

APLICACIÓN DEL BARCODING AL MANEJO Y CONSERVACIÓN DE PECES Y SUS SUBPRODUCTOS EN LA AMAZONÍA PERUANA

Carmen GARCÍA-DÁVILA^{1,3}, Mayra FLORES¹, Lucero PINEDO¹, Rodrigo LOYOLA¹, Diana CASTRO-RUIZ^{1,3}, Carlos ANGULO^{1,3}, Eduardo MEJIA^{1,3}, Homero SÁNCHEZ^{1,3}, Aurea GARCÍA^{1,3}, Werner CHOTA^{1,3}, Guillain ESTIVALS^{2,3}, Hugo PANDURO¹, Christian NOLORBE¹, Carlos CHUQUIPIONDO⁴, Fabrice DUPONCHELLE^{2,3}, Jean-François RENNO^{2,3}

- 1 Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM), Carretera Iquitos-Nauta km 4.5, Iquitos, Perú
- 2 Institut de Recherche pour le Developpement (IRD), UMR BOREA, Montpellier, Francia
- 3 Laboratorio Mixto Internacional - Evolución y Domesticación de la Ictiofauna Amazónica (LMI – EDIA)
- 4 Amazon Research Center for Ornamental Fishes, Asentamiento humano 31 de Mayo, Calles las Flores manzana T lote 2, Iquitos, Loreto, Perú

RESUMEN

Fue generado y depositado en el GenBank secuencias nucleotídicas del gen COI de 207 especies de peces comercializados en los mercados de consumo y ornamental en la Amazonia peruana. Posteriormente este banco de secuencias nucleotídicas fueron utilizadas como base de comparación en la identificación específica exitosa de: i) larvas de bagres colectadas en tres cuencas hidrológicas (Ucayali, Napo y Marañón), mostrando ser una alternativa mucho más segura que las determinaciones mediante análisis morfológico o morfométrico; ii) de alevinos de identidad morfológica dudosa en los procesos de exportación, mostrando que la identidad específica de juveniles de saltón blanco *B. filamentosun* y saltón negro *B. capapretum* asignada *a priori* por los extractores era equivocada y iii) subproductos de peces amazónicos, lo que permitió mostrar los altos grados de sustitución en filete fresco. La generación de estos banco de secuencias nos permitió proponer protocolos basados en caracterización molecular de las especies, lo que pensamos contribuirá a la modernización del sistema de fiscalización y monitoreo de la comercialización de los peces (ornamentales y de consumo), permitiéndole los decisoras de política un mayor control tanto en el área de comercialización como de manejo sostenido y conservación en el sector pesquero en la Amazonía peruana.

PALABRAS CLAVE: gen COI, peces ornamentales, peces de consumo, asambleas de larvas, código de barras genético.

APPLICATION OF BARCODING TO MANAGEMENT AND CONSERVATION OF FISH AND THEIR BY-PRODUCTS IN PERUVIAN AMAZON

ABSTRACT

Were generated and deposited in Genbank Nucleic acid sequences of the COI gene of 207 species of fish commercialized in the human and ornamental markets. Subsequently, the nucleotide sequences were used as a basis for comparison in the specific identification of: i) larvae of catfish collected in three hydrological basins (Ucayali, Napo and Marañón), showing to be a much safer alternative to morphological and morphometric studies; ii) of fingerlings of dubious morphological identity in the export processes, showing that The specific identity of saltón blanco *B. filamentosun* and santón negro *B. capapretum* juvenile assigned a priori by the extractors was wrong and iii) subproducts of Amazonian fish, showing the high degrees of substitution in fresh fillets. The generation of these sequences bank allowed us to propose protocols based on molecular characterization of the species, which we think will contribute to the modernization of the system of inspection and monitoring of the commercialization of fish (ornamental and consumer), allowing policy makers greater control both in the area of commercialization and sustained management and conservation in the fishing sector in the Peruvian Amazon.

KEYWORDS: COI gen, ornamental fish, consumption fish, larval assemblies, genetic barcode.

INTRODUCCIÓN

La cuenca amazónica peruana alberga una gran diversidad ictiofaunística (Ortega & Vari, 1986, Ortega *et al.*, 2011), cuya identidad taxonómica a nivel de especie está basada en el análisis visual de los especímenes (patrones de coloración) o claves taxonómicas (Ortega, 2011). Pero muchas veces la gran diversidad específica y la escasez de taxónomos especializados en peces, han ocasionado malas identificaciones, especialmente de aquellas con caracteres diferenciales muy confusos, no pudiéndose diferenciar con precisión especies morfológicamente muy parecidas, (García-Dávila *et al.*, 2013). Esta incertidumbre es particularmente muy fuerte en especies ornamentales, como es el caso de las especies del género *Corydoras*, donde es muy difícil diferenciar con precisión algunas especies, cuyos caracteres diferenciales (diagnósticos) no son muy claros.

Este problema es agravado por el hecho, de que diferentes especies pueden ser identificadas por el mismo nombre comercial o al contrario una sola especie puede recibir diferentes identificaciones comerciales dependiendo de la región o del acuario. Esto, imposibilita un real control de la comercialización, de este modo, muchas especies ornamentales son exportadas ilegalmente, poniendo en peligro a especies protegidas, cuya comercialización está prohibida, y que se venden como si fueran especies cuya comercialización es libre. Igualmente en los peces de consumo humano se puede observar la confusión muchas veces proposital en la identificación de las especies, sobre todo cuando se trata de bagres de valor comercial elevado (e.g. la doncella *Pseudoplatystoma punctifer* con otros bagres pintados de menor valor comercial). Este problema se agudiza todavía más cuando se trata de la venta de subproductos como filetes y carne picada donde la identificación morfológica es imposible, se suele vender una especie por otra. Estas deficiencias, causan al estado peruano pérdidas cuantiosas, no solo monetarias, sino también en la conservación y gestión de estos recursos, así como pérdida de oportunidades de una expansión sostenible del comercio de carnes a otros mercados nacionales e internacionales, donde la veracidad de la información es imprescindible.

En este contexto, el uso de la secuencia nucleotídica del gen mitocondrial citocromo oxidasa sub unidad I (COI) como código de barras de ADN, ha sido utilizado con éxito en la identificación molecular de especies en las que la identificación taxonómica en base a caracteres morfológicos es dudosa o se hace imposible (Astroga, 2008; Hajibabaei *et al.*, 2007). Además, las diferencias en

las secuencias de ADN, nos permiten separar las especies en cualquier fase del ciclo de vida de un ser vivo (Cywinska *et al.*, 2006; García-Dávila *et al.*, 2014). Entonces la identificación molecular en base al barcoding se une a la taxonomía morfológica tradicional como una herramienta complementaria para potencializar la identificación taxonómica de las especies (Hajibabaei *et al.*, 2007; Pfenninger *et al.*, 2006). En consecuencia la aplicación del barcoding podría contribuir fuertemente en los procesos de legislación, regulación, monitoreo y supervisión del comercio de peces ornamentales y de consumo, así como de sus stocks naturales en la Amazonía peruana, ya que permiten la identificación inequívoca de peces (en cualquier etapa de desarrollo), o de sus subproductos.

Este estudio pretende contribuir a solucionar este problema a través de la generación de un banco de secuencias nucleotídicas del gen COI de las 207 especies de peces comercializadas en el mercado ornamental y de consumo humano en la Amazonía peruana, además de su aplicación a la identificación taxonómica de larvas bagres y alevinos de peces colectados en ambientes naturales que no puedan ser identificados morfológicamente, así como de subproductos pesqueros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fue realizada la colecta, identificación taxonómica, fotodocumentación y colecta de tejido muscular de 651 especímenes pertenecientes a 217 especies ornamentales y de consumo. Especímenes pequeños fueron conservados como muestras vouchers y depositados en las colecciones ictiológicas del IIAP, en especímenes grandes se realizó solo un voucher fotográfico. De cada espécimen fue extraída una muestra de tejido muscular la cual fue conservada en alcohol al 96% para los estudios moleculares.

La extracción fue realizada mediante el método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) a partir de tejido muscular de los adultos y del total de la larva. El gen citocromo oxidasa sub unidad I (COI, 576 pb) fue amplificado utilizando los primeros Fish F1 5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3' y Fish R1 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3' (Hubert *et al.*, 2008). La amplificación vía PCR fue realizada en un volumen final de 15 µl conteniendo 6,78 ul de agua ultra pura, 3 ul de 5x PCR tampón, 0,9 ul de MgCl₂ (25 mM), 0,6 ul de cada primer (10 uM), 1,5 ul del mix de dNTP (2 mM), 0,12 ul (5U/ ul) de Taq ADN polimerasa (Promega), y 1,5 ul (100 ng/ ul) de ADN molde. Las condiciones de PCR fueron de 94°C durante 2 min,

35 ciclos de 94°C durante 30 s, 54°C 40 s, y 72°C durante 1 min, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR del gen COI fueron secuenciados utilizando los mismos primer de la amplificación en un analizador genético 3130XL (Applied Biosystems).

Para cada espécimen fue generado una secuencia nucleotídica consenso (unión de secuencias Forward y Reverse) con auxilio del software MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank. Las secuencias editadas de las 207 especies fueron alineadas en una matriz de alineamiento múltiple con ayuda del programa de alineamiento múltiple ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) que está dentro del software BioEdit v.7.0.9. (Hall, 1999). La identidad molecular de las larvas y alevinos de bagres así como de los subproductos fue determinada a través de la relación filogenética de la secuencia en análisis con el banco de secuencias de las 207 especies en un árbol filogenético de vecino próximo (Neighbor-Joining – NJ), utilizando el software MEGA 4.0.

Con los datos obtenidos se determinó: i) presencia de las diferentes especies de bagres así como su frecuencia relativa en las cuencas de los ríos Napo, Ucayali y Marañón; ii) la identidad taxonómica de alevinos de bagres de la familia Pimelodidae colectados en ambientes naturales cuya identidad taxonómica era desconocida; iii) el porcentaje de veracidad de la información en cuanto a la identidad taxonómica en subproductos pesqueros en el mercado de Belén de la ciudad de Iquitos (región Loreto).

RESULTADOS

Fue generado un banco de secuencias del gen Citocromo Oxidasa Sub unidad I (COI) de 510 pares de bases para un total 621 individuos pertenecientes a 207 especies de peces (128 especies comercializadas como ornamentales, 69 como consumo, más 10 especies comercializadas en ambos rubros (tabla 1).

Estos bancos de secuencias nucleotídicas permitieron por primera vez conocer la identidad específica de las asambleas de larvas presentes en los periodos de aguas altas y aguas bajas de los ríos Ucayali, Marañón y Napo (Tabla 2). Esto permitió conocer mes a mes la diversidad de especies de bagres que se estaban reproduciendo en esos ríos (figura 1), así como también analizar detalladamente los ciclos de reproducción durante el periodo hidrológico de las especies con frecuencia > 5%. Encontrándose que la relación entre el período reproductivo de los peces y los períodos hidrológicos varían con las especies, algunas tendieron a reproducirse principalmente durante la temporada de agua baja (*B. rousseauxii*, *B. platynemum*, *B. vaillantii*, *H. edentatus*, *H. marginatus*), en tanto que otras durante las aguas altas (*B. filamentosum* y *P. blochii*) (García-Dávila *et al.*, 2014, 2015).

También utilizamos estos bancos para identificar alevinos de bagres de la familia Pimelodidae colectados en ambientes naturales y cuya identidad taxonómica era desconocida por los exportadores. Antes de los análisis moleculares, los alevinos con el

Tabla 1. Número de órdenes, familias y especies de peces ornamentales caracterizadas molecularmente mediante barcoding.

ORDEN	ORNAMENTAL		CONSUMO	
	FAMILIA	ESPECIE	FAMILIA	ESPECIE
Myliobactiformes	01	09	-	-
Osteoglossiformes	02	02	02	02
Lepidosireniformes	01	01	-	-
Characiformes	11	33	6	32
Gymnotiformes	05	08	-	-
Siluriformes	07	57	7	35
Synbranchiformes	01	01	-	-
Perciformes	02	22	2	8
Pleuronectiformes	01	02	-	-
Tetraodontiformes	01	01	-	-
Clupeiformes	-	-	1	2
TOTAL	32	138	18	79

Tabla 2. Número total de larvas por especie colectados en los ríos Napo, Maraón y Ucayali entre 2012 y 2014.

ESPECIE	NAPO	MARAÓN	UCAYALI	SCN	TOTAL
<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	32	35	120	32	219
<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	19	11	2	169	201
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	45	43	21	153	262
<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	17	9	41	1	68
<i>Calophysus macropterus</i>	-	3	-	105	108
<i>Hypophthalmus marginatus</i>	23	17	16	49	105
<i>Hypophthalmus edentatus</i>	1	25	24	15	65
<i>Platynemichthys notatus</i>	6	7	2	18	33
<i>Pimelodus blochii</i>	95	106	96	248	545
<i>Pimelodina flavipinnis</i>	1	8	6	17	32
Total	239	264	328	807	1638

cuerpo cubierto de manchas grandes redondeadas de color gris o café oscuro sobre un fondo crema, a excepción de la parte inferior posterior del cuerpo donde no hay manchas solo un fondo crema (zona comprendida entre la base anterior de la aleta pélvica hasta el pedúnculo de la aleta caudal, en la parte superior delimitado por la línea lateral), eran comercializados como saltón blanco *Brachyplatystoma filamentosum* (Figura 2A). En tanto que los juveniles sin manchas solo con el cuerpo de color gris oscuro (a excepción del vientre que es crema), con barbillas maxilares muy largas (el doble de la longitud total) eran considerados como saltón negro *B. capapretum*. Los resultados de los análisis moleculares mostraron que estos alevinos tenían secuencias nucleotídicas del gen COI muy diferentes entre sí. Estas secuencias nucleotídicas cuando contrastadas con el banco de secuencias de bagres de la familia Pimelodidae a través de un análisis de vecino próximo (figura 3), permitieron establecer las relaciones filogenéticas de los juveniles con las secuencias de los adultos. Con esto se pudo comprobar que los juveniles denominados como saltón blanco eran en realidad juveniles de saltón negro y viceversa, mostrando que la identidad taxonómica de estos alevinos estaba invertida, es decir la identificación morfológica *a priori* era errada.

La comparación de los bancos de secuencias con las secuencias obtenidas de muestras de filete fresco del mercado de Belén de la ciudad de Iquitos, permitió comprobar que casi toda la carne de doncella *Pseudoplatystoma punctifer* y dorado *Brachyplatystoma rousseauxii* comercializada

como filete fresco estaba adulterada, es decir era substituida su totalidad por otras especies de menor valor comercial como el cunchimama *Zungaro zungaro*, achacubo *Surubimichthys planiceps*, saltón blanco *Brachyplatystoma filamentosum*, tabla barba *Brachyplatystoma platynemum*, zungaro alianza *Brachyplatystoma juruense* y cahua *Pterodoras granulatus*. Además se pudo observar que la substitución está relacionada a la disponibilidad de especies substitutas en los diferentes periodo hidrológicos (Figura 4). Solo en un caso la carne declarada era la comercializada (saltón blanco *B. filamentosum*).

DISCUSIÓN

Las deficiencias en el monitoreo y fiscalización de los peces y sus subproductos causan al estado peruano pérdidas cuantiosas, no solo monetarias, sino también en la conservación y gestión de estos recursos, así como pérdida de oportunidades de una expansión sostenible del comercio de carne de peces a otros mercados nacionales e internacionales, donde la veracidad de la información es imprescindible. El sistema actual de monitoreo basado en el análisis morfológico, necesita ser complementado, con otras herramientas como el análisis molecular que permite una identificación a nivel específico, ya sea de especímenes (adultos, larvas y juveniles) completos o de sus partes (subproductos) e inclusive de sus huevos.

Por ejemplo el estudio de los stocks pesqueros, con el empleo de estos bancos de secuencias como elemento comparativo para la identificación

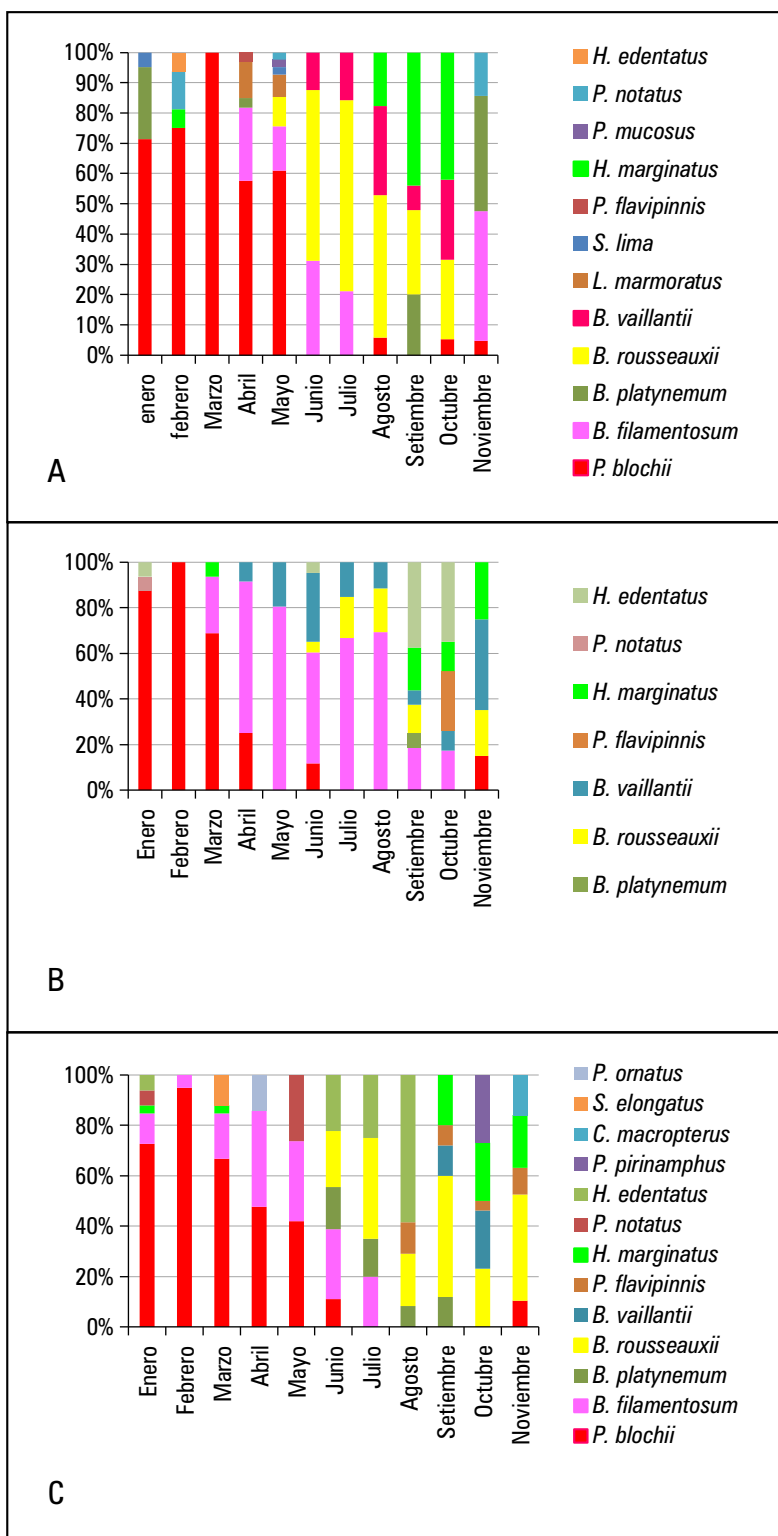


Figura 1. Porcentaje mensual de larvas de diferentes especies de peces identificadas mediante Barcoding y colectadas en los ríos Napo (A) Ucayali (B) y Marañón (C).

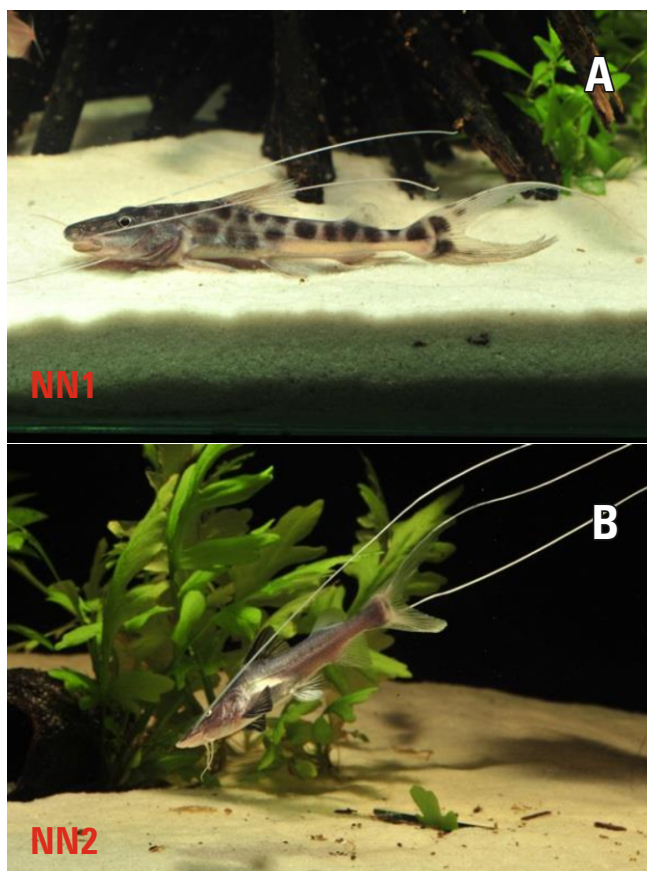


Figura 2. Alevinos del genero *Brachyplatystoma* no identificados morfológicamente: (A) *B. capapretum*, (B) *B. filamentosum*

específica es de vital importancia para los planes de manejo y conservación de estos recursos, ya que nos permite analizar la dinámica reproductiva de las mismas. Antes del empleo de las herramientas moleculares el estudio de las larvas de los grandes bagres migradores estaba basado solo en datos morfológico (Araujo-Lima & Donald, 1988; Leite *et al.*, 2006, 2007) lo que permitió una mejor comprensión de la influencia de los régimen hidrológicos sobre la dinámica de reproducción de este grupo de especies (Cañas & Pine 2010; Cañas & Waylen, 2011). Sin embargo, la identificación morfológica de cada larva es un proceso extremadamente pesado y largo que no permitía un grado de precisión suficiente para lograr la identificación precisa de las especies, siendo posible en algunos casos solo identificar a nivel de familia (Cañas & Pine, 2010; Cañas & Waylen, 2011). Pero existen familias como los Pimelodidae, a la cual pertenecen los grandes bagres comerciales, que

cuentan con unas cien especies (Reis *et al.*, 2003), 20% de las cuales tiene una importancia significativa o mayor en las pesquerías amazónicas (Barthem & Goulding 1997, 2007), de las cuales se conoce muy poco sus periodos y lugares de reproducción a fin de poder proponer estrategias de gestión sostenible y generar información base para el cultivo en cautiverio. El Barcoding o identificación molecular de las especies, constituye una alternativa eficiente a los estudios morfométricos para la identificación específica de las larvas de peces. Permitiendo por primera vez observar las diferencias en la abundancia de larvas entre las estaciones de muestreo en las cuencas de los ríos Arabela, Curaray y Napo (Tabla 1), y permitiéndonos explicar la relación de las épocas de reproducción con el ciclo hidrológico y el tamaño y estabilidad de los cuerpos de agua de las cuencas evaluadas. El barcoding fue exitosamente utilizado para identificar larvas de diferentes familias de peces tanto marinos como de

agua dulce (Paine *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2010; Matarese *et al.*, 2011; García-Dávila *et al.*, 2014, 2015; Pappalardo *et al.*, 2015), el alcance de esta técnica es tan grande que permite incluso la identificación específica a partir de huevos. Asimismo el empleo del Barcoding permite la identificación precisa de especímenes desconocidos o mal identificados (intencionalmente o no), o de sus subproductos (filete fresco, carne picada), es decir con el empleo del Barcoding no se necesita tener el individuo adulto o completo para identificarlo, esto es muy útil los sistemas de comercialización porque permitiría corroborar la identidad de las especies declaradas, permitiendo así un sistema de custodia más adecuado en los procesos de exportación.

Por lo que concluimos que el empleo del código de barras de ADN en los sistemas de monitoreo y fiscalización podría modernizar los sistemas de comercialización con miras a mercados nacionales e internacionales.

Financiamiento: Concejo Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación Tecnológica (CONCYTEC) a través de FONDECYT, Proyecto: PIAP-2-P-098-14

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Araujo-Lima, C. A. R. M.; Donald, E., 1988: Numero de Vertebras de Characiformes do rio Amazonas e seu uso na identificao da larvas do grupo [Number of Vertebrae of Characiforms of the Amazon River and its use for identifying larvae of the group]. *Acta Amazonica*, 18: 351–358.
- Astorga, M.P. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalves de importancia para la acuicultura. En A. Lovatelli; A. Farias; E. L. Uriarte (Eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura.
- Barthem, R. B. & Goulding, M. 1997. The catfish connection. Biology and Resource Management in the Tropics Series. Columbia University Press. New York. 145p.
- Barthem, R. B. & Goulding, M. 2007. Un ecosistema inesperado: A Amazonia revelada pela Pesca. Grafica Biblos, Lima-Perú, 241pp.

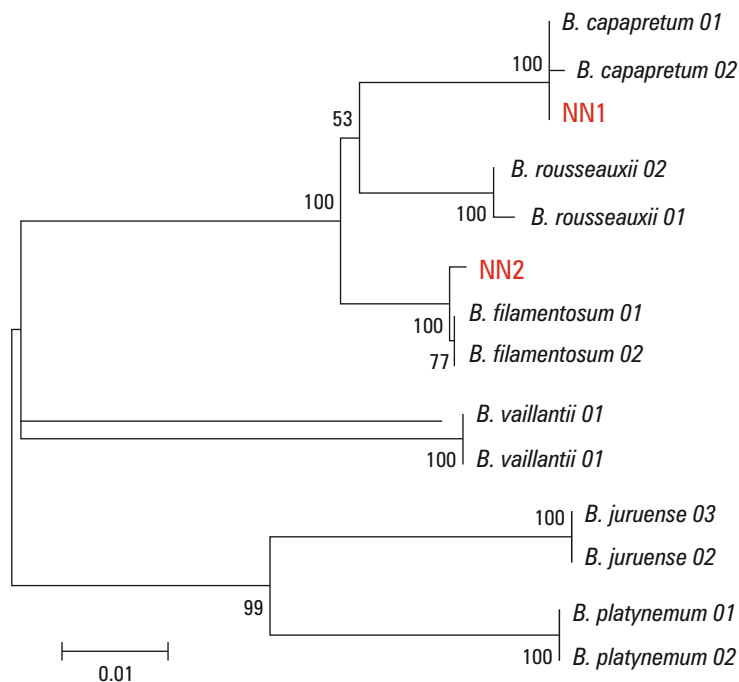


Figura 3. Dendrograma de Neighbor-Joining para verificar la identidad específica de los alevinos del género *Brachyplatystoma*.

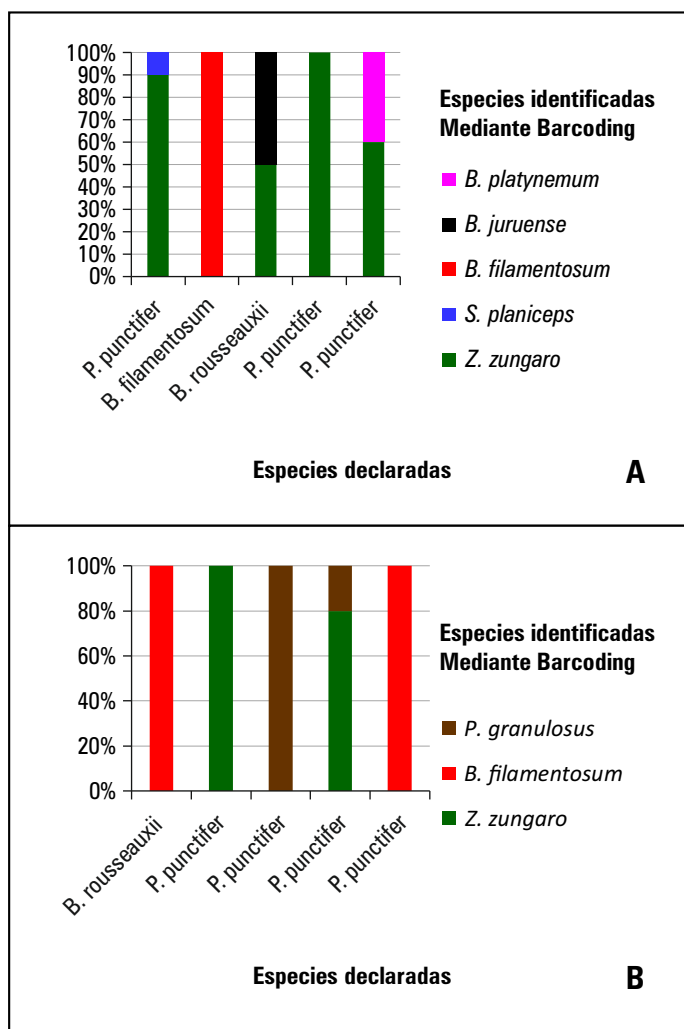


Figura 4. Porcentaje de especies substitutas identificadas mediante Barcoding en muestras de filete fresco de peces comercializados en el periodo de vaciante (A) y creciente (B) en el mercado de Belén de la ciudad de Iquitos.

Cañas, C. M.; Pine, W. E. 2010. Documentation of the temporal and spatial patterns of pimelodidae catfish spawning and larvae dispersion in the madre de Dios River (Peru): Insights for conservation in the Andean-Amazon headwaters. River Research and Applications:n/a-n/a.

Cañas, C. M.; Waylen, P.R. 2011. Modelling production of migratory catfish larvae (Pimelodidae) on the basis of regional hydro-climatology features of the Madre de Dios Basin in southeastern Peru. Hydrological Processes:n/a-n/a.

Cywinska, A.; Hunter, F.; Hebert, P. D. 2006.

Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Department of Biological Sciences, Brock University, St. Catharines, Ontario, Canada and 2 Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

Doyle, J. J.; Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull., 19:11-15.

García-Dávila, C.; Duponchelle, F.; Castro-Ruiz, D.; Villacorta, J.; Querouil, S.; Chota-Macuyama, W.; Nuñez, J.; Romer U.; Carvajal-Vallejos, F. Renno, J.-F. 2013 Molecular identification of a cryptic species in the

- Amazonian predatory catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1962) from Peru. *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-013-9734-5.
- García-Dávila, C.; Castro-Ruiz, D.; Sanches, H.; Ismiño, R.; Rengifo, D.; García, A.; Tello, S.; Chota-Macuyama, W.; Duponchelle, F.; Renno, J.-F. 2014. Diversidad de ictioplancton en los ríos Curaray, Arabela y Napo (Amazonía peruana). *Folia Amazónica*, volumen 23 (1):67-78.
- García-Dávila, C.; Castro-Ruiz, D.; Renno, J.-F.; Chota-Macuyama, W.; Carvajal-Vallejos, F.; Sanchez, H.; Angulo, C.; Nolorbe, C.; Alvarado, J.; Estivals, G.; Núñez-Rodríguez, J.; Duponchelle, F. 2015. Using barcoding of larvae for investigating the breeding seasons of pimelodid catfishes from the Marañón, Napo and Ucayali rivers in the Peruvian Amazon. *J. Appl. Ichthyol*, 31 (Suppl. 4) (2015), 40–51.
- Hall, T. A. 1999. BIOEDIT a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Department of Microbiology North Carolina State University. *Nucl. Acids. Symp* – Ser. 41: 95–98.
- Hajibabaei M, G.A.C. Singer, P.D.N. Hebert, D.A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics.
- Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia-Dávila, C. R.; Paugy, D. and Renno, J. F. 2008. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichtyofauna. *Molecular Ecology* 16: 2115–2136.
- Leite, R. G.; Cañas, C.; Forsberg, B.; Barthem, R.; Goulding, M., 2007: Larvas dos Grandes Bagres Migradores [Larvae of the Big Migratory Catfishes]. Instituto Nacional da Pesquisas da Amaz^onia (INPA)/Asociacion para la Conservacion de la cuenca Amazonica (ACCA), Primera Edicion, Manaus, 127 pp.
- Matarese, A. C.; Spies, I. B.; Busby, M. S.; Orr, J. W., 2011: Early larvae of *Zesticelus profundorum* (family Cottidae) identified using DNA barcoding. *Ichthyol. Res.* 58, 170–174.
- Ortega, H., Vari, R., 1986. Annotated Checklist of the Freshwater Fishes of Peru. *Smithsonian Contrib. Zool.* 437: 1-25.
- Ortega, H., M. Hidalgo, E. Correa, J. Espino, L. Chocano, G. Trevejo, A.M. Cortijo y R. Quispe. 2011. Lista anotada de los Peces de Aguas Continentales del Perú. Estado Actual del conocimiento, distribución, usos y aspectos de conservación. Universidad Mayor San Marcos de Lima- Ministerio del Ambiente. 37 pp.
- Paine, M.; McDowell, J.; Graves, J., 2008: Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island. *Ichthyol. Res.* 55, 7–16.
- Pappalardo, A. M.; Cuttitta, A.; Sardella, A.; Musco, M.; Maggio, T.; Patti, B.; Mazzola, S.; Ferrito, V., 2015: DNA barcoding and COI sequence variation in Mediterranean lanternfishes larvae. *Hydrobiologia* 749, 155–167.
- Pfenninger M.; Cordellier M.; Streit B. 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). *BMC Evolutionary Biology*, 6(100): 1–14.
- Reis, R. E.; S. O. Kullander, S.O.; Ferraris, C. J. 2003. Checklist of freshwater fishes of South and Central America. *Edipucrs*, Porto Alegre.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA versión 4.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.

Recibido: 24 de Agosto del 2017

Aceptado para publicación: 02 de Octubre del 2017

