

**DETERMINACIÓN DEL ORIGEN SEGÚN ESPECIE DE CARNES CRUDAS Y
DERIVADOS CÁRNICOS, IMPORTADOS Y COMERCIALIZADOS EN
BUCARAMANGA Y SU ÁREA METROPOLITANA. FASE II: SECUENCIACIÓN
DEL GEN MITOCONDRIAL *Cyt b*.**

LAURY AMELIA ROA FUENTES

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Bucaramanga
2012**

**DETERMINACIÓN DEL ORIGEN SEGÚN ESPECIE DE CARNES CRUDAS Y
DERIVADOS CÁRNICOS, IMPORTADOS Y COMERCIALIZADOS EN
BUCARAMANGA Y SU ÁREA METROPOLITANA. FASE II: SECUENCIACIÓN
DEL GEN MITOCONDRIAL *Cyt b*.**

LAURY AMELIA ROA FUENTES

**Trabajo de grado presentado como requisito
para optar al título de bióloga.**

DIRECTOR

Jorge Hernández Torres, Ph.D.

CODIRECTOR

Oriana Danuta Serna Daza, Bióloga

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Bucaramanga
2012**

A Lilia y Hernando.
Mis padres, mi guía, mi mundo, mi motor.

A Sol, Lili y Nano.
Mis hermanos, mis cómplices, mi reto!

A "Le Petit Prince" y "Pollito" Ü.
Mis sobrinos, mi gran preocupación

Los amo!

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jorge Hernández, por la confianza depositada, por todas sus enseñanzas que indudablemente serán de gran ayuda.

A la Bióloga Oriana Serna, por su inmensa paciencia, apoyo y acompañamiento durante este proceso.

A mi familia en “Guati”: Oscar Torres y Cindy Espitia, por su amistad sincera, por hacer de los días en el “CINFIN” más agradables, por escucharme y por aguantarme. Espero estar cerca de ustedes pronto...

A mis amigas: María Ordoñez y Laura Cabanzo, niñas creo que no pudo ser mejor, fueron 6 años haciendo hasta lo imposible por lograr lo que teníamos en mente y de seguro serán muchos más. You know what I mean!

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1. Genoma mitocondrial	18
1.2. Variación genética y ADNmt: útiles herramientas para identificar y clasificar especies	20
1.3. El gen mitocondrial <i>Cyt b</i>	21
1.4. Identificación de especies animales	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1. Toma de Muestras.....	24
2.2. Extracción de ADN total	24
2.2.1. Tejido crudo/Embutidos.....	24
2.2.2. Tejido procesado/Enlatados	24
2.2.2.1. Limpieza de Tejido	24
2.2.2.2. Extracción PCI.....	25
2.2.2.3. Extracción CHELEX	25
2.3. Amplificación parcial del gen <i>Cyt b</i>	26
2.4. Clonación	27
2.5. Secuenciación	28
2.6. Determinación de origen según especie	28
3. RESULTADOS	30
3.1. Extracción de ADN total.	30
3.2. Amplificación	35

3.2.1.	Par de oligonucleótidos L14841/H15149 (Universales).....	35
3.2.2.	Par de oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R	36
3.2.3.	Par de oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R.....	37
3.3.	Clonación y secuenciación	38
3.4.	Determinación de origen según especie.	39
3.4.1.	Identificación de productos obtenidos con los oligonucleótidos L14841/H15149	39
3.4.2.	Identificación de productos obtenidos con los oligonucleótidos C- CB280F/C-CB431R	41
3.4.3.	Identificación de productos obtenidos con los oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R	42
4.	DISCUSIÓN	43
5.	CONCLUSIONES	48
	RECOMENDACIONES	49
	BIBLIOGRAFÍA	50
	ANEXOS	62

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial del gen mitocondrial *Cyt b*.....27

Tabla 2. Muestras colectadas en Bucaramanga y su Área Metropolitana e identificadas con el menor valor de distancia genética calculada (Tamura & Nei, 1993).....31

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Mapa del ADN mitocondrial en *Homo sapiens*. Abreviaturas: *ATP6* y *ATP8*, genes de las subunidades 6 y 8 de ATPasa; *COI*, *COII*, *COIII*, genes de las subunidades I, II y III de citocromo c oxidasa; *Cyt b*, gen de la proteína citocromo b; *ND1-NH6*, genes de las subunidades 1-6 de NADH hidrogenasa (Imagen tomada de Brown, 2008).....19

Figura 2. Aislamiento de ADN total. *M*: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. (A) Extracciones método PCI. (B) Extracciones método Chélex. Atún: 1, M34; 2, M35; 3, M36; 4, M37. Sardina: 5, M27; 6, M28; 7, M29; 8, M30.....35

Figura 3. Productos PCR del gen *Cyt b* amplificados con los oligonucleótidos L14841/H15149 de la muestra M4. *M*: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. 1, Bandas inespecíficas (flechas), condiciones 59 °C, 1.5 mMCl₂; 2, Condiciones 60 °C, 1 mMCl₂.....36

Figura 4. Productos PCR del gen *Cyt b* amplificados con los oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R de las muestras M27 y M28. *M*: Thermo Scientific 100 pb DNA Ladder. 1: 3 µl de amplificado de M27; 2, 3 µl de amplificado de M28.....37

Figura 5. Producto PCR del gen *Cyt b* amplificado con los oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R de la muestra M20 (Róbalo). *M*: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. 1: 3 de µl amplificado de M20.....38

Figura 6. ADN plasmídico de 4 clones de la muestra M22. *M*: GeneRuler™ 1 kb plus DNA Ladder. 1, 1 µl clon 1 no recombinante (flecha); 2, 1 µl clon 2 recombinante; 3, 1 µl clon 3 recombinante; 4: 1 µl clon 4 recombinante.....39

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Especies seleccionadas como secuencias de referencia para la construcción de la matriz de datos con el par de oligonucleótidos L14841/H15149.....	62
ANEXO B. Matriz de distancia de las secuencias patrón analizadas a partir del par de oligonucleótidos L14841/H151491. (Numeración de especies en el Anexo 1, columna 1).....	63
ANEXO C. Árbol Neighbor-joining hecho a partir del alineamiento de secuencias de 307 pb del gen citocromo b, mostrando la relación entre la muestra M12 y las especies patrón.....	64
ANEXO D. Especies de “Sardina” permitidas por la CAC seleccionadas como secuencias patrón para las secuencias analizadas a partir del par de oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R.....	65
ANEXO E. Matriz de distancia de las secuencias patrón analizadas a partir del par de oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R. (Numeración de especies en el Anexo 4, columna 1).....	66
ANEXO F. Árbol Neighbor-joining hecho a partir del alineamiento de secuencias de 103 pb del gen citocromo b, mostrando la relación entre la muestra M27 y las especies patrón.....	67
ANEXO G. Especies de “Róbalo” permitidas por el Codex Alimentarius seleccionadas como secuencias patrón para las secuencias analizadas a partir del par de oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R.....	68

ANEXO H. Matriz de distancia de las secuencias patrón analizadas a partir del par de oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R. (Numeración de especies en el Anexo 7, columna 1).....68

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>Cyt b</i>	Gen de la proteína citocromo b
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

RESUMEN

TÍTULO:

DETERMINACIÓN DEL ORIGEN SEGÚN ESPECIE DE CARNES CRUDAS Y DERIVADOS CÁRNICOS, IMPORTADOS Y COMERCIALIZADOS EN BUCARAMANGA Y SU ÁREA METROPOLITANA. FASE II: SECUENCIACIÓN DEL GEN MITOCONDRIAL *Cyt b*. *

AUTOR:

LAURY AMELIA ROA FUENTES **

PALABRAS CLAVES:

Citocromo b, identificación de carnes, productos importados, fraude.

DESCRIPCIÓN:

La vigilancia sobre la comercialización fraudulenta de especies animales se ha convertido en un tema importante en la industria de los alimentos. La tipificación de productos cárnicos se ha vuelto esencial en el control de calidad, haciendo indispensable el diseño de métodos de identificación rápidos y confiables. Los métodos basados en DNA incrementan la especificidad, sensibilidad y rendimiento en muestras altamente procesadas. En la actualidad, Colombia no ha implementado sistemas de control para identificar el origen animal de los productos que entran al país. Con el objetivo de determinar el origen animal de carnes crudas y procesadas, importadas y comercializadas en Bucaramanga y su Área Metropolitana, fueron analizados 50 productos entre congelados, enlatados y embutidos. Se realizó un análisis filogenético mediante el uso del gen *Cyt b* como marcador molecular. Los resultados demuestran que los embutidos contienen carne de cerdo en mayor cantidad y en pocos casos res y pollo, a pesar de que las etiquetas declaran proporciones iguales. Gran cantidad de enlatados contienen grasa de cerdo como condensante y esto no se encuentra registrado en las etiquetas. Los resultados revelan que hay sustitución de especies de pescados, enlatados o congelados, lo que en la industria de alimentos es conocido como fraude. De manera general, los resultados indican incongruencia entre el contenido de los productos y lo impreso en las etiquetas, incumpliendo con las normas establecidas por el INVIMA.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Hernandez Torres, Co-Director: Oriana Danuta Serna Daza.

ABSTRACT

TITLE:

DETERMINING THE ORIGIN OF SPECIES BY RAW MEAT AND MEAT PRODUCTS, IMPORTED AND MARKETED IN BUCARAMANGA AND ITS METROPOLITAN AREA. PHASE II: SEQUENCING OF MITOCHONDRIAL *Cyt b* GENE.*

AUTHOR:

LAURY AMELIA ROA FUENTES**

KEYWORDS:

Cytochrome b, identification of meat, imported products, fraud.

DESCRIPTION:

The surveillance of fraudulent marketing of animal species has become an important issue in the food industry. Typification of meat products has become essential in quality control, making necessary the designing of fast and reliable methods of identification. DNA-based methods increase the specificity, sensitivity and performance in highly processed samples. Currently, Colombia has not yet implemented control systems to identify foreign animal products entering to the country. In order to determine the animal origin of raw and processed meats, imported and marketed in Bucaramanga and its metropolitan area, fifty products were analyzed from frozen, canned and cured meats. Phylogenetic analysis was performed using the *Cyt b* gene as a molecular marker. The results show that the sausages contain a lot of pork and rarely chicken meat, although the labels declare equal portions. Lots of canned products contain lard and this is not listed on labels. The results show substitution of species of fish, canned or frozen, which in the food industry is known as fraud. In general, the results suggest inconsistency between the content of the products and the printed on labels, in violation of the standards set by the INVIMA.

* Work degree

** Faculty of Science, School of Biology, Director: Jorge Hernandez Torres, Co-Director: Oriana Danuta Serna Daza.

INTRODUCCIÓN

Garantizar la seguridad alimentaria ha sido desde hace algunas décadas, un tema de gran importancia en la industria de los alimentos a nivel mundial. Esta necesidad surge por la creciente inquietud sobre la comercialización de alimentos fraudulentos, en la cual ha sido demostrada la sustitución de una especie por otra o la mezcla engañosa de especies (Chandrika et al., 2010).

Los consumidores son los principales afectados, cuando no se establecen normas ni se realizan programas de vigilancia alimentaria confiables por parte de las autoridades competentes. Los consumidores se exponen a una cadena de riesgos que pueden ser clasificados en cuatro grandes ejes: i) Riesgo sanitario: Cuando se trata de casos de fraude, la carne se procesa en mataderos con pésimas condiciones de salubridad. ii) Consumo de alérgenos: Niños y adultos con problemas de alergias están expuestos a reacciones mortales. iii) Detrimento económico: Cobro injusto por productos de menor valor. iv) Perjuicio moral: Fraude que atenta contra las normas y costumbres de grupos sociales que se abstienen de consumir algún tipo de carne por razones religiosas o culturales (Teletchea et al., 2005; Aranguren et al., 2009).

Por otro lado, el comercio de especies en peligro de extinción ha contribuido a una severa reducción de la biodiversidad. Del 10 al 20% de todos los vertebrados y especies vegetales estarán en peligro de extinción en las próximas décadas (Espinel et al., 2011). La vida silvestre y sus productos representan el tercer puesto en el tráfico ilegal después de las drogas y las armas (IUCN; <http://www.redlist.org> y CITES <http://www.cites.org>). Una de las amenazas más graves para la supervivencia de las poblaciones de animales es la caza furtiva; cada año, millones de animales en peligro de extinción son ilegalmente matados o capturados para las colecciones de zoológicos privados, trofeos de caza, objetos ornamentales (e.g., el marfil), de consumo humano (e.g., tortugas marinas y sus huevos) o para la medicina tradicional (e.g., tigres, rinocerontes) (Manel et al.,

2003). La autenticación de los alimentos y la protección de la biodiversidad requieren métodos confiables y precisos para determinar, sin ambigüedades, las especies animales en una amplia gama de muestras degradadas y procesadas (Wetton et al., 2004).

Con base en esto, diferentes países del mundo han aumentado su nivel de exigencia con las etiquetas de los productos, con el fin de garantizar la legalidad de los mismos y mejorar el nivel de información del consumidor. Por eso, es de suma importancia contar con instrumentos adecuados para verificar, entre otros requisitos, la autenticidad de las especies indicadas en la etiqueta de los productos, evitando el fraude comercial y permitiendo un mejor control sobre la comercialización de especies (McKean, 2001; Blanco et al., 2008).

La identificación de especies animales en productos frescos basada en su forma, color o características morfológicas específicas puede servir como una herramienta de discriminación inicial. Pero cuando se tratan carnes procesadas como enlatados, embutidos o filetes, entre otros, su identificación se hace más compleja (Hsieh et al., 2002). De esta manera, se han implementado metodologías basadas en el análisis de proteínas o el ADN para su identificación. Desafortunadamente, los tratamientos a los que son sometidas las carnes, como altas temperaturas, deshidratación y cambios de pH, destruyen las propiedades bioquímicas y la integridad estructural de las proteínas, haciendo impráctico el análisis con estos métodos (Rasmussen et al., 2008). Por esta razón, las metodologías basadas en ADN son ampliamente utilizadas por ser una molécula altamente estable, que permite el análisis de los productos alimenticios elaborados y tratados térmicamente y gracias a su ubicuidad, cualquier tipo de tejido puede ser analizado (Ferguson et al., 1995).

En Colombia no se llevan a cabo controles serios sobre el origen animal de los productos que entran al país. Entidades a nivel nacional como el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) encargada del registro y

control de las importaciones, bajo el decreto 3075 de 1997, establece las normas de producción, almacenamiento, distribución, transporte y comercialización de productos importados al país. A pesar de esto, no se ejerce ningún tipo de vigilancia acerca de la legalidad del contenido animal presente en los productos. Gran parte de los controles que se ejercen en Colombia están basados en los certificados expedidos por la autoridad sanitaria del país exportador y en los pocos casos en que se realizan, están dirigidos hacia el riesgo sanitario e inocuidad de los alimentos.

En este estudio, se determinó el origen animal de 50 carnes crudas y procesadas, importadas y comercializadas en Bucaramanga y su Área Metropolitana. Se utilizó el gen mitocondrial *Cyt b* como marcador molecular. Los resultados muestran sustitución de especies e incongruencia entre el contenido de los productos y lo impreso en las etiquetas. Adicionalmente, este estudio emplea un método eficaz en la identificación del origen de especie de las carnes crudas y derivados cárnicos, ofreciendo un panorama preliminar sobre la legalidad de los productos importados y distribuidos en la región.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Genoma mitocondrial

Las mitocondrias, organelos que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas, son responsables de la producción de la mayor parte de la energía útil derivada de la degradación de los carbohidratos y ácidos grasos, que finalmente es convertida en trifosfato de adenosina (Cooper & Hausman, 2008).

Una de las características importantes de la mitocondria es que es un organelo con sistema genético propio (ADNmt), con gran parte de la maquinaria necesaria para su expresión; es decir, para replicar, transcribir y traducir la información genética que contiene (Solano et al., 2001). De esta manera, la producción energética de la mitocondria depende de factores codificados tanto por el núcleo como por el ADNmt, que modulan su función, incluyendo la actividad enzimática y la disponibilidad de cofactores (García & Goldenthal, 2006).

En mamíferos el genoma mitocondrial presenta diferentes propiedades: Se constituye de moléculas circulares de doble cadena, con varias copias por organelo (Collombet et al., 1998). Está libre de histonas, no cuenta con mecanismos de reparación, ostenta un rápido ritmo de sustitución de nucleótidos (Martin & Palumbi, 1993) y es heredado maternalmente (Li et al., 2010). Tiene una región no codificante, conocida como D-loop (en los vertebrados y equinodermos) o región rica en A+T (invertebrados), que al parecer ejerce el control sobre su replicación y transcripción (Arias et al., 2003).

En humanos, este genoma se constituye por 16569 pares de bases, con 37 genes que codifican 13 subunidades de cuatro de los cinco complejos que conforman la cadena de transporte de electrones, 22 ácidos ribonucleicos de transferencia y dos ácidos ribonucleicos ribosomales (Barrera et al., 2000) (Fig. 1). A su vez, se asume ausencia total de recombinación y presenta una tasa de mutación

comparativamente alta (5-10 veces mayor) en relación con el ADN nuclear (Gray et al., 1999).

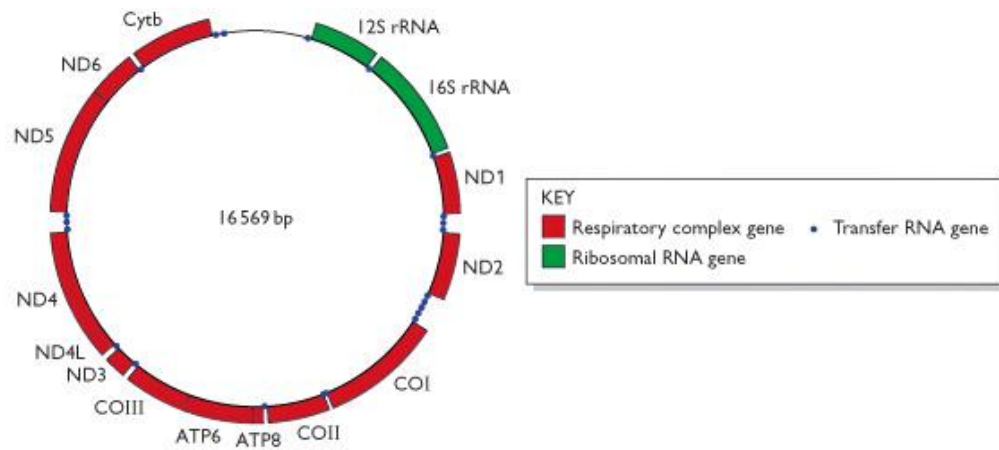


Figura 1. Mapa del ADN mitocondrial en *Homo sapiens*. Abreviaturas: *ATP6* y *ATP8*, genes de las subunidades 6 y 8 de ATPasa; *COI*, *COII*, *COIII*, genes de las subunidades I, II y III de citocromo c oxidasa; *Cyt b*, gen de la proteína citocromo b; *ND1-NH6*, genes de las subunidades 1-6 de NADH hidrogenasa (Imagen tomada de Brown, 2008).

La relativa simplicidad, la alta tasa de evolución y el modo de herencia uniparental han hecho del ADNmt una molécula bien estudiada desde diversos puntos de vista evolutivos (Marshall & Baker, 1998; Gebru et al., 2006; Kujoth et al., 2005; Tozzo et al., 2011). Además, el genoma mitocondrial se ha caracterizado por ser un marcador útil, tanto para estudios poblacionales como filogenéticos, por presentar una tasa de sustitución de bases alta y cambios en el tamaño total de la molécula debido a inserciones y deleciones, principalmente en la región rica en A+T. Datos más recientes demuestran que la translocación de genes que codifican ARNt parece ser más frecuente de lo que se pensaba, generando cambios en el orden de los genes entre organismos filogenéticamente relacionados (Bejarano, 2001; Gray et al., 2001; Silvestre, 2002).

1.2. Variación genética y ADNmt: útiles herramientas para identificar y clasificar especies

La variabilidad es producida por eventos aleatorios como mutaciones, recombinaciones o alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas) (Miller, 2004). Se presenta en todas las poblaciones y se manifiesta en cada individuo haciendo de éste una unidad genética única (Vogel & Motulsky, 1997).

Una de las principales causas de variabilidad son las mutaciones, producidas por sustitución, inserción, delección o recombinación de nucleótidos, que pueden propagarse en la población por deriva genética o selección natural, hasta alcanzar un estado fijo en una especie (Hartl & Clark, 1997).

Dentro de la mitocondria se consume oxígeno para proporcionar energía requerida por la célula; esta actividad metabólica produce radicales libres con efecto mutagénico (Silva et al., 2008). La molécula de ADNmt no posee histonas protectoras que impidan el daño oxidativo producido por los radicales. Además, la ADN polimerasa mitocondrial presenta una escasa actividad correctora con respecto a la nuclear (Mendoza et al., 2003). En consecuencia, la variación de secuencias entre individuos de una misma especie es relativamente grande produciendo, en un mismo individuo a lo largo de su vida, una pequeña heterogeneidad en la molécula (Wallace, 1992).

Fundamentados en la variabilidad inter e intraespecífica, en las últimas décadas los estudios basados en el ADNmt han sido dirigidos hacia el entendimiento de las relaciones filogenéticas (Hassan et al., 2008; Oven & Kayser, 2009; Sun et al., 2010), taxonómicas (Ruiz et al., 2007; Galtier et al., 2009; Kartavtsev, 2011) y genealógicas (Thorne & Wolpoff, 1992; Bosch et al., 2003; Gallo et al., 2003), así como el análisis de la estructura genética de las poblaciones (Peña et al., 2002; Silva et al., 2008; Marín et al., 2009).

1.3. El gen mitocondrial *Cyt b*

El citocromo b es una proteína de membrana constituyente de la subunidad del complejo III de la cadena respiratoria, encargada de catalizar la oxidación del ubiquinol a ubiquinona y transferir electrones al citocromo c para la generación de ATP (Voet et al., 2004).

A nivel proteico el citocromo b presenta una tasa lenta de sustitución de aminoácidos y principalmente los ubicados en los dominios que atraviesan la membrana (Irwin et al., 1991). En relación con su secuencia nucleotídica, la variación se presenta con tasas distintas de acuerdo a la región analizada (Moritz et al., 1992). Por lo general, las regiones variables se ubican adyacentes a otras altamente conservadas, para las que han sido diseñados una amplia variedad de oligonucleótidos, que permiten la amplificación de regiones específicas del gen, en una extensa variedad de vertebrados (Shukla et al., 2001).

Las características del gen *Cyt b* lo han postulado como uno de los genes mitocondriales más conocidos con respecto a la estructura y función de sus productos proteicos (Hauska, 2004; Alric et al., 2005; Ghezzi et al., 2011) y uno de los genes más útiles en la determinación de relaciones filogenéticas (Esposti et al., 1993; Ramírez et al., 2005; Formas et al., 2008).

1.4 Identificación de especies animales

Las agencias gubernamentales involucradas en la determinación del origen animal de productos se enfrentan a graves problemas, cuando los diferentes procesos a los que son sometidos los alimentos han eliminado todas las características físicas que permitan su identificación (Barlett et al., 1992). Con el desarrollo de la biotecnología molecular, se han superado estas limitaciones con métodos para la identificación basados en DNA como FINS, PCR-RFLP y PCR-específica (Zhang et al., 2010).

En 1992, Bartlett & Davidson desarrollaron la FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*), una de las metodologías más rápidas y reproducibles usadas en la identificación de especies animales (Teletchea et al., 2005). El método parte de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN para la identificación de los cambios o sustituciones nucleotídicas de las secuencias del gen en estudio. Con base en comparaciones de esta secuencia con otras ya conocidas, es posible el cálculo de distancias genéticas que permite finalmente concretar el taxón al que pertenece dicho gen (Quintero et al., 2001).

Comparado con otras metodologías como PCR-RFLP o PCR especie específica este método presenta diferentes ventajas: i) La posible detección de múltiples especies en un mismo producto (Hold et al., 2001); ii) puede ser aplicada a una amplia variedad de productos, incluyendo aquellos que han sido sometidos a intensos procesos de transformación (Lago et al., 2011_a) y por último; iii) los resultados arrojados no se ven afectados por la variabilidad intraespecífica de las secuencias (Chapela et al., 2003_a). La región génica seleccionada debe presentar alta variabilidad interespecífica y baja variabilidad intraespecífica, con el fin de evitar ambigüedades en el momento de la identificación (Rasmussen et al., 2008).

En la actualidad, la secuenciación y el alineamiento del gen mitocondrial *Cyt b* han sido ampliamente utilizados para la identificación de especies en productos alimenticios, en especial cuando las características morfológicas de la muestra no son claras (Chapela et al., 2003_b; Balitzki-Korte et al., 2005; Karaiskou et al., 2010).

Los resultados obtenidos postulan esta metodología como un posible control de calidad que beneficia tanto a consumidores, como a comerciantes de productos cárnicos crudos y procesados. Además, permite verificar la trazabilidad del alimento y garantiza la competencia limpia entre los comerciantes (Lago et al., 2011_b).

Aunque la secuenciación era una técnica laboriosa que requería de una infraestructura costosa, en la actualidad la revolución genómica ha creado nuevos métodos rentables de secuenciación, en particular de electroforesis capilar. Hoy la secuenciación es una técnica de rutina y un instrumento práctico y óptimo para la identificación de especies (Blanco et al., 2008).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Toma de Muestras

Se compraron en Bucaramanga y su Área Metropolitana 50 muestras aleatorias de carnes crudas y derivados cárnicos importados.

Las muestras fueron registradas, transportadas y almacenadas de acuerdo a los métodos de muestreo previamente establecidos en el laboratorio (Rincón et al., 2004).

2.2. Extracción de ADN total

El método de extracción de ADN total para cada muestra fue seleccionado de acuerdo con los aditivos como salsas, aceites o agua, y al tipo de procesamiento como enlatado, embutido o deshidratado.

2.2.1. Tejido crudo/Embutidos

Para este tipo de muestras, se empleó el kit de extracción DNeasy Tissue® (Qiagen, Maryland) utilizando entre 25 y 45 mg de tejido, siguiendo el protocolo para aislamiento de ADN total de tejidos animales descrito en el manual del usuario.

2.2.2. Tejido procesado/Enlatados

2.2.2.1. Limpieza de Tejido

300 mg de tejido fueron previamente lavados con agua destilada; el exceso de grasa presente en el músculo fue eliminada por incubación toda la noche en cloroformo : metanol : agua destilada (1:2:0.8). El tejido desengrasado fue lavado con agua destilada y recuperado para la extracción de ADN.

2.2.2.2. Extracción PCI

Se realizó el protocolo descrito por Rincón et al., (2004) de la siguiente manera: Con la ayuda de un mortero previamente esterilizado se trituraron 300 mg de tejido y se introdujo en un tubo de microcentrifuga con 500 µl de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS) y 3.2 U de proteinasa K. Se mezcló fuertemente y se incubó por 4 h a 37 °C. Fue necesario mezclar ocasionalmente para mantener el tejido en suspensión.

Se incubó en hielo por 30 min y luego se centrifugó por 10 min a 12000 g. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y mezclado con 500 µl de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó por 5 min a 12000 g y se transfirió la fase superior acuosa a un nuevo tubo. Se adicionó un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 12000 g. Este paso se realizó dos veces.

El ADN fue precipitado con 1/10 de volumen de 3 M acetato de sodio y dos volúmenes de 100% etanol frío. Se centrifugó por 15 min a máxima velocidad y el sobrenadante fue descartado. Se lavó el sedimento con 70% etanol frío y se dejaron evaporar las últimas trazas de etanol.

El sedimento fue resuspendido en 50 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) con una incubación a 37 °C durante 5-10 h. Finalmente, los extractos fueron almacenados a -20 °C.

2.2.2.3. Extracción CHELEX

Se realizó el protocolo descrito por Jérôme et al., (2003) de la siguiente manera: 300 mg de tejido previamente lavado y desengrasado fueron mezclados con 300 µl de 5% Chelex, 3.2 U de proteinasa K y 30 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0). Se incubó a 37 °C durante 5-10 h hasta alcanzar la digestión total del tejido. Se calentó por 15 min a 100 °C para desnaturalizar y precipitar proteínas y finalmente se centrifugó a 12000 g por 10 min. La fase acuosa

superior, que contenía el ADN en suspensión, fue transferida a un nuevo tubo y almacenada a -20 °C.

2.3. Amplificación parcial del gen *Cyt b*

Se amplificó mediante PCR un fragmento del gen *Cyt b* con el uso de los oligonucleótidos universales L14841/H15149 (Kocher et al., 1989) (Tabla 1). Este método fue previamente estandarizado en nuestro laboratorio (Rincón et al., 2004). Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl y fueron preparadas con 1X Taq buffer (750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.18 µM de cada oligonucleótido, 1.25 U Taq polimerasa (Fermentas) y 50-100 ng de ADN total. Las rutinas de PCR se iniciaron con una desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 58 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min. El último ciclo fue seguido por un paso de extensión a 72 °C por 5 min.

Para muestras con presunto origen Sardinias, fueron utilizados los oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R que amplifican un fragmento de 142 pb (Jerôme et al., 2003) (Tabla 1). Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl y fueron preparadas con 1X Taq buffer (750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20), 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.18 µM de cada oligonucleótido, 0.75 U de Taq polimerasa (Fermentas) y 100-300 ng de ADN. Un paso inicial de desnaturalización fue llevado a cabo a 94 °C por 5 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 s, alineamiento a 56 °C por 20 s y extensión a 72 °C por 20 s. El último ciclo fue seguido por un paso de extensión a 72 °C por 7 min.

Para muestras con presunto origen Sardina, Atún, Berberechos, Pescado, Arenques, Anchoas, Salmón, Róbalo, Merluza y Caballa fueron utilizados los oligonucleótidos Cytb144F/Cytb272R (Meritt et al., 1998) (Tabla 1). Cada reacción de PCR fue realizada a un volumen final de 25 µl y fueron preparadas con 1X Taq

buffer (750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20), 2 mM MgCl₂, 0.2 μM de cada dNTP, 1 μM de cada oligonucleótido, 0.5 U de Taq polimerasa (Fermentas) y 100-300 ng de ADN. Un paso inicial de desnaturalización fue llevado a cabo a 94 °C por 5 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min. El último ciclo fue seguido por un paso de extensión a 72 °C por 5 min.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial del gen mitocondrial *Cyt b*.

Oligonucleótido	Secuencia	Referencia
L14841	5'- AAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCAT GATGAAA-3'	Kocher et al., 1989
H15149	5'- AACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	
C-CB280F	5'- TGCATTTACGCCACATTGGCCGAGG-3'	Jerôme et al., 2003
C-CB431R	5'-GTGGCCCCTCAGAAGGACATTTGGCC-3'	
Cytb144F	5'-TGAGSNCARATGTCNTWYTG-3'	Meritt et al., 1998
Cytb272R	5'-GCRAANAGRAARTACCAAYTC-3'	

Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador Swift™ MaxPro (Esco) y los productos amplificados fueron visualizados en geles 1-2% agarosa coloreados con EZ-Vision® (Amresco). Posteriormente, los amplificados fueron purificados con columnas GeneJET™ PCR Purification Kit.

2.4. Clonación

Los productos PCR purificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy Vector® (Promega) y propagados en células competentes de *E. coli* JM109 con el método de CaCl₂, de acuerdo al protocolo propuesto por Sambrook et al., (1989).

Se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico de acuerdo con el método propuesto por Zhou et al. (1990).

2.5. Secuenciación

El servicio de secuenciación fue contratado con la empresa MacroGen Inc. (Corea) mediante electroforesis capilar. Los productos PCR purificados de muestras en donde fue obvia la presencia de un único origen animal, fueron secuenciados de manera directa con los oligonucleótidos de amplificación (Tabla 1). Por otra parte, para muestras con más de una especie animal en su contenido, fueron secuenciados 4 clones utilizando el oligonucleótido pUC/M13 Forward Sequencing (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') de pGEM-T Easy.

2.6. Determinación de origen según especie

Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999) y la presencia de posibles secuencias quiméricas fue evaluada mediante la aplicación online Chimera-Check de la base de datos para genes ribosomales (Cole et al., 2003).

Las base de dato construída por Rincón et al., (2004) fue considerada obsoleta. Por lo anterior, nuevas bases de datos específicas fueron construidas para los 3 pares de oligonucleótidos utilizados (L14841/H15149, C-CB280F/C-CB431R y CYTB144F/CYTB272R). Cada una de éstas, se compone de secuencias de especies de referencia, dentro de las cuales se incluyen aquellas que son comercialmente permitidas por la CAC. Esta Comisión fue establecida por la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la organización Mundial de la Salud (OMS), quienes establecen las normas, directrices y códigos de prácticas alimentarias internacionales, y a partir de las cuales el INVIMA fundamenta sus controles.

Construidas las bases de datos, se realizaron comparaciones directas de las secuencias correspondientes, mediante alineamientos con ClustalW (Larkin et al., 2007). El cálculo de distancias genéticas se hizo usando el método Tamura-Nei (1993); la construcción de árboles de similitud con el método Neighbor-Joining y la

validación de sus agrupamientos con un bootstrap de 1000 réplicas con el programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011). Con estos análisis se realizó la identificación o discriminación inicial de cada una de las muestras.

Se utilizaron los niveles de discriminación empleados por el *Barcode of Life Data System*, que propone valores de distancia menores o iguales al 1% (0.01) para determinación a nivel de especie y valores iguales o menores al 3% (0.03) a nivel de género (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Cuando el valor de la distancia genética fue mayor al 3% (0.031) se asumió este valor como un criterio de discriminación inicial y se continuó con la determinación mediante alineamiento de nucleótidos BlastN contra las base de datos de Genbank y EMBL, considerando una identificación a nivel de género y especie con valores de similitud de $\geq 95\%$ y $\geq 97,5\%$, respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1. Extracción de ADN total.

Se colectaron 50 productos cárnicos entre crudos, enlatados, embutidos y precocidos en diferentes establecimientos comerciales en Bucaramanga y su área Metropolitana. Adicionalmente, se registró la información específica contenida en cada etiqueta (Tabla 2, columnas 1, 2, 3 y 4).

Para la extracción de ADN fueron seleccionados 3 diferentes métodos (descritos en el numeral 2.2) aplicados de acuerdo con el tipo de procesamiento (enlatado, embutido, etc.) de cada una de las muestras.

En las muestras M10 y M16 fue necesario realizar, previo a la extracción, un proceso de limpieza de tejido (descrito en materiales métodos) para eliminar las sustancias aditivas como picantes y salsas que disminuyen la calidad del ADN extraído. Además, muestras de Chorizo se trataron con una solución de desengrase cloroformo : metanol : agua destilada (1:2:0.8) y posteriores lavados sucesivos con agua destilada, con el fin de ayudar a la eliminación de posibles contaminantes e inhibidores de PCR que no son excluidos durante el proceso de extracción (Besbes et al., 2011).

La extracción de ADN con el Kit DNeasy Tissue® (Tabla 2, muestras 1-20) en muestras crudas o pre-cocidas necesitó de un tiempo más prolongado de digestión con proteinasa K. En ocasiones fue necesario incubarlas durante toda la noche hasta obtener digestión total del tejido. Esta clase de muestras presentan un estado más conservado en comparación con los embutidos o enlatados, haciendo que el proceso de lisis tome más tiempo.

Tabla 2. Muestras colectadas en Bucaramanga y su Área Metropolitana e identificadas con el menor valor de distancia genética calculada (Tamura & Nei, 1993). El presunto origen corresponde a la(s) especie(s) cárnica(s) descrita en la etiqueta de cada muestra. V.L., Venta libre. S.D., Secuenciación directa. N.C., No concluyente (casillas en amarillo). Las casillas en rojo representan hallazgos. Para facilitar la interpretación, las muestras pares han sido sombreadas en celeste.

Muestra		Proceso	Aditivos	Presunto origen	Oligonucleótidos	Clon	Especie más cercana	Menor distancia genética
M1	Jamón Serrano	Embutido	X	V.L.	L14841/H15149	S.D.	<i>Sus scrofa</i>	0.010
M2	Salchichón	Embutido	X	V.L.	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.010
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.003
M3	Salchichón	Embutido	X	V.L.	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.000
M4	Salame	Embutido	X	V.L.	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.010
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.010
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.000
M5	Chorizo	Embutido	X	Cerdo	L14841/H151498	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.000
M6	Chorizo	Embutido	X	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.000
M7	Salame	Embutido	X	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.000
M8	Salami	Embutido	Finas hierbas	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.020
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.000

M9	Chorizo	Embutido	X	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.00
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.007
M10	Chorizo	Embutido	Picante	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.000
M11	Chorizo	Embutido	X	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.007
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.003
M12	Chorizo	Embutido	X	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.017
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.007
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.003
M13	Jamón serrano	Embutido	X	V.L.	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.003
M14	Salame sopressata	Embutido	X	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.007
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.003
M15	Salsa bolognesa	Pre-cocido	Carne bovina	Carnes bovinas	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.002
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.002
M16	Merluza blanca	Pre-cocido	Salsa marina	<i>Merluccius albidus</i>	L14841/H15149	S.D.	<i>Merluccius albidus</i>	0.073
M17	Palmitos de mar	Pre-cocido	X	Merluza	L14841/H15149	1	<i>Decapterus macarellus</i>	0.215
						2	<i>Decapterus macarellus</i>	0.215
						3	<i>Decapterus macarellus</i>	0.215
						4	<i>Decapterus macarellus</i>	0.216
M18	Pollo Korma	Pre-cocido	X	Pollo	N.C.			
M19	Ensalada de surimi	Pre-cocido	Palmitos	V.L.	N.C.			

M20	Róbalo	Crudo	Filete	Róbalo	CYTB144F/CYTB2 72R	S.D.	<i>Micropterus cataractae</i>	0,274
M21	Jamón Endiablado	Enlatado	X	Cerdo y Pollo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.007
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.002
M22	Jamón Endiablado	Enlatado	X	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.010
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.003
M23	Paté de Cerdo	Enlatado	X	Cerdo	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						3	<i>Gallus gallus</i>	0.010
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.004
M24	Cerdo	Enlatado	En ajo	Cerdo	N.C.			
M25	Chucrut	Enlatado	Grasa	Cerdo	N.C.			
M26	Mousse de Pato	Enlatado	Aceitunas	Cerdo, pollo y pato	L14841/H15149	1	<i>Gallus gallus</i>	0.000
						2	<i>Gallus gallus</i>	0.000
						3	<i>Gallus gallus</i>	0.000
						4	<i>Gallus gallus</i>	0.000
M27	Sardinas	Enlatado	Salsa de tomate	Sardinas (sin sp)	C-CB280F/C- CB431R	S.D.	<i>Opisthonema oglinum</i>	0.169
M28	Sardinas	Enlatado	Salsa de tomate	Sardinas (sin sp)	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.003
					C-CB280F-C- CB431R	S.D.	<i>Opisthonema oglinum</i>	0.169
M29	Sardinas	Enlatado	X	<i>Sardinops sagax</i>	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
						3	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						4	<i>Sus scrofa</i>	0.000
					C-CB280F/C- CB431R	S.D.	<i>Opisthonema oglinum</i>	0.169
M30	Sardinas	Enlatado	X	Sardinas (sin sp)	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.000
M31	Sardina	Enlatado	Salsa picante	Sardinas (sin sp)	L14841/H15149	1	<i>Bos Taurus</i>	0.000
M32	Sardinas	Enlatado	X	<i>Engraulis ringens</i>	N.C.			
M33	Atún	Enlatado	Agua	Atún (sin sp)	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						2	<i>Gallus gallus</i>	0.000
M34	Atún	Enlatado	Rallado,	Atún	L14841/H15149	1	<i>Bos Taurus</i>	0.000

			aceite	(sin sp)				
M35	Atún	Enlatado	Aceite	<i>Thunnus albacares</i>	N.C.			
M36	Atún	Enlatado	Agua	Atún (sin sp)	N.C.			
M37	Atún	Enlatado	Aceite	<i>Thunnus albacares</i>	N.C.			
M38	Atún	Enlatado	Aceite	Atún (sin sp)	N.C.			
M39	Atún	Enlatado	Aceite	Atún (sin sp)	N.C.			
M40	Atún	Enlatado	Lomitos, aceite	<i>Thunnus albacares</i>	N.C.			
M41	Atún	Enlatado	Lomitos	Atún (sin sp)	N.C.			
M42	Atún	Enlatado	Aceite	Atún (sin sp)	N.C.			
M43	Pescado	Enlatado	Salsa de tomate	<i>Opisthonema libertate</i>	C-CB280F-C/CB431R	S.D.	<i>Sardinops caerulea</i>	0.142
M44	Arenques	Enlatado	Salsa de tomate	Arenques	L14841/H15149	1	<i>Bos Taurus</i>	0.001
M45	Anchoas	Enlatado	Filetes	Anchoas	L14841/H15149	1	<i>Sus scrofa</i>	0.003
						2	<i>Sus scrofa</i>	0.000
M46	Berberecho	Enlatado	X	Berberecho	N.C.			
M47	Caballa del sur	Enlatado	Escabeche	Caballa	N.C.			
M48	Salmon Rosado	Enlatado	X	Salmón rosado	N.C.			
M49	Anchovas	Enlatado	Aceite de oliva	Anchoas	N.C.			
M50	Atún	Tetrapak	Atún 76%	Atún	N.C.			

La cantidad de ADN genómico obtenido en las extracciones con el método PCI fue mayor (≈ 1200 ng/ μ l) que con el método Chelex (≈ 560 ng/ μ l) con la misma cantidad de muestra (300 mg). De igual manera, se observaron diferencias tanto en cantidad como en calidad entre el ADN extraído de muestras de Atún y de Sardina (Fig. 2, A y B). El ADN extraído de las muestras con presunto origen Atún se encontró totalmente degradado o en pequeñas cantidades, dificultando el proceso de amplificación (PCR).

El método Chelex fue usado como un proceso alternativo de extracción buscando obtener mayor cantidad de ADN y disminuir posibles inhibidores de PCR en el producto extraído. En algunas muestras la cantidad de ADN mejoró pero en otras ninguno de los dos métodos utilizados produjo extractos amplificables (e.g., Fig. 2, A y B, Carril 2).

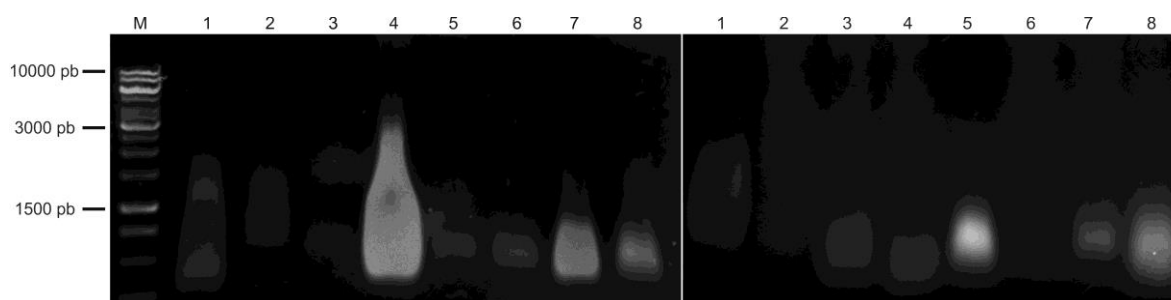


Figura 2. Aislamiento de ADN total. *M*: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. (A) Extracciones método PCI. (B) Extracciones método Chélex. Atún: 1, M34; 2, M35; 3, M36; 4, M37. Sardina: 5, M27; 6, M28; 7, M29; 8, M30.

3.2. Amplificación

Diferentes oligonucleótidos fueron seleccionados siguiendo las recomendaciones citadas en la literatura (Céspedes et al., 1998; Cocolin et al., 2000; Hsieh et al., 2007; Sánchez, 2012) prefiriendo aquellos que aumentaran la resolución en la identificación de los grupos especialmente de peces. Además, se buscó que amplificaran fragmentos cortos (100-400 pb) del gen mitocondrial *Cyt b* en un intento por solucionar el problema de baja integridad del ADN en muestras altamente procesadas.

Se seleccionaron 3 pares de oligonucleótidos con diferentes tamaños para el proceso de amplificación, uno de éstos universal (L14841/H15149) y dos específicos (C-CB280F/C-CB431R y CYTB144F/CYTB272R).

3.2.1. Par de oligonucleótidos L14841/H15149 (Universales).

Se obtuvieron amplificadores del tamaño esperado (379 pb) en el 95% de las muestras (Tabla 2) con ADN extraído a partir del Kit DNeasy Tissue® (Quiagen).

En algunos casos fue necesario realizar modificaciones para eliminar bandas inespecíficas. Por ejemplo, en la muestra M4, fue necesario aumentar la temperatura de alineamiento a 60 °C y disminuir la cantidad de MgCl₂ a 1 mM (Fig. 3) para obtener un amplificado sin bandas inespecíficas.

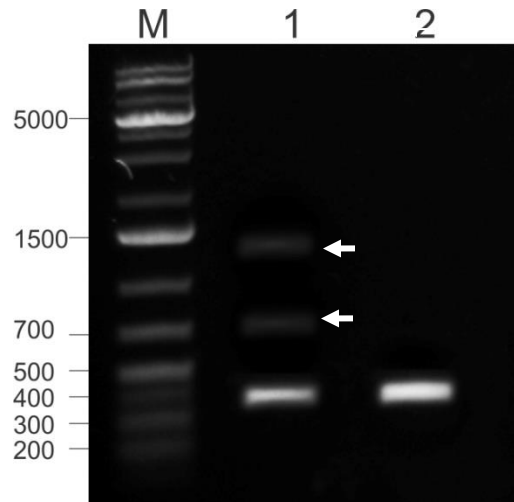


Figura 3. Productos PCR del gen *Cyt b* amplificados con los oligonucleótidos L14841/H15149 de la muestra M4. M: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. 1, Bandas inespecíficas (flechas), condiciones 59 °C, 1.5 mMCl₂; 2, Condiciones 60 °C, 1 mMCl₂.

Para amplificar muestras de ADN extraídas con el método PCI y Chelex, fueron utilizados 50–100 ng de ADN diluido de manera seriada (1/5, 1/10 o 1/20) para lograr los productos PCR esperados. Por otra parte, fue necesario disminuir la temperatura de alineamiento y aumentar la concentración de MgCl₂ en un intento por mejorar las condiciones y obtener amplificado. Estas modificaciones redujeron la cantidad de ADN amplificado, lo que hizo necesario realizar varios procesos de amplificación por muestra para tener suficiente ADN y continuar con el proceso de clonación o secuenciación. A pesar de los múltiples intentos, tan sólo del 38% de los enlatados se obtuvo amplificado positivo. De las 10 muestras de Atún enlatadas sólo se obtuvo amplificado de una muestra.

3.2.2. Par de oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R

Esta pareja de oligonucleótidos, específicos para Sardinias, amplifican un fragmento de 142 pb del gen *Cyt b* (Jerôme et al., 2003); por lo tanto, fueron

usados sólo en las muestras que indicaban contenido de este tipo (Tabla 2, muestras M27 a la M32 y M43).

A pesar de los cambios en los gradientes de temperatura, del medio de reacción y las variaciones en los métodos de extracción para disminuir la cantidad de contaminantes e inhibidores, tan sólo 4 de las muestras de Sardina (M27, M28, M29 y M43) dieron amplificados del tamaño esperado con este par de oligonucleótidos (Fig. 4).

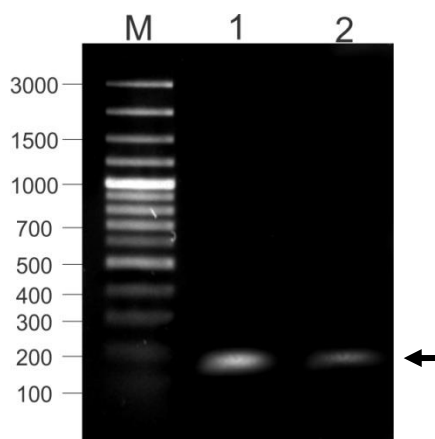


Figura 4. Productos PCR del gen *Cyt b* amplificados con los oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R de las muestras M27 y M28. *M*: Thermo Scientific 100 pb DNA Ladder. 1: 3 μ l de amplificado de M27; 2, 3 μ l de amplificado de M28.

3.2.3. Par de oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R

Se esperaba un amplificado de 410 pb (Fig. 5) en todas las muestras con presunto origen Sardina, Atún, Berberechos, Pescado, Arenques, Anchoas, Salmón, Róbalo, Merluza y Caballa. Tan sólo de la muestra M20 (Merluza) se obtuvo amplificado con este juego de oligonucleótidos.

En resumen las muestras M18, M19, M24, M25, M32, M35, M36, M37, M38, M39, M40, M41, M42, M46, M47, M48, M49 y M50 no fueron amplificadas por ninguno de los oligonucleótidos utilizados, por lo que fueron consideradas como no concluyentes (Tabla 2, coloración amarilla).

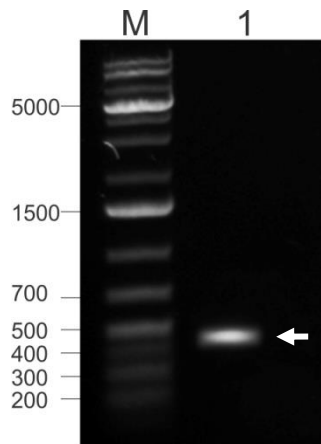


Figura 5. Producto PCR del gen *Cyt b* amplificado con los oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R de la muestra M20 (Róbalo). *M*: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. *1*: 3 µl de amplificado de M20.

3.3. Clonación y secuenciación

Los productos PCR de muestras en las que era evidente la presencia de más de un tejido animal se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Con el producto de las ligaciones se transformó *E. coli JM109*; 4 clones recombinantes se seleccionaron por muestra y se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico. Éste ADN fue visualizado en geles 1% agarosa y se confirmó su estado recombinante por comparación diferencial en la tasa migración (Fig. 6) entre los mismos.

Como se describió en el numeral 2.5, se secuenciaron los clones recombinantes utilizando el oligonucleótido pUC/M13 de pGEM-T Easy. Por otra parte, los productos PCR purificados de muestras con un único origen animal fueron secuenciados con los oligonucleótidos de PCR.

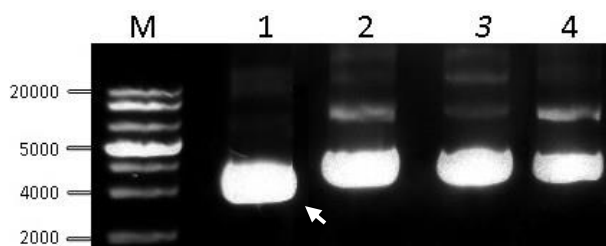


Figura 6. ADN plasmídico de 4 clones de la muestra M22. *M*: GeneRuler™ 1 kb plus DNA Ladder. 1, 1 μ l clon 1 no recombinante (flecha); 2, 1 μ l clon 2 recombinante; 3, 1 μ l clon 3 recombinante; 4: 1 μ l clon 4 recombinante.

3.4. Determinación de origen según especie.

Como se mencionó en el numeral 2.6 valores de distancia genética menores o iguales al 1% (0.01) ofrecen una determinación a nivel de especie y valores iguales o menores al 3% (0.03) a nivel de género (Ratnasingham & Hebert, 2007). Cuando el valor de distancia genética fue mayor al 3% (0.031) se asumió como un criterio de discriminación inicial para continuar con la determinación mediante alineamiento de nucleótidos BlastN contra las base de datos de Genbank y EMBL, considerando una identificación a nivel de género y especie con valores de similitud de $\geq 95\%$ y $\geq 97,5\%$, respectivamente.

Del 100% (94) de las secuencias analizadas (Tabla 2, columnas 7 y 8) el 89.4% tuvieron un valor de distancia genética dentro del rango de determinación utilizado para este método (0.01-0.03). Por otra parte, el 10.6% tuvieron valores de distancia mayores a 0.03 por lo que se continuó con el proceso de determinación como fue descrito con anterioridad.

3.4.1. Identificación de productos obtenidos con los oligonucleótidos L14841/H15149

La base de datos, específica para este marcador, fue construida con todas las especies mencionadas en el Anexo 1, que incluye las especies descritas en la Tabla 2 como presunto origen y otras especies permitidas por la CAC bajo los nombres de Sardina, Atún, Merluza, etc. Además, fueron incluidas caballo, perro,

etc., reportadas comúnmente por ser comercializadas de manera ilegal (V.L., 14 de marzo 2003; 24 de Septiembre 2012). Adicionalmente, en el Anexo 2 se incluye la matriz de distancia entre estas secuencias.

En la Tabla 2 (columna 8), se muestra la especie con el menor valor de distancia genética obtenida en el análisis de secuencias de cada muestra. M5 a M12, M14 y M22 fueron identificados como *Sus scrofa* coincidiendo con lo descrito en la etiqueta. En el Anexo 3, se muestra que el clado formado entre cada una de estas muestras y *Sus scrofa*, estuvo altamente soportado con un valor de bootstrap de 100. Las muestras M1 a M4 y M13 no presentan información sobre su presunto origen lo que impide verificar su correspondencia con la especie identificada. Los clones de M15 identificados como *Sus scrofa* no coinciden con *Bos taurus*, presunto origen cárnico de la muestra (carne bovina).

En la muestra M23 fue identificado *Gallus gallus* (especie que no está reportada dentro el contenido cárnico de la muestra), y *Sus scrofa*.

En la muestra M16 el menor valor de distancia genética encontrado fue de 0.073 con la especie *Merluccius albus*; este valor es mayor al 3% establecido para asignar género. De esta manera, como se describió con anterioridad, se realizó un nuevo proceso de determinación mediante alineamiento de nucleótidos en BlastN contra las base de datos de Genbank y EMBL. Este nuevo proceso dio como resultado la especie *Merluccius gayi*, con un porcentaje de 99, aceptada para la identificación. *Merluccius gayi* no corresponde con el presunto origen (*Merluccius albus*) descrito en la etiqueta de M16.

En la muestra M17 la distancia genética, en sus 4 clones, fue de 0.215 con la especie *Decapterus macarellus*. El análisis mediante alineamiento de nucleótidos con BlastN contra las base de datos de Genbank y EMBL dio como resultado la especie *Selar crumenophthalmus*, con un valor de identidad del 99% para los 4 clones, especie que no coincide con lo descrito en la etiqueta de M17.

En M26, los 4 clones fueron identificados como *Gallus gallus*. Por la ausencia de pato y cerdo, fueron seleccionados y procesados 10 clones adicionales (datos no mostrados) identificados, igualmente, como *Gallus gallus*.

En las muestras M28, M29, M30, M31, M33, M34, M44 y M45 la(s) especie(s) identificada(s) para cada clon no se encuentran reportadas en los productos (Tabla 2, columna 4 y 7), ni como componente ni como aditivo. En las muestras de Sardina M28, M29, M30 y M33 se encontró *Sus scrofa*; para M33 fue además identificado *Gallus gallus*. Adicionalmente para M31, M34 y M44 se identificó *Bos taurus*. En la Tabla 2 (columna 7) se presenta el contenido animal descrito en las etiquetas de estas muestras y estas especies no se encuentran registradas, demostrando omisión de información.

3.4.2. Identificación de productos obtenidos con los oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R

Las especies patrón escogidas para la base de datos específica para este marcador (Anexo 4), fueron seleccionadas de acuerdo a las especies comercialmente permitidas por la CAC con el nombre de Sardina. En el Anexo 5 se incluye la matriz de distancia entre estas secuencias.

Los valores de distancia genética fueron mayores a los aceptados en este estudio para género (≤ 0.03) y especie (≤ 0.01) en las secuencias de las muestras M27 (Anexo 6), M28, M29 y M43 (Tabla 2, columna 8); por esto, se realizó un nuevo proceso de determinación mediante búsquedas con BlastN contra las base de datos de Genbank y EMBL.

Las muestras M27, M28 y M43 fueron identificadas como *Opithonema mediraastre* con un índice de identidad de 98% para las tres muestras. La muestra M29 fue identificada *Sardinops sagax* resultado que coincide con su presunto origen.

3.4.3. Identificación de productos obtenidos con los oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R

Sólo la muestra M20, presunto Róbalo, dio el correcto amplificado con este par de oligonucleótidos. Por esta razón, la base de datos para este marcador fue elaborada con base en las especies comercialmente permitidas con el nombre de Róbalo por la CAC (Anexo 7). En el Anexo 8 se incluye la matriz de distancia entre estas secuencias

La menor distancia genética obtenida fue de 0.274 con la especie *Micropterus cataractae* (Tabla 2, columna 8), pero este valor de distancia no está dentro del nivel mínimo aceptado. En un nuevo proceso de determinación mediante alineamiento de nucleótidos en BlastN contra las base de datos de Genbank y EMBL, esta secuencia fue identificada como *Pangasius sanitwongsei* con un índice de identidad de 99%, especie que no corresponde a la reportada en la etiqueta de la muestra.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se pudo evaluar parcialmente el nivel de legalidad del contenido cárnico de productos importados y comercializados en Bucaramanga y su área metropolitana, mediante secuenciación del gen mitocondrial *Cyt b*.

Como los resultados lo demuestran, a pesar de los múltiples ajustes en los protocolos de extracción y amplificación, no fue posible obtener resultados de todos los productos enlatados. El éxito de esta metodología depende de ciertos parámetros, incluyendo el grado de daño del ADN y el método de extracción de ADN total (Besbes et al., 2011).

El proceso de enlatado, de manera breve, incluye lavado, corte y eviscerado; un nuevo lavado, cocción a 100 °C por aproximadamente 4 h, limpieza, envasado, dosificación de líquido de cobertura a 80 °C (agua, aceite, otros), sellado y lavado; esterilización a 117 °C, escurrido y secado; etiquetado y embalaje (Lin & Hwang, 2007). Estos procesos térmicos normalmente degradan el ADN en fragmentos de 500 pb o menos (Chikuni et al., 1990; Unseld et al., 1995). Ram et al., (1996) encontraron que el ADN aislado de productos enlatados tiene un tamaño menor a 123 pb, mientras que Quintero et al., (1998) encontraron principalmente fragmentos menores a 100 pb. Además, Marguet & Forterr, (1998) encontraron despurinizaciones del ADN en productos con sustancias aditivas ácidas. Se ha demostrado que en muestras enlatadas existe una amplia variedad de factores que determinan el tamaño de los fragmentos de ADN, así como su susceptibilidad a la amplificación por PCR (Infante et al., 2004; Bossier, 2006; Aguilar et al., 2011). Esto puede explicar el estado degradado del ADN genómico observado en las muestras de la Figura 2. A pesar de esto, es probable que parte del ADNmt por sus características estructurales se mantenga estable, por lo que fueron realizadas amplificaciones encontrando productos del tamaño esperado en las muestras altamente procesadas (M21, M22, M23, M26, M27, M28, M29, M30, M31, M33, M34, M43, M44 y M45).

Unsel et al. (1995) intentaron solucionar este problema identificando atún de productos enlatado, mediante la amplificación de un fragmento de 59 pb del gen mitocondrial *Cyt b*. Sin embargo, las secuencias obtenidas a partir de este corto fragmento no permitieron la diferenciación de las especies de atún de gran importancia comercial, *Thunnus albacares* y *Thunnus thynnus*. A su vez, Quintero et al. (1998) extrajeron ADN de muestras crudas/congeladas y muestras enlatadas de Atún, y con los pares de oligonucleótidos CytbL/H y H15573/L15424 amplificó fragmentos de 350 y 176 pb, respectivamente. Como resultado, obtuvieron amplificadas PCR con los dos conjuntos de cebadores sólo de las muestras crudo/congeladas. En los enlatados la amplificación con el par CytbL/H no fue posible. Esto demuestra que la longitud del fragmento seleccionado para la amplificación sí es un factor determinante para analizar muestras altamente procesadas.

Por otra parte, las normas tanto de etiquetado como de contenido animal permitidas en los productos importados y establecidas por la CAC, son aplicadas por el INVIMA a nivel nacional. De esta manera, la CAC establece en su quinta edición de "Etiquetado de Alimentos" (2007) que: "*El nombre del producto deberá indicar la verdadera naturaleza del alimento y, normalmente, deberá ser específico y no genérico*". Las muestras M1, M2, M3, M4, M13 y M19 no presentan ningún registro de su verdadera naturaleza incumpliendo con la primera norma establecida para el correcto etiquetado, y aun así se importan, distribuyen y comercializan de manera libre en la región estudiada.

En las muestras M15 y M23 fueron identificadas especies animales no reportadas en los productos. En M15, con presunto origen carne bovina, sólo se encontró Cerdo y en M23 fue encontrado Pollo cuando se reporta como único origen Cerdo. Es claro que estos productos presentan cambio u omisión de especies en su contenido cárnico, poniendo en peligro a la población alérgica, que en los peores casos puede llegar a provocar la muerte.

En el caso de productos en filete congelados denominados como Merluza son permitidas todas las especies pertenecientes a los géneros *Merluccius* y *Urophycis*. La muestra M16 fue identificada como *Merluccius gayi*. A pesar de ser una especie que se permite comercializar bajo el nombre de Merluza, no coincide con la especie nombrada en la etiqueta del producto (*Merluccius albidus*). De esta manera, se identifica un fenómeno de recambio de especies en estos productos, en contra de la normatividad establecida y engañando a los consumidores quienes pagan por un producto mientras les venden otro.

La muestra M17 etiquetada como Merluza fue identificada como *Selar crumenophthalmus* especie que no coincide con lo establecido por la CAC. Agusa et al., (2006) mencionan que los costos de producción de *Selar crumenophthalmus* son bajos en comparación con las especies del género *Merluccius*, entre otras. Esto muestra que el recambio está dirigido hacia la reducción de costos en producción y aumento de ganancia en ventas de manera ilegal.

La presencia de *Sus scrofa*, *Bos taurus* y *Gallus gallus* en muestras enlatadas de Sardina y Atún está relacionada con el uso de la grasa de estos animales, como agente condensante. Una vez más se evidencia omisión de información por parte de los productores en los alimentos. La CAC establece en su quinta edición de Etiquetado de Alimentos (2007) que: “Cualquier sustancia, incluidos los aditivos alimentarios, que se emplee en la fabricación o preparación de un alimento y esté presente en el producto final aunque posiblemente en forma modificada, debe ser reportada en la lista de ingredientes del producto” y en este caso estos presuntos condensantes no están incluidos en la descripción del producto. Además de los peligros con la población alérgica ya mencionados, estos resultados demuestran que se atenta contra las normas y costumbres de grupos sociales que se abstienen de consumir algún tipo de carne por razones religiosas o culturales.

La CAC establece que el nombre Sardinias está destinado exclusivamente para la especie *Sardina pilchardus* o Sardinias X, donde X es el nombre de un país o una

zona geográfica, con declaración de la especie o el nombre común de la misma, expresado de una manera que no induzca a engaño al consumidor. Por otra parte, en el informe de la 28ª reunión del comité del Codex sobre pescado y productos pesqueros, respondió a la petición por parte de Ecuador de incluir las especies *Opisthonema libertate*, *Opisthonema bulleri*, *Opisthonema mediraastre* y *Opisthonema berlangai* en la Norma del Codex para las Sardinias y productos análogos en conserva. El comité acordó que se necesitaban más datos e información a fin de evaluar la propuesta e invitó a la delegación del Ecuador a que presentara un nuevo proyecto, detallando todos los elementos según se establece en el Manual de Procedimiento para consideración del Comité. Hasta la fecha, no se ha reportado avance sobre ésta, sin embargo en las muestras M27, M28 y M29 se identificó la especie *Opisthonema mediraastre*, lo que demuestra que Ecuador ya está comercializando esta especie sin autorización de la CAC.

Para los pescados etiquetados como Róbalo, la CAC admite todas las especies de los géneros *Morone* y *Micropterus*; sin embargo, la muestra M20 etiquetada bajo este nombre fue identificada como *Pangasius sanitwongsei*. Es claro, un intercambio fraudulento de especies. A nivel mundial, la comercialización de *Pangasius* está desmotivando drásticamente el interés por el consumo de merluza, lenguado, rape, corvina o filetes de pescadilla, éxito relacionado con tres grandes puntos fuertes del producto: bajo precio, presentación en forma de filetes blancos sin piel y sin espinas y sabor suave (Canaest consultores, 2008). Además, el INVIMA ha reportado importación de ésta especie desde países orientales con agentes contaminantes en su contenido como mercurio. Igualmente, Agusa et al., (2006) analizaron el musculo e hígado de pescados y encontraron (Zn, Hg, Cd, Pb, etc.) a concentraciones perjudiciales del sureste de Asia. A partir de esto, se podría afirmar que con el fin de evadir los análisis realizados por INVIMA, los importadores recurren al etiquetado fraudulento de los productos sin importar el riesgo al que se exponen los consumidores.

A pesar del interés de las entidades como el *Invima*, las *Secretarías de Salud* y la *Codex Alimentarius Commission* para estandarizar y establecer normas claras del contenido cárnico de los productos, es evidente la negligencia y desobediencia por parte de los productores. De igual forma, los resultados obtenidos en este trabajo evidencian la falta de medidas de control o la no aplicación de las mismas sobre los productos que entran al país.

5. CONCLUSIONES

Se logró la identificación de 32 muestras, dentro de las cuales se detectaron los siguientes tipos de fraude: Omisión de información en la etiqueta, recambio de especies y ausencia de especies animales en el contenido del producto.

Los controles del INVIMA sobre los productos importados que son comercializados en Bucaramanga y su Área Metropolitana, no son suficientes para garantizar la legalidad en el contenido cárnico de los productos. Se expone a la población a riesgos de intoxicación por comercialización de especies posiblemente contaminadas que son etiquetadas con nombre diferente para evadir los procesos de control.

Grupos poblacionales que se abstienen al consumo de carne de Cerdo o Vaca son susceptibles a engaño por ausencia u omisión de información en la etiquetas de los productos especialmente los enlatados.

RECOMENDACIONES

Profundizar en el diseño de métodos de extracción, reproducibles y fiables, que garanticen ADN de buena cantidad y calidad, deben ser desarrollados para esta metodología, de tal manera que se asegure la identificación principalmente de productos altamente procesados.

Las entidades gubernamentales tanto nacionales como internacionales deben aumentar su nivel de regulación sobre la comercialización y etiquetado correcto de los productos de importación.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, A., Alonso, G., & Barrero, M. (2011). Standardization of nucleic acids extraction methods in commercial samples of canned tuna (*Thunnus* sp.). RVCTA. 2: 71-62.

Agusa, T., Kunito, T., Sudaryanto, A., Monirith, I., Atireklap, S., Iwata, H., Ismail, A., Sanguansiin, J., Muchtar, M., Tana, T., & Tanabe, S. (2006). Exposure assessment for trace elements from consumption of marine fish in Southeast Asia. ELSEVIER. 145: 766-777.

Alric, J., Pierre, Y., Picot, D., Lavergnet, J., & Rappaport, F. (2005). Spectral and redox characterization of the heme c_i of the cytochrome b_6f complex. PNAS. 102: 15860-15865.

Aranguren, J., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil, Y., Yáñez, L., Borjas, L., & Zabala, W. (2009). Identificación de especies en productos de origen animal mediante PCR. Rev. Cient. 19: 159-164.

Arias, M., Francisco, F., & Silvestre, D. (2003). O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. Apoidea. Neotr. 54: 305-309.

Balitzki-Korte, B., Anslinger, K., Bartsch, C., & Rolf, B. (2005). Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene. J. Inter. Leg. Med. 119: 291-294.

Bartlett, S., & Davidson, W. (1992). FINS (Forensically informative nucleotide sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens. Bio. Tech. 12: 408-11.

Barrera, C., Barragán, H., & Sánchez, J. (2000). Mutaciones del genoma mitocondrial y su expresión clínica en cardiología. Gac. Méd. Méx. 136: 585-594.

Bejarano, E. (2001). Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniosis: utilidad de los genes mitocondriales. *Biom.* 21: 182-191.

Besbes, N., Fattouch, S., & Sadok, S. (2011). Comparison of methods in the recovery and amplificability of DNA from fresh and processed sardine and anchovy muscle tissues. *Food Chem.* 129: 665–671.

Blanco, M., Perez, M., & Sotelo, C. (2008). Identification of shark species in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *J. Agric. Food Chem.* 56: 9868–9874.

Bosch, E., Calafell, F., Plaza, S., Pérez, A., Comas, D., & Bertranpetit, J. (2003). Genética e historia de las poblaciones del norte de África y la Península Ibérica. *Inv. Cien.* 12: 62-69.

Bossier, P. (2006). Authentication of Seafood Products by DNA Patterns. *Food Scie.* 64: 189-163.

Brown, T. (2008). *Genomas*. 3a edición. Médica Panamericana. Buenos Aires. pp: 320.

Canaest Consultores. (2008). Estudio sobre la distribución de *Pangasius* spp. en España. (En línea). Disponible en la WEB <http://xa.yimg.com/kq/groups/15366095/1568988488name/Informe+Panga+2008-+Espa%C3%B1a.pdf>.

Céspedes, A., García, T., Carrera, E., González, I., Sanz, B., Hernández, P., & Martín, R. (1998). Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome *b* gene. *J. Food Scie.* 63: 206-209.

Chandrika, M., Maimunah, M., Zainon, M., & Son, R. (2010). Identification of the species origin of commercially available processed food products by mitochondrial DNA analysis. *J. Inter. Food Resea.* 17: 867-876.

Chapela, M., Sotelo, C., Perez, R., Pardo, M., Perez, B., Gilardi, P., & Riese, J. (2003)_a. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18: 1211–1215.

Chapela, M., Sotelo, C., & Pérez, R. (2003)_b. Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR- RFLP of a cytochrome *b* gene fragment. *Eur. Food Res. Technol.* 217: 524–529.

Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T., & Kato, S. (1990). Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat. Sci.* 27: 119-128.

Cocolin, L., D'agaro, E., Manzano, M., Lanari, D., & Comi, G. (2000). Rapid PCR-RFLP Method for the Identification of Marine Fish Fillets (*Seabass, Seabream, Umbrine, and Dentex*). *J. Food Scie.* 65: 1315-1317.

Cole, J., Chai, B., Marsh, L., Farris, R., Wang, Q., Kulam, S., Chandra, S., McGarrell, D., Schmidt, T., Garrity, G., & Tiedje, J. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31: 442-443.

Collombet, J., & Coutelle, C. (1998). Towards gene therapy of mitochondrial disorders. *Mol. Med.* 4: 31-38.

Cooper, G., & Hausman, R. (2008). *La Célula.* 4a edición. Marbán, España. pp: 259-260.

Espinel, A., Gómez, M., Villareal, D., Velásquez, J., & Renjifo, L. (2011). Guía metodológica para el análisis de riesgo de extinción de especies en Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Pontificia Universidad Javeriana. pp: 64-65.

Esposti, M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., & Meyer, A. (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Bioene*. 1143: 243-271.

Ferguson, A., Taggart, J., Prodöhl, P., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P., & Hynes, R. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. Fish Biol.* 47: 103-126.

Formas, J., Núñez, J., & Cuevas, C. (2008). Identidad de la rana austral chilena *Eupsophus coppingeri* (Amphibia, Anura, Neobatrachia): evidencias morfológicas, cromosómicas y moleculares. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 81: 3-20.

Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 18: 4541-4550.

Gallo, J., Morales, C., Castillo, I., Moreno, M., Mazóna, M., & Moreno, F. (2003). Predisposición familiar a la fototoxicidad de los aminoglucósidos debido a la mutación A1555G del ADN mitocondrial. *Med. Clin.* 121: 216-8.

García, J., & Goldenthal, M. (2006). La mitocondria y el corazón. *Rev. Esp. Cardiol.* 55: 1293-1310.

Gebru, T., Hailu, A., Kremsner, P., Kun, J., & Grobusch, P. (2006). Molecular surveillance of mutations in the cytochrome *b* gene of *Plasmodium falciparum* in Gabon and Ethiopia. *J. Malaria*. 5: 107-112.

Ghezzi, D., Arzuffi, P., Zordan, M., Dare, C., Lamperti, C., Benna, C., D'Adamo, P., Diodato, D., Costa, R., Mariotti, C., Uziel, G., Smiderle, C., & Zeviani, M. (2011). Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Natu. Gen.* 43: 259-265.

Gray, M., Burger, G., & Lang, B. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Gen. Bio.* 2: 1018.1–1018.5.

Gray, M., Burger, G., & Lang, B. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*. 283: 1476-1481.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Hartl, L., & Clark, G. (1997). Principles of population genetics. 3rd Edition. Sinauer Associates, Sunderland (MA). pp: 564.

Hassan, A., Ramadan, S., Mahmoud, M., & El-Hefnawi, P. (2008). Phylogenetic analysis and comparison between cow and buffalo (including *Egyptian buffaloes*) mitochondrial displacement-loop regions. *Mitoch. DNA*. 19: 401-410.

Hauska, G., Schütz, M., & Büttner, M. (2004). The cytochrome b 6 f complex—composition, structure and function. *Adv. Phot. Resp.* 4: 377-398.

Hsieh, S., Chai, j., & Hwang, F. (2007). Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. *Food Cont.* 18: 369-374.

Hsieh, Y., Shiu, S., Chen, K., & Hwang, D. (2002). Identification of toxin and fish species in cooked fish liver implicated in food poisoning. *Food Chem. Taxie.* 67: 948-952.

Hold, G., Russell, V., Pryde, S., Rehbein, H., Quinteiro, J., Vidal, R., Rey, M., Sotelo, C., & Pérez, R. (2001). Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1175–1179.

Infante, C., Catanese, G., Ponce, M., & Manchado, M. (2004). Novel method for the authentication of frigate tunas (*Auxis thazard* and *Auxis rochei*) in commercial canned products. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7435–7443.

Irwin, D., Kocher, T., & Wilson, A. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144.

Jérôme, M., Lemaire, C., Bautista, J., Fleurence, J., & Etienne, M. (2003). Molecular Phylogeny and Species Identification of Sardines. *J. Agric. Food Chem.* 51: 43–50.

Karaiskou, N., Apostolidis, A., Triantafyllidis, D., Kouvatsi, A., & Triantaphyllidis, C. (2010). Genetic identification and phylogeny of three species of the genus *Trachurus* based on mitochondrial DNA analysis. *Mar. Biotechnol.* 5: 493–504.

Kartavtsev, Y. (2011). Divergence at Cyt-b and Co-1 mtDNA genes on different taxonomic levels and genetics of speciation in animals. *Mitoch. DNA.* Publicado en línea el 23 Jun.

Kocher, T., Thomas, W., & Meyer, A. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PINAS*. 86: 6196-6200.

Kujoth, G., Hiona, A., Pugh, T., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S., Hofer, T., Seo, A., Sullivan, R., Jobling, Q., Morrow, J., Van Remmen, H., Sedivy, J., Yamasoba, T., Tonokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., & Prolla, T. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 309: 481-484.

Lago, F., Herrero, B., Vieites, J., & Espiñera, M. (2011)_a. FINS methodology to identification of sardines and related species in canned products and detection of mixture by means of SNP analysis systems. *Eur. Food Res. Technol.* 232: 1077-1086.

Lago, F., Herrero, B., Vieites, J., & Espiñera, M. (2011)_b. Genetic identification of Horse Mackerel and related species in seafood products by means of forensically informative nucleotide sequencing methodology. *J. Agric. Food Chem.* 59: 2223-2228.

Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., MacGettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., López, R., Thompson, J., Gibson, T., & Higgins, D. (2007). ClustaW and ClustalX version 2. *Bioinform.* 23: 2947-2948.

Li, D., Gou, Y., Shao, H., Tellier, L., Wang, J., Xiang, Z., & Xial, Q. (2010). Genetic diversity, molecular phylogeny and selection evidence of the silkworm mitochondria implicated by complete resequencing of 41 genomes. *Evo. Bio.* 24: 10-81.

Lin, W., & Hwang, D. (2007). Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Cont.* 18: 1050-1057.

Marín, M., López, A., Freitas, L., & Uribe, S. (2009). Caracterización molecular de *Euptychiina* (Lepidoptera: Satyrinae) del norte de la Cordillera Central de los Andes. *Rev. Colom. Ento.* 35: 235-244.

McKean, J. (2001). The importance of traceability for public health and consumer protection. *Rev. Sci. Tech.* 20: 363-371.

Manel, S., Berthier, P., & Luikart, G. (2003). Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment test and multilocus genotypes. *Conserv. Biol.* 16: 650–659.

Marguet, E., & Forterre, P. (1998). Protection of DNA by salts against thermodegradation at temperatures typical for hyperthermophiles. *Extremop.* 2: 115-122.

Marshal, H., & Baker, A. (1998). Rates and patterns of mitochondrial DNA sequence evolution in fringilline finches (*Fringilla* spp.) and the greenfinch (*Carduelis chloris*). *Mol. Bio. Evol.* 15: 638-646.

Martin, A., & Palumbi, R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.* 90: 3172-3176.

Mendoza, C., Blanco, f., & Soriano, F. (2003). Toxicidad mitocondrial de los antirretrovirales: Diagnóstico y monitorización. *Med. Clin.* 121: 42-47

Meritt, T., Shi, L., Chase, M., Rex. M., Etter, J., & Quattro, J. (1998). Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7: 7–11.

Miller, Kenneth. (2004). *Biologia*. Massachusetts. Prentice Hall. pp: 125-128.

Moritz, C., Shenider, C., & Wake, D. (1992). Evolutionary relationship within the *Ensatina eschscholtzi* complex confirm the ring species interpretation. *Syst. Bio.* 41: 273-291.

Oven, V., & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.* 30: 386-394.

Peña, J., Sánchez, M., García, S., & Pérez, A. (2002). Aislamiento por distancia en poblaciones europeas sobre la base de polimorfismos genéticos séricos. *Antropo.* 2: 31-39.

Quinteiro, J., Sotelo, C., Rehbein, H., Pryde, S., Medina, I., PerezMartin, R., ReyMendez, M., & Mackie, I. (1998). Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1662-1669.

Quinteiro, J., Vidal, R., Izquierdo, M., Sotelo, G., Chapela, J., Pérez, I., Rehbein, H., Hold, G., Russell, V., Pryde, E., Rosa, C., Santos, T., & Rey, M. (2001). Identification of hake species (*Merluccius genus*) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5108–5114.

Ramírez, J., Arroyo, J., & Castro, A. (2005). Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. *Act. Zoo. Mex.* 21: 21-82.

Rasmussen, R., & Morrissey, M. (2008). DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 7: 280-295.

Rincón, E., Hernández, J., & Navarro, L. (2004). Desarrollo de un método para la identificación de carne gourmet según especie mediante amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial fase I: amplificación enzimática de ADN mitocondrial. Universidad Industrial de Santander.

Ruiz, M., Randi, R., Martínez, M., & Alvarez, D. (2007). Relaciones filogenéticas entre géneros de ciervos neotropicales (Artiodactyla: Cervidae) mediante secuenciación de ADN mitocondrial y marcadores microsatelitales. *Rev. Biol. Trop.* 55: 723-741.

Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third ed. Cold spring harbor laboratory press, New York. pp: 1.35-1.39.

Sánchez, A. (2012). Identificación y cuantificación de especies del género *Merluccius* mediante la utilización de PCR a Tiempo Real. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología.

Ram, J., Ram, M., & Baidoun, F. (1996). Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2460-2467.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Not.* 7: 355–364.

Shukla, M., Pidiyar, V., Bhave, N., Patole, M., & Shouche, Y. (2001). PCR amplification and sequencing of mitochondrial *12SrRNA* gene fragment from *Muntiacus muntjak* (Indian muntjac). *Curr. Sci.* 80: 617–618.

Silva, A., Briceño, I., Burgos, J., Torres, D., Villegas, V., Gómez, A., Bernal, J., & Rodríguez, J. (2008). Mitochondrial DNA analysis on pre-Columbian bone remains of the Herrera period. *Bioméd.* 28: 569-577.

Silvestre, D. (2002). Seqüenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil.

Solano, A., Playán, A., López, M., & Montoya, J. (2001). Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. Sal. Púb. Mex. 43: 151-161

Sun, H., Zhemin, Z., & Yuan, H. (2010). Sequence and phylogenetic analysis of complete mitochondrial DNA genomes of two grasshopper species *Gomphocerus rufus* (Linnaeus, 1758) and *Primnoa arctica* (Zhang and Jin, 1985) (Orthoptera: Acridoidea). Mitoch. DNA. 21: 115-131.

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10: 512-526.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Bio. Evol. doi: 10.1093/molbev/msr121.

Teletchea, F., Maudet, C., & Hanni, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. Tren. Biotech. 23: 359-366.

Thorne, A., & Wolpoff, M. (1992). Evolución multirregional de los humanos. Inv. Cien. 7: 14-20.

Tozzo, P., Ponzano, E., Novelli, E., Onisto, M., & Caenazzo, L. (2011). Discrimination between human and animal DNA application of a duplex

polymerase chain reaction to forensic identification. *J. For. Med. Pathol.* 32: 180-183.

Unsel, M., Beyermann, B., Brandt, P., & Hiesel, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR. Meth. Applic.* 4: 241-243.

Voet, D., & Voet, J. (2004). *Biochemistry*. 3rd edición. Buenos Aires. pp: 154-157.

Vogel, F., & Motulsky, A. (1997). *Human genetics: problems and approaches*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp: 589.

Wallace, D. (1992). Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* 61: 1175-1212.

Wetton, J., Tsang, C., Roney, C., & Springgs, A. (2004). An extremely sensitive species-specific ARMs PCR test for the presence of tiger bone DNA. *Forensic Sci. Int.* 140: 139–145.

Zhang, L., Liu, S., Zhang, Y., & Han, Y. (2010). DNA-based methods for identification of seafood species. *Yi Chuan.* 32: 555-60.

Zhou, C., Yang, Y., & Jong, A. (1990). Miniprep in ten minutes. *Biotech.* 8: 172-173.

ANEXOS

ANEXO. A

Especies seleccionadas como secuencias de referencia para la construcción de la matriz de datos con el par de oligonucleótidos L14841/H15149.

Números Matriz de Distancias	ESPECIE	NOMBRE COMÚN	Número de Acceso
1	<i>Equus asinus</i>	Asno	NC_001788.1
2	<i>Equus caballus</i>	Caballo	JF511458.1
3	<i>Capra hircus</i>	Cabra	NC_005044.2
4	<i>Bos taurus</i>	Vaca	JN817350.1
5	<i>Canis familiaris</i>	Perro	JF489119.1
6	<i>Felis catus</i>	Gato	NC_001700.1
7	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	JF318990.1
8	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	X14848.1
9	<i>Columba leucocephala</i>	Paloma	AY274023.1
10	<i>Gallus gallus</i>	Pollo	GU261717.1
11	<i>Anas platyrhynchos</i>	Pato	NC_009684.1
12	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Bagre	GU593110.1
13	<i>Pagrus pagrus</i>	Pargo	DQ197976.1
14	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia	DQ274052.1
15	<i>Engraulis japonicus</i>	Anchoa	NC_003097.1
16	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchoa	NC_009581.1
17	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardina	NC_009592.1
18	<i>Sardinops sagax</i>	Sardina chilena	EU552565.1
19	<i>Thunnus albacares</i>	Atún de aleta amarilla	NC_014061.1
20	<i>Thunnus alalunga</i>	Atún blanco	NC_005317.1
21	<i>Ovis aries</i>	Oveja	JX235881.1
22	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha	JX960815.1
23	<i>Salmo clarki</i>	Trucha	JX960803.1
24	<i>Salvelinus namaycus</i>	Trucha	JX960857.1
25	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Robalo	AF143190.1
26	<i>Dicentrarchus punctatus</i>	La baila	AF143191.1
27	<i>Salmo salar</i>	Salmon del atlántico	JX960833.1
28	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Salmon del pacífico	JX960819.1
29	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mejillones	NC_006886.2
30	<i>Scomber scombrus</i>	Xarda	NC_006398.1
31	<i>Decapterus macarellus</i>	Caballa	EU349424.1
32	<i>Scomber japonicus</i>	Caballa	NC_013723.1
33	<i>Merluccius albidus</i>	Merluza blanca	AY821666.1
34	<i>Merluccius merluccius</i>	Merluza europea	NC_015120.1
35	<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	GU135833.1

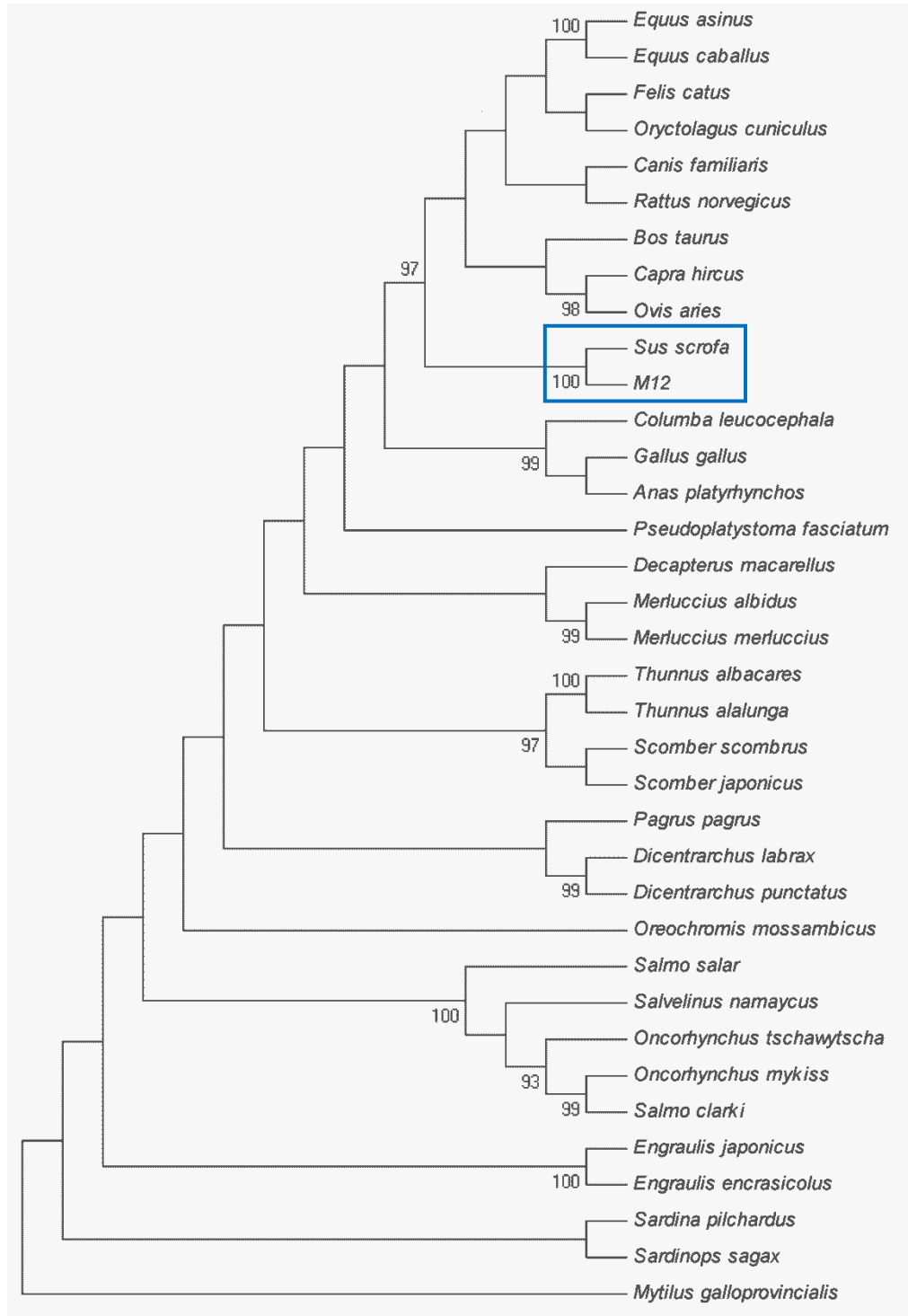
ANEXO. B

Matriz de distancia de las secuencias patrón analizadas a partir del par de oligonucleótidos L14841/H151491.
(Numeración de especies en el Anexo 1, columna 1).

```
[ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35]
[ 1]
[ 2] 0.062
[ 3] 0.247 0.257
[ 4] 0.182 0.195 0.193
[ 5] 0.256 0.252 0.262 0.288
[ 6] 0.232 0.215 0.268 0.234 0.262
[ 7] 0.207 0.203 0.267 0.261 0.302 0.237
[ 8] 0.210 0.210 0.253 0.240 0.230 0.248 0.217
[ 9] 0.354 0.366 0.364 0.342 0.425 0.387 0.411 0.403
[10] 0.333 0.329 0.369 0.339 0.367 0.359 0.366 0.329 0.219
[11] 0.365 0.365 0.405 0.337 0.420 0.406 0.398 0.381 0.219 0.190
[12] 0.298 0.298 0.357 0.314 0.309 0.344 0.344 0.261 0.316 0.295 0.290
[13] 0.324 0.354 0.355 0.323 0.378 0.418 0.373 0.370 0.286 0.332 0.328 0.247
[14] 0.306 0.321 0.337 0.305 0.408 0.376 0.336 0.353 0.307 0.298 0.290 0.235 0.238
[15] 0.388 0.394 0.394 0.361 0.381 0.410 0.446 0.362 0.365 0.380 0.366 0.278 0.289 0.253
[16] 0.383 0.383 0.397 0.363 0.400 0.400 0.440 0.368 0.359 0.370 0.369 0.269 0.280 0.250 0.017
[17] 0.402 0.426 0.410 0.430 0.399 0.421 0.401 0.431 0.399 0.381 0.411 0.281 0.312 0.243 0.275 0.279
[18] 0.431 0.431 0.424 0.476 0.474 0.503 0.365 0.411 0.459 0.428 0.417 0.323 0.365 0.314 0.273 0.273 0.240
[19] 0.376 0.375 0.375 0.382 0.434 0.423 0.329 0.370 0.344 0.311 0.346 0.250 0.274 0.276 0.276 0.272 0.328 0.282
[20] 0.382 0.381 0.370 0.384 0.428 0.423 0.344 0.370 0.345 0.322 0.343 0.247 0.265 0.262 0.276 0.272 0.332 0.291 0.017
[21] 0.223 0.243 0.118 0.205 0.212 0.297 0.234 0.225 0.394 0.373 0.429 0.368 0.380 0.358 0.412 0.395 0.398 0.407 0.375 0.353
[22] 0.389 0.418 0.417 0.394 0.413 0.403 0.397 0.433 0.403 0.389 0.391 0.332 0.339 0.223 0.293 0.283 0.320 0.303 0.288 0.277 0.383
[23] 0.414 0.445 0.405 0.406 0.423 0.456 0.416 0.445 0.424 0.413 0.418 0.344 0.363 0.214 0.299 0.289 0.333 0.302 0.319 0.303 0.372 0.033
[24] 0.418 0.464 0.385 0.378 0.408 0.428 0.402 0.429 0.409 0.378 0.368 0.312 0.311 0.260 0.263 0.264 0.364 0.288 0.291 0.275 0.387 0.122 0.119
[25] 0.401 0.383 0.400 0.401 0.395 0.454 0.383 0.427 0.378 0.345 0.385 0.310 0.261 0.244 0.316 0.306 0.315 0.318 0.288 0.274 0.366 0.331 0.327 0.300
[26] 0.418 0.400 0.397 0.359 0.403 0.409 0.388 0.432 0.361 0.365 0.364 0.296 0.239 0.243 0.299 0.296 0.291 0.378 0.287 0.294 0.397 0.355 0.329 0.297 0.142
[27] 0.406 0.452 0.339 0.372 0.433 0.428 0.380 0.428 0.370 0.389 0.368 0.286 0.280 0.238 0.279 0.269 0.309 0.260 0.263 0.267 0.366 0.124 0.123 0.120 0.300 0.281
[28] 0.391 0.421 0.367 0.384 0.406 0.392 0.357 0.431 0.432 0.402 0.414 0.312 0.331 0.192 0.295 0.296 0.302 0.303 0.295 0.284 0.350 0.077 0.080 0.136 0.306 0.301 0.121
[29] 0.760 0.738 0.632 0.693 0.665 0.729 0.634 0.749 0.674 0.628 0.652 0.693 0.643 0.575 0.602 0.618 0.592 0.565 0.598 0.607 0.631 0.624 0.642 0.632 0.598 0.655 0.617 0.600
[30] 0.383 0.392 0.386 0.346 0.436 0.452 0.416 0.378 0.399 0.355 0.353 0.278 0.308 0.275 0.303 0.303 0.324 0.310 0.198 0.198 0.411 0.362 0.361 0.354 0.313 0.350 0.350 0.373 0.707
[31] 0.339 0.366 0.371 0.354 0.413 0.360 0.386 0.348 0.303 0.281 0.300 0.266 0.266 0.246 0.319 0.309 0.325 0.313 0.296 0.286 0.393 0.271 0.283 0.301 0.334 0.315 0.272 0.272 0.750 0.296
[32] 0.343 0.398 0.435 0.349 0.415 0.451 0.404 0.343 0.400 0.349 0.384 0.274 0.281 0.271 0.309 0.314 0.353 0.360 0.178 0.187 0.401 0.353 0.358 0.357 0.314 0.334 0.344 0.327 0.646 0.168 0.284
[33] 0.355 0.346 0.403 0.397 0.433 0.361 0.411 0.397 0.331 0.345 0.332 0.265 0.295 0.247 0.325 0.314 0.364 0.331 0.269 0.275 0.415 0.331 0.339 0.310 0.312 0.321 0.306 0.344 0.614 0.248 0.268 0.290
[34] 0.343 0.329 0.423 0.384 0.352 0.372 0.418 0.350 0.341 0.355 0.355 0.260 0.311 0.235 0.289 0.290 0.367 0.341 0.312 0.296 0.414 0.315 0.317 0.313 0.324 0.301 0.334 0.311 0.655 0.262 0.273 0.300 0.140
[35] 0.193 0.187 0.239 0.239 0.262 0.245 0.271 0.247 0.327 0.370 0.388 0.318 0.300 0.342 0.334 0.323 0.355 0.443 0.355 0.356 0.233 0.403 0.411 0.388 0.335 0.328 0.372 0.379 0.728 0.368 0.358 0.333 0.353 0.331
```

ANEXO. C

Árbol Neighbor-joining hecho a partir del alineamiento de secuencias de 307 pb del gen citocromo b, mostrando la relación entre la muestra M12 y las especies patrón.



ANEXO. D

Especies de “Sardina” permitidas por la CAC seleccionadas como secuencias patrón para las secuencias analizadas a partir del par de oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R.

Números Matriz de Distancias	ESPECIE	Números de acceso
1	<i>Sardina pilchardus</i>	NC_009592.1
2	<i>Sardinops melanostictus</i>	NC_002616.1
3	<i>Sardinops sagax</i>	EU552565.1
4	<i>Sardinops caerulea</i>	AF472585.1
5	<i>Sardinella maderensis</i>	NC_009587.1
6	<i>Sardinella longiceps</i>	JQ266230.1
7	<i>Sardinella aurita</i>	DQ197990.1
8	<i>Clupea harengus</i>	NC_009577.1
9	<i>Sprattus sprattus</i>	NC_009593.1
10	<i>Hyperlophus vittatus</i>	NC_016671.1
11	<i>Nematolosa vlaminghi</i>	HQ896330.1
12	<i>Etrumeus teres</i>	NC_009583.1
13	<i>Ethmidium maculatum</i>	NC_016710.1
14	<i>Engraulis anchoita</i>	GQ890167.1
15	<i>Engraulis mordax</i>	JQ012421.1
16	<i>Engraulis ringens</i>	JQ012426.1
17	<i>Opisthonema oglinum</i>	EU552620.1

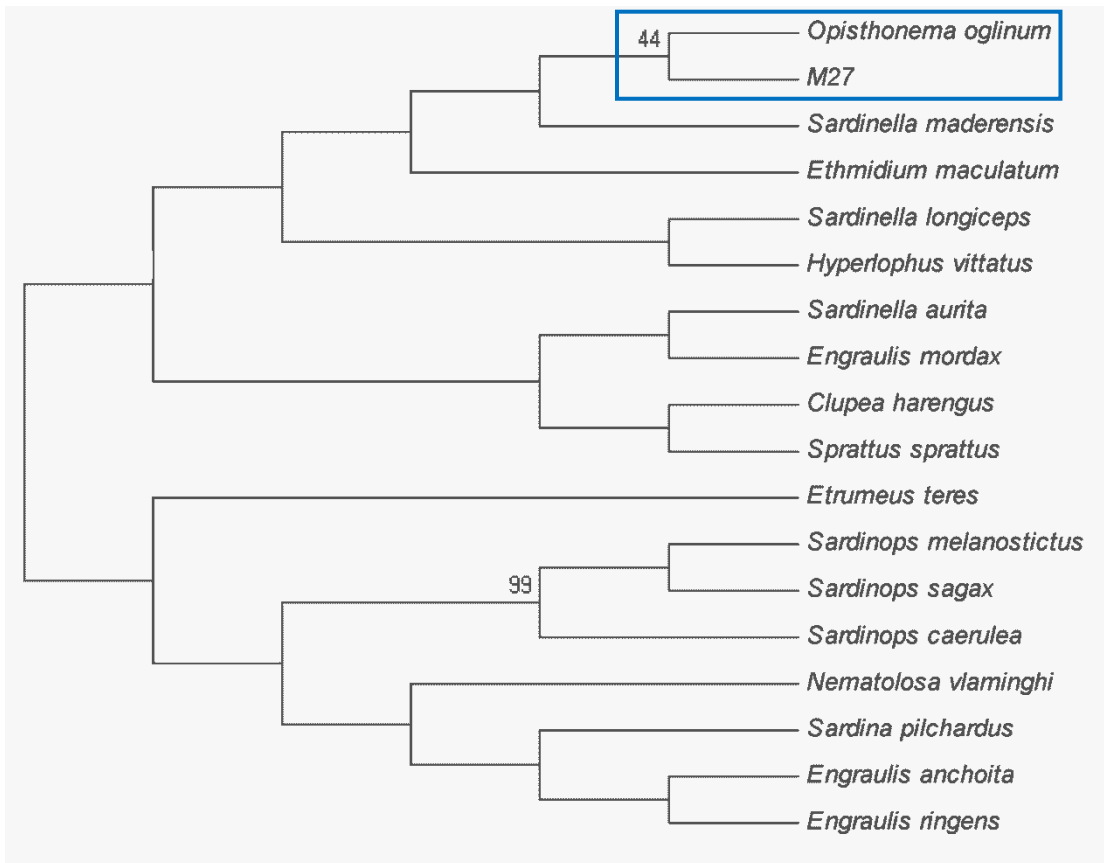
ANEXO. E

Matriz de distancia de las secuencias patrón analizadas a partir del par de oligonucleótidos C-CB280F/C-CB431R. (Numeración de especies en el Anexo 4, columna 1).

[1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17]
[1]																	
[2]	0.246																
[3]	0.246	0.039															
[4]	0.261	0.050	0.080														
[5]	0.313	0.274	0.274	0.294													
[6]	0.322	0.292	0.292	0.275	0.230												
[7]	0.321	0.221	0.221	0.206	0.190	0.241											
[8]	0.283	0.228	0.228	0.214	0.230	0.285	0.199										
[9]	0.358	0.309	0.309	0.290	0.217	0.256	0.175	0.177									
[10]	0.339	0.342	0.342	0.323	0.263	0.279	0.269	0.299	0.228								
[11]	0.283	0.254	0.254	0.270	0.254	0.303	0.272	0.266	0.227	0.353							
[12]	0.292	0.221	0.221	0.205	0.218	0.278	0.185	0.260	0.242	0.292	0.272						
[13]	0.325	0.245	0.245	0.230	0.193	0.247	0.243	0.235	0.204	0.249	0.270	0.228					
[14]	0.254	0.215	0.215	0.229	0.258	0.404	0.215	0.319	0.271	0.299	0.242	0.215	0.227				
[15]	0.296	0.261	0.261	0.244	0.271	0.382	0.186	0.229	0.200	0.254	0.293	0.251	0.284	0.219			
[16]	0.256	0.260	0.260	0.275	0.274	0.385	0.216	0.230	0.258	0.284	0.241	0.202	0.291	0.113	0.232		
[17]	0.337	0.251	0.251	0.234	0.152	0.267	0.214	0.283	0.227	0.213	0.300	0.301	0.190	0.286	0.213	0.303	

ANEXO. F

Árbol Neighbor-joining hecho a partir del alineamiento de secuencias de 103 pb del gen citocromo b, mostrando la relación entre la muestra M27 y las especies patrón.



ANEXO. G

Especies de “Róbalo” permitidas por el Codex Alimentarius seleccionadas como secuencias patrón para las secuencias analizadas a partir del par de oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R.

Números Matriz de Distancias	ESPECIE	Números de acceso
1	<i>Micropterus cataractae</i>	HM070886.1
2	<i>Micropterus coosae</i>	HM070942.1
3	<i>Micropterus dolomieu</i>	NC_011361.1
4	<i>Micropterus floridanus</i>	NC_014689.1
5	<i>Micropterus notius</i>	HM070898.1
6	<i>Micropterus salmoides</i>	NC_014686.1
7	<i>Micropterus treculii</i>	HM070894.1
8	<i>Morone saxatilis</i>	NC_014353.1
9	<i>Morone americanus</i>	AF240744.1
10	<i>Morone chrysops</i>	AY770838.1
11	<i>Morone mississippiensis</i>	AF045362.1

ANEXO. H

Matriz de distancia de las secuencias patrón analizadas a partir del par de oligonucleótidos CYTB144F/CYTB272R. (Numeración de especies en el Anexo 7, columna 1).

```
[ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 ]
[ 1]
[ 2] 0.105
[ 3] 0.111 0.104
[ 4] 0.106 0.112 0.108
[ 5] 0.105 0.095 0.095 0.093
[ 6] 0.121 0.114 0.105 0.049 0.090
[ 7] 0.115 0.105 0.098 0.094 0.079 0.093
[ 8] 0.273 0.269 0.256 0.278 0.244 0.271 0.264
[ 9] 0.258 0.258 0.279 0.272 0.260 0.280 0.268 0.137
[10] 0.249 0.244 0.252 0.237 0.224 0.250 0.251 0.134 0.177
[11] 0.262 0.248 0.249 0.261 0.237 0.252 0.252 0.133 0.102 0.151
```