

USO DE LA TÉCNICA MOLECULAR RAPD PARA IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE PECES AMAZÓNICOS DE INTERÉS PESQUERO COMERCIAL

THE USE OF THE RAPD MOLECULAR TECHNIQUE TO PRELIMINAR IDENTIFICATION AMAZONIAN FISHES OF COMMERCIAL FISHERY INTEREST

José Ortega, Martín Gavilán, María Estela Ayala

Dirección de Investigación, Instituto Tecnológico Pesquero del Perú.

Carretera a Ventanilla, km 5,200 Callao. mestela@itp.org.pe

RESUMEN

ORTEGA J, GAVILÁN M, AYALA ME. 2006. Uso de la técnica molecular RAPD para identificación preliminar de peces amazónicos de interés pesquero comercial. *Bol. invest. Inst. tecnol. pesq. Perú* 7: 71-82.- Se describe el trabajo correspondiente a la extracción de ácidos nucleicos de siete especies de peces amazónicos procedentes de la localidad de Pucallpa (Ucayali, Perú) y la obtención de sus perfiles moleculares que permitan su identificación preliminar. Las especies evaluadas fueron "bagre" (*Pimelodus* sp.), "boquichico", (*Prochilodus nigricans*), "chambira" (*Hydrolycus scomberoides*), "chio-chio" (*Psectrogaster rutiloides*), "llambina" (*Potamorhina altamazonica*), "palometa" (*Mylossoma duriventre*) y "sardina" (*Triportheus angulatus*). La caracterización molecular fue realizada aplicando la técnica molecular de Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD) estandarizada, haciendo uso de 3 iniciadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) previamente seleccionados (OPN-01, OPQ-03 y OPZ-14).

PALABRAS CLAVES: ácidos nucleicos, bagre, boquichico, chambira, chio-chio, llambina, palometa, sardina, ADN, RAPD, Pucallpa, Amazonía peruana.

ABSTRACT

ORTEGA J, GAVILÁN M, AYALA ME. 2006. The use of the RAPD molecular techniques to preliminary identification amazonian fishes of commercial fishery interest. *Bol. invest. Inst. tecnol. pesq. Perú*. 7: 71-82.- A study on nucleic acid extraction from seven amazonian fishes from Pucallpa (Ucayali, Perú) and their molecular profiles that permit their preliminary identification is described. The species evaluated were "bagre" (*Pimelodus* sp.), "boquichico", (*Prochilodus nigricans*), "chambira" (*Hydrolycus scomberoides*), "chio-chio" (*Psectrogaster rutiloides*), "llambina" (*Potamorhina altamazonica*), "palometa" (*Mylossoma duriventre*) y "sardina" (*Triportheus angulatus*). Molecular profiles were obtained by standardized RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique using 3 previously selected primers (OPN-01, OPQ-03 y OPZ-14).

KEYWORDS: nucleic acids, bagre, boquichico, chambira, chio-chio, llambina, palometa, sardina, DNA, RAPD, Pucallpa, Peruvian Amazon.

INTRODUCCIÓN

La identificación y el conocimiento de la variabilidad a nivel genético es muy

importante para el adecuado manejo y conservación de las principales especies hidrobiológicas (CALCAGNOTTO y TOLEDO, 2000). En el Perú, la extracción,

la preservación y el manejo de los principales recursos pesqueros se basan en la información periódica de la tasa de captura, periodos de veda, así como también en datos climáticos, entre otros.

A su vez, los estudios bioquímicos y de composición proximal, forman parte del banco de información que permite llevar un registro del comportamiento de dichas especies.

Por otro lado, la creciente necesidad de controlar la calidad de los alimentos exige, en muchos casos, verificar la identidad de sus componentes, para lo cual es importante desarrollar métodos que aseguren la autenticidad de las especies involucradas (BOSSIER, 1999). En el caso de productos pesqueros, el gran número de especies utilizadas en la producción de alimentos, la diversidad de tecnologías de procesamiento, presentaciones, la introducción de especies foráneas y el incremento de la acuicultura, determinan la necesidad de caracterizar las especies pesqueras.

El uso de métodos moleculares, permite generar información de gran valor científico aplicable a estudios de caracterización molecular, conservación y mejoramiento genético de especies (CALCAGNOTTO y TOLEDO 2000, WASKO et al. 2004), así como a su identificación (o autenticación) convencional mediante el análisis de perfiles y secuencias de proteínas y/o ácidos nucleicos. En el caso específico de autenticación se requiere el uso de una base de datos previa de los perfiles y secuencias, que sean a su vez, específicas para cada género, especie, población y en algunos casos incluso para cada individuo.

El uso de técnicas que utilizan el ácido desoxirribonucleico (ADN), presenta

ventajas respecto a los estudios basados en proteínas, por tratarse de moléculas de gran estabilidad y que además no necesitan un estándar para cada tipo de tejido, debido a que se encuentra presente en todas las células en un mismo individuo. La gran mayoría de estas técnicas tiene como fundamento la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y son conocidas también como técnicas de marcadores moleculares, las cuales pueden utilizar tanto el ADN nuclear como el mitocondrial. Un sistema muy conocido de marcadores basado en PCR es la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) por ser simple, de bajo costo y rápida, en comparación a otros sistemas de marcadores. La técnica RAPD ha sido utilizada en estudios de caracterización de especies, así como, en estudios de variabilidad genética en especies marinas (MARTÍNEZ *et al.* 2006; WASKO *et al.*, 2004; LEHMANN *et al.* 2000; BOSSIER, 1999; MARTÍNEZ Y PASTENE, 1999).

El presente estudio detalla la aplicación de la técnica RAPD en siete especies pesqueras amazónicas: Bagre (*Pimelodus* sp.) Boquichico, (*Prochilodus nigricans*), Chambira (*Hydrolycus scomberoides*), Chio-chio (*Psectrogaster rutiloides*), Llambina (*Potamorhina altamazonica*), Palometa (*Mylossoma duriventre*) y Sardina (*Triportheus angulatus*), con la finalidad de obtener perfiles moleculares especie-específicos que puedan ser utilizados en procesos de identificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y manejo del material biológico

Las muestras fueron obtenidas en la localidad de Pucallpa (Ucayali, Perú)

Tabla 1. Especies de peces amazónicos estudiados en el presente trabajo

Nombre Común	Nombre Científico	Familia
Bagre	<i>Pimelodus</i> sp.	Pimelodidae
Boquichico	<i>Prochilodus nigricans</i>	Curimatidae
Chambira	<i>Hydrolycus scomberoides</i>	Characidae
Chio-chio	<i>Psectrogaster rutiloides</i>	Curimatidae
Llambina	<i>Potamorhina altamazonica</i>	Curimatidae
Palometa	<i>Mylossoma duriventre</i>	Characidae
Sardina	<i>Triportheus angulatus</i>	Characidae

y transportadas inmediatamente a los laboratorios del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, ITP, vía aérea en recipientes con hielo, para asegurar su integridad. Se trabajó con un total de siete especies amazónicas (Tabla 1), realizando las pruebas en un total de 20 especímenes de cada especie. Las muestras fueron procesadas asépticamente en el laboratorio, tomando una muestra del tejido muscular del dorso, en placas petri y manteniéndolas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos.

Extracción de ácidos nucleicos

El ADN genómico total fue extraído aplicando una modificación del método fenol-cloroformo/CTAB de Doyle y Doyle (1987). Para el efecto, fueron colocados 0,15 g de tejido muscular en microtubos de 1,8 mL, resuspendiendo en tampón de lisis (EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, 1% SDS y Tris HCl 10 mM pH 8). Se agregaron 120 uL de tiocianato de guanidina 6 M y 20 uL de Proteinasa K (20 mg/mL), sometiendo a incubación en baño María a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche.

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos los microtubos fueron centrifugados a 12000xg por 15 minutos. El sobrenadante

fue transferido a un nuevo microtubo agregando un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclando y centrifugando a 16000xg por 10 minutos. Estos pasos de extracción de ácidos nucleicos fueron repetidos por 3 veces, las 2 primeras utilizando fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) y la última con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v). Estos tratamientos sucesivos son necesarios para separar las proteínas, polisacáridos y otros contaminantes que podrían interferir con el resultado final del procedimiento de extracción (FERREIRA y GRATTAPAGLIA, 1998).

La fase superior acuosa final fue trasvasada a un nuevo microtubo donde se mezcló con un volumen igual de isopropanol helado, llevándose las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo mínimo de 30 minutos para precipitar ácidos nucleicos, centrifugando luego a 16000xg por 20 minutos. El precipitado resultante fue lavado con 70% etanol frío, secado al ambiente, resuspendido en 50 uL de agua libre de nucleasas (SIGMA) y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Cuantificación del ADN

La calidad y concentración de las muestras

de ácidos nucleicos fueron determinadas por corridas electroforéticas horizontales en geles de 0,7% agarosa en tampón TBE 1X (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 20 mM). Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga 2X (0,03% azul de bromofenol, 0,03% xilen cianol, 0,04% anaranjado G, 12% sucrosa y TBE 0,1X) en una proporción 1:1. Los geles teñidos con bromuro de etidio (0,5 ug/mL) durante 30 minutos, fueron visualizados en un transiluminador UV. La cuantificación fue realizada mediante comparación visual de las muestras con estándares de concentración conocida de ADN del bacteriófago Lambda (Promega) de 5 y 10 ng/uL diluidos en tampón de carga para agarosa 10X (0,15% azul de bromofenol, 0,15% xilen cianol, 0,2% anaranjado G, 60% sucrosa y TBE 0,5X) y TE 1X.

Amplificación del ADN (RAPD)

La técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS *et al.* 1990) fue modificada y estandarizada para su utilización en este tipo de muestras. Inicialmente se utilizaron 8 iniciadores: OPG-13 (5'-CTCTCCGCCA-3'), OPN-01 (5'-CTCACGTTGG-3'), OPN-15 (5'-CAGCGACTGT-3'), OPQ-03 (5'-GGTCACCTCA-3'), OPS-18 (5'-CTGGCGAACT-3'), OPY-05 (5'-GGCTGCGACA-3'), OPY-06 (5'-AAGGCTCACC-3') y OPZ-14 (5'-TCGGAGGTTTC-3') (Operon Technologies Inc.) en 8 especímenes de cada especie a fin de seleccionar aquellos que permitían obtener polimorfismo de los productos RAPD entre las especies, siendo escogidos de ellos OPN-01, OPQ-03 y OPZ-14.

Cada reacción de amplificación tuvo lugar en un microtubo en volumen final de 15 uL conteniendo tampón de PCR 1X (Perkin Elmer), 2,5 mM de MgCl₂, 200 uM de cada dNTP, 30 ng del iniciador

seleccionado, 0,6U de polimerasa de ADN *Taq* (Promega) y 22,5 ng de ADN extraído como molde. Finalmente el microtubo fue cubierto con aceite mineral.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 trabajando con las siguientes condiciones: un ciclo de 94 °C por 5 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 37 °C por 1 min 72 °C por 1 min y finalmente un ciclo de 72 °C por 7 minutos.

Los productos RAPD fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de 2% agarosa en tampón TBE 1X por un tiempo aproximado de 3 horas a 100V y a temperatura ambiente aproximada de 22 °C. Antes de ser cargados en los geles, los productos de PCR fueron mezclados con 2 uL de tampón de carga 2X y 0,1 ug/mL de bromuro de etidio para permitir su visualización en un transiluminador UV. El tamaño de los productos fue estimado por comparación con marcadores comerciales (100 bp y/o 1 Kb, Promega) y su registro fue realizado con un capturador digital de imágenes Sistema Eagle Eye (Stratagene, La Jolla, CA).

Los pasos de amplificación y visualización de productos fueron repetidos dos veces a fin de asegurar su presencia/ausencia.

Evaluación de productos RAPD

Los productos obtenidos, visualizados a manera de bandas, fueron analizados tomando en cuenta su presencia/ausencia en las muestras. Para un determinado perfil (conjunto o patrón de bandas presentes en un gel) obtenido a partir de cada combinación iniciador-especie, se consideraron como perfiles de interés aquellos que presentaban el mismo conjunto de bandas en todos los

especímenes de cada especie, lo cual indica el monomorfismo a este nivel (intraespecífico) y el perfil característico de esta especie. A su vez se considero que este mismo perfil no se encuentre presente en las otras especies analizadas, es decir, que se presente variabilidad interespecífica. Los iniciadores que produjeron bandas de presencia/ausencia variable entre especímenes de una especie (polimorfismo intraespecífico) fueron descartados. Esta evaluación fue realizada tanto para la selección primaria de los iniciadores en los 8 especímenes de cada especie, así como para la prueba final utilizando 20.

RESULTADOS

Extracción y cuantificación de los ácidos nucleicos

Utilizando el método modificado de extracción de ácidos nucleicos, a partir de aproximadamente 0,15 gramos de músculo fresco de cada espécimen, se obtuvieron entre 10 y 35 ng/uL de ADN total, de óptima calidad (sin ADN degradado ni ARN) que fueron suficientes para continuar con la aplicación de la técnica RAPD (Figura 1).

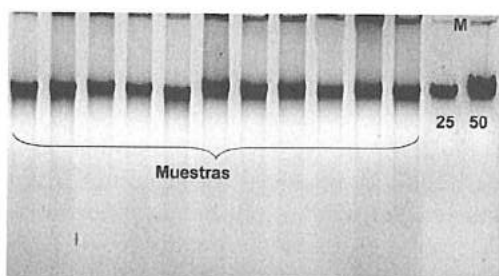


Figura 1.- Cuantificación de ácidos nucleicos en gel de 0,7% agarosa con 0.5 ug/mL de bromuro de etidio.

Por cada muestra se colocan en el gel 2 uL y el cálculo de la concentración es realizado por comparación visual con los marcadores de peso. M: Marcadores de peso de 25 y 50 ng (ADN de fago Lambda).

Perfiles moleculares RAPD

Al aplicar la técnica RAPD utilizando los tres iniciadores seleccionados se obtuvieron 2 tipos de resultados: i) un producto o productos monomórficos, o ii) un producto o productos polimórficos entre los especímenes de la especie. Teniendo en cuenta esto no todos los iniciadores dieron perfiles adecuados para cada especie.

Para el caso de "Bagre" (*Pimelodus* sp.), al utilizar el iniciador OPQ-03 en los 8 individuos iniciales se obtuvo un perfil con productos monomórficos que van aproximadamente desde los 1100 a 900 pares de bases (bp), al hacer el tamizado con los 20 especímenes estos productos presentan distribución polimórfica (Figura 2) por lo que no es adecuado para la identificación de esta especie.

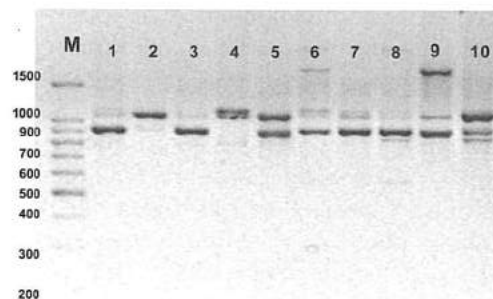


Figura 2.- Perfil molecular para el "Bagre" utilizando el iniciador OPQ-03.

Se muestran 10 de los 20 especímenes evaluados para esta especie. M: Marcador de 100 bp.

Trabajando con la especie "Boquichico" (*Prochilodus nigricans*) y el iniciador OPQ-03 sólo se obtuvo una banda con claridad de 550 bp, de característica monomórfica entre los 8 especímenes iniciales pero polimórfica al aumentar el número de la muestra a 20 (Figura 3), por lo que tampoco

resultaría adecuado para la identificación de esta especie.

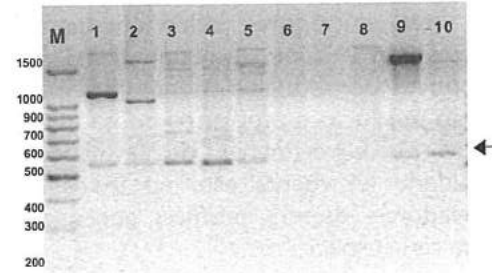


Figura 3. Perfil molecular de "Boquichico" con el iniciador OPQ-03 y la banda de 550 bp (flecha) en 10 especímenes.

M: Marcador de 100 bp.

Se observa la banda de 550 bp (flecha) en 10 especímenes.

En la Figura 4, se observa que utilizando el iniciador OPN-01 en la especie "Chambira" (*Hydrolycus scomberoides*), se obtuvo un perfil adecuado para la identificación de esta especie, los productos monomórficos son de aproximadamente 700, 500 y 600 bp, que son compartidos por todos los especímenes evaluados. Al utilizar el iniciador OPQ-03 en esta misma especie se observa un perfil con productos de 1400, 750 y 700 bp (Figura 5). Finalmente, en esta especie y con el iniciador OPZ-14 se observaron productos que iban de aproximadamente 1500 a 500 pares de bases (Figura 6), existen productos monomórficos de 1500, 900, 750 y 550 que

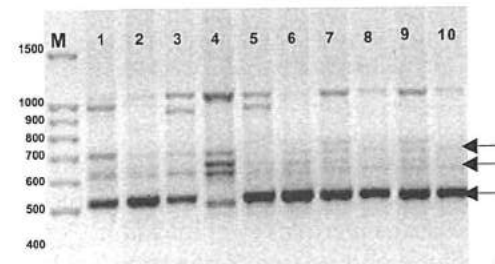


Figura 4. Perfil molecular de la especie "Chambira" con el iniciador OPN-01.

Se observan los productos de 700, 600 y 500 bp (flechas).

Se muestran 10 especímenes de los 20 evaluados.

M: Marcador de 100 bp.

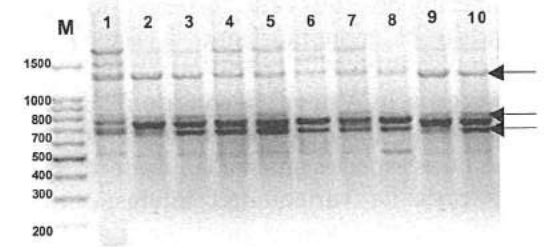


Figura 5. Perfil molecular de la especie "Chambira" con el iniciador OPQ-03.

Se observan los productos de 1400, 750 y 700 bp (flechas) que pueden ser utilizados para la identificación de esta especie. M: Marcador de 100 bp.

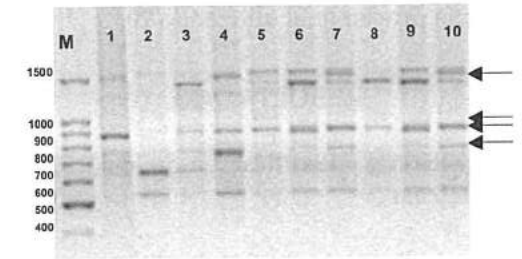


Figura 6. Perfil molecular de la especie "Chambira" con el iniciador OPZ-14.

Se observan productos de 1500 a 500 bp y los que pueden servir para la identificación de esta especie (flechas). M: Marcador de 100 bp.

pueden ser utilizados en la identificación de esta especie (flechas), aunque muchos no se observan con la suficiente claridad.

La Figura 7 permite apreciar los resultados de la utilización del iniciador OPQ-03 en la especie "Chio-chio" (*Psectrogaster rutiloides*), se obtuvieron bandas con variabilidad intraespecífica (polimórficas) y sin variabilidad (monomórficas) entre los diferentes especímenes evaluados de 1200 a 400 bp, aunque existen productos que se presentan en todos (flechas) este perfil no es adecuado para la identificación de esta especie por la presencia de los productos polimórficos.

La especie "Ilambina" (*Potamorhina altamazonica*) fue evaluada con los 3

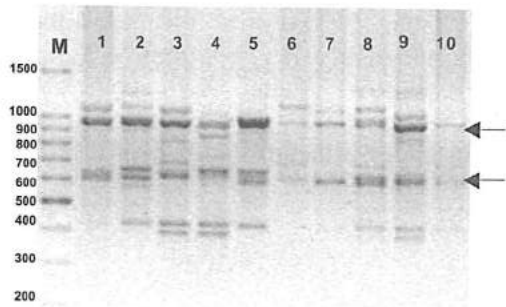


Figura 7.- Perfil molecular RAPD de la especie "Chio-chio" con el iniciador OPQ-03.

El iniciador produjo bandas polimórficas y monomórficas (flechas). Se muestran 10 de las 20 especies evaluadas. M: Marcador de 100 bp.

iniciadores seleccionados. Con OPN-01 produjo un perfil con bandas polimórficas de aproximadamente 1400 a 800 bp no adecuados para la identificación de esta especie (Figura 8). Con OPQ-03 se observó un perfil con más productos que iban de 1500 a 400 pares de bases pero al igual que el caso anterior se observó el polimorfismo intraespecífico (Figura 9). Con el iniciador OPZ-14 se obtuvo un perfil simple con un solo producto de 850 bp (flecha) también de presencia variable entre los especímenes analizados (Figura 10).

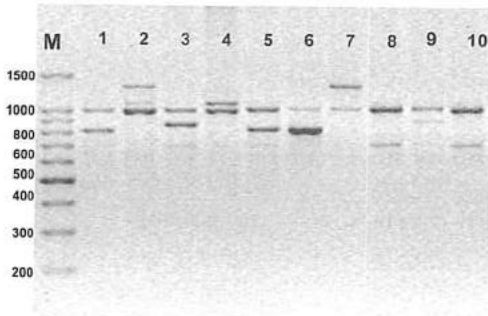


Figura 8. Perfil molecular RAPDs de la especie "Llambina" con el iniciador OPN-01.

Se pueden observar el polimorfismo intraespecífico de los productos. M: Marcador de 100 bp.

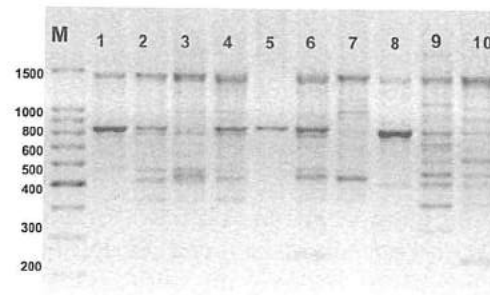


Figura 9. Perfil molecular RAPDs de la especie "Llambina" con el iniciador OPQ-03.

El iniciador fue más complejo que el anterior, pero también produjo polimorfismo intraespecífico. M: Marcador de 100 bp.

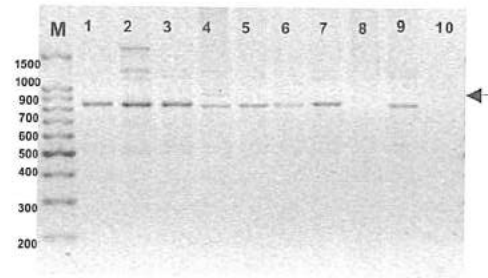


Figura 10. Perfil molecular RAPDs de la especie "Llambina" con el iniciador OPZ-14.

El iniciador permitió obtener un solo producto de 850 bp (flecha). M: Marcador de 100 bp.

En la especie "Palometa" (*Mylossoma duriventre*) se observó un perfil con muchas bandas desde 1500 a 500 bp con el iniciador OPQ-03 (Figura 11). Los

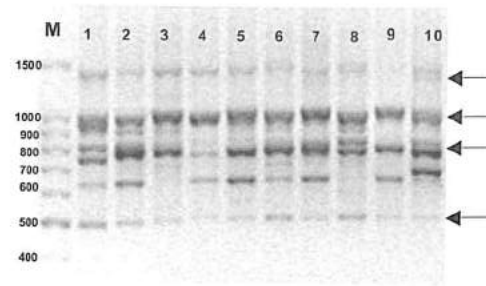


Figura 11. Perfil molecular RAPDs de la especie "Palometa" con el iniciador OPQ-03.

Las flechas indican los productos monomórficos que pueden ser usados en la identificación de esta especie. M: Marcador de 100 bp.

productos de 1500, 1000, 750 y 500 bp se presentaron en todos los especímenes analizados (monomórficos), lo que los hace adecuados para la identificación de esta especie.

Por último, en la especie "Sardina" (*Triportheus angulatus*) con el iniciador OPQ-03 se observó un perfil que dio productos con variabilidad interespecífica, pero también se observaron productos monomórficos presentes en todos los especímenes evaluados (1500, 800 y 600 bp) (Figura 12).

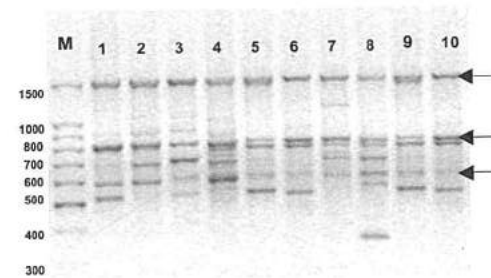


Figura 12.- Perfil molecular de "Sardina" con el iniciador OPQ-03.

Generé el siguiente perfil con productos que van de 1500 a 500 pares de bases.
Las flechas señalan los productos monomórficos que pueden ser utilizados en la identificación de esta especie.
M: Marcador de 100 bp.

La Tabla 2 muestra los iniciadores seleccionados y los productos o bandas características que se consideran específicas para cada especie y que podrían ser utilizados en la identificación de estas especies.

DISCUSIÓN

Como se mencionó, al aplicar la técnica RAPD con los tres iniciadores seleccionados para las especies amazónicas evaluadas, se obtuvieron dos tipos de productos: monomórficos y polimórficos, entre los especímenes de cada especie.

De las siete especies evaluadas, sólo "chambira" mostró productos monomórficos con los tres iniciadores seleccionados, tres especies ("chio-chio", "palometa" y "sardina") con un sólo iniciador (OPQ-03) y las tres restantes ("bagre", "boquichico" y "llambina") productos polimórficos y monomórficos con los otros iniciadores. Este detalle, además de la presencia de pocos o muchos productos de amplificación, está directamente relacionado con la secuencia del iniciador y el genoma de la especie analizada, dentro del cual se encuentra la secuencia complementaria del iniciador.

Tabla 2.- Iniciadores y productos RAPD específicos para cada especie amazónica

Especie	Iniciador	Productos (pb)
"Chambira" (<i>Hydrolycus scomberoides</i>)	OPN-01	700, 600, 500
	OPQ-03	1400, 750, 700
	OPZ-14	1500, 900, 750, 550
"Chio-chio" (<i>Psectrogaster rutiloides</i>)	OPQ-03	1000/620
"Palometa" (<i>Mylossoma duriventre</i>)	OPQ-03	1500, 1000, 750, 500
"Sardina" (<i>Triportheus angulatus</i>)	OPQ-03	1500, 800 600

Resulta importante resaltar que el iniciador RAPD OPQ-03 permitió obtener mejores resultados en la mayoría de especies analizadas, tal como lo demuestra la Figura 13. En ésta se comparan los diferentes productos obtenidos y se observa, además, el polimorfismo interespecífico (diferencia entre los patrones obtenidos para cada especie) que resulta de la aplicación de este iniciador en las distintas especies. La presencia de mayor cantidad de productos con el iniciador OPQ-03, indica que su secuencia complementaria se encontraría ampliamente distribuida en el genoma de las especies analizadas. Este resultado sugiere el uso de un único iniciador para la identificación de varias especies a la vez, lo cual resulta ventajoso en términos económicos y prácticos. Es necesario precisar que al aplicar la técnica RAPD los distintos productos obtenidos de un tamaño similar no necesariamente corresponden a la misma secuencia sobre todo si se trata de distintas especies y sería necesario secuenciar los productos de mayor importancia para darle mas validez en su utilización en la identificación de especies.

Otro aspecto a tomar en cuenta es que generalmente RAPD amplifica muchas secuencias del ADN blanco de la muestra,

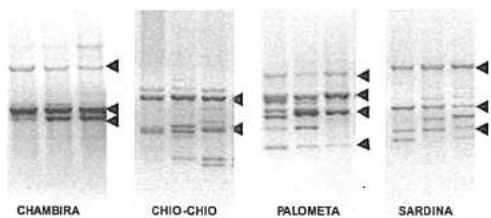


Figura 13. Productos específicos obtenidos con el iniciador OPQ-03

Las flechas señalan los productos específicos seleccionados para cada especie (chambira 1400/750/700 bp, chio-chio 1000/620 bp, palometa 1500/1000/750/500 bp y sardina 1500/800/600 bp).

Se pueden observar productos adicionales que resultaron polimórficos entre los especímenes de cada especie.

lo que deriva en patrones complejos de amplificación, es decir, muchas bandas. En este trabajo, la mayoría de patrones resultaron siimples, es decir, con pocas bandas y de un gran tamaño, entre 1500 y 500 pares de bases. Esto se explica inicialmente por la temperatura de alineamiento utilizada para realizar la amplificación (37 °C) que es mas alta que la utilizada en otros trabajos (35 °C) (MARTÍNEZ *et al.* 2006; MARTÍNEZ Y DANIELSDOTTIR, 2000; MARTÍNEZ Y PASTENE, 1999; MARTÍNEZ Y YMAN, 1998). Otro factor importante es que los tejidos estuvieron suficientemente frescos y el ADN no se degradó, lo cual origina en algunos casos que se obtengan productos de menor tamaño.

Los resultados mencionados anteriormente demuestran la validez de la aplicación de la técnica RAPD en especies amazónicas para su identificación y monitoreo, si bien es cierto este es un trabajo preliminar donde sólo se han evaluado un pequeño grupo de especies correspondientes a diferentes géneros, tendrían que realizarse mas trabajos para determinar si la técnica podría distinguir entre especies muy relacionadas dentro del mismo genero. La validez de la aplicación de esta técnica ha sido sugerido también por los estudios de WASKO *et al.* (2004) quien la aplica en la diferenciación de poblaciones silvestres y cautivas de especies amazónicas. Asimismo, se ha utilizado con éxito en estudios de diversidad y filogenética en diferentes especies amazónicas y otras relacionadas (OLIVERA *et al.* 2002, CALLEJAS y OCHANDO 2002, BARDAKCI *et al.* 1994). Por otro lado, PARTIS y ROBERTS (2002) investigaron la utilización potencial de RAPD para la identificación de especies marinas de importancia comercial. MARTÍNEZ Y DANIELSDOTTIR (2000) utilizaron esta técnica para la identificación de especies

de mamíferos marinos en productos alimenticios. En estos trabajos RAPD ha demostrado ser útil para obtener patrones especie-específicos para la caracterización e identificación de especies sobre todo en tejidos frescos o que no han sido sometidos a mucha degradación.

No existen muchos trabajos publicados sobre la identificación molecular de especies pesqueras peruanas, y a nivel mundial la mayoría de trabajos sobre el tema se basan en otras técnicas moleculares. Así, por ejemplo, la técnica PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa - Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) ha sido utilizada para realizar la identificación a nivel de especies y subespecies de merluza (QUINTEIRO *et al.* 2001), identificación de salmón (HOLD *et al.* 2001) y Pleuronectiformes (SOTELO *et al.* 2001), diferenciación de 5 especies de Mugílidos (Papasotiropoulos *et al.* 2002). Otros trabajos se refieren a la identificación de especies de atún (WEDER *et al.* 2001) utilizando SSCP (Polimorfismo en la Conformación de una Sola Hebra de ADN) y a la identificación de pez globo (CHENG *et al.*, 2001), y pez espada (HSIEH *et al.* 2004) por secuenciamiento.

Como se sabe, la técnica RAPD presenta varias ventajas: 1) se puede generar un gran número de productos utilizando un solo iniciador sin un conocimiento previo del ADN de las especies bajo estudio; 2) es una técnica simple y rápida, cualidades que sustentan su aplicación en diferentes campos como estudios de diversidad genética, caracterización de germoplasma, estructura de poblaciones, mapeo de genomas y otros; sin embargo, también presenta desventajas principalmente en la reproducibilidad y el polimorfismo. La reproducibilidad resulta en cambios en los fragmentos producidos, causada por variaciones en calidad de ADN, en

los componentes y/o condiciones de PCR. El polimorfismo, que constituiría una ventaja, puede transformarse en desventaja si es muy elevado, sobre todo si se manifiesta a través de polimorfismo intraespecífico, que puede invalidar los resultados para estudios de identificación de especies pero que si la hacen válida para otro tipo de estudios en genética de poblaciones.

Si bien en la actualidad se tiende a utilizar otras técnicas, RAPD aun es muy usado por las ventajas que ya se han mencionado y además porque en un solo paso se puede determinar rápidamente si una determinada muestra corresponde a un grupo de especies o incluso determinar que especie es. Esta técnica utilizada en conjunto con otras técnicas como RFLP, SSCP u otras podrían optimizar los trabajos de identificación de especies pesqueras.

CONCLUSIONES

La utilización de la técnica RAPD para la caracterización molecular de peces amazónicos permitió obtener perfiles moleculares específicos para cuatro de las especies estudiadas. Se utilizaron 3 iniciadores RAPD: OPN-01, OPQ-03 y OPZ-14.

Utilizando los tres iniciadores se obtuvieron perfiles satisfactorios (productos monomórficos) en la especie "chambira", y en las especies "chiochio", "palometa" y "sardina" sólo con el iniciador OPQ-03. Se puede concluir que el iniciador OPQ-03 permitió obtener los mejores resultados en todas las especies evaluadas.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el uso de la técnica RAPD para la identificación de especies

amazónicas peruanas, puede ser útil y aplicable en estudios de diferenciación interespecífica. A su vez, los perfiles moleculares podrían servir de patrones de identificación (autenticación) o con propósitos básicos de caracterización molecular de estas especies.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a la Dra. María Iciar Galarza Martínez, investigadora Senior, del Departamento de Tecnología de Procesamiento, División Marina del Instituto SINTEF, en Trondheim, Noruega, por su gentil colaboración al revisar el presente trabajo.

También agradecen a la Dra. Susana Sirvas de la Facultad de Oceanografía, Pesquería y Ciencias Alimentarias de la Universidad Nacional Federico Villarreal por sus acertados comentarios.

REFERENCIAS

1. Bardakci F, Skibinski D. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73: 117-230.
2. Bossier P. 1999. Authentication of Seafood Products by DNA Patterns. *J. Food Science* 64: 189-193.
3. Calcagnotto D, Toledo S. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Biology* 23: 127-130.
4. Callejas C, Ochando MD. 2002. Phylogenetic relationships among Spanish Barbus species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity* 89 (1): 36-43.
5. Cheng C, Hsieh Y, Noguchi T, Arakawa O, Hwang D. 2001. Effect of Processing on Sequencing of Cytochrome B Gene and Its Restriction Site in the Meat of Puffer *Takifugu rubripes*. *J. Food Drug Analysis* 9(4): 232-237.
6. Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
7. Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ra ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia. 220 pp.
8. Hsieh, H.S., Chai, T., Cheng, Y.W. y D.F. Hwang. 2004. Application of DNA technique for identifying the species of different processed products of swordfish meat. *Journal of Food Science* 69:1-6.
9. Hold G, Russell V, Pryde S, Rehbein H, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Sotelo C, Pérez-Martín R, Santos A, Rosa C. 2001. Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. *Eur. Food Res. Technol.* 212: 385-389.
10. Lehmann D, Hettwer H, Taraschewski. 2000. RAPD-PCR investigations of systematic relationships among four species of eels (Teleostei: Anguillidae), particularly *Anguilla anguilla* and *A. rostrata*. *Marine Biology* 137: 195-204.
11. Martínez I, Aschan M, Skjerdal T and SM Aljanabi. 2006. The genetic structure of *Pandalus borealis* in the Northeast Atlantic determined by RAPD analysis. *Journal of Marine Science*, 63: 840-850.
12. Martínez I, Pastene LA. 1999. RAPD-typing of Central and Eastern North Atlantic and Western North Pacific minke whales, *Balaenoptera acutorostrata*. *Journal of Marine Science* 56: 640-651.
13. Oliveira AV, Prioli SM, Pavanelli CS, Julio HF, Panarari RS. 2002. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Parana river floodplain of Brazil. *Genetica* 115(3): 259-267.
14. Papatotiroopoulos V, Klossa-Kilia E, Kiliass G, Alahiotis S. 2002. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. *Biochem Genetic* 40: 71-86.
15. Partis L, Wells R. 2002. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes* 10:435-441.
16. Quinteiro J, Vidal R, Izquierdo M, Sotelo C, Chapela M, Perez-Martín R, Rehbein H, Hold G, Russell V, Pryde S, Rosa C, Santos

- A, Rey-Méndez. 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.
17. Sotelo C, Calo-Mata P, Chapela J, Perez-Martin R, Rebién H, Holo G, Russell V, Pryde S, Quinteiro J, Izquierdo M., Rey-Mendez M, Rosa C, Santos A. 2001. Identification of Flatfish (Pleuronectiformes) Species Using DNA-Based Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4562-4569.
 18. Wasko A, Martins C, Oliveira C, Senhorini, J. y F. Foresti. 2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish mantrinha (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J Applied Ichthyol.* 20: 48.
 19. Weder J, Rehbién H. 2001. On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. *Eur Food Res Technol.* 213: 139-144.
 20. Williams JG, Hanafey M. 1993. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods in Enzimology* 218:704-740.
 21. Sharma SK, Dawson IK, Waugh R. (1995). Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 647-654.