



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
TUMBES**



**FACULTAD DE INGENIERÍA
PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA**

TESIS DE PREGRADO

**Identificación molecular mediante la técnica de ADN
barcode en peces de aguas continentales de la región
Tumbes, 2016**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
PESQUERO**

PRESENTADO POR:

Est. Ronald Ivan Campaña Maza

TUMBES, PERÚ

2017



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
TUMBES**



**FACULTAD DE INGENIERÍA
PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA**

TESIS DE PREGRADO

**Identificación molecular mediante la técnica de ADN
barcode en peces de aguas continentales de la región
Tumbes, 2016**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
PESQUERO**

PRESENTADO POR:

Est. Ronald Ivan Campaña Maza

TUMBES, PERÚ

2017

RESPONSABLES

Est. RONALD IVAN CAMPAÑA MAZA

EJECUTOR

Mg. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. OSCAR A. MENDOZA NEYRA

PRESIDENTE

Mg. MARCO A. ZAPATA CRUZ

SECRETARIO

Dra. TESSY PERALTA ORTIZ

VOCAL

AGRADECIMIENTO

A DIOS, por bendecirme cada día con su amor, por cuidarme y por haberme dado la vida. Agradezco infinitamente a mis padres por que sin ellos no hubiera sido posible lograr todos los objetivos que me propuse, ya que son mi motor para seguir adelante cada día.

También agradezco al Instituto del Mar del Perú sede Tumbes que me abrió sus puertas para poder desarrollar todas las actividades correspondientes a mi proyecto. A FONDECYT ya que por medio de esta entidad se obtuvo el financiamiento para el proyecto N° 192-2015.

A mi asesor Mg. Alberto Ordinola Zapata y a mis co-asesores Dra. Zoila Raquel Siccha Ramírez y Mg. Beder E. Ramírez Segura y a los miembros del Jurado Calificador: Dr. Oscar Mendoza Neyra, Mg. Marco A. Zapata Cruz y Dra. Tessy Peralta Ortiz, por sus observaciones, recomendaciones y el incondicional apoyo que me ayudo a mejorar mi proyecto de tesis.

A la Coordinadora del Laboratorio Imarpe Tumbes, Mg. Mervin Guevara, a los taxónomos del proyecto: Dr. Ricardo Britzke, Blgo. Carlos Luque Sánchez y Blgo. Manuel Vera, al Coordinador Administrativo: Wagner Samir Fernández Saldarriaga, a la Técnica Pesquera Lilia Roxani Córdova Guerrero, al Blgo. Fidel Pacaya Flores, a Vanessa Montoya Romero, a María Serna Cruz; a todos ellos gracias por su gran apoyo.

Quiero reconocer la enseñanza brindada por los docentes de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, durante mi formación profesional: Dra. Enedia G. Vieyra Peña, Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Ing. John Sandoval Ramayoni, Mg. Braulio Morán Ávila, Dr. Cesar Arturo Mantilla Ávalos, Mg. César Poma Sánchez, Mg. Jorge Carrasco Casariego, Dr. David Saldarriaga Yacila, Dr. Adán Alvarado Bernuy, Dr. Teodoro Seminario Chirinos, Dr. Leocadio Malca Acuña y Mg. Martin Amaya Ayala, quienes gracias a sus enseñanzas y consejos me ayudaron a mi formación durante los estudios universitarios.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a DIOS; por su infinita bondad hacía mi persona, porque día a día me cuida y me protege, porque me ha regalado un lindo existir.

A mis padres Edilfredo Campaña Seminario y Emilaura Maza Cardoza, a mis hermanos quienes comparten mis logros, y por los cuales lucho día a día, porque son el motor que me impulsa a seguir adelante.

A mis abuelos Segundo Campaña Olivos y Fidel Maza Pacherez, a los que llevo en mi memoria, así como a mis abuelas Témpera Seminario Mogollón y Matilde Cardoza Farfán, con las cuales podré compartir este momento inolvidable de convertirme en un profesional.

Ronald Ivan Campaña Maza

CONTENIDO

RESPONSABLES	iii
JURADO DICTAMINADOR	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	12
III. MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1. MATERIALES	21
3.2. MÉTODOS	23
3.2.1. Colecta de ejemplares	23
3.2.2. Obtención y almacenamiento de muestras de tejidos.....	26
3.2.3. Extracción de ADN total (protocolo de extracción salina).	26
3.2.4. Amplificación del fragmento del gen COI por PCR.	26
3.2.5. Observación de los resultados mediante electroforesis	27
3.2.6. Secuenciamiento.....	28
3.2.7. Alineamiento de secuencias de los productos amplificados	28
3.2.8. Análisis de datos.....	28
IV. RESULTADOS	29
4.1. Especies ícticas identificadas mediante ADN <i>barcode</i> en los cuerpos de aguas continentales de Tumbes	29
4.2. Especies ícticas identificadas mediante ADN <i>barcode</i> por cuerpo de agua continental de la región Tumbes	30
4.3. Especies ícticas de aguas continentales identificadas mediante ADN <i>barcode</i> por estaciones de muestreo.....	31
4.4. Distancias genéticas en peces de aguas continentales de la región Tumbes.	35
V. DISCUSIÓN.....	39
VI. CONCLUSIONES.....	42
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Género y especie de peces identificados en aguas continentales de la región Tumbes (tomado de Luque, 2008).	17
Tabla 2. Género y especie de peces identificados en aguas continentales de la región Tumbes (tomado de Valenzuela, 2014).	18
Tabla 3. Estaciones de muestreo para la colecta de peces.	24
Tabla 4. Programación del termociclador para las dos parejas de <i>primers</i> utilizados en la amplificación del gen COI.	27
Tabla 5. Orden, familia y especie de peces identificados mediante ADN <i>barcode</i> en la región Tumbes.	29
Tabla 6. Especie de peces por cuerpo de agua en la región Tumbes.	31
Tabla 7. Especies colectadas según estación de muestreo en el río Tumbes.	32
Tabla 8. Especies colectadas según estación de muestreo en Quebrada El Piojo	33
Tabla 9. Especies colectadas según estación de muestreo Quebrada Seca.	33
Tabla 10. Especies colectadas según estación de muestreo en el río Zarumilla.	34
Tabla 11. Especies colectadas según estación de muestreo en la Laguna La Coja	34
Tabla 12. Especies colectadas según estación de muestreo en la Albufera Bocapán.	35
Tabla 13. Distancia genética intra-específica de las 32 especies de peces identificados mediante la técnica ADN <i>barcode</i> en aguas continentales de la región Tumbes.	38
Tabla 14. Distancia genética inter-específica por familia de las 32 especies de peces identificados mediante la técnica ADN <i>barcode</i> en aguas continentales de la región Tumbes.	52
Tabla 15. Peces encontrados en la región Tumbes-Perú por Luque 2008, Valenzuela 2014 y en la presente investigación	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estaciones de muestreo para la colecta de peces.....	24
Figura 2. Procedimiento para la captura de peces continentales en la región Tumbes.....	25
Figura 3. Árbol filogenético de los peces continentales de la región Tumbes 2016.....	36
Figura 4. Especies encontradas con mayor frecuencia en los cuerpos de agua de la región Tumbes	51
Figura 5. Peces de aguas continentales identificados mediante la técnica ADN <i>barcode</i> en la región Tumbes en 2016.....	54

Identificación molecular mediante la técnica de ADN *barcode* en peces de aguas continentales de la región Tumbes, 2016.

Est. Ronald Ivan Campaña Maza¹

Mg. Alberto Ordinola Zapata²

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo realizar la identificación mediante ADN *barcode* de los peces de aguas continentales de la región Tumbes (Perú). Para ello se recolectaron 268 ejemplares provenientes del río Tumbes, río Zarumilla, Quebrada El Piojo, Quebrada Seca, Quebrada Bocapán y Laguna La Coja, empleando diferentes artes de pesca como atarraya y chinchorro así como malla de tul para captura manual. Los peces colectados fueron identificados usando claves taxonómicas, luego se tomó muestras de 0,5 cm³ de tejido muscular que fue almacenado en el banco de tejidos del proyecto, de igual manera se conservó los especímenes en alcohol al 70 % en la colección de *vouchers* del proyecto. De cada pez, se extrajo 0,5 g de tejido muscular para realizar la amplificación por PCR de un fragmento del gen COI. Los amplicones fueron secuenciados obteniéndose 107 secuencias las que se analizaron con los softwares Geneious 5.6 y Bioedit 7.0.5. También se usó Mega 6.0 para los análisis de distancia genética y del vecino más próximo (*neighbor-joining*), modelo de sustitución de Kimura 2- parámetros (K2P), y cladograma usando 1000 réplicas de *bootstrap*. Se logró identificar 32 especies de peces mediante DNA *barcode*. Las distancias genéticas intra-específicas fueron desde 0,0 % a 0,7 %, no se pudo calcular dicha distancia para nueve especies de las que sólo se obtuvo un ejemplar, otras nueve especies presentaron distancias intra-específicas de 0,0 %. Las especies que tuvieron mayor distancia intra-específica fueron *Selene brevoortii* y *Chilobrycon deuterodon*, con 0,5 % y 0,7 %, respectivamente. Las distancias genéticas entre familias variaron entre 3,7 % a 27,2 %.

Palabras clave: ADN *barcode*, ictiofauna, identificación molecular, gen COI.

¹ Estudiante de la Escuela de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes

² Profesor Principal de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes

Molecular identification by the barcode DNA technique in inland fishes of the Tumbes region, 2016.

Est. Ronald Ivan Campaña Maza¹

Mg. Alberto Ordinola Zapata²

ABSTRACT

The present research had as objective to realize the identification by DNA barcode of the fish of continental waters of the region Tumbes (Peru). For this purpose, 268 fish were collected of the Tumbes River, Zarumilla River, Quebrada El Piojo, Quebrada Seca, Quebrada Bocapán and La Coja Lagoon, using different fishing gear such as atarraya and chinchorro as well as tulle mesh for manual capture. Collected fish were identified using taxonomic codes, then 0.5 cm³ samples of muscle tissue were collected and stored in the tissue bank of the project. They were also preserved in 70 % alcohol in the collection of vouchers draft. From this, 0.5 g of muscle tissue was extracted to perform the PCR amplification of a fragment of the COI gene. Amplicons were sequenced, obtaining 107 sequences, they were analyzed with Geneious 5.6 and Bioedit 7.0.5 softwares. Mega 6.0 was also used for neighbor-joining (NJ) analysis, Kimura substitution model 2-parameter (K2P), and cladogram using 1000 replicas of bootstrap. 32 species of fish were identified using DNA barcode. Intraspecific genetic distances were from 0.0 % to 0.7 %, it was not possible to calculate this distance for nine species from which only one specimen was obtained, another nine species presented intra-specific distances of 0.0 %. The species that had greater intra-specific distance were *Selene brevoortii* and *Chilobrycon deuterodon*, with 0.5 % and 0.7 % respectively. Genetic distances between families ranged from 3.7 % to 27.2 %.

Keywords: DNA barcode, ichthyofauna, molecular identification, COI gene.

¹ Student of the School of Fisheries Engineering of the National University of Tumbes

² Principal Professor of the School of Fisheries Engineering, National University of Tumbes

Thesis presented to obtain the professional title of Fisheries Engineer
National University of Tumbes
Engineering Faculty of Fisheries and Marine Sciences
Academic Professional School of Fisheries Engineering
Calle Los Ceibos S / N Puerto Pizarro, Tumbes, Perú
E-mail: Ronald_ivan_18m@hotmail.com
2017

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial hay una pérdida constante de especies que reduce la biodiversidad, esto se debe a la sobre-explotación, al deterioro del medio ambiente y a la introducción de especies invasoras que desplazan a las poblaciones nativas Lowe, Browne, Boudjelas & De Poorter (2004). Esta situación también se produce entre las especies ícticas, muchas de las cuales pueden ser extinguidas incluso antes de ser conocidas o identificadas por el ser humano, por tratarse de especies crípticas. Esto es algo perjudicial, pues la biodiversidad perdida no puede ser recuperada. Como un primer paso para la conservación de la biodiversidad de peces, es necesario identificarla.

Los esfuerzos para identificar peces del Perú han sido realizados por distintos investigadores, tales como Chirichigno (1974); Chirichigno & Iwamoto (1977), Chirichigno & McEachran (1979), Chirichigno & Vélez (1998), Vildoso, Vélez, Chirichigno, & Chirinos (1999), Chirichigno & Cornejo (2001) y Hooker (2009), todos ellos basados únicamente en criterios morfológicos; éstos sin embargo, tienen desventajas tales como no poder identificar diversos estadios del ciclo biológico (huevos, alevines, juveniles), por ser a menudo complejos y requerir algunas veces de especialistas en taxonomía. Actualmente la identificación de especies se puede realizar de una manera más rápida y precisa acudiendo a la información genética, que no cambia con los estadios de vida, no depende de la influencia del medio y no requiere de especialistas taxónomos para la identificación, además de ser más precisa. Por lo que en el año 2005 se propuso el uso del gen que codifica la citocromo oxidasa subunidad I (COI), como un sistema de identificación universal para animales, incluyendo a los peces (Ward, Zemplak, Innes, Last, & Hebert, 2005).

La técnica de identificación de peces mediante el gen COI se basa en obtener una muestra pequeña de tejido de aleta, músculo u otros órganos, del cual luego se extrae el ADN para ser amplificado por reacción de cadena de polimerasa (PCR) (De Oliveira, 2012), con *primers* específicos como los de Ward et al. (2005), para luego obtener las secuencias de nucleótidos que se analizan mediante programas computarizados (Siccha, 2011).

En Tumbes, la diversidad de peces es alta, como lo ha reportado Luque (2008), el cual sustenta haber encontrado 248 especies en los ambientes marino, de manglar y continental

de la región Tumbes, dentro de las cuales 36 especies son pertenecientes a peces continentales, siendo las más abundantes las de los órdenes Characiformes y Perciformes.

Un buen número de investigaciones se han centrado en determinar la diversidad de peces marinos, pero las especies de aguas continentales no han sido suficientemente estudiadas, a pesar que tienen una mayor amenaza por la contaminación de los cuerpos de agua dulce por la minería, aguas servidas, productos agrícolas, especies invasoras entre otros (Cossíos, 2010; Puño, 2015).

Los estudios sobre peces continentales de la región Tumbes son pocos, el último fue el realizado por Valenzuela (2014) quien evaluó los peces de la cuenca del río Tumbes el año 2012, reportando 32 especies de peces correspondientes a 8 órdenes, 18 familias y 26 géneros, encontrando que las especies más abundantes fueron las de los órdenes Characiformes y Perciformes.

Investigar la diversidad íctica continental de la región Tumbes es importante puesto que, a pesar de que estos peces no constituyen una pesquería comercialmente importante en la región; sin embargo, son fuente de alimento para muchas familias de los alrededores, los que los pescan para su autoconsumo, siendo una fuente importante de proteínas para ellos (Ortega et al., 2012), de igual manera, constituyen un eslabón importante en la cadena trófica acuática y contribuyen a la diversidad que ha llevado a ser al Perú considerado como un país megadiverso (Vildoso et al., 1999).

Es por ello que en esta investigación se propuso identificar la fauna íctica continental de la región Tumbes, como el primer paso para la protección de su biodiversidad teniendo como objetivo:

Determinar las especies de peces de aguas continentales de la región Tumbes en el año 2016, que pueden ser identificadas mediante la técnica de ADN *barcode*.

II. ANTECEDENTES

2.1. Biodiversidad

La biodiversidad es la variabilidad de organismos vivos de cualquier origen, incluidos los ecosistemas terrestres y los ecosistemas acuáticos marinos y continentales, hoy en día la biodiversidad enfrenta una pérdida progresiva e irrecuperable de la misma, las actividades humanas han reducido la biodiversidad mundialmente, con la pérdida de poblaciones animales y vegetales y como se sabe el ser humano necesita de la biodiversidad para poder sobrevivir por ello es necesario hacer un buen uso de los recursos que existen en el planeta (Nuñez, González & Barahona, 2003).

La biodiversidad es fundamental para el ser humano, porque de ella se obtienen bienes y servicios esenciales para su bienestar y desarrollo, por otro lado la preocupación por conservar el medio ambiente es tan antigua como el hombre mismo, por lo tanto es importante proteger y conservar la biodiversidad, ya que el ser humano vive en un ecosistema en donde todos los elementos están relacionados entre sí y al causarle daño a una especie se producen desequilibrios que afectan a otros seres vivos incluyendo al hombre (Mueses, 2011).

En el año 1992, en Rio de Janeiro se firmó un convenio para proteger la biodiversidad pero éste no se ha cumplido por todos los países, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), tiene una lista en la cual, de las 3500 especies de vertebrados estudiados el 20 % están amenazadas de extinción y de éstas, las especies más amenazadas son los peces esturiones de la familia Acipenseridae en la que el 85 % de las especies están amenazadas (Normander, 2012).

2.2. Biodiversidad en peces

Los peces son el grupo de vertebrados más diversos, pero están amenazados por la sobrexplotación, la destrucción de hábitats, la invasión de otras especies, esto causa la disminución de sus poblaciones naturales, poniendo en riesgo de extinción a muchas especies (Mancera-Rodríguez, Márquez & Hurtado-Alarcón, 2013).

En el mundo existen 33 600 especies de peces de acuerdo a fishbase (www.fishbase.org, fecha de consulta: 06/09/2017). Los peces constituyen el 50 % de los vertebrados a nivel

mundial; es un grupo muy diverso ya que está constituido por diversas especies que van desde las primitivas como Agnatha hasta las avanzadas tales como Chondrichthyes y Osteichthyes (Ward et al., 2005), esto hace que la identificación de las especies ícticas sea un aspecto clave para determinar su biodiversidad.

2.3. Identificación de especies ícticas

La identificación de peces ha evolucionado en el tiempo, ha pasado de identificar peces por sus caracteres morfológicos externos (proporciones, número de espinas y radios de las aletas, número de branquiespinas, número de escamas y color) haciendo uso de claves taxonómicas (Chirichigno, 1974); por caracteres anatómicos internos como es la morfología de los otolitos (García-Godos, 2001), y en la actualidad utilizando con mayor frecuencia marcadores moleculares, ya que éstos representan una herramienta más exacta y eficaz que la identificación por morfología externa e interna (Astorga, 2008).

2.4. Identificación de especies ícticas mediante marcadores moleculares

Según Astorga (2008), los marcadores moleculares corresponden a una amplia gama de herramientas para análisis directos e indirectos del ADN, las cuales han sido desarrolladas en las últimas décadas, tales como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), los microsatélites, la secuenciación, el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) y marcadores de secuencias expresadas (EST). La aplicación de estas herramientas ha llegado a ser muy amplia y la adecuada elección de alguno de estos métodos moleculares está dada por el tipo de problemática a resolver.

2.5. Identificación de especies ícticas mediante la técnica del ADN *barcode*

Hebert, Cywinska, Ball, & de Waard (2003), propusieron el código de barras genético (ADN *barcode*), como una técnica para la bio-identificación global de todas o casi todas las especies del planeta.

Una región de 648 pb del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) está siendo utilizada como *barcode* estándar para casi todos los grupos de animales (Ward et al., 2005; Páiz-Medina & Huete-Pérez 2008). Además ya existe una base de datos de

referencia para el código de barras de ADN conocida como *Barcode* of Life Data o BOLD (Paz et al., 2011).

2.6. Gen citocromo c oxidasa sub unidad 1 (COI)

El genoma mitocondrial es ampliamente usado para estudios moleculares debido a la alta cantidad de copias de este en cada célula (entre 1000 a 10 000 copias) comparado al genoma nuclear (una sola copia), también a su herencia por vía materna y su alta tasa de mutación, hasta 10 veces mayor que la nuclear (Fernández, 2005). Varios genes codificados por éste se usan para medir la variabilidad genética, por ejemplo el 12S rADN es altamente conservado y por ello se usa para niveles taxonómicos más altos: phyla y subphyla; el gen 16S rADN se usa para diferenciación en taxas de categoría media tales como familias, mientras que los genes que codifican proteínas, entre ellos el COI, están poco conservados y se usan en categorías taxonómicas más bajas como familias, géneros y especies. Finalmente la región de control (CR) es hipervariada; y puede ser usada para la identificación de especies y sub-especies (Arif & Khan, 2009).

La citocromo oxidasa es una enzima de mitocondrias y algunas bacterias, utilizada en la cadena de transporte de electrones que conduce a la formación de adenosin tri fosfato (ATP). La enzima está formada por 13 subunidades, 10 codificadas por el ADN nuclear y 3 por el ADN mitocondrial, estas últimas con la citocromo oxidasa I (COI), citocromo oxidasa II (COII) y citocromo oxidasa III (COIII). El gen que codifica a la citocromo oxidasa es uno de los más altamente conservados dentro del genoma mitocondrial (Ordinola-Zapata, 2012).

Debido a ello, un fragmento de 650 pb del gen mitocondrial que codifica la proteína citocromo oxidasa I (COI) ha sido aceptado por la comunidad científica como código de barras de ADN (Hebert et al., 2003).

2.7. Investigaciones relacionadas con la diversidad de peces en aguas continentales

Luque (2008), realizó un estudio de la diversidad hidrobiológica en la región Tumbes (Perú), con la finalidad de elaborar un inventario actualizado de peces. Para ello, realizó muestreos en áreas de los ríos Tumbes y Zarumilla así como de las lagunas La Coja y Lamederos. Colectó cinco ejemplares de cada especie, para la identificación taxonómica se utilizó claves taxonómicas y listas sistemáticas así como consultas a sitios web de

instituciones de investigación, como: <http://www.fishbase.org>, <http://www.cephbase.utmb.edu>, <http://www.itis.usda.gov>, <http://animaldiversity.ummz.umich.edu> y <http://www.fao.org/figis>, entre otros. Como resultado se logró identificar 36 especies de peces: 12 especies pertenecientes al orden Characiformes, una al orden Cyprinodontiformes, una al orden Gymnotiformes, dos al orden Mugiliformes, 10 al orden Perciformes, cinco al orden Pleuronectiformes y cinco al orden Siluriformes (tabla 1).

Tabla 1. Género y especie de peces identificados en aguas continentales de la región Tumbes (tomado de Luque, 2008)

Género	Especie	Género	Especie
Achirus	<i>A. klunzingeri</i> , <i>A. mazatlanus</i>	Eucinostomus	<i>E. currani</i>
Aequidens	<i>A. rivulatus</i>	Hoplias microlepis	<i>H. microlepis</i>
Arius	<i>A. seemanni</i>	Lebiasina	<i>L. bimaculata</i>
Astyanax	<i>A. festae</i>	Mugil cephalus	<i>M. cephalus</i> , <i>M.</i>
Awaous	<i>A. transandeanus</i>	Oreochromis	<i>O. niloticus</i>
Brycon	<i>B. alburnus</i> , <i>B. atrocaudatus</i> ,	Paracetopsis	<i>P. bleekeri</i>
Bryconamericus	<i>B. brevirostris</i> , <i>B. peruanus</i>	Phylipnus	<i>P. maculatus</i>
Centropomus	<i>C. nigrescens</i>	Pimelodella	<i>P. elongata</i>
Chaetostoma	<i>C. microps</i>	Poecilia	<i>P. reticulata</i>
Chilobrycon	<i>C. deuterodon</i>	Pseudocurimatai	<i>P. troschelli</i>
Cichlasoma	<i>C. festae</i>	Rhoadsia	<i>R. altipinna</i>
Citharichthys	<i>C. gilberti</i>	Saccodon	<i>S. wagneri</i>
Diapterus	<i>D. peruvianus</i>	Sternopygus	<i>S. macrurus</i>
Dormitator	<i>D. latifrons</i>	Trichomycterus	<i>Trichomycterus</i> sp
Eleotris	<i>E. picta</i>	Trinectes	<i>T. fluviatilis</i> , <i>T.</i>

Valenzuela (2014), determinó la diversidad de la ictiofauna en el río Tumbes, durante la época húmeda y seca del 2012 en el río Tumbes, para ello recolectó 982 especímenes en nueve estaciones. Las especies fueron identificadas basados en sus caracteres morfométricos y datos merísticos usando claves de identificación. Se identificaron 32 especies de peces agrupados en ocho órdenes, 18 familias y 26 géneros. 19 de estas especies fueron exclusivamente dulceacuícolas y las 13 restantes anfidromas (tabla 2).

Tabla 2. Género y especie de peces identificados en aguas continentales de la región Tumbes (tomado de Valenzuela, 2014)

Género	Especie	Género	Especie
Achirus	<i>A. klunzingeri</i>	Gobionellus	<i>Gobionellus</i> sp
Andinoacara	<i>A. rivulatus</i>	Lebiasina	<i>L. bimaculata</i>
Astvanax	<i>A. festae</i>	<i>Lycengraulis</i>	<i>L. poevi</i>
Awaous	<i>A. banana</i>	Mugil	<i>M. cephalus</i> , <i>M. Linnaeus</i> ,
Brycon	<i>B. atrocaudatus</i> , <i>B.</i>	Oreochromis	<i>O. niloticus</i>
Bryconamericus	<i>B. brevirostris</i> , <i>B.</i>	Paracetopsis	<i>P. atahualpa</i>
Centropomus	<i>C. unionensis</i>	Pimelodella	<i>P. elongata</i>
Chaetostoma	<i>C. microps</i>	Pseudocurimata	<i>P. peruana</i> , <i>P. troschelii</i>
Chilobrycon	<i>C. deuterodon</i>	Pseudophallus	<i>P. starksii</i>
Dormitator	<i>D. latifrons</i>	Rhoadsia	<i>R. altipinna</i>
Evorthodus	<i>E. minutus</i>	Saccodon	<i>S. wagneri</i>
Gambusia	<i>G. affinis</i>	Sternopygus	<i>Sternopygus</i> sp
<i>Gobiomorus</i>	<i>G. maculatus</i>	Trinectes	<i>T. fluviatilis</i> , <i>T. fonsecensis</i>

Las investigaciones antes señaladas, se realizaron identificando los peces en base a características morfométricas, no existiendo antecedentes de identificación basada en caracteres moleculares en la región Tumbes; sin embargo, en otros países si se han realizado, como se muestra a continuación:

Ward et al. (2005), evaluaron peces marinos de Australia, para ello usaron parte de su tejido muscular del cual extrajeron ADN. Se amplificó un fragmento de aproximadamente 655 pb en la región 5' del gen COI, para lo cual usaron los *primers*:

FishF1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3',

FishF2: 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3',

FishR1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3',

FishR2: 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'.

Luego del secuenciamiento y alineamiento, pudieron identificar 207 especies de peces. El promedio de las distancias genéticas obtenidas dentro de la especie, género, familia, orden y clase fueron 0,39 %, 9,93 %, 15,46 %, 22,18 % y 23,27 %, respectivamente.

Lara (2008) determinó la eficacia del *barcode* ADN en la identificación de peces de agua dulce en Cuba. Para ello colectó 96 individuos provenientes de diferentes áreas geográficas representativas de las aguas continentales de Cuba. A partir de 250 mg de músculo de cada

ejemplar extrajeron ADN, luego amplificaron un fragmento del gen COI mediante PCR, utilizando los *primers*:

Fish COIF: 5'- AAYCAYAAAGAYGGYACCCT-3';

Fish COIr: 5'-CTTCNGGRTGNCCRAA GAAYCA-3'.

Como resultado, pudieron identificar 24 especies distribuidas en 11 géneros y siete familias. El promedio de divergencia genética entre individuos coespecíficos fue de 0,96 %, por otro lado el valor entre especies congénéricas dio como resultado un 10,2 % entre estas.

Siccha (2011), realizó una investigación para determinar la diversidad genética de especies de lisa en peces de Brasil, Argentina, Uruguay, Venezuela y Grecia; colectó 85 ejemplares de *M. liza*, *M. platanus*, *M. curema*, *M. cephalus*, *M. trichodon*, *M. incilis*, *M. rubrioculus* y *M. hospes*, amplificando varios genes mitocondriales: COI, 16S rRNA, 12S rRNA, ATPasa 6, ATPasa 8 y Cytb. Los resultados mostraron que los ejemplares de las especies *Mugil liza* y *Mugil platanus* presentaron una divergencia genética de 0 %, por lo que concluyó que ambas especies podrían ser una sola especie. Por otra parte, las especies *Mugil cephalus* y *Mugil liza* obtuvieron una distancia genética inter-específica de 19,5 %, corroborándose que son especies totalmente distintas.

De Oliveira (2012), realizó una investigación con el propósito de tener una biblioteca de secuencias de referencias del ADN *barcode* para peces marinos de las regiones del sudeste y el sur de Brasil, con énfasis en el estado de Sao Paulo, siguiendo el método de Hebert et al. (2003a) y Hebert et al.(2003b) logró amplificar un fragmento de 652 pb del gen COI en 875 especímenes pertenecientes a 156 especies. Los resultados mostraron que el análisis de *neighbor-joining* permitió discriminar sin ambigüedad el 93,6 % de las especies analizadas, las cuales presentaron distancias genéticas intra-específicas bajas con un promedio de 0,40 %, que fueron casi 30 veces menores a las distancias obtenidas entre especies congénéricas; sin embargo, seis de estas especies obtuvieron divergencias intra-específicas mayores en el rango de 2,03 a 12,63 %, lo que demostró una diversidad subestimada dentro de estas especies; así también, dos pares de especies solo tuvieron una divergencia genética menor a 2 %, lo que sumado a ciertas características fenotípicas de las mismas, sustentó que a pesar de la baja distancia genética se trataban de especies separadas.

García-Dávila et al. (2014), analizaron la biodiversidad de 689 alevines de peces colectadas en el año 2012 en las cuencas de los ríos: Napo, Arabela y Curaray. La extracción de ADN la hicieron siguiendo el método del bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB). Para la amplificación por PCR de un fragmento del gen COI, usaron los *primers* propuestos por Hubert et al. (2008): Fish F1 5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3' y Fish R1 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AATCA-3', que produjo un fragmento de 576 pb. Los productos de la amplificación fueron secuenciados y analizados, con lo que se pudieron identificar 11 especies, presentes en dichos ríos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Material biológico

- 268 ejemplares de peces continentales de la región Tumbes.

Equipos y materiales

Equipos y material de campo

- 1 GPS Garmin modelo Summit HC
- 1 atarraya de 1 ¼ in de luz de malla
- 1 paño de malla de 20 milímetros y 1 m de longitud
- 1 malla de tul
- 4 baldes de 20 l
- 4 canastillas de 30 kg
- Hielo en escama

Material de laboratorio

- 7 cajas de 100 unidades de puntas de micropipeta de 10 µl
- 2 cajas de 100 unidades de puntas de micropipeta de 100 µl
- 2 cajas de 100 unidades de puntas de micropipeta de 200 µl
- 7 cajas de 100 unidades de puntas de micropipeta de 1000 µl
- 1 micropipeta de 0,1-2 µl marca Axygen modelo AP-2
- 1 micropipeta de 0,5-10 µl marca Axygen modelo AP-10
- 1 micropipeta de 20-200 µl marca Axygen modelo AP-200
- 1 micropipeta de 10-100 µl marca Axygen modelo AP-100
- 1 micropipeta de 100-1000 µl marca Axygen modelo AP-1000
- 1 millar de microtubos de 1,5 ml
- 700 microtubos de 0,2 µl
- 50 hojas de bisturí N° 22
- 6 rollos de papel absorbente
- 1 rollo de papel aluminio
- 1 paquete de algodón
- 4 matraces de 500 ml
- 2 matraces de 500 ml
- 1 probeta de 500 ml

- 1 probeta de 1000 ml

Equipos de laboratorio

- 1 cámara de flujo laminar marca Nuñire modelo UN-201-330E
- 1 balanza electrónica marca Ohaus modelo AS120
- 1 autoclave marca DBG modelo D60A35
- 1 termociclador marca Applied Biosystems modelo Veriti 96 Xell Thermal Cyclers
- 1 baño maría marca Cole Parmer modelo #SHWB20
- 1 centrífuga marca Centurion modelo K2015
- 1 horno de microondas marca Samsung modelo MS32J5133AM/PE.
- 1 cámara fotográfica marca Nikon modelo D5300
- 1 congeladora marca Bosch modelo GSD32
- 1 vortex Mixer marca Labnet modelo S0200-230V-EU
- 1 centrifuga/vortex marca Biosan modelo MSC-3000
- 1 fotodocumentador marca MS Major Science modelo UVCI-1200
- 1 cámara fotográfica marca Nikon modelo D5300
- 1 cámara electroforética horizontal marca Biometra modelo Compact XS 025-000, 025-099

Insumos (Reactivos)

- 20 g de cloruro de sodio
- 100 l de alcohol al 96 %
- 20 l de agua destilada
- 50 ml de agua ultra pura
- 3 ml de proteinasa K
- 27 ml de etanol al 70 %
- 16 ml de etanol al 100 %
- 3 ml de $MgCl_2$ a una concentración de 100 mM
- 1 ml de dNTP's a una concentración de 100 mM
- 500 μ l de taq polimerasa a una concentración de 5 U/ μ l
- 70 g de agarosa
- 60 ml de TAE 50X

- 3 ml EDTA (0,5 M y pH 8)
- 4,5 ml de tris-hidroximetil-amino metano (tris) (1 M, pH 8)
- 15 ml de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10 %
- 1 kit de extracción de ADN total de Wizard (Promega).
- 1 kit de PCR de 100 reacciones
- 1 l de etanol grado biología molecular al 100 %
- 1 ml de intercalante de ADN (GelRed) 1 %
- 50 nMol de *primer* Fish F1
- 50 nMol de *primer* Fish F2
- 50 nMol de *primer* Fish R1
- 50 nMol de *primer* Fish R2

Material de oficina

- 1 millar de papel bond tamaño A4 de 75g.
- 1 libreta de campo.
- 1 memoria USB de 8 Gb

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Colecta de ejemplares

Se colectó 268 ejemplares de peces de diferentes especies, los cuales fueron obtenidos en el río Tumbes y la quebrada de El Piojo (provincia de Tumbes); la laguna La Coja, Quebrada Seca y el río Zarumilla (provincia de Zarumilla) y la Quebrada de Bocapán (provincia de Contralmirante Villar). En la tabla 3 y figura 1, se observan las estaciones de muestreo en cada cuerpo de agua.

Tabla 3. Estaciones de muestreo para la colecta de peces

Cuerpo de agua	Estación de muestreo	Coordenadas geográficas	
		Latitud	Longitud
Río Tumbes	Rica Playa	03°48'18,12"S	80°29'55,44"O
	La Capitana	03°47'20,04"S	80°28'28,80"O
	Brunos	03°47'22,46"S	80°28'34,00"O
	Higeron	03°46'06,06"S	80°27'24,72"O
	Francos	03°41'31,14"S	80°27'03,18"O
	Cerro Blanco	03°39'10,34"S	80°26'08,29"O
	Malval	03°36'13,62"S	80°26'42,54"O
	Realengal	03°36'07,14"S	80°27'14,64"O
	San Francisco	03°36'10,62"S	80°26'57,90"O
	Desembocadura del río Tumbes	03°30'28,92"S	80°29'49,86"O
Quebrada El Piojo	Puente El Piojo	03°35'27,80"S	80°28'41,60"O
Río Zarumilla	La Palma	03°33'23,30"S	80°12'40,60"O
	Aguas Verdes	03°28'38,50"S	80°14'52,90"O
Quebrada Seca	Quebrada Seca	03°31'01,60"S	80°19'43,30"O
laguna La Coja	laguna La Coja	03°35'56,49"S	80°12'33,14"O
Quebrada de Bocapán	Bocapán 1	03°42'48,40"S	80°43'40,70"O
	Bocapán 2	03°42'45,62"S	80°43'51,96"O

Las estaciones antes señaladas se pueden apreciar en la figura 1.



Figura 1. Estaciones de muestreo para la colecta de peces.
Fuente: Google Earth (fecha de acceso 09/09/2017).

La colecta de peces se realizó utilizando distintos artes de pesca tales como atarraya y chinchorro de 1 ¼ pulgadas de luz de malla, también se empleó malla de tul para la captura manual (figura 2). Se trató de recolectar el mayor número posible de peces sin importar el tamaño. Una vez capturados fueron conservados vivos, y se agruparon por especies. Las fotografías fueron tomadas en el laboratorio, para poder obtener una mejor calidad se necesitó que los peces estén en su mayoría vivos, puesto que al morir pueden cambiar su coloración.

Las estaciones de colecta, arte de pesca utilizado, características de los peces fueron registrados en una ficha (anexo 1), esta ficha y los registros fotográficos de los ejemplares fueron ingresados en la base de datos del proyecto.



Figura 2. Procedimiento para la captura de peces continentales en la región Tumbes. (a) colecta usando chinchorro. (b) Ejemplares de pequeño tamaño de algunos peces, en este caso lenguados (c) Peces capturados que han sido agrupados por especies. (d) colecta usando atarraya.

3.2.2. Obtención y almacenamiento de muestras de tejidos y ejemplares de peces

Los especímenes fueron trasladados al Laboratorio Costero Imarpe Tumbes donde fueron identificados por el personal encargado de la taxonomía en base a caracteres morfológicos y usando claves taxonómicas hasta el nivel de especie. De cada pez se extrajo 0,5 cm³ de tejido muscular, el cual fue depositado en microtubos de 2 ml conteniendo alcohol al 96 %, los que fueron guardados en el banco de tejidos de peces del proyecto en un congelador vertical a -20 °C. Los peces fueron rotulados con el mismo código de sus respectivos tejidos y guardados en alcohol al 70 % en la colección de *vouchers* del proyecto.

3.2.3. Extracción de ADN total (protocolo de extracción salina).

Se tomó 0,5 g de tejido muscular de cada pez, y se colocó en un microtubo de 1,5 ml, se maceró y adicionó 290 µl de solución tampón, solución salina y 10 µl de proteínasa K, los microtubos se agitaron con un vórtex y se incubaron en baño maría a 56 °C por 2 h. Transcurrido ese tiempo se adicionó 2 µl de ARNasa y se incubó durante 1 h en baño maría a 37 °C, luego se adicionó 100 µl de solución 5M de NaCl en cada micro-tubo y se homogenizó con cuidado. Se centrifugó por 10 min a 10 000 rpm a 25 °C, luego se extrajo 300 µl del sobrenadante el cual se colocó en un nuevo microtubo de 1,5 ml, se adicionó 600 µl de etanol helado al 100 %. Después de esto las muestras se colocaron en el congelador por 2 horas. Al retirar las muestras del congelador se centrifugaron por 30 min a 14 000 rpm a 4 °C. Se eliminó el etanol por inversión para luego adicionar 1000 µl de etanol al 70 % helado, se centrifugaron las muestras por 10 min a 14 000 rpm a 4 °C, se descartó el etanol con mucho cuidado y las muestras se colocaron a secar invirtiendo el microtubo en papel toalla, una vez secas las muestras se adicionó 150 µl de *elution buffer*. El ADN obtenido fue guardado en el banco de ADN extraído del proyecto.

3.2.4. Amplificación del fragmento del gen COI por PCR.

Para la amplificación del fragmento del gen COI, se usaron los *primers* descritos por Ward et al. (2005):

Primer Fish F1: 5'- TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC -3'

Primer Fish F2: 5'- TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC -3'

Primer Fish R1: 5'- TAGACTTCT GGGTGGCCAAAGAATCA -3'

Primer Fish R2: 5'- ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA -3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µl, para ello en cada tubo de 200 µl, se colocaron los siguientes componentes:

- 17,6 µl de agua ultra pura
- 2,5 µl de solución buffer 10X
- 0,5 µl de MgCl₂ a una concentración de 100 mM
- 0,2 µl de Taq polimerasa a una concentración de 5 U/µl (marca GeneON)
- 0,6 µl del mix de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPS)
- 2,0 µl del ADN extraído
- 0,8 µl de cada *primer* (usando sólo una de las dos parejas: F1/R1 o F2/R2).

El programa de PCR consistió en dos protocolos (tabla 4):

Tabla 4. Programación del termociclador para las dos parejas de *primers* utilizados en la amplificación del gen COI

Fase	Temperatura (°C)		Tiempo (min)	Número de ciclos
	<i>Primers</i> Fish F1 y Fish R1	<i>Primers</i> Fish F2 y Fish R2		
Pre desnaturalización	94	94	5	1
Amplificación				25
Desnaturalización	94	94	1	
Hibridación	50	52	1	
Polimerización	72	72	1	
Polimerización final	72	72	7	
Conservación	12	12	∞	

3.2.5. Observación de los resultados mediante electroforesis.

Se preparó un gel de agarosa al 1 %, para ello se pesó 0,5 g de agarosa y se disolvió en 50 ml de solución tris - ácido acético - EDTA (TAE) 1X.

Los amplicones (producto de la amplificación de ADN en la PCR) fueron migrados en el gel de agarosa. Se tomó 2 µl de cada amplicón y se mezcló con

1 µl del reactivo intercalante Gelred (marca Biotium). Esta mezcla fue depositada en cada pocillo del gel. Adicionalmente se colocó en uno de los pocillos 2 µl de marcador de peso molecular de 50 a 1500 pb (marca GeneON) con 1 µl del intercalante Gelred.

Los geles fueron colocados en la cámara de electroforesis y se dejó migrar a 60 V durante 60 min.

Los geles de la migración fueron visualizados y fotografiados utilizando un fotodocumentador.

3.2.6. Secuenciamiento

Los amplicones fueron empacados con parafina con el propósito de que estos no se contaminen, para después de ello ser enviados a secuenciar en duplicado tanto la cadena *forward* como la *reverse*, a la empresa Macrogen (USA).

3.2.7. Alineamiento de secuencias de los productos amplificados

Los electroferogramas fueron ensamblados usando el programa Geneious v.5.6 (Biomatters Ltd), las secuencias consenso resultado fueron verificadas para ver la presencia de inserciones, deleciones o codones de parada (*stop codons*). Las secuencias consenso fueron alineadas usando el programa Geneious v.5.6 y finalmente analizados usando el software editor de alineamiento de secuencias Bioedit 7.0.5 (Hall, 1999).

3.2.8. Análisis de datos

El cálculo de la composición media de nucleótidos de las secuencias, los análisis de distancia de las especies y el de vecino más próximo (*neighbor-joining*) y la determinación de las distancias genéticas intra e interespecíficas fueron calculadas usando el método evolutivo de *neighbor-joining* (NJ) y el modelo de sustitución de Kimura 2- parámetros (K2P) (Kimura, 1980), el dendrograma fue obtenido en Mega v.6.0 usando 1000 réplicas de *bootstrap* (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013). La identificación de caracteres diagnóstico fueron realizados usando las herramientas disponibles en BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007), así como la identificación del número de índice de *barcode* (BIN).

IV. RESULTADOS

4.1. Especies ícticas identificadas mediante ADN *barcode* en los cuerpos de aguas continentales de Tumbes

En los cuerpos de agua continentales de Tumbes se encontraron 32 especies correspondientes a seis órdenes y 17 familias (tabla 5).

Tabla 5. Orden, familia y especie de peces identificados mediante ADN *barcode* en la región Tumbes.

Orden	Familia	Especie
Pleuronectiformes	Achiridae	<i>Trinectes fluviatilis</i>
	Paralichthyidae	<i>Citharichthys gilberti</i>
Characiformes	Bryconidae	<i>Chilobrycon deuterodon</i>
		<i>Brycon alburnus</i>
		<i>Brycon sp</i>
		<i>Brycon dentex</i>
	Characidae	<i>Astyanax festae</i>
		<i>Rhoadsia altipinna</i>
	Lebiasinidae	<i>Lebiasina bimaculata</i>
	Curimatidae	<i>Pseudocurimata troschelii</i>
	Parodontidae	<i>Saccodon wagneri</i>
Perciformes	Carangidae	<i>Selene brevoortii</i>
		<i>Oligoplites saurus</i>
	Gobiidae	<i>Awaous transandeanus</i>
		<i>Ctenogobius sagittula</i>
	Gerreidae	<i>Gerres cinereus</i>
		<i>Diapterus peruvianus</i>
	Eleotridae	<i>Dormitator latifrons</i>
		<i>Eleotris picta</i>
		<i>Gobiomorus maculatus</i>
	Centropomidae	<i>Centropomus unionensis</i>
		<i>Centropomus robalito</i>
	Cichlidae	<i>Andinoacara rivulatus</i>
		<i>Oreochromis mossambicus</i>
<i>Oreochromis sp.</i>		
<i>Oreochromis aureus</i>		
		<i>Oreochromis aff. mossambicus</i>
Mugiliformes	Mugilidae	<i>Mugil curema</i>
		<i>Mugil sp</i>
Siluriformes	Ariidae	<i>Arius seemanni</i>
	Heptapteridae	<i>Pimelodella elongata</i>
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Poecilia sp</i>

En la tabla 5, se observa que el mayor número de especies corresponden a los órdenes Perciformes (16 especies) y Characiformes (nueve especies), los órdenes con menor número de especies fueron Mugiliformes (dos especies) y Cyprinodontiformes (una especie).

4.2. Especies ícticas identificadas mediante ADN *barcode* por cuerpo de agua continental de la región Tumbes

En la tabla 6 se aprecia las especies identificadas según cuerpo de agua muestreado. Se observa que el río Tumbes es el que tiene mayor número de especies identificadas con 23 especies; seguido del río Zarumilla con 14 especies. Los cuerpos de agua con menor número de especies fueron las quebradas Bocapán con ocho, El Piojo con siete, Quebrada Seca con seis y La Coja con sólo cuatro especies.

De igual manera se observa que las especies que se presentaron en mayor número de cuerpos de agua fueron *Chilobrycon deuterodon*, *Astyanax festae* y *Oreochromis sp.*, presentes en cinco, seguidas por las especies: *Pimelodella elongata* que se halló en cuatro cuerpos de agua (figura 4 del anexo 2), asimismo también las especies *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis aff. mossambicus* y *Poecilia sp.* que fueron halladas en tres cuerpos de agua.

Tabla 6. Especie de peces por cuerpo de agua en la región Tumbes.

Especie	Cuerpo de agua					
	Río Tumbes	Quebrada El Piojo	Río Zarumilla	Quebrada Seca	Quebrada de Bocapán	Laguna la Coja
<i>Andinoacara rivulatus</i>	x		x			
<i>Arius seemanni</i>					x	
<i>Astyanax festae</i>	x	x	x	x		x
<i>Awaous transandeanus</i>	x		x			
<i>Brycon alburnus</i>	x					
<i>Brycon dentex</i>	x					
<i>Brycon sp</i>	x					
<i>Centropomus unionensis</i>	x					
<i>Centropomus robalito</i>					x	
<i>Chilobrycon deuterodon</i>	x	x	x	x		x
<i>Citharichthys gilberti</i>	x					
<i>Ctenogobius sagittula</i>	x				x	
<i>Diapterus peruvianus</i>					x	
<i>Dormitator latifrons</i>	x					
<i>Eleotris picta</i>	x				x	
<i>Gerres cinereus</i>	x					
<i>Gobiomorus maculatus</i>	x		x			
<i>Lebiasina bimaculata</i>			x			
<i>Mugil curema</i>	x				x	
<i>Mugil sp</i>	x					
<i>Oligoplites saurus</i>					x	
<i>Oreochromis mossambicus</i>	x	x		x		
<i>Oreochromis sp.</i>	x	x	x	x		x
<i>Oreochromis aureus</i>	x					
<i>Oreochromis aff.</i>		x	x	x		
<i>Pimelodella elongata</i>	x	x	x			x
<i>Poecilia sp.</i>		x	x	x		
<i>Pseudocurimata troschelii</i>	x		x			
<i>Rhoadsia altipinna</i>	x		x			
<i>Saccodon wagneri</i>			x			
<i>Selene brevoortii</i>					x	
<i>Trinectes fluviatilis</i>	x		x			
Total de especies	23	7	14	6	8	4

4.3. Especies ícticas de aguas continentales identificadas mediante ADN *barcode* por estaciones de muestreo

En las tablas 7,8, 9, 10, 11 y 12 se observan las especies identificadas por cada cuerpo de agua muestreado en la región Tumbes, las cuales se muestran a continuación:

Tabla 7. Especies colectadas según estación de muestreo en el río Tumbes.

Especie	Estación de muestreo									
	Brunos	Desembocadura del río Tumbes	Realengal	Cerro Blanco	Franco	Higuerón	Malval	La Capitana	Rica Playa	San Francisco
<i>Andinoacara rivulatus</i>			x							
<i>Astyanax festae</i>					x	x				
<i>Awaous transandeanus</i>					x					
<i>Brycon alburnus</i>					x	x		x	x	
<i>Brycon atrocaudatus</i>	x									
<i>Brycon dentex</i>			x				x		x	x
<i>Centropomus unionensis</i>		x								
<i>Chilobrycon deuterodon</i>										x
<i>Citharichthys gilberti</i>			x							
<i>Ctenogobius sagittula</i>		x								
<i>Dormitator latifrons</i>		x					x			
<i>Eleotris picta</i>		x							x	x
<i>Gerres cinereus</i>		x								
<i>Gobiomorus maculatus</i>		x		x	x					
<i>Mugil curema</i>		x								
<i>Mugil sp.</i>		x								x
<i>Oreochromis aureus</i>								x		
<i>Oreochromis mossambicus</i>								x		
<i>Oreochromis sp.</i>								x		x
<i>Pimelodella elongata</i>			x							
<i>Pseudocurimata troscheli</i>										x
<i>Rhoadsia altipinna</i>									x	
<i>Trinectes fluviatilis</i>			x							x
Total de especies	1	8	5	1	4	2	2	4	4	7

En la tabla 7 se puede apreciar que entre las estaciones de muestreo en el río Tumbes, las que más especies registraron fueron la desembocadura del río y San Francisco con ocho y siete especies, siendo las estaciones con menos especies Brunos y Cerro Blanco con una especie.

Tabla 8. Especies colectadas según estación de muestreo en Quebrada El Piojo.

Especie	Estación de muestreo
	Puente El Piojo
<i>Astyanax festae</i>	x
<i>Chilobrycon deuterodon</i>	x
<i>Oreochromis aff. mossambicus</i>	x
<i>Oreochromis mossambicus</i>	x
<i>Oreochromis</i> sp.	x
<i>Pimelodella elongata</i>	x
<i>Poecilia</i> sp.	x
Total de especies	7

En la tabla 8 se observa que en la Quebrada el Piojo sólo existió una estación de muestreo ubicada en el Puente del mismo nombre, en esta estación se registraron siete especies de peces.

Tabla 9. Especies colectadas según estación de muestreo Quebrada Seca.

Especie	Estación de muestreo
	Quebrada Seca
<i>Astyanax festae</i>	x
<i>Chilobrycon deuterodon</i>	x
<i>Oreochromis mossambicus</i>	x
<i>Oreochromis aff. mossambicus</i>	x
<i>Oreochromis</i> sp.	x
<i>Poecilia</i> sp.	x
Total de especies	6

En la tabla 9 se observa que en Quebrada Seca sólo existió una estación de muestreo con el mismo nombre, en esta estación se registraron seis especies de peces.

Tabla 10. Especies colectadas según estación de muestreo en el río Zarumilla.

Especie	Estación de muestreo	
	La Palma	Aguas Verdes
<i>Andinoacara rivulatus</i>	x	
<i>Astyanax festae</i>	x	
<i>Awaous transandeanus</i>	x	
<i>Chilobrycon deuterodon</i>	x	
<i>Gobiomorus maculatus</i>	x	
<i>Lebiasina bimaculata</i>	x	
<i>Oreochromis aff. mossambicus</i>	x	
<i>Oreochromis sp.</i>	x	
<i>Pimelodella elongata</i>	x	
<i>Poecilia sp.</i>	x	
<i>Pseudocurimata troschelii</i>	x	
<i>Rhoadsia altipinna</i>		x
<i>Saccodon wagneri</i>	x	
<i>Trinectes fluviatilis</i>	x	
Total de especies	13	1

En la tabla número 10 se aprecia que casi la totalidad de especies recolectadas en el río Zarumilla, se hallaron en la estación de La Palma mientras que en la estación de Aguas Verdes sólo se halló una especie.

Tabla 11. Especies colectadas según estación de muestreo en la Laguna La Coja.

Especie	Estaciones de muestreo
	Laguna La Coja
<i>Astyanax festae</i>	x
<i>Chilobrycon deuterodon</i>	x
<i>Oreochromis sp.</i>	x
<i>Pimelodella elongata</i>	x
Total	4

En la tabla número 11 se observa que las cuatro especies de peces recolectadas en la Laguna la Coja, se recogieron de la única estación de muestreo que tiene el mismo nombre.

Tabla 12. Especies colectadas según estación de muestreo en la Albufera Bocapán.

Especie	Estación de muestreo	
	Bocapán 1	Bocapán 2
<i>Arius seemanni</i>	x	
<i>Centropomus robalito</i>	x	
<i>Ctenogobius sagittula</i>	x	x
<i>Diapterus peruvianus</i>	x	x
<i>Eleotris picta</i>		x
<i>Mugil curema</i>	x	
<i>Oligoplites saurus</i>	x	
<i>Selene brevoortii</i>	x	x
Total de especies	7	4

En la tabla número 12 se puede apreciar un total de siete especies de peces colectadas en la Albufera Bocapán, éstas se recogieron en la estación Bocapán 1, mientras que sólo 4 de las mismas se hallaron en la estación Bocapán 2.

4.4. Distancias genéticas en peces de aguas continentales de la región Tumbes.

En la figura 3, se aprecia el árbol filogenético de los ejemplares correspondientes a las 32 especies identificadas en los cuerpos de agua continentales de la región Tumbes.

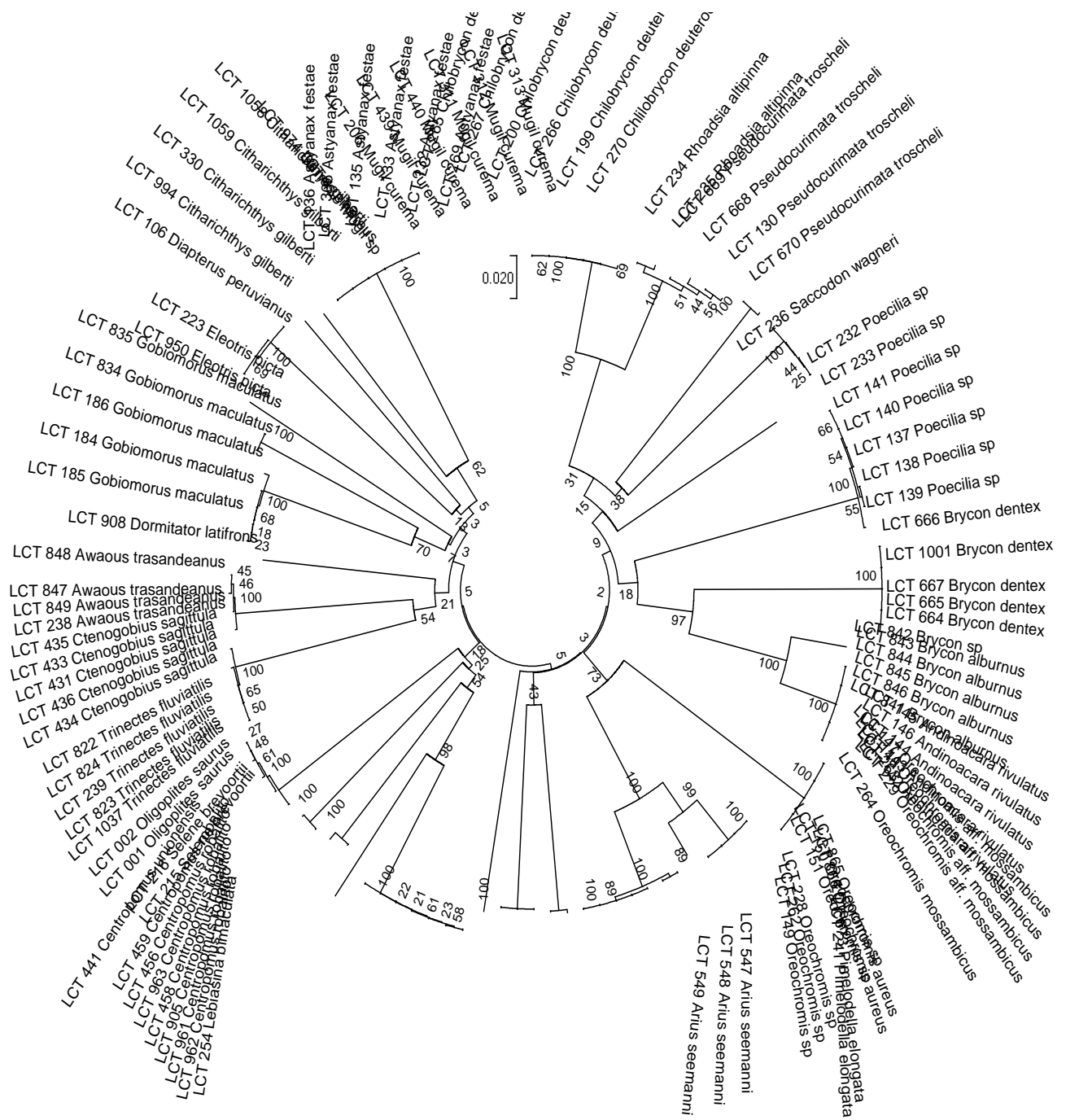


Figura 3. Árbol filogenético de los peces continentales de la región Tumbes. 2016.

En la figura 3 se aprecia que los ejemplares correspondientes a nueve especies tuvieron sus secuencias de ADN completamente similares, con una distancia genética de 0,000, entre ellas: *Andinoacara rivulatus*, *Arius seemanni*, *Brycon dentex*, *Brycon alburnus*, *Centropomus robalito*, *Eleotris picta*, *Mugil curema*, *Oreochromis aureus*, *Oreochromis aff. mossambicus*, también hubieron nueve

especies que solo contaron con un ejemplar, por lo tanto para ellas no se pudo calcular la distancia genética; en los ejemplares de las 14 especies restantes, las secuencias no fueron completamente similares por lo que su distancia genética no fue cero, se aprecia que en los ejemplares de la especie *Chilobrycon deuterodon*, casi todos sus ejemplares muestran secuencias distintas con distancias mayores.

En la tabla 13, se muestra las distancias genéticas intra-específicas de las 32 especies. Se observa que en nueve especies no se pudo calcular la distancia por contar con un solo ejemplar, otras nueve especies mostraron una distancia genética de cero, mientras que las catorce restantes mostraron distancias de 0,1 % a 0,7 %, de estas últimas *Selene brevoortii* y *Chilobrycon deuterodon*, muestran las mayores distancias con 0,5 % y 0,7 % respectivamente.

Las distancias genéticas inter-específicas por familia de los peces se muestran en la tabla 14 del anexo 3, allí se observa que las distancias genéticas entre las 17 familias va desde 3,7 % a 27,2 %, siendo las familias que presentaron menores distancias genéticas Gerreidae y Eleotridae, que mostraron una distancia genética de 3,7 % entre ellas, mientras que las familias que tuvieron mayores distancias genéticas fueron Curimatidae con Achiridae, así como Poeciliidae con Curimatidae con una distancia genética de 27,2 % para ambas parejas de familias.

Tabla 13. Distancia genética intra-específica de las 32 especies de peces identificados mediante la técnica ADN *barcode* en aguas continentales de la región Tumbes.

Especie	Distancia genética	Error estándar	Especie	Distancia genética	Error estándar
<i>Brycon sp</i>	n/c*	n/c	<i>Arius seemanni</i>	0,000	0,000
<i>Centropomus unionensis</i>	n/c	n/c	<i>Brycon dentex</i>	0,000	0,000
<i>Dormitator latifrons</i>	n/c	n/c	<i>Citharichthys gilberti</i>	0,001	0,001
<i>Lebiasina bimaculata</i>	n/c	n/c	<i>Pseudocurimata troschellii</i>	0,001	0,001
<i>Gerres cinereus</i>	n/c	n/c	<i>Astyanax festae</i>	0,001	0,001
<i>Diapterus peruvianus</i>	n/c	n/c	<i>Ctenogobius sagittula</i>	0,001	0,001
<i>Mugil sp</i>	n/c	n/c	<i>Gobiomorus maculatus</i>	0,002	0,001
<i>Saccodon wagneri</i>	n/c	n/c	<i>Pimelodella elongata</i>	0,002	0,002
<i>Oreochromis mossambicus</i>	n/c	n/c	<i>Oligoplites saurus</i>	0,002	0,002
<i>Centropomus robalito</i>	0,000	0,000	<i>Oreochromis sp.</i>	0,002	0,001
<i>Brycon alburnus</i>	0,000	0,000	<i>Poecilia sp.</i>	0,002	0,001
<i>Eleotris picta</i>	0,000	0,000	<i>Rhoadsia altipinna</i>	0,002	0,002
<i>Andinoacara rivulatus</i>	0,000	0,000	<i>Trinectes fluviatilis</i>	0,002	0,001
<i>Mugil curema</i>	0,000	0,000	<i>Awaous transandeanus</i>	0,003	0,002
<i>Oreochromis aureus</i>	0,000	0,000	<i>Selene brevoortii</i>	0,005	0,003
<i>Oreochromis aff. Mossambicus</i>	0,000	0,000	<i>Chilobrycon deuterodon</i>	0,007	0,002

* n/c = no es posible calcular

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación usando la técnica de ADN *barcode* se identificó taxonómica y genéticamente 32 especies de peces continentales en la región Tumbes, la cual es una cantidad ligeramente inferior a la reportada por Luque (2008), quien usando claves taxonómicas encontró 36 especies de peces continentales en la misma región. Por otra parte, Valenzuela (2014) reportó 34 especies de peces, pero sólo en el río Tumbes.

Se precisa que en el artículo de Luque (2008), no se ha indicado el número de especies por cuerpo de agua continental en la región y que estas corresponden a un solo año, el 2008; sin embargo, el autor cuenta con información sobre sus capturas en el río Tumbes y Zarumilla en los años 2006 a 2008, las que fueron proporcionadas por el mismo.

Doce especies identificadas en esta investigación, no fueron reportadas por Luque (2008) y Valenzuela (2014), por otra parte, es esta investigación no se encontró 30 especies de las reportadas por Luque (2008) y Valenzuela (2014), así como en los muestreos realizados por Luque en los años 2006 a 2008 (Carlos Luque, en comunicación personal, 28/08/2017).

Es posible que las especies no encontradas en esta investigación comparadas con las de los otros autores, se deba a que, en el caso de Luque (2008), se realizó muestreos por más tiempo (tres años), y en el caso de Valenzuela (2014) porque las mismas estaciones de muestreo fueron evaluadas en dos momentos del año, lo que no ocurrió en esta investigación, con lo que es posible que algunas especies que se presentan en determinadas zonas en diferentes épocas del año, no pudieron ser encontradas en esta investigación.

Por otra parte, se puede argumentar que en caso de las especies que han sido identificadas en esta investigación pero no por Luque (2008) y Valenzuela (2014), esto se deba a: que al realizar dichos autores, solo identificación morfológica, es posible que hayan clasificado erróneamente algunas especies como indica García-Dávila et al. (2014), con lo cual disminuyen el número de especies identificadas. En la presente investigación la identificación de los peces se hizo morfológica y genéticamente, por lo que hay menos probabilidad de una identificación errónea.

Otra razón podría ser que las poblaciones de algunas de ellas se hayan reducido, tal vez por la contaminación que como indica Puño (2015), al existir gran cantidad de contaminantes en los ríos de la región Tumbes, esto puede reducir la diversidad biológica en dichos cuerpos de agua; otra posible razón para esta diferencia entre el número de especies identificadas en cada investigación puede ser por la introducción de especies invasoras como lo indica Cossíos (2010), de que especies de peces introducidas en ambientes acuáticos peruanos, podrían estar desplazando a las especies autóctonas, es así que dentro de las especies que se han identificado se hallan las tilapias (*Oreochromis mossambicus*, *O. aureus* y *Oreochromis* sp.), que se reportan por primera vez en esta investigación. Las especies de tilapias se han considerado entre las 100 especies invasoras más perjudiciales del mundo (Lowe et al., 2004).

Respecto a las especies de peces identificadas en el principal cuerpo de agua continental de la región que es el río Tumbes, en esta investigación se encontró 23, siendo inferior a las que encontrara Luque entre los años 2006 a 2008 quien reporta que encontró 34 especies (Luque en comunicación personal, 28/08/2017); así como al número de especies encontrada por Valenzuela (2014) en el río Tumbes, quien reportó 32 especies. Las razones para tales diferencias, se han discutido en los párrafos anteriores.

Por otro lado, en lo que respecta al río Zarumilla, en esta investigación se logró encontrar 14 especies, cantidad que es superada ampliamente por la investigación de Luque 2006 a 2008 (en comunicación personal, 28/08/2017), quien encontró 27. En el caso de Valenzuela (2014), no hay información al respecto pues sólo estudio las especies de peces en el río Tumbes.

Respecto a las distancias intra-específicas de las 32 especies de peces identificadas genéticamente, se puede mencionar que en nueve especies, no se pudo calcular la distancia por contar con un solo ejemplar, en otras nueve especies la distancia fue cero, mientras que las catorce restantes mostraron distancias de 0,1 % a 0,7 %, de estas últimas *Selene brevoortii* y *Chilobrycon deuterodon* muestran las mayores distancias con 0,5 % y 0,7 % respectivamente. En la investigación de De Oliveira (2012), las distancias intra-específicas fueron de 0,4 %, en la mayoría de las especies pero en seis de ellas hubo distancias intra-específicas entre 2,03 a 12,63 %, por otro lado en la investigación de Siccha (2011) las distancias intra-específicas fueron de 0,0 %, mientras que Lara (2008), encontró distancia

genética intra-específica de 0,96 %. Los datos de distancias genética intra-específicas en esta investigación son similares a las reportadas por los dos autores señalados.

Las distancias genéticas inter-específicas se calcularon entre familias, de las 32 especies identificadas correspondientes a 17 familias, las distancias genéticas fueron desde 3,7 % a 27,2 %, la familias con menores distancias genéticas fueron Gerreidae con Eleotridae, las cuales tuvieron una distancia genética de 3,7 %, y las familias con mayores distancias genéticas fueron Curimatidae con Achiridae con 27,2 %; la familia Poeciliidae con la familia Curimatidae de igual manera mostraron distancia genética de 27,2 %. Al respecto, Siccha (2011), encontró distancias genéticas inter-específica de 19,5 % entre especímenes del mismo género, Ward et al. (2005), encontró distancias genéticas obtenidas dentro de la especie, género, familia, orden y clase que fueron 0,39 %, 9,93 %, 15,46 %, 22,18 % y 23,27 %, respectivamente. En la investigación realizada por Lara (2008), encontró que las distancias genética inter-específicas entre especies congénicas fue de 10,2 %.

Por lo tanto se concluye que las distancias genéticas intra e inter-específicas obtenidas en esta investigación son similares a las encontradas en investigaciones similares como las reportadas.

Debido a que en las sucesivas investigaciones realizadas por diferentes autores y en esta investigación, se siguen reportando especies que no han sido previamente encontradas, es posible que la diversidad de peces en las aguas continentales de Tumbes se halle subestimada.

Por otra parte es preocupante que en casi todos los cuerpos de aguas continentales de la región Tumbes, a excepción de la quebrada de Bocapán se halla encontrado ejemplares del género *Oreochromis* que es una de las especies invasoras más perjudiciales del mundo (Lowe et al., 2004).

VI. CONCLUSIONES

1. Mediante la técnica de ADN *barcode*, se identificó 32 especies de peces en las aguas continentales de la región Tumbes, las que correspondieron a 6 órdenes y 18 familias.
2. Entre los cuerpos de aguas evaluados, en el que se tuvo mayor número de especies fue el río Tumbes con 23 especies, seguido del río Zarumilla con 14, quebrada Bocapán con ocho, quebrada El Piojo con siete, Quebrada Seca con seis y laguna La Coja con cuatro.
3. La familia Perciforme fue la que estuvo mejor representada en los cuerpos de agua continentales de la región Tumbes, al incluir 16 de las 32 especies encontradas.
4. Los ejemplares encontrados tuvieron distancias genéticas intraespecíficas de 0,0 a 0,7 %, las cuales son distancias genéticas que convencionalmente se encuentran en peces en cuerpos de aguas continentales.
5. Las distancias genéticas inter-específicas por familia de los ejemplares encontrados, van desde 3,7 % a 27,2 %.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios sobre la biodiversidad de peces de la región Tumbes, usando metagenómica para poder identificar mayor cantidad de especies, pues esta técnica permitirá identificar larvas, huevos, gametos y hasta fragmentos de tejidos de los peces.
2. Realizar estudios poblacionales de las especies de peces continentales en la región Tumbes, puesto que se carece de datos acerca del número de individuos, es decir la abundancia de ejemplares, de cada especie.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arif, I. A. & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9–17. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/255987918_DNA_marker_technology_for_wildlife_conservation
- Astorga, M. P. (2008). Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En A. Lovatelli, A. Farías & I. Uriarte (Eds.). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. (pp. 277 – 287). Puerto Montt, Chile: Taller Técnico Regional de la FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i0444s.pdf#page=293>.
- Chirichigno, N. (1974). *Clave para identificar los peces marinos del Perú*. Callao, Perú: Instituto del Mar del Perú. Recuperado de <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/bitstream/handle/123456789/272/INF%2044.pdf?sequence=1>
- Chirichigno N., & McEachran, J. (1979). *Urolophus tumbesensis*, a new stingray from the coast of Peru (Batoidea: Urolophidae). *Copeia* 709-713
- Chirichigno N. & Vélez, J. (1998). *Clave para identificar los peces marinos del Perú*. Callao, Perú: Instituto del Mar del Perú
- Chirichigno N. & Cornejo, R. (2001). *Catálogo comentado de los peces marinos del Perú*. Callao, Perú: Instituto del Mar del Perú.
- Chirichigno N. & Iwamoto, T. (1977). *Coryphaenoides delsolari* a new species of macrourid fish from the Pacific coast of South America. *Proc. Biol. Soc. Wash*, 519-528.

- Cossios, E. D. (2010). Vertebrados naturalizados en el Perú: historia y estado del conocimiento. *Rev. peru. biol.*,17(2), 179 - 189. Recuperado de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- De Oliveira, A. (2012). *Identificação molecular de peixes marinhos das regiões Sudeste e Sul do Brasil com ênfase no estado de São Paulo*. (Dissertação pra obtenção do título de Mestre), Universidade Estadual Paulista. Brasil.
- Fernández, E. (2005). *Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea*. (Tesis de Doctor en Biología), Universitat de Barcelona, Barcelona, España. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2445/35896>
- García-Dávila, C., Castro-Ruiz, D., Sánchez-Ribeiro, H. R., Ismiño-Orbe, D., Rengifo-Trigoso, A., García-Vasquez, S., Tello-Martin, W., Chota-Macuyama, F., Duponchelli, J. & François-Renno, A. (2014). Diversidad de ictioplancton en los ríos Curaray, Arabela y Napo (Amazonia Peruana). *Folia Amazónica*, 23 (1), 67 – 78. Recuperado de <http://iiap.org.pe/Upload/Publicacion/PUBL1398.pdf>
- García-Godos, I. (2001). Patrones morfológicos del otolito sagitta de algunos peces óseos del mar peruano. *Boletín de Imarpe*, 20(1-2), 1-79. Recuperado de <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/handle/123456789/1061>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp.* Ser, 41, 95–98.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. & deWaard, J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society*, 270, 313–321. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1691236/pdf/12614582.pdf>.

- Hooker, M. Y. (2009). Nuevos registros de peces costeros tropicales para el Perú. *Rev. peru. biol.*, 16(1): 33 - 41. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195014940003>.
- Kimura, D. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16 (2), 111-120.
- Lara, A. (2008). *Código de barras de ADN de las especies cubanas de peces dulceacuícolas*. (Tesis de maestro en Biología Marina y Acuicultura). Universidad de La Habana, La Habana, Cuba. Recuperado de <http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/5514/Tesis%20maestr%C3%ADa%20Lara%2c%20Ariagna.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Lowe, S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2004). *100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database*. Auckland, Nueva Zelanda. <https://portals.iucn.org/library/node/9804>
- Luque, C. (2008). *Estudio de la diversidad hidrobiológica en Tumbes*. Tumbes, Perú: Instituto del Mar del Perú. Recuperado de http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_10_informe_biodiversidad_2007,_revjll.pdf
- Mancera-Rodríguez, N., Marquez, E. & Hurtado-Alarcón, J. (2013). Uso de citogenética y técnicas moleculares en estudios de diversidad genética en peces colombianos. En López, A. (Ed.). *Biología Molecular aplicada a la producción animal y la conservación de especies silvestres*. (pp. 237–312). Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Edna_Marquez/publication/255704564_Uso_de_Citogenetica_y_Tcnicas_Moleculares_en_Estudios_de

[_Diversidad_Gentica_en_Peces_Colombianos/links/0deec525a98a42a9a6000000.pdf](#)

Mueses, V. M. (2011). *Conservación de la biodiversidad o desarrollo social: una deliberación bioética*. (Tesis de maestría en bioética). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/bioetica/tesis07.pdf>

Normander, B. (2012). *Biodiversidad: combatir la sexta extinción masiva. En la situación del mundo 2012: hacia una prosperidad sostenible*. Madrid, España: Icarito editorial. Recuperado de https://www.fuhem.es/media/cdv/file/biblioteca/Situaci%C3%B3n%20del%20Mundo/2012/Biodivesidad_combatir_la_sexta_extincion_masiva_B._Normander.pdf

Núñez, I., González, E. & Barahona, A. (2003). La biodiversidad: historia de un concepto. *Interciencia*, 28(7), 387-393. Recuperado de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201602/20142_201602/Concept_de_biodiversidad.pdf

Ordinola-Zapata, A. (2012). *Diversidad y estructura genética poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en la región Tumbes, 2012*. (Tesis de Maestro en Acuicultura y Gestión Ambiental). Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú.

Ortega, H., Hidalgo, M., Trevejo, G., Correa, E., Cortijo, A. M., Meza, V. & Espino, J. (2012). *Lista anotada de los peces de aguas continentales del Perú*. Lima, Perú: Ministerio del Ambiente – UNMSM. Recuperado de http://museohn.unmsm.edu.pe/body/content/departamentos/ictiologia/Ortega_et_al.2012Lista_Peces_Aguas_Content.Peru.pdf

Páiz-Medina, L. & Huete-Pérez, J. (2008). *DNA Barcode, una alternativa para identificar especies del Complejo Midas Cichlidae en Nicaragua*.

Managua, Nicaragua: Universidad Centroamericana. Recuperado de <http://repositorio.uca.edu.ni/315/1/Encuentro81articulo6.pdf>

Puño, N. (2015). *Plan del manejo ambiental del recurso hídrico de la cuenca del río Puyango Tumbes*. Tumbes, Perú: Universidad Nacional de Tumbes.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. (2007). bold: The Barcode of Life Data System. *Mol Ecol Notes*, 7(3), 355 – 364. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1890991/>

Siccha, Z. R. (2011). *Filogeografía das espécies de tainha, Mugil liza e M. platanus (Teleostei: Mugiliformes)*. (dissertação pra obtenção do título de Mestre). Universidade Estadual Paulista, Sao Paulo, Brazil.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Genética Evolutiva Análisis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30 (12), 2725-2729. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840312/pdf/mst197.pdf>

Valenzuela, S. (2014). Ictiofauna y estado de conservación de la cuenca del río Tumbes (Tumbes). (Tesis de Biólogo). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/3887/Valenzuela_rs.pdf?sequence=1

Vildoso, A., Vélez, J., Chirichigno, N. & Chirinos, A. (1999). Diversidad de peces marinos del Perú. *Bol. Inst. Mar Perú*, 18(1-2), 49-76.

Ward, R., Zemlak, T., Innes, B., Last, P. & Hebert, P. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360: 1847–1857. Recuperado de www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1609232/pdf/rstb20051716.pdf

ANEXOS

Anexo 1. Ficha para identificación de peces.

Nombre científico										
Nombre común										
Orden										
Familia										
Subfamilia										
Lugar / fecha										
Arte de pesca										
Zona de pesca / pos. geografía										
Profundidad										
Tipo de fondo										
Colectores										
Color en vida										
Color en preservante										
Referencia específica										
Referencia general										
Espé cime n	Long	peso	sexo					Cód. De colecció n	Cód. De IMARPE	Cód. De campo
Fotografías										
Observaciones										
Identificado por										

Anexo 2.



Figura 4. Especies de peces encontrados con mayor frecuencia en cuerpos de agua continentales de la región Tumbes. (a) *Chilobrycon deuterodon*, (b) *Astyanax festae*, (c) *Oreochromis* sp., (d) *Pimelodella elongata*.

Anexo 3

Tabla 14. Distancia genética inter-especifica por familia de las 32 especies de peces identificados mediante la técnica ADN *barcode* en aguas continentales de la región Tumbes.

Familia	A*	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
A Centropomidae		0,022	0,023	0,018	0,017	0,016	0,017	0,023	0,017	0,021	0,023	0,013	0,024	0,023	0,021	0,018	0,023
B Achiridae	0,213		0,024	0,018	0,020	0,018	0,019	0,023	0,018	0,022	0,021	0,017	0,026	0,022	0,025	0,019	0,021
C Paralichthyidae	0,235	0,245		0,018	0,018	0,018	0,016	0,023	0,019	0,024	0,020	0,017	0,024	0,024	0,026	0,022	0,026
D Eleotridae	0,167	0,187	0,187		0,012	0,013	0,012	0,017	0,013	0,017	0,014	0,012	0,018	0,016	0,018	0,014	0,018
E Gobiidae	0,172	0,202	0,187	0,104		0,013	0,013	0,019	0,013	0,019	0,018	0,013	0,019	0,018	0,019	0,014	0,018
F Bryconidae	0,170	0,184	0,193	0,122	0,109		0,013	0,016	0,012	0,016	0,016	0,013	0,015	0,014	0,016	0,008	0,014
G Gerreidae	0,112	0,147	0,120	0,037	0,053	0,062		0,016	0,012	0,017	0,013	0,014	0,018	0,016	0,018	0,016	0,018
H Heptapteridae	0,234	0,234	0,252	0,164	0,187	0,177	0,123		0,017	0,022	0,020	0,018	0,023	0,022	0,025	0,018	0,020
I Cichlidae	0,180	0,184	0,202	0,128	0,126	0,111	0,065	0,171		0,017	0,016	0,013	0,018	0,016	0,020	0,015	0,018
J Lebiasinidae	0,217	0,230	0,258	0,162	0,188	0,154	0,119	0,222	0,177		0,020	0,019	0,023	0,023	0,026	0,018	0,022
K Mugilidae	0,236	0,225	0,211	0,141	0,171	0,165	0,070	0,206	0,164	0,211		0,015	0,022	0,022	0,023	0,019	0,022
L Carangidae	0,108	0,154	0,167	0,100	0,106	0,114	0,049	0,178	0,119	0,182	0,141		0,019	0,016	0,018	0,015	0,018
M Curimatidae	0,257	0,272	0,271	0,197	0,209	0,156	0,151	0,237	0,205	0,249	0,236	0,202		0,023	0,025	0,016	0,022
N Parodontidae	0,238	0,232	0,237	0,165	0,184	0,138	0,126	0,228	0,165	0,224	0,232	0,155	0,224		0,024	0,017	0,021
O Poeciliidae	0,224	0,269	0,293	0,178	0,186	0,163	0,137	0,259	0,200	0,269	0,255	0,180	0,272	0,258		0,020	0,022
P Characidae	0,195	0,201	0,232	0,141	0,139	0,070	0,101	0,192	0,145	0,179	0,203	0,147	0,158	0,157	0,198		0,016
Q Ariidae	0,234	0,216	0,289	0,177	0,182	0,145	0,133	0,192	0,173	0,230	0,209	0,161	0,233	0,222	0,243	0,159	

*Las letras en el encabezado corresponden a las familias que están precedidas por la misma letra en la columna izquierda

Anexo 4

Tabla 15. Especies de peces identificados en la región Tumbes, por Luque (2008), Valenzuela (2014) y en la presente investigación.

Especie	Luque (2008)	Valenzuela (2014)	Esta investigación	Especie	Luque (2008)	Valenzuela (2014)	Esta investigación
<i>Achirus klunzingeri</i>	x	x		<i>Hoplias microlepis</i>	x		
<i>Achirus mazatlanus</i>	x	x		<i>Lebiasina bimaculata</i>	x	x	x
<i>Aequidens rivulatus</i>	x			<i>Lycengraulis poeyi</i>		x	
<i>Andinoacara rivulatus</i>		x	x	<i>Mugil cephalus</i>	x		
<i>Arius seemanni</i>	x		x	<i>Mugil cephalus Linnaeus,</i>		x	
<i>Astyanax festae</i>	x	x	x	<i>Mugil curema</i>	x		x
<i>Awaous transandeanus</i>	x		x	<i>Mugil curema Valenciennes,</i>		x	
<i>Awaous banana</i>		x		<i>Mugil sp.</i>			x
<i>Brycon alburnus</i>	x		x	<i>Oligoplites saurus</i>			x
<i>Brycon atrocaudatus</i>	x	x		<i>Oreochromis aureus</i>			x
<i>Brycon dentex</i>	x	x	x	<i>Oreochromis aff. mossambicus</i>			x
<i>Bryconamericus brevirostris</i>	x	x		<i>Oreochromis mossambicus</i>			x
<i>Bryconamericus peruanus</i>	x	x		<i>Oreochromis niloticus</i>	x	x	
<i>Brycon sp.</i>			x	<i>Oreochromis sp.</i>			x
<i>Centropomus nigrescens</i>	x			<i>Paracetopsis atahualpa</i>		x	
<i>Centropomus unionensis</i>		x	x	<i>Paracetopsis bleekeri</i>	x		
<i>Centropomus robalito</i>			x	<i>Phylipnus maculatus</i>	x		
<i>Chaetostoma microps</i>	x	x		<i>Pimelodella elongata</i>	x	x	x
<i>Chilobrycon deuterodon</i>	x	x	x	<i>Poecilia reticulata</i>	x		
<i>Cichlasoma festae</i>	x			<i>Poecilia sp.</i>			x
<i>Citharichthys gilberti</i>	x		x	<i>Pseudocurimata peruana</i>		x	
<i>Ctenogobius sagittula</i>			x	<i>Pseudocurimata troschelii</i>	x	x	x
<i>Diapterus peruvianus</i>	x		x	<i>Pseudophallus starksii</i>		x	
<i>Dormitator latifrons</i>	x	x	x	<i>Rhoadsia altipinna</i>	x	x	x
<i>Eleotris picta</i>	x		x	<i>Saccodon wagneri</i>	x	x	x
<i>Eucinostomus currani</i>	x			<i>Selene brevoortii</i>			x
<i>Evorthodus minutus</i>		x		<i>Sternopigus macrurus</i>	x		
<i>Gambusia affinis</i>		x		<i>Sternopygus sp.</i>		x	
<i>Gerres cinereus</i>			x	<i>Trichomycterus sp.</i>	x		
<i>Gobiomorus maculatus</i>		x	x	<i>Trinectes fluviatilis</i>	x	x	x
<i>Gobionellus sp.</i>		x		<i>Trinectes fonsecensis</i>	x	x	

Anexo 5.



Centropomus robalito



Trinectes fluviatilis



Diapterus peruvianus



Andinoacara rivulatus



Dormitator latifrons



Chilobrycon deuterodon



Mugil curema



Poecilia sp

Figura 5. Peces de aguas continentales identificados mediante la tecnica ADN *barcode* en la región Tumbes en 2016.

Continúa...



Pimelodella elongata



Lebiasina bimaculata



Awaous transandeanus



Saccodon wagneri



Selene brevoortii



Rhoadsia altipinna



Brycon alburnus



Astyanax festae

Figura 5. Peces de aguas continentales identificados mediante la tecnica ADN *barcode* en la región Tumbes en 2016.

Continúa...



Gobiomorus maculatus



Centropomus unionensis



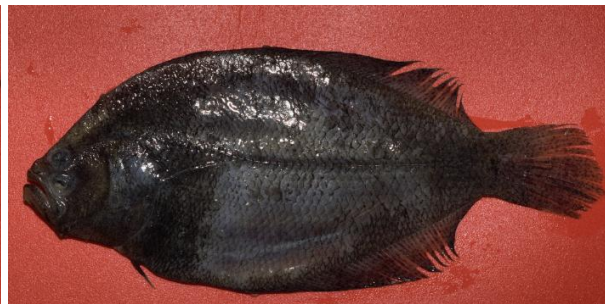
Oligoplites saurus



Pseudocurimata troschellii



Gerres cinereus



Citharichthys gilberti



Oreochromis aff. mossambicus



Eleotris picta

Figura 5. Peces de aguas continentales identificados mediante la técnica ADN *barcode* en la región Tumbes en 2016.

Continúa...



Arius seemanni



Oreochromis aureus



Oreochromis mossambicus



Brycon sp



Brycon dentex



Mugil sp



Oreochromis sp



Ctenogobius sagittula

Figura 5. Peces de aguas continentales identificados mediante la técnica ADN *barcode* en la región Tumbes en 2016.