previamente por un proceso térmico (Bachur S., 2014).

Con el desarrollo del PCR, se introdujo la detección de genes específicos, mejorando su eficiencia cuando se empleaba PCR-RFLP, diversos métodos moleculares se han trabajado para la detección de especies de peces (Akasaki et al., 2006, Dooley et al., 2005, Fumiére, et al., 2009, Nagase et al., 2009, Quinteiro et al. 2001, Wolf et al., 2000). Sin embargo, esta técnica es más trabajosa, toma mayor tiempo y es menos específica y sensible que el qPCR. Muchas de las variantes de PCR para la identificación de ayanque y merluza trabajan con un producto de PCR de fragmentos largos, ineficiente para la detección de alimentos procesados en cocción y pasteurizados, haciendo imposible la detección de ADN degradado resultando en falsos negativos. Las variaciones específicas de los productos hidrobiológicos en sus características organolépticas originan diferencias en las preferencias del consumidor y los valores comerciales. Ambas cuestiones requieren

estrategias para garantizar la autenticidad del producto, la adulteración y una descripción incorrecta (Hargin, 1996).

Por lo que el objetivo de este trabajo es desarrollar un método molecular que detecte *Cynoscion analis* y 2 especies del género *Merluccius* para la verificación de autenticidad de los productos hidrobiológicos, siendo un método altamente sensible y específico.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Muestra y extracción de ADN

Se tomaron muestras de especies del género *Merluccius gayi gayi*, *Merluccius gayi peruanus* y *Cynoscion analis* conocidas comúnmente como merluza y ayanque respectivamente. Los especímenes se recolectaron de terminales pesqueros de Lima y norte del Perú, fueron identificados morfológicamente y llevados al laboratorio conservando la cadena de frío a 4 °C. Se utilizó 30 mg de tejido muscular crudo de cada muestra para la extracción de ADN utilizando el kit “Axyprep multisource genomic DNA miniprep kit” (Axygen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La recuperación y pureza de ADN se evaluó con un espectrofotómetro (A260/A280 nm) Nanodrop Lite (Thermo Scientific, USA). El ADN fue almacenado a –20 °C hasta su uso.

Diseño de primers, amplificación y secuenciamiento

Los primers fueron diseñados para alinear a 58°C, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs y obtener amplicones menores a 150 bp (Tabla 1), lo cual permitirá la detección de las 3 especies en el mismo protocolo de ciclamiento. La especificidad teórica de los primers fue evaluada con el software BLASTn utilizando la base de datos GenBank, sólo se usarán aquellas secuencias que no presenten homología con especies cercanas.

Se utilizaron las secuencias GenBank ID AY850707.1 (*Merluccius gayi gayi*), AY850709.1 (*Merluccius gayi peruanus*) y GQ220043.1 (*Cynoscion analis*). Las secuencias de *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* fueron alineadas usando ClustalX v.2.1 y se diseñó los primers utilizando la herramienta PrimerQuest Tool (IDT) incluyendo el SNP de la subespecie de *Merluccius gayi peruanus* (Figura 1). El ADN amplificado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, purificadas con el kit

Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

AxyPrep DNA Gel Extraction (AXYGEN Biosciences, USA) y secuenciadas (Macrogen, Korea). El secuenciamiento se realizó utilizando ambos sets de primers forward and reverse.

Condiciones de qPCR

Se utilizó un volumen final de reacción de 12.5 µl, 1X SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, USA), 0.5 uM primers, una desnaturalización inicial de 94°C x 10 min, 40 ciclos de 94°C x 45s, 58°C x 45s, 72°C x 1 min y una extensión final de 72°C x 10 min. Seguido de una curva de disociación 65 a 95°C 1 °C/s. La amplificación se realizó en un termociclador LightCycler 96 (Roche, Switzerland), y se analizó el threshold (Cq) y temperatura de melting (Tm) con el software v.1.01.0.1320.

Eficiencia de amplificación qPCR y LDT

La curva estándar se llevó a cabo mediante diluciones decimales seriadas 1:10 por triplicado utilizando el ADN cuantificado y secuenciado para cada especie. Los parámetros aceptados para la curva estándar fueron; una pendiente ideal de -3.32 con un coeficiente de correlación (R²) mayor o igual a 0.98. La eficiencia de amplificación fue calculada por la siguiente ecuación: $E = [10^{(-1 / pendiente)} - 1] \times 100\%$ (Bustin et al., 2009). El límite de detección práctico del método se consideró como la menor concentración del target que se puede detectar de forma reproducible en un intervalo de confianza del 95%.

Especificidad y sensibilidad de qPCR

La sensibilidad relativa del PCR es la proporción de muestras positivas detectadas como positivas por el PCR cuando la muestra es positiva y la especificidad relativa es la proporción de muestras negativas que el PCR detecta como negativa cuando la muestra es negativa. Se describe estadísticamente como la probabilidad condicional de detectar positiva o negativa cuando la muestra es positiva o negativa (Dohoo et al., 2003; Made et al., 2004). 10 repeticiones de qPCR de cada especie fue evaluado para la amplificación de otras especies comúnmente utilizadas en productos hidrobiológicos: bonito, anchoveta (*Engraulis ringens*), jurel (*Trachurus picturatus*), caballa (*Scomber japonicus*), atún (*Thunnus spp.*), machete (*Ethmidium maculatum*) y sardina (*Sardinops sagax sagax*). el qPCR debe detectar sólo el target. Todos los resultados serán evaluados con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Extracción de ADN

El promedio de ADN recuperado tras la extracción fue de $23.85 \pm 17.32 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ dsADN y $1.84 \pm 0.41 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de pureza, el ADN extraído permitió trabajar el PCR en tiempo final para poner a prueba los primers diseñados.

Diseño de primers y secuenciamiento

Los primers diseñados no formaron productos inespecíficos ni dímeros (Figura 2), los amplicones fueron de 106 bp *Cynoscion analis*, 133 bp *Merluccius gayi gayi* y 110 bp *Merluccius gayi peruanus*. Los resultados del secuenciamiento no son homólogas con secuencias de referencia en GenBank, demostrando la especificidad teórica de los primers diseñados y sin amplificación de especies fuera del target (Tabla 2).

Condiciones de qPCR

La amplificación de las 3 especies se representa con una curva sigmoidea por arriba del threshold y menor a $37.71 \pm 0.74 \text{ Cq}$ *Cynoscion analis*, $33.38 \pm 0.50 \text{ Cq}$ *Merluccius gayi gayi* y $33.77 \pm 0.46 \text{ Cq}$ *Merluccius gayi peruanus* (Figura 3). La temperatura de melting para cada producto fue de 79.89 ± 0.20 de *Cynoscion analis*, 80.13 ± 0.13 de *Merluccius gayi* y 79.89 ± 0.58 *Merluccius gayi peruanus* (Figura 4).

Eficiencia de amplificación qPCR y LDT

El slope de las curvas estándar se encuentran entre -3.3035 y -3.5893 , con coeficiente de regresión (R^2) mayor a 0.99 en las 3 especies (Figura 5) y eficiencias de amplificación de 90.06 % *Merluccius gayi gayi*, 96.07 % *Merluccius gayi peruanus* y 99.97 % *Cynoscion analis* (Tabla 3). El límite de detección fue de $0.00116 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN para *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* y $0.00149 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN *Cynoscion analis* (Figura 3). Ninguno de los qPCR amplificó para otras especies cercanas y utilizadas en productos hidrobiológicos (Tabla 2). El método validado es 100% específico y sensible.

Discusión

Los consumidores de todos los mercados del mundo esperan cada vez más que la industria pesquera diseñe y aplique medidas para la seguridad y trazabilidad de los productos alimenticios para asegurar que estos

Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

productos son de calidad suficiente, auténticos y debidamente etiquetados con toda la información necesaria. Por lo tanto, es necesario técnicas rápidas y fiables para controlar la seguridad de los productos y prevenir el fraude.

Uno de los métodos usados para la detección de especies marinas es por medio de la detección de proteínas, como, por ejemplo, 2-D electrophoresis and MALDI-TOF MS (Carrera et al., 2006), pero al ser usadas en productos que son procesados a altas temperaturas no presentan alta especificidad debido a la destrucción estructural que sufren en el procesamiento, siendo difícil la diferenciación de especies. Es por estas razones que el uso de PCR en tiempo real es el adecuado para la detección de estas especies en productos que sufren alteraciones ya que se trabaja con el ADN, el cual puede extraerse y detectar a pesar de los cambios ocurridos en el producto.

El estudio realizado por Quintero et al., 2001, detecto amplicones de especies de merluza en muestras de tejido y productos procesados con diferentes niveles de concentración de ADN, usando la metodología reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Este método amplifica el fragmento que contiene variación y es procesado con una enzima de restricción formando fragmentos de restricción en diferentes tamaños que permiten identificar los alelos por medio de una resolución electroforética, pero la desventaja que presenta este análisis, es la difícil identificación simultanea de varios SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) diferentes debido a que los cebadores y enzimas de restricción deben ser específicos para cada uno, algunos de estos reactivos llegan a ser muy costosas, y este proceso toma mucho tiempo (Rasmussen, H. B., 2012).

Existen estudios que detectan la especie merluza usando la sonda TaqMan (Sanchez et al. 2009), el cual presenta una alta especificidad en la detección de la especie a estudiar, ya que están diseñadas para una especie en específico, siendo imposible usarlo en la detección de dos a más especies, por lo que en este estudio no pudo ser usado. A cambio, se usó SYBR Green I, es un fluorocromo, el cual al unirse a un ADN de doble cadena (dsADN) emite una fluorescencia que permite detectar la amplificación de secuencias de dsADN. Sin embargo, su principal desventaja es que puede detectar dímeros y productos no específicos, produciendo falsos positivos (Loftis & Reeves, 2012). Este último nos permite trabajar con varias especies a la vez y es más económica que la primera, pudiendo ser diferenciadas con el análisis de las curvas de

melting, las cuales ayudan a determinar si la señal proviene del target o dímeros. En este estudio no se observó presencia de dímeros, por lo que es un protocolo adecuado para trabajos de análisis de laboratorio.

La diferencia morfológica entre las dos subespecies de merluza, *Merluccius gayi gayu* y *Merluccius gayi peruanus* es poco significativa (Hernandez et al., 2000) y mucho más si estas pasan por procesos de cambios en su estructura, por lo que el presente estudio ayuda a la diferenciación de estas especies. Se observó al secuenciamiento que no hubo homología entre las especies de estos primers diseñados y presentando diferentes temperaturas de melting que permiten diferenciar estas dos especies.

Estos primers fueron diseñados con tamaño de bandas pequeñas ya que la mayoría de los productos hidrobiológicos sufren variaciones en sus estructuras, causando una degradación del ADN, siendo necesario un amplicon de tamaño pequeño. Uno de los procesos con alta transformación es la producción de harina de pescado debido a las altas temperaturas a las que son sometidas. En un estudio realizado por Fumiere et al. (2006), en el cual trabajó un método PCR para la detección de contaminantes como harinas de especies prohibidas en piensos compuestos, comparando amplicones de diferentes longitudes, obteniendo como resultado que amplicones mayores a 174 bp no pudieron ser detectados. En el presente estudio se diseñaron amplicones de 106 bp *Cynoscion analis*, 133 bp *Merluccius gayi gayi* y 110 bp *Merluccius gayi peruanus*, logrando la amplificación de las 3 especies trabajadas. Por lo tanto, es importante el uso de kits con características de ser capaces de recuperar fragmentos cortos de ADN, minimice la cantidad de inhibidores de PCR en la muestra y pueda ser aislado eficientemente.

Agradecimientos

"Financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innóvate Perú), de acuerdo al contrato 134-PNICP-PIAP-2015".

Referencias bibliográficas

1. Aas, K., & Elsayed, S. M. (1969). Characterization of a major allergen (cod): Effect of enzymic hydrolysis on the allergenic activity. *Journal of Allergy*, 44(6), 333-343.
2. Akasaki, T., Yanagimoto, T., Yamakami, K., Tomonaga, H., & Sato, S. (2006). Species Identification and PCR-RFLP Analysis of Cytochrome b Gene in Cod Fish (Order Gadiformes) Products. *Journal of Food Science*, 71(3).

Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

3. Bachur S. 2014. Revisión de los principales métodos de detección e identificación de proteínas animales procesadas en alimentos balanceados. *SNS*: 5-6: 15-27.
4. Bernhisel-Broadbent, J., Strause, D., & Sampson, H. A. (1992). Fish hypersensitivity. II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 90(4), 622-629.
5. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
6. Carrera, M., Cañas, B., Piñeiro, C., Vázquez, J., & Gallardo, J. M. (2006). Identification of commercial hake and grenadier species by proteomic analysis of the parvalbumin fraction. *Proteomics*, 6(19), 5278-5287.
7. de Martino, M., Novembre, E., Galli, L., de Marco, A., Botarelli, P., Marano, E., & Vierucci, A. (1990). Allergy to different fish species in cod-allergic children: in vivo and in vitro studies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86(6), 909-914.
8. Decreto Supremo N° 015-2007-PRODUCE. El Peruano, Lima, Perú, August 4, 2007.
9. Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003. Chap. 5: Screening Diagnostic Tests. *Veterinary Epidemiologic Research*. AVC Inc., Charlottetown, Canada (pp. 86–113).
10. Dooley, J. J., Sage, H. D., Clarke, M. A. L., Brown, H. M., & Garrett, S. D. (2005). Fish species identification using PCR– RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis: application to detect white fish species in food products and an interlaboratory study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3348-3357.
11. FAO. El consumo mundial de pescado per cápita supera por primera vez los 20 kilogramos anuales. (2016). <http://www.fao.org/news/story/es/item/423048/icode/> Accessed 15 November 2016
12. Fumière, O., Dubois, M., Baeten, V., von Holst, C., Berben, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(6), 1045-1054.
13. Hargin, K. D. (1996). Authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 43, 277-289.

14. Hernandez, C., Galleguillos, R., & Oyarzun, C. (2000). Diferenciación genética de *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* (Pisces, Merlucciidae) y antecedentes paleogeográficos de su área de distribución. *Revista chilena de historia natural*, 73(1), 23-29.
15. Kuehn, A., Scheuermann, T., Hilger, C., & Hentges, F. (2010). Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity. *International archives of allergy and immunology*, 153(4), 359-366.
16. Mäde, D., Petersen, R., Trümper, K., Stark, R., & Grohmann, L. (2004). In-house validation of a real-time PCR method for rapid detection of *Salmonella* ssp. in food products. *European Food Research and Technology*, 219(2), 171–177.
17. Nagase, M., Maeta, K., Aimi, T., Suginaka, K., & Morinaga, T. (2009). Authentication of flying-fish-meal content of processed food using PCR-RFLP. *Fisheries Science*, 75(3), 811-816.
18. Quinteiro, J., Vidal, R., Izquierdo, M., Sotelo, C. G., Chapela, M. J., Pérez-Martín, R. I. & Rosa, C. (2001). Identification of hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR– RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5108-5114.
19. Rasmussen, H. B. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In *Gel electrophoresis-principles and basics*. InTech.
20. Sánchez, A., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Perez-Martin, R. I., & Sotelo, C. G. (2009). Identification of European hake species (*Merluccius merluccius*) using real-time PCR. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(9), 3397-3403.
21. Wolf, C., Burgener, M., Hübner, P., & Lüthy, J. (2000). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *LWT-Food Science and Technology*, 33(2), 144-150.

Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

C. analis 1 ATGACTGTAAGCCTCTTCGACCAATTTATATCCCCACCTACTTAGGAGTCCCCCTGTTA
61 GCCCTGGCCCTCACCTACCCTGAATTCTTTACCCCTCCC**CCTCTGCCCGATGACTTAAT**
121 AACCGCCTACTTACTCTCCAAGGCTGATTTATTAACCGATTTACCCAACAAATTCTTATA
181 CCCC**TAAGTCTAGGCGGACATAAGTG**GGGCTCTAATCTTAACTTCCCTTATGATTTTCCTT
241 ATTACTCTAAACATTCTAGGCCTCCTTCCCTATACTTTTACCCCTACAACCCAGCTTTCC
301 CTCAACCTGGGCCTTGCAGTGCCACTCTGACTAGCTACAGTGCTTATCGGCCTACGCAAC
361 CAACCAACTGCTGCCCTCGGACATCTCTACCAGAAGGTACCCCCACACCCCTAATCCCA
421 GTCCTTATTATCATCGAGACAATTAGCCTATTTATCCGCCATTAGCCCTAGGCGTACGA
481 TTAACCGCCAACCTCACAGCCGGCCACCTCCTAATGCAACTCACTTCTCAGCCGCCTTC
541 GTTATACTATCAATGATGCCCGCCGTGGCAGTCTTACAACGATTCTCCTGTTCTTATTA
601 ACTCTCTTAGAAGTTGCCGTAGCTATAATTCAAGCCTACGTATTTGTCCTTCTTATAAGC
661 CTTTACCTACAAGAAAACGTCTAA

M. gayi 1 ATCCCCATATTTTTATTTGGACCATTCAAGCAACTTAAATTTGAAAAAAGAACATAGACA
M. gayiper 1 ATCCCCATATTTTTATTTGGACCATTCAAGCAACTTAAATTTGAAAAAAGAACATAGACA
consensus 1 *****.*****

M. gayi 61 TAACATAAAATCTATCATCACTCTTATTTAACCTGTCAACCCATAATACACATTCTTCCC
M. gayiper 61 TAATATAAAATCTATCATCACTCTTATTTAACCTGTCAACCCATAATACACATTCTTCCC
consensus 61 ***.*****

M. gayi 121 TACAATTAACTTATTTGTATCC**CCTCACTTCTTTCTCCAAAGAC**CCCTAATTAAATCAC
M. gayiper 121 TACAATTAACTTATTTGTATCC**CCTCACTTCTTTCTCCAAAGAC**CCCTAATTAAATCAC
consensus 121 *****

M. gayi 181 CCGCTAGACTTGCTTACGAAGATACACAGTTCAGTGTAAGGTCAAGGGTACTAATTGAAG
M. gayiper 181 CCGCTAGACTTGCTTACGAAGATACACAGTTCAGTGTAAGGTCAAGGGTACT**TAATTGAAG**
consensus 181 *****

M. gayi 241 ACTCAC**ACTCAGTGAATTATTTCCTGGCATCCCTGC**CTAGCTTCAGGTCCATAGAGATCT
M. gayiper 241 **ACTCACCGCTCAG**TGAATTATTTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTTC-ATAGAGATCT
consensus 241 *****.*****

M. gayi 301 TACAGCTCATAACTAGCATTTTTGCACATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATCAAATT
M. gayiper 300 TACAGCTCATAACTAGCATTTTTGCACATCTCT--ATGTTGGCAGTCATATATCAA---T
consensus 301 *****.***** *...*

M. gayi 361 TCTCAGCATGCCGAGCGTTCTCTCTAAGGGGCAACGGGTTTTCTTTTTTTTT
M. gayiper 355 TCTCAGCATGC-GAGCGTTCTCTCTAAGGGGCAACGGGTTTTCTTTTTTTTT
consensus 361 *****.*****

Figura 1. Diseño de primers y alineamiento de secuencias consenso. *Cynoscion analis* (GQ220043.1), *Merluccius gayi gayi* (AY850707.1), *Merluccius gayi peruanus* (AY850709.1). Letras en negrita (forward), letras subrayadas (reverse).

Tabla 1. Primers y tamaño de amplicon bp

Especie	Secuencia 5'– 3'	bp
<i>Cynoscion analis</i>	Fwd: CCTCTGCCCCGATGACTTAAT Rev: CTAAGTCTAGGCGGACATAAGTG	106
<i>Merluccius gayi gayi</i>	Fwd: CCTCACTTCCTTTCTCCAAAGA Rev: TTATTCCTGGCATCCCTGC	133
<i>Merluccius gayi peruanus</i>	Fwd: CCTCACTTCCTTTCTCCAAAGA Rev: TAATTGAAGACTCACCGCTCAG	110

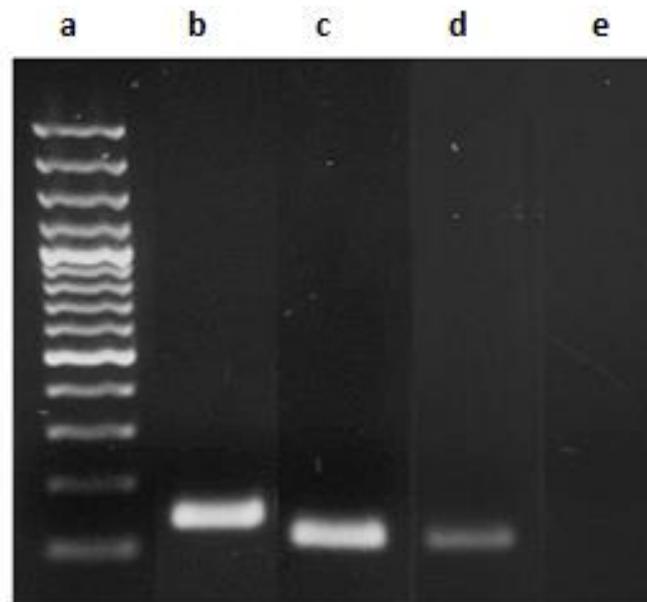
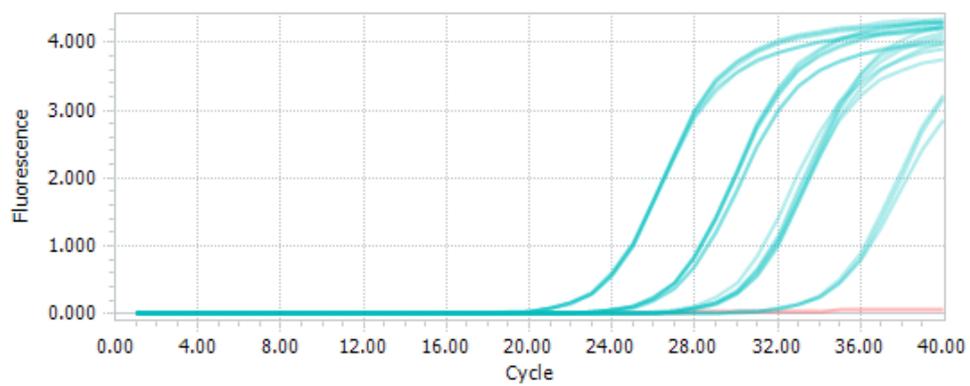


Figura 2. Electroforesis en gel de agarose 2%. (a) ladder 100bp. (b) *Merluccius gayi gayi* 133bp. (c) *Merluccius gayi peruanus* 110bp. (d) *Cynoscion analis* 106bp. (e) control negativo.

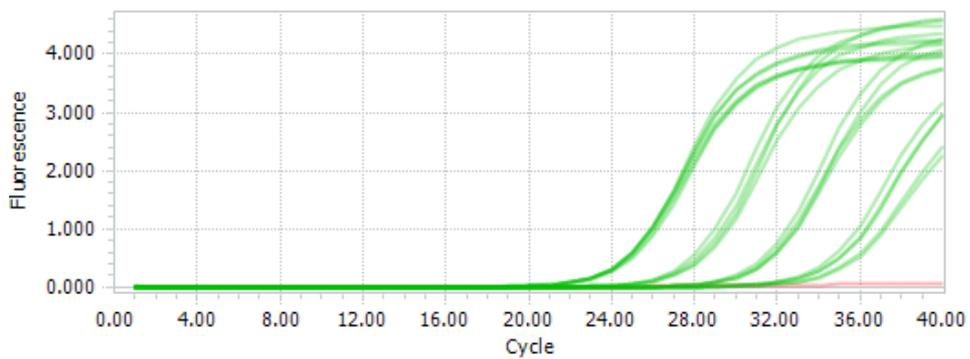
Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

Tabla 2. Especificidad qPCR. Amplificación cruzada del ensayo para hallar la especificidad, 10 repeticiones por cada especie.

Primers	Detección qPCR								
	<i>E. Ringens</i>	<i>T. Picturatus</i>	<i>S. Japonicus</i>	<i>Thunnus spp.</i>	<i>E. maculatum</i>	<i>S. sagax</i>	<i>C. Analis</i>	<i>M. Gayi gayi</i>	<i>M. Gayi peruanus</i>
<i>Cynoscion analis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Merluccius gayi gayi</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Merluccius gayi peruanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+



(a)



(b)

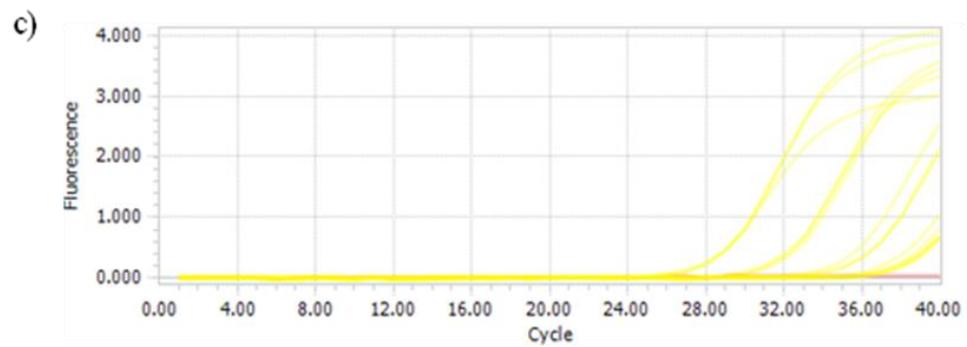
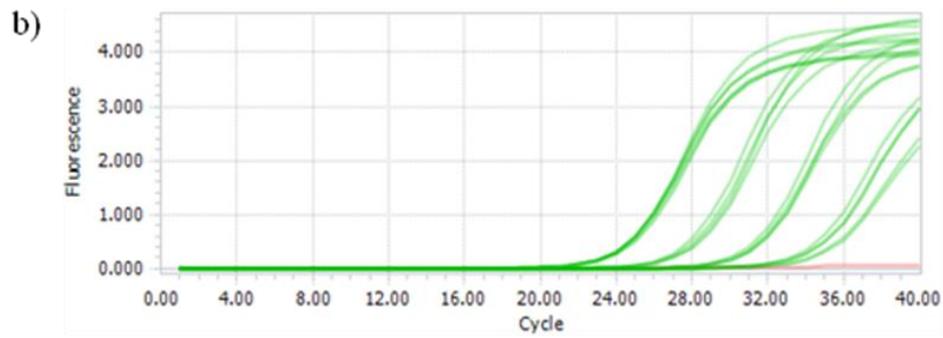
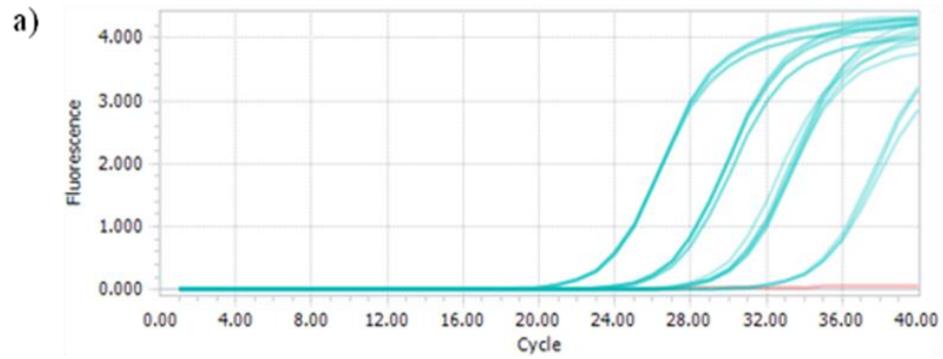
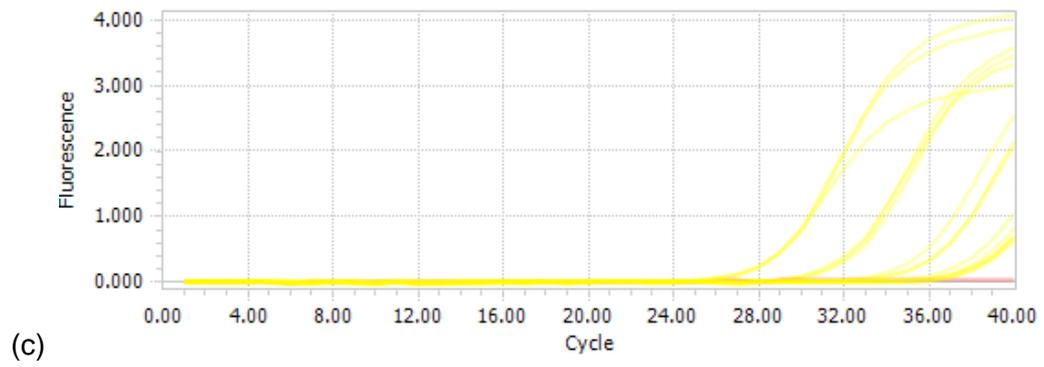


Figura 3. Curvas estándar. *Merluccius gayi gayi* (a), *Merluccius gayi peruanus* (b) y *Cynoscion analis* (c)

Identificación molecular de *Cynoscion analis* y especies del género *Merluccius* por qPCR para la autenticación de productos hidrobiológicos.

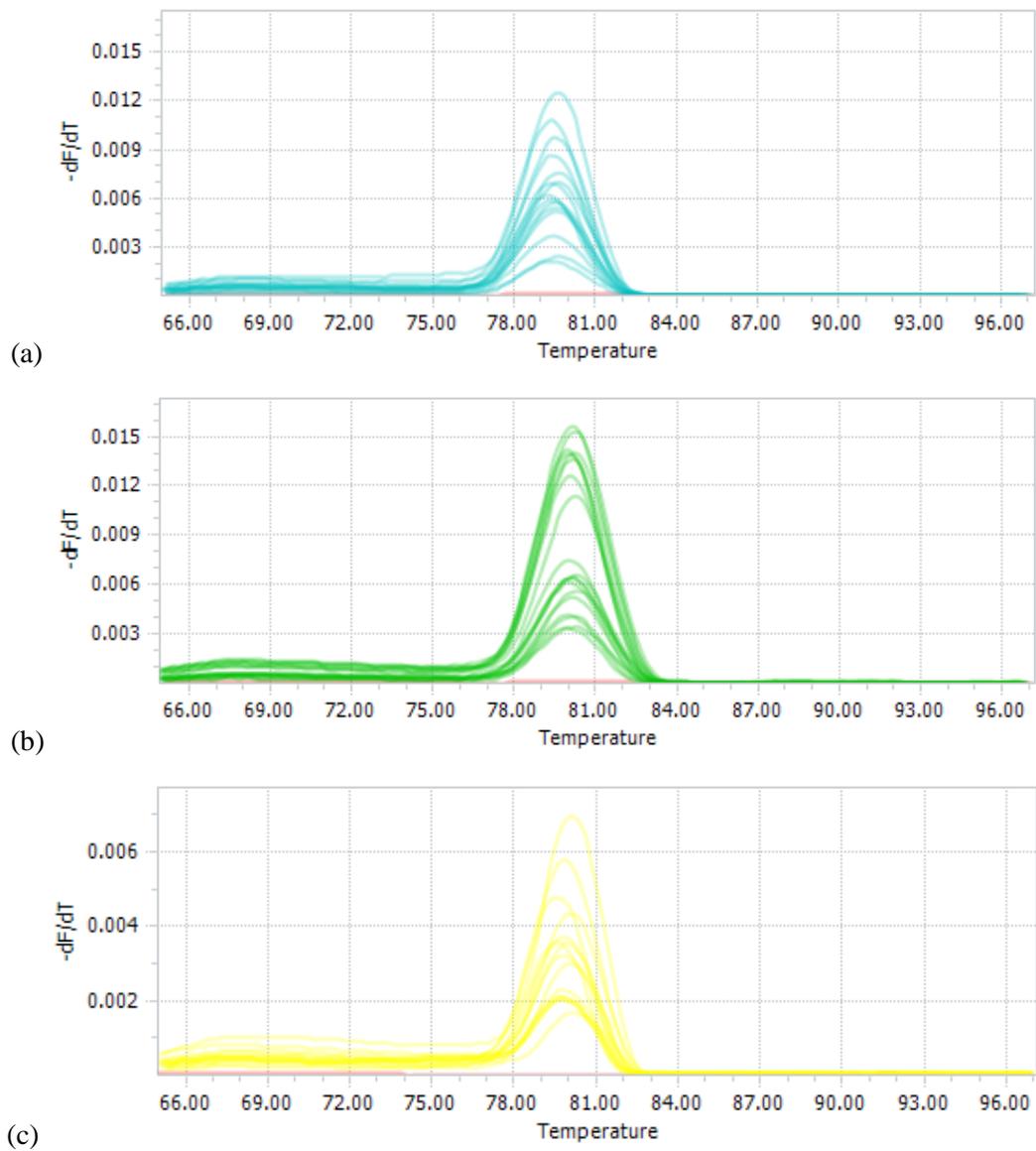


Figura 4. Picos de melting. *Merluccius gayi gayi* (a), *Merluccius gayi peruanus* (b) y *Cynoscion analis* (c)

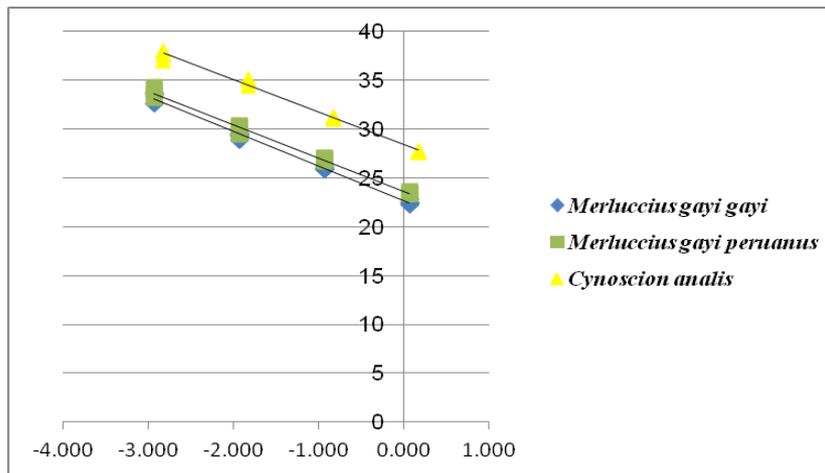


Figura 5. Regresión lineal de las especies acuáticas detectadas en qPCR tiempo real. Los valores medios de Cq es inversamente proporcional a la concentración logarítmica de las copias de ADN.

Tabla 3. Slope y eficiencia de amplificación de ayanque y merluza.

Especie	Y	R ²	Eficiencia de amplificación
<i>Cynoscion analis</i>	$-3.3227x + 28.438$	0.99	99.97 %
<i>Merluccius gayi peruanus</i>	$-3.4199x + 23.64$	0.9942	96.07 %
<i>Merluccius gayi gayi</i>	$-3.5858x + 22.631$	0.9945	90.06%