

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

**ADN AMBIENTAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO
POBLACIONAL DE *Apistogramma agassizii*, EN LA REGION
LORETO - PERÚ**

PRESENTADO POR:

Br. RONALD JOSE DELGADO BARBOZA

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO**

ASESOR:

M. Sc. JORGE ACURIO SAAVEDRA

COASESOR:

Dr. GUILLAIN ESTIVALS

FINANCIADO POR PROCIENCIA contrato N°
PE501083194-2023-prociencia - CONCYTEC

CUSCO - PERÚ

2026



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el Asesor JORGE ACURIO SAAVEDRA
..... quien aplica el software de detección de similitud al
trabajo de investigación/tesis titulada: ADN AMBIENTAL PARA LA
IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO POBLACIONAL DE
Apistogramma agassizii, EN LA REGION LORETO - PERÚ

Presentado por: RONALD JOSE DELGADO BARBOZA DNI N° 70871697;
presentado por: DNI N°:
Para optar el título Profesional/Grado Académico de BIOLOGO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el
Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de**
Similitud en la UNSAAC y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 1 %.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.	<input checked="" type="checkbox"/>
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las subsanaciones.	<input type="checkbox"/>
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	<input type="checkbox"/>

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto**
las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 20 de ENERO de 2026

Firma

Post firma JORGE ACURIO SAAVEDRA

Nro. de DNI 23983840

ORCID del Asesor 0000-0001-9184-1662

Se adjunta:

- Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
- Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: **oid:** 27259° 5475 75160

Ronald José Delgado Barboza

ADN AMBIENTAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO POBLACIONAL DE *Apistogramma agassizii*, ...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:547575160

155 páginas

Fecha de entrega

20 ene 2026, 7:24 a.m. GMT-5

21.340 palabras

170.524 caracteres

Fecha de descarga

20 ene 2026, 7:55 a.m. GMT-5

Nombre del archivo

Tesis ADN_a RJDB 2025.docx

Tamaño del archivo

23.0 MB

1% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 8 palabras)

Exclusiones



- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 1%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
177 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.
-  **Texto oculto**
10 caracteres sospechosos en N.º de páginas
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

Este trabajo dedico a mis padres Lázaro y Domitila y a mis hermanos Moisés, Yaneth y Ruth, por su apoyo incondicional, demostrándome unión, disponibilidad en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

- A mi alma mater, la Universidad Nacional de San Antonio Abad (UNSAAC), por ser el pilar fundamental en mi formación académica.
- Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP, concretamente al Laboratorio de Biología y Genética Molecular – LBGM, y a Prociencia por la subvención a través del programa de Proyectos de Investigación Básica 2023-01 E041-2023-01 contrato N°PE501083194-2023-PROCIENCIA “Generando nuevas perspectivas del uso del ADN ambiental (eDNA) para la conservación de la biodiversidad.”
- A mi asesor Dr. Guillain Estivals, por haberme elegido y brindado su confianza, paciencia, enseñanzas y por ser mi mentor en cada paso en el arduo camino de la tesis.
- A mi asesor M. Sc. Jorge Acurio Saavedra, por los consejos y correcciones oportunas y sugerencias para la culminación de la tesis.
- A la Dra Diana Castro directora del laboratorio de Biología y Genética Molecular – LBGM, al staff de profesionales biólogos: Carlos Angulo, Jhon Gregory, al personal técnico: Luis zafra y Antonio Dávila, a compañeros tesistas Zoyla e Ivanna. Por la confianza y vivencia compartidas en el laboratorio.
- A Dr. Nicolas Hubert, investigador del IRD- Francia, por la guía, el apoyo en la secuenciación NGS y la obtención de los mitogenomas.
- A Pierre Caminade, personal técnico de IRD- Francia, por la guía y apoyo en la colecta de campo.
- A Ehiko Rios y familia, por la hospitalidad, hicieron amena mi estadía para realizar la presente tesis.
- A mis padres y hermanos por el apoyo incondicional. Gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	ii
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	iv
JUSTIFICACIÓN	vi
OBJETIVOS	vii
HIPÓTESIS	viii
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
ANTECEDENTES	1
1.2. MARCO CONCEPTUAL	7
1.2.1 Descripción del género <i>Apistogramma</i> (Cíclidos Enanos).....	7
1.2.2 <i>Apistogramma agassizii</i> (modelo de estudio).....	7
1.2.3 Taxonomía de <i>Apistogramma agassizii</i>	9
1.2.4 ADN AMBIENTAL (ADNa).....	10
1.2.5 ADN DE TEJIDO.....	10
1.2.6 HAPLOTIPO	10
1.2.7 BARCODING de ADN	11
1.2.8 BARCODING GAP	13
1.2.9 METABARCODING de ADN.....	14
1.2.10 PRINCIPIOS DE LA GENÉTICA DE POBLACIONES	18

1.2.10.1 Genética mendeliana.....	18
1.2.10.2 Teoría de la evolución	18
1.2.10.3 Ley de Hardy-Weinberg (HW).....	19
1.2.10.4 FUERZAS EVOLUTIVAS	19
1.2.10.4.1 Las Mutaciones.....	20
1.2.10.4.2 La deriva genética.....	21
1.2.10.4.3 La migración.....	22
1.2.10.4.4 Selección Natural.....	23
CAPÍTULO II.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1 MATERIALES	25
2.1.1 ÁREA DE PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.....	25
2.1.2 ÁREA DE PROCESAMIENTO	28
2.1.3 Material Biológico.....	29
2.1.4 Materiales de laboratorio	29
A. Equipos	29
B. Reactivos.....	30
C. Consumibles y fungibles.....	32
D. Programas bioinformáticos.....	32
2.2 METODOLOGÍA.....	34
2.2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	34

2.2.2 FLUJOGRAMA DE LA INVESTIGACIÓN	34
2.3. MÉTODOS.....	35
2.3.1 PLANTEAMIENTO DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA.....	35
2.3.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES POLIMÓRFICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>A. agassizii</i> Y DISEÑO DE LOS PRIMERS	36
2.3.3. OPTIMIZACIÓN, AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES Y CONSTRUCCIÓN DE LA BASE DE DATOS DE REFERENCIA	40
2.3.3.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LOS TEJIDOS	40
2.3.3.2 AMPLIFICACIONES, SECUENCIACIONES Y EDICIONES DE LAS SECUENCIAS	41
2.3.3.2.1 Optimización y amplificación del marcador D-loop	41
2.3.3.2.2 Optimización y amplificación del marcador ND5.....	43
2.3.3.2.3 Optimización y amplificación del marcador Cytb.....	45
2.3.3.2.4 Optimización y amplificación del marcador tRNA.....	46
2.3.4 SECUENCIACIÓN	48
2.3.4.1 Purificación de los productos PCR con EXO SAP	48
2.3.4.2 Reacción de secuenciación	48
2.3.4.3 Purificación de la reacción de secuenciación.	49
2.3.5. EDICIÓN DE SECUENCIAS SANGER.....	50
2.3.6. DISEÑO DE LA CONDICIÓN CONTROLADA (acuario)	52

2.3.6.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A PARTIR DEL MOOC Y ADN _a	54
2.3.6.1.1 ELABORACIÓN DEL MOOC	54
2.3.6.1.2. EXTRACCIÓN DEL ADN _a	54
2.3.6.1.3. PREPARACIÓN DE LAS LIBRERÍAS GENÓMICAS Y SECUENCIACIÓN NGS (metabarcoding de ADN _a y mooc)	55
2.3.6.1.4. PARAMÉTRAJE DE LA HERRAMIENTA BIOINFORMÁTICA	55
2.3.6.1.5. BARCODING GAP	56
2.3.6.1.6 EXTRACCIÓN Y FILTRACIÓN DEL POLIMORFISMOS DE SECUENCIAS (NGS)	57
2.3.7. ANÁLISIS DE DATOS	57
2.3.7.1 CARACTERIZACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL ADN DE LA BASE DE DATOS DE REFERENCIA	57
2.3.7.2 COMPARACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS DE LA BASE DE DATOS DE REFERENCIA VS NGS (MOOC Y ADN _a)	58
2.3.8 EVALUACIÓN EN CONDICIÓN NATURAL (<i>In situ</i>)	58
2.3.8.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO	58
2.3.8.2. EXTRACCIÓN DE ADN _a , SECUENCIACIÓN Y FILTRACIÓN DE POLIMORFISMO	60
2.3.8.3 ANALISIS DE DATOS	61

2.3.8.3.1 RELACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS OBTENIDOS A PARTIR DEL METABARCODING DE ADN DEL MOOC VS EL ADN _a (validación del enfoque ADN _a)	61
2.3.8.3.2 ESTRUCTURA POBLACIONAL A PARTIR DEL METABARCODING DE ADN _a	61
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
3.1 RESULTADOS	62
3.1.1 CONDICIÓN CONTROLADA	62
3.1.1.1 Base de datos de referencia	62
3.1.1.2 Valores obtenidos para el barcoding gap.....	63
3.1.1.3 Comparación de los haplotipos de la base de datos de referencia vs obtenidos a partir del metabarcoding (mooc y ADN _a).....	67
3.1.1.3.1 D-loop en condición controlada	67
3.1.1.3.2 tRNA en condición controlada	69
3.1.1.3.3 ND5 en condición controlada	71
3.1.1.3.4 Cytb en condición controlada	73
3.1.2 CONDICIÓN NATURAL.....	74
3.1.2.1. Comparación de los haplotipos obtenidos a partir del metabarcoding (mooc y ADN _a)	74
3.1.2.1.1. D-loop en condición natural	74
3.1.2.1.2 tRNA en condición natural	75
3.1.2.1.3 ND5 en condición natural.....	76

3.1.2.1.4 Cytb en condición natural.....	77
3.1.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	78
3.1.3.1 Distribución y abundancia relativa de los haplotipos dentro del área de estudio obtenidos a partir de ADN para los cuatro marcadores	78
3.1.3.1.1 Distribución y abundancia para el marcador D-loop.....	78
3.1.3.1.2. Distribución y abundancia para el marcador tRNA.....	80
3.1.3.1.3. Distribución y abundancia para el marcador ND5	82
3.1.3.1.4 Distribución y abundancia para el marcador Cytb.	84
3.2 DISCUSIÓN.....	85
CONCLUSIONES.....	89
RECOMENDACIONES	90
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	91
ANEXO: 1 Base de datos de referencia	107
ANEXO: 2 Secuencia de haplotipos en condición controlada (Acuario)	113
ANEXO: 3 Secuencia de haplotipos en condición natural (<i>in situ</i>)	117
ANEXO: 4 Cantidad y calidad de ADN de muestras tejido obtenidos para los 15 individuos de <i>A. agassizii</i> para la construcción de la base de referencia.	125
ANEXO: 5 Misión de campo para colecta de muestras biológicas en las tres zonas de estudio.....	126
ANEXO: 6 Trabajo en laboratorio	127
ANEXO: 7 Script para la extracción y filtración de polimorfismos (haplotipos)	129

ANEXO: 8 Figura de la amplificación de los primers en la fase de optimización.....	130
ANEXO: 9 Autorización para la colecta de muestras biológicas.....	131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Datos de colecta de muestras de aleta de tejido, individuos de A. agassizii y ADN_a, en las tres zonas de estudio.</i>	26
Tabla 2 <i>Secuencia de los Primers usados para la secuenciación Sanger.</i>	38
Tabla 3 <i>Cócteles de 3 pares de Primers para cada marcador utilizado en la secuenciación NGS.</i>	39
Tabla 4 <i>Volúmenes de reacción utilizados para la amplificación del marcador D-loop.</i> 42	
Tabla 5 <i>Condiciones del programa de amplificación (PCR) para el marcador D-loop.</i> 43	
Tabla 6 <i>Volúmenes de reacción utilizados para la amplificación del marcador ND5.</i> ...	44
Tabla 7 <i>Condiciones del programa de amplificación (PCR) para el marcador ND5</i>	44
Tabla 8 <i>Volúmenes de reacción utilizados para la amplificación del marcador Cytb.</i> ...	45
Tabla 9 <i>Condiciones del programa de amplificación (PCR) para el marcador Cytb.</i>	46
Tabla 10 <i>Volúmenes de reacción utilizados para la amplificación del marcador tRNA.</i> 47	
Tabla 11 <i>Condiciones del programa de amplificación (PCR) para el marcador tRNA.</i> .	47
Tabla 12 <i>Reacción de secuenciación para el sentido forward y sentido reverse.</i>	48
Tabla 13 <i>Condiciones de secuenciación.</i>	49
Tabla 14 <i>Caracterización del polimorfismo de la base de referencia.</i>	62
Tabla 15 <i>Barcoding gap para el marcador D-loop</i>	63
Tabla 16 <i>Barcoding gap para el marcador ND5.</i>	64
Tabla 17 <i>Barcoding gap para el marcador Cytb.</i>	65
Tabla 18 <i>Barcoding gap para el marcador tRNA.</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Apistogramma agassizii</i> (modelo de estudio).	9
Figura 2 Ejemplo de Haplotipos.	11
Figura 3 Flujograma del barcoding de ADN.	13
Figura 4 Esquema del barcoding gap.	14
Figura 5 Flujo de trabajo general para los estudios de metabarcoding de ADNa.	16
Figura 6 Estrategia de Unoise para eliminar los falsos haplotipos.	17
Figura 7 Interacción de las fuerzas evolutivas.	20
Figura 8 Deriva genética.	22
Figura 9 Modelo de Migración.	23
Figura 10 Modelo simple de selección natural.	24
Figura 11 Ubicación del área de estudio.	27
Figura 12 Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) IIAP-Iquitos.	28
Figura 13 Genoma mitocondrial de <i>Apistogramma agassizii</i> sp1.	37
Figura 14 Electroferograma de secuencias sanger de <i>A. agassizii</i> mostrando calidad de picos.	51
Figura 15 Secuencias de consenso con presencia de mutación.	52
Figura 16 Filtración de ADN ambiental en condición controlada (acuario).	53
Figura 17 Filtración de ADNa en condición natural (in situ).	59
Figura 18 Colecta de individuos <i>A. agassizii</i> con redes de pesca.	60
Figura 19 Árbol filogenético para el marcador D-loop en condición controlada	68

Figura 20 <i>Árbol filogenético para el marcador tRNA en condición controlada.</i>	70
Figura 21 <i>Árbol filogenético para el marcador ND5 en condición controlada.</i>	72
Figura 22 <i>Árbol filogenético para el marcador Cytb en condición de controlada.</i>	73
Figura 23 <i>Árbol filogenético para el marcador D-loop en condición natural.</i>	74
Figura 24 <i>Árbol filogenético para el marcador tRNA en condición natural.</i>	75
Figura 25 <i>Árbol filogenético para el marcador ND5 en condición natural.</i>	76
Figura 26 <i>Árbol filogenético para el marcador Cytb en condición natural.</i>	77
Figura 27 <i>Distribución y abundancia relativa en % para el marcador D-loop.</i>	79
Figura 28 <i>Distribución y abundancia relativa en % para el marcador tRNA.</i>	81
Figura 29 <i>Distribución y abundancia relativa para el marcador ND5.</i>	83
Figura 30 <i>Distribución y abundancia relativa para el marcador Cytb.</i>	84

RESUMEN

La Amazonía peruana concentra una gran diversidad de peces de agua dulce, pero persisten vacíos sobre su biología, distribución y variación genética. Ante la creciente presión antropogénica, se requieren herramientas eficientes para el monitoreo y la conservación. El metabarcoding de ADN ambiental (ADNa) es un método innovador, no invasivo y costo-efectivo para inventarios biológicos, aunque su aplicación en estudios poblacionales sigue poco explorada en regiones megadiversos como la Amazonía. El presente estudio analizó la capacidad del metabarcoding de ADNa para detectar polimorfismo poblacional en *A. agassizii* Sp1, un ciclido amazónico caracterizado por su marcada diferenciación genética a microescala. Se diseñaron y optimizaron cuatro marcadores mitocondriales polimórficos (D-loop, tRNA, ND5 y Cytb) y se estableció una base de referencia mediante secuenciación Sanger a partir de ADN de tejido. Esta referencia permite comparar los haplotipos obtenidos con secuenciación de nueva generación (NGS, Illumina MiSeq) aplicada a muestras de ADNa. El estudio se desarrolló en condiciones controladas de acuario y en seis sitios naturales de la región Loreto. Los resultados mostraron que el metabarcoding de ADNa identifica haplotipos equivalentes a los obtenidos por Sanger, demostrando su fiabilidad para detectar variación intraespecífica. Además, se evidenció una diferenciación genética significativa entre microcuencas, incluso a corta distancia geográfica. En conjunto, los hallazgos confirman que el ADNa es una herramienta robusta y no invasiva para estudios poblacionales, con gran potencial para el monitoreo, la conservación y el manejo sostenible de la biodiversidad acuática amazónica.

Palabras clave: ADN ambiental (ADNa), *Apistogramma agassizii*, Polimorfismo poblacional, Marcadores mitocondriales.

INTRODUCCIÓN

La cuenca Amazónica alberga la mayor biodiversidad de peces de agua dulce del planeta, con más de 2,700 especies descritas, de las cuales cerca de 1000 habitan en la Amazonía peruana (Dagosta & Pinna, 2019). Pese a esta enorme riqueza biológica, el conocimiento sobre la biología, ecología, distribución y estado de conservación de muchas especies sigue siendo limitado (López Fernández et al., 2010). A ello se suma una creciente presión antropogénica, deforestación, minería, actividades petroleras, expansión urbana y construcción de infraestructura, que amenaza la integridad de los ecosistemas acuáticos y la seguridad alimentaria local (Butler, 2013; Castello et al., 2013). Estas presiones han debilitado los factores que históricamente favorecieron la conservación de la Amazonía (Myers et al., 2000; Reis et al., 2016), colocándola en una etapa crítica de perturbación ecológica (Davidson et al., 2012; Thomaz et al., 2020; Viana, 2020). Ante este panorama, surge la necesidad de desarrollar herramientas que permitan inventariar especies, evaluar su estado de conservación y diseñar planes de manejo sostenibles. Sin embargo, debido a su tamaño y dificultad de acceso, se trata de una tarea que sería inviable utilizando métodos de muestreo convencionales (colecta de individuos). Estos métodos no son muy eficaces para inventariar todas las especies presentes en el ambiente, y resultan costosos en términos de tiempo, equipos y logística, además de ser a menudo invasivos porque necesitan en general el sacrificio de individuos.

El metabarcoding de ADN se presenta como una alternativa prometedora y no invasiva. Este enfoque permite acceder a la información genética presente sin sacrificar organismos y, a un menor costo en comparación con métodos convencionales (Hajibabaei et al., 2011; Taberlet et al., 2012). Aunque ha sido ampliamente utilizado para inventarios de especies, su aplicación en estudios poblacionales es reciente y limitada (Adams et al., 2019; Deiner et al., 2017; Elbrecht et al., 2018; Marshall & Stepien, 2019; Sigsgaard et al., 2020; Turon et al., 2020),

especialmente en ambientes megadiversos como la Amazonía peruana, donde la variabilidad genética intraespecífica es clave para la conservación. Algunos estudios pioneros han mostrado que el ADN puede detectar especies y caracterizar comunidades acuáticas (Deiner et al., 2017; Turon et al., 2020), identificar haplotipos y revelar variación genética intraespecífica en organismos difíciles de muestrear, como tiburón ballena (Sigsgaard et al., 2017), marsopas (Parsons et al., 2018) y moluscos marinos (Adams et al., 2023). Sin embargo, en la Amazonía peruana no se han publicado estudios orientados al uso del ADN para evaluar polimorfismo poblacional, lo que plantea un vacío de conocimiento y una oportunidad científica significativa. Investigaciones previas sobre *A. agassizii* han evidenciado una diferenciación genética notable en escalas microgeográficas, lo que convierte en un modelo adecuado para evaluar el potencial de ADN en estudios poblacionales (Estivals et al., 2020, 2022).

El propósito central del estudio es evaluar la aplicabilidad del metabarcoding de ADN para identificar el polimorfismo poblacional de *A. agassizii* Sp1 en la región Loreto. Para ello, se diseñaron y optimizaron cuatro marcadores mitocondriales polimórficos (D-loop, ND5, Cytb y tRNA), desarrollando dos metodologías complementarias: (I) secuenciación Sanger de ADN extraído de tejido, utilizada como referencia, y (II) secuenciación de nueva generación (NGS) a partir de muestras de ADN. El diseño incluyó pruebas en condiciones controladas (acuario) y naturales, con colecta de muestras en seis sitios de muestreo.

El estudio busca validar el uso del ADN para identificar haplotipos comparables a los obtenidos a partir de ADN de tejido, y demostrar su potencial para inferir la estructura genética poblacional en ambientes megadiversos. La implementación de esta metodología no invasiva permitirá avanzar hacia monitoreos más eficientes, económicos y sostenibles, contribuyendo al manejo responsable de la ictiofauna amazónica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el bioma sufre probablemente una sexta crisis de extinción masiva de especies, debido principalmente a las acciones directas e indirectas del hombre sobre los ecosistemas (Ceballos et al., 2015). Las regiones tropicales, de las que forma parte la Amazonia, poseen una biodiversidad mayor que las regiones templadas (Wright & Muller L, 2006). La cuenca del Amazonas alberga la mayor diversidad de peces de agua dulce del mundo con 2716 especies nativas (Dagosta & Pinna, 2019). Solo en la Amazonía peruana se considera un aproximado de 1000 especies. No obstante, el conocimiento actual sobre el estado real de la diversidad ictiológica resulta aún limitado y probablemente subestimado, mientras que la información disponible respecto a su estado de conservación es escasa (Jézéquel et al., 2020; Kornfield & Smith, 2000). Desde finales del siglo pasado, las actividades antropogénicas en la Amazonía han aumentado considerablemente, tal como la deforestación, la minería, la extracción petrolera, el desarrollo de infraestructuras (carreteras, expansión de las ciudades, construcción de represas) y la introducción de especies exóticas (Castello et al., 2013; Castello & Macedo, 2016; Fraser, 2014; Hurd et al., 2016). Estas actividades generan una acelerada pérdida de ecosistemas y contribuyen al desplazamiento y extinción de especies. A pesar de su alta relevancia ecológica, los ecosistemas amazónicos (especialmente los acuáticos) han sido sistemáticamente desatendidos en los esfuerzos de conservación (Azevedo-Santos et al., 2016; Butler, 2013). En este sentido, el metabarcoding ADN se reconoce actualmente como el método más adecuado para inventariar de manera rápida la biodiversidad. Varios estudios mostraron su eficiencia para inventariar especies en la Amazonía (Batista et al., 2022; Bevilaqua et al., 2020; Cilleros et al., 2019; Condachou et al., 2025; Coutant et al., 2023; Mariac et al., 2022). Este método reduce drásticamente los costes en tiempo, dinero, recursos humanos, logística y no es invasivo, ya que sólo se captura ADN presente en el ambiente (Deiner et al., 2017).

El metabarcoding de ADN se basa en la secuenciación masiva (NGS) y el análisis bioinformático de fragmentos de *barcodes* que se agrupan en unidades operativas taxonómicas (OTUs). Estas secuencias se comparan con bases de datos de referencia, de las cuales depende la correcta identificación de las especies (Deiner et al., 2017).

El ADN contiene fragmentos del genoma de los individuos y, por tanto, refleja el polimorfismo de poblaciones y especies. Esto lo convierte en una fuente de información con gran potencial aún desaprovechado, cuya plena utilidad dependerá de la identificación y optimización de marcadores más polimórficos que los *barcodes* convencionales (COI-5P, 12S, 16S), actualmente restringidos a la identificación taxonómica. El acceso a información intraespecífica es crucial para evaluar con precisión el estado de conservación de las especies, lo que exige el desarrollo de nuevos marcadores adaptados a distintos contextos biológicos y ecológicos. Dado que no existe un marcador universal, será indispensable contar con un abanico de *barcodes* que permite estudios más robustos de biodiversidad y conservación. En este escenario, el ADN representa un método emergente que, al diversificarse y perfeccionarse, tiene el potencial de convertirse en una herramienta clave para la gestión y conservación de la biodiversidad.

Con base a lo expuesto, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿es posible que el ADN ambiental alcance una eficacia comparable al ADN genómico extraído de tejido para evaluar el polimorfismo poblacional en la Amazonía peruana?

JUSTIFICACIÓN

El crecimiento demográfico en la Amazonía está estrechamente relacionado con una intensificación en la explotación de los recursos naturales, lo que ejerce una presión creciente sobre los ecosistemas. Esta situación pone en evidencia la urgencia de implementar monitoreos sistemáticos mediante estudios poblacionales que permitan evaluar con rigor el estado de vulnerabilidad de las especies y orientar acciones de conservación efectivas. Sin embargo, los planes de manejo y conservación actualmente vigentes para el aprovechamiento de los recursos naturales se centran, en gran medida, en la estimación de la abundancia de especies en cada sitio de extracción, con el fin de calcular el número de individuos potencialmente removibles del medio. Dichos planes resultan limitados, pues carecen de una perspectiva de conservación a largo plazo y omiten la consideración de la variabilidad genética intra e inter poblacional (polimorfismo genético y estructuración genética poblacional), información esencial para establecer estrategias de manejo sostenibles. (Adams et al., 2019; Sigsgaard et al., 2020)

Los estudios de genética de poblaciones resultan fundamentales, ya que permiten evidenciar la sobreexplotación de los recursos naturales mediante la identificación de reducciones en el polimorfismo genético y la evaluación de la viabilidad poblacional y de las especies en horizontes de corto y largo plazo. No obstante, hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio que aplique el ADN en genética de poblaciones en la Amazonía, a pesar de que este método presenta claras ventajas: requiere menos tiempo, dinero y recursos humanos, demanda una logística más sencilla y, además, es no invasivo, pues se basa únicamente en la captura del ADN presente en el ambiente. El desafío central consiste en garantizar que (1) los marcadores moleculares utilizados sean lo suficientemente polimórficos y (2) la diversidad genética inferida a partir de datos de secuenciación masiva (NGS) represente de manera fidedigna a las poblaciones naturales.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la aplicabilidad del ADN ambiental, para identificar el polimorfismo poblacional de *A. agassizii* en la región Loreto, Perú.

Objetivos Específicos

- Diseñar y optimizar dos métodos de identificación del polimorfismo de las secuencias de cuatro marcadores mitocondriales, I) A partir del ADN extraído de tejido de *A. agassizii* y II) A partir del metabarcoding de ADNa, en muestras de agua dulce en la región Loreto.
- Validar el enfoque de ADNa mediante la comparación el polimorfismo de las secuencias de cuatro marcadores mitocondriales obtenidos mediante ambos métodos; I) en condiciones controladas, y II) en condiciones *in situ*.
- Determinar la estructura poblacional de *A. agassizii* en seis sitios de colecta en la región Loreto.

HIPÓTESIS

Es posible emplear el metabarcoding de ADN_a para identificar el polimorfismo poblacional de *A. agassizii* en la Amazonía peruana, empleando marcadores mitocondriales polimórficos y que sean comparables con los polimorfismos procedentes de ADN de su tejido.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES

Internacionales

Thomsen & Willerslev (2015). En Dinamarca, en su artículo Environmental DNA an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity; revisaron los logros obtenidos a través del análisis de ADN de macroorganismos en un contexto de conservación, y analizaron las i) limitaciones asociadas a la contaminación, la cobertura incompleta de bases de datos genéticas y la interpretación de las señales espaciales y temporales. ii) ventajas en el entorno de monitoreo de la diversidad, como su carácter no invasivo, costo-efectivo y su capacidad para identificar múltiples taxones de manera simultánea.

Evans et al. (2016). En EE. UU, en su artículo Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding; evaluó en mesocosmos ocho especies de peces y un anfibio, en muestras de ADN y con seis marcadores mitocondriales pudo identificar las nueve especies evaluados, estos resultados ilustran el potencial de ADN para la cuantificación de la diversidad de especies acuáticas en entornos naturales.

Sigsgaard et al. (2017). En Catar, en su artículo Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA; investigó el uso del ADN de agua de mar para obtener información a nivel poblacional en tiburones ballena (*Rhincodon typus*), comparó secuencias obtenidas a partir de muestras de ADN y con secuencias de muestras de tejido, utilizaron dos marcadores mitocondriales polimórficos de la región D-loop (DL1: 412pb y DL2: 476-43 pb); como resultado identificaron más haplotipos de muestras de ADN (DL1: 7,

DL2: 18) que de las muestras de tejido (DL1:4, DL2:12), concluyendo que la base de referencia no representa la diversidad mitocondrial de la zona de estudio.

Parsons et al. (2018). En EE. UU, en su artículo *Water, water everywhere: environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species*; utilizó de ADNa para estudiar la estructura poblacional de la marsopa (*Phocoena phocoena*); identificaron ocho haplotipos para la región mitocondrial Cytb, en 36 de 40 muestras de ADNa incluidos dos nuevos haplotipos que no se habían encontrado en muestras de tejido anteriores. A partir de los resultados obtenidos concluyen que el ADNa es una herramienta eficaz para estudiar poblaciones de cetáceos difíciles de muestrear.

Elbrecht et al. (2018). En Canadá, en su artículo *Estimating intraspecific genetic diversity from community DNA metabarcoding data*; implementaron un método (JAMP) de limpieza de datos (denoising) y filtrado de secuencias para identificar haplotipos reales sin errores de secuenciación; trabajaron con muestras de una sola especie (31 individuos con 15 haplotipos conocidos) como referencia, y 18 muestras ambientales de macroinvertebrados de agua dulce amplificado con primers COI; como resultado obtuvieron 15 haplotipos esperados en la muestra de prueba, aunque también se observaron muchos haplotipos inesperados posiblemente errores o variantes biológicas reales, y en la muestras ambientales identificaron entre 534 y 646 haplotipos agrupados en 177 – 200 OTUs (unidades taxonómicas operacionales), concluyeron que es posible identificar información genética intraespecífica desde datos de metabarcoding de ADNa, también permite detectar posibles estructuras poblacionales y patrones filogeográficos sin necesidad de análisis individuales por especie, sin embargo factores como la biomasa desigual, los errores de PCR, secuenciación y la escasez de los barcode de referencias, pueden afectar la precisión.

Marshall & Stepien (2019). En Canadá, en su artículo científico *Invasion genetics from ADNa and thousands of larvae; A targeted metabarcoding assay that distinguishes species and population variation of zebra and quagga mussels*; probó el método de ADNa utilizando ensayos de metabarcoding con secuenciación de alto rendimiento (HTS) para identificar y distinguir simultáneamente los mejillones cebra y quagga euroasiáticos, especies invasoras estrechamente relacionadas (*Dreissena polymorpha* y *D. rostriformis*). El ensayo analizó la variación genética de una región del gen citocromo oxidasa I (COI) para evaluar la variabilidad genética inter e intraespecífica temporal y espacial. Además, el ensayo facilita el análisis del ADNa del agua, las primeras etapas de la vida de miles de individuos y el análisis simultáneo de 50 a 100 muestras etiquetadas recolectadas en el campo. Para tener mejor precisión en los resultados tomaron en consideración los siguientes puntos: (a) mesocosmos simulados que contienen cantidades conocidas de ADN por taxón, (b) acuarios con composiciones mixtas de especies/haplotipos de adultos, y (c) agua y plancton recolectados en el campo versus muestreo tradicional de adultos.

Stepien et al. (2019). En EE. UU, en su artículo, *Invasion genetics of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* across North America; Differentiation of front, introgression, and ADNa metabarcode detection*; evaluaron la variabilidad genética de la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) mediante el uso de ADNa colectados en 48 puntos de muestreo. Utilizaron diez loci microsatélites (ADN nuclear) y dos genes mitocondriales: la subunidad I del citocromo b (Cytb) y el citocromo c oxidasa (COI). Los resultados del estudio muestran que la invasión de la carpa plateada posee niveles moderados de diversidad genética.

Tsuji et al. (2020). En Japón, en su artículo *Evaluating intraspecific genetic diversity using environmental DNA and denoising approach: A case study using tank water*; corroboró dos

métodos de identificación de variantes de secuencia de amplicones (ASV), DADA2 y UNOISE3, para la eliminación de ruido en los datos HTS; utilizó como muestra de ADN_a agua de crianza de Ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*), que contenían nueve haplotipos conocidos de la región mitocondrial D-loop, realizó 15 réplicas de PCR y posteriormente fueron secuenciados por HTS y el número total de haplotipos verdaderos detectados y haplotipos falsos positivos fue comparado con y sin denoising usando DADA2 y UNOISE3. Como resultado todos los haplotipos verdaderos fueron detectados en las 15 réplicas de PCR, mientras que los haplotipos falsos positivos tuvieron tasas de detección que variaron de 1/15 a 15/15, y concluyeron que la corrección o eliminación de secuencias erróneas con dos métodos ASV, DADA2 y UNOISE3, fue eficaz para mejorar la precisión de las evaluaciones de diversidad genética intraespecífica mediante análisis de ADN_a.

Andres et al. (2021). En EE. UU, en su artículo Nuclear ADN_a estimates populations allele frequencies and abundance in experimental mesocosms and field samples; demostró que los estudios de ADN_a también tienen la capacidad de detectar diversidad intraespecífica en el genoma nuclear, lo que permite evaluaciones de frecuencias alélicas a nivel de población y estimaciones del número de contribuyentes genéticos en una muestra de ADN_a. Utilizando un panel de loci de microsatélites desarrollado para el gobio redondo (*Neogobius melanostomus*), probaron la similitud entre las estimaciones de frecuencias alélicas basadas en ADN_a y en tejidos individuales en mesocosmos experimentales y en un ensayo de campo y concluyeron que las muestras del mesocosmos y como de campo, tienen las frecuencias alélicas del ADN_a altamente correlacionadas con las frecuencias alélicas de muestras de tejido de gobio redondo genotipados, lo que muestra que los marcadores nucleares se pueden amplificar de manera confiable a partir de muestras de agua.

Adams et al. (2023). En Nueva Zelanda, en su artículo Environmental DNA reflects common haplotypic variation; probó la efectividad de ADNa para obtener haplotipos dentro de la especie *Haliotis iris* pāua de patas negras de Nueva Zelanda, utilizó el marcador mitocondrial ATP8-ATP6, a partir del cual identifico seis haplotipos con muestras de tejido y tres haplotipos de muestras de ADNa, de los cuales tres haplotipos son comunes entre muestras de ADNa y tejido; llegaron a la conclusión que el ADNa tiene un potencial para identificar la diversidad haplotípica a nivel poblacional.

Zanovello et al. (2024). En Italia, en su artículo Validation of an eDNA-based workflow for monitoring inter- and intra-specific CytB haplotype diversity of alpine amphibians; analizaron la diversidad genética inter e intraespecífica de anfibios en 38 humedales con ADN ambientales, diseñaron siete marcadores mitocondriales del gen citocromo B, y corroboraron la sensibilidad de los marcadores en silico, *in vitro* e *in situ*. Para la obtención de variación de secuencias específicas (ESV) y asignación taxonómica probaron 3 flujos de trabajos bioinformáticos diferentes (MICCA + VSEARCH y OBITools + ecotag y OBIttools + metabinkit).

Nacionales

Estivals et al. (2020). En Loreto, en su artículo científico The amazonian dwarf cichlid *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875) is a geographic mosaic of potentially tens of species; Conservation implications; estudiaron el estado taxonómico de 1151 especímenes de *A. agassizii* recolectados en 35 sitios en los alrededores de Iquitos en la Amazonía Peruana, basándose en los análisis moleculares (ADN nuclear y mitocondrial) y también experimentos de elección de pareja. Como resultado identificaron al menos tres especies biológicas dentro del nominal *A. agassizii* en el área de muestreo.

Estivals et al. (2022). En Loreto, en su artículo científico *Exceptional genetic differentiation at a micro-geographic scale in *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875) from the peruvian amazon; Sympatric speciation?*; analizaron la estructura genética de *A. agassizii* Sp1, para ello a genotipado 889 individuos con diez loci microsatélites, recolectados en 26 áreas distribuidas en pequeños arroyos en 11 microcuencas en una porción muy pequeña de la Amazonía peruana. Revelaron 22 poblaciones con estructuras genéticas altamente diferenciadas.

1.2. MARCO CONCEPTUAL

1.2.1 Descripción del género *Apistogramma* (Cíclidos Enanos)

El género de peces cíclidos *Apistogramma*, agrupa casi 1/3 de las 258 especies de cíclidos descritas para la Amazonía (22 para Perú). Todas sus especies son consideradas como ornamentales y son extraídas del medio ambiente (Britzke et al., 2014; Estivals et al., 2020, 2022). Se distribuye a lo largo del neotrópico al lado Este de los andes, desde Venezuela hasta el norte de Argentina, habita las cuencas de magdalena (Colombia), el Amazonas, el Orinoco y la cuenca de Paraguay (Angulo Chávez, 2016). La mayoría de las especies de este género son endémicas y tienen una distribución muy reducida. Sin embargo, algunas de ella tienen una distribución muy amplia al nivel de la Amazonía tal como *A. agassizii*.

Viven en todo tipo de aguas, claras, blancas o negras, aunque prefieren aguas con corrientes mínimas y donde se acumulen hojas muertas de plantas (Estivals et al., 2020; Römer, 2000). Son peces de tamaño pequeño a menudo menores a 8 cm, presentan un dimorfismo sexual bien diferenciado donde los machos son más grandes y de colores más llamativos que las hembras; todas las especies del género *Apistogramma* son apreciados como peces ornamentales (Estivals et al., 2020, 2022).

1.2.2 *Apistogramma agassizii* (modelo de estudio)

A. agassizii comparte semejanza con los cíclidos africanos haplochromines como la alta variabilidad morfológica, dimorfismo sexual bien diferenciado, polimorfismo de color asociado con la elección de parejas, cuidado parental, alta endemividad y adaptaciones tróficas (Estivals et al., 2020, 2022; Römer, 2000). Los cíclidos haplochromines de los grandes lagos africanos son usados como modelos de estudios para entender los mecanismos involucrados dentro de las

radiaciones específicas y adaptativas en los vertebrados (Estivals et al., 2020, 2022; Kornfield & Smith, 2000).

A. agassizii es de tamaño pequeño (7cm), sedentaria (no migra), se reproduce durante todo el año sin dispersar gametos (cuidado parental), presenta un dimorfismo sexual marcado y un polimorfismo de color (Estivals et al., 2022). Un estudio reciente sobre *A. agassizii* ha demostrado a partir de 10 loci microsatélites, dos marcadores mitocondriales (COI y CytB) y de experimentos sobre la elección de pareja que esta especie se compone en realidad de al menos tres especies biológicas (Sp1, Sp2 y Sp3) en la región Loreto (Estivals et al., 2020). En 2022, Estivals et al. mostraron que la especie *A. agassizii* Sp1 está estructurada por al menos 22 poblaciones genéticas altamente diferenciadas que se organizan según diferentes escalas geográficas en una pequeña región de Loreto, Amazonía peruana. Es actualmente la especie de pez cíclido con la estructura genética más compleja conocida para la Amazonía. Algunas poblaciones genéticas están separadas por sólo unos cientos de metros o decenas de kilómetros, no obstante, presentan niveles de diferenciación muy importantes, por ende, en una pequeña zona de estudio, se puede acceder fácilmente a diferentes poblaciones genéticas.

Por lo expuesto, la especie *A. agassizii* Sp1 es un excelente modelo para determinar si el uso del metabarcoding de ADNa, en un lugar megadiverso como la Amazonía, es eficiente para realizar estudios poblacionales. Más allá del presente estudio, el objetivo es adaptar la metodología desarrollada a otras especies más difíciles de observar/muestrear para su conservación y su manejo sostenible.

1.2.3 Taxonomía de *Apistogramma agassizii*

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Subclase: Neopterygii

Infraclase: Teleostei

Superorden: Acanthopterygii

Orden: Perciformes

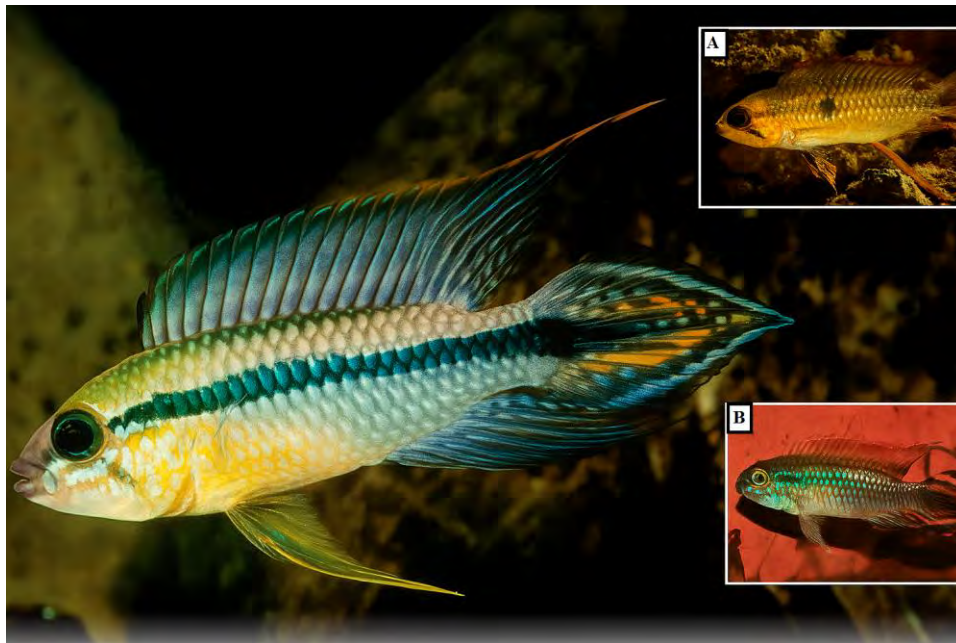
Familia: Cichlidae

Género: *Apistogramma*

Especie: *A. agassizii* (Steindachner, 1875)

Figura 1

Apistogramma agassizii (modelo de estudio).



Nota. Figura tomada del libro de peces ornamentales de la Amazonía peruana (p. 394) por García Dávila et al. (2020) A: Hembra B: Macho.

1.2.4 ADN AMBIENTAL (ADNa)

Material genético obtenido directamente de muestras ambientales (suelo, sedimentos, agua, aire, entre otros), sin necesidad de contar con restos biológicos evidentes, constituye un enfoque de muestreo eficiente, no invasivo y fácil de estandarizar. Combinado con las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), en constante avance, resulta particularmente adecuado para los desafíos del monitoreo de la biodiversidad (Thomsen & Willerslev, 2015). El ADNa incluye fragmentos de ADN y ARN liberados por organismos de flora y fauna a través de células epiteliales, mucosidad, sangre, heces, polen, entre otros. Estos rastros suelen encontrarse como fragmentos cortos y degradados, generalmente de menos de 500 pb, y pueden extraerse directamente del ambiente, por ejemplo, a partir de muestras de agua dulce (Dejean et al., 2011; Ficetola et al., 2008).

1.2.5 ADN DE TEJIDO

Material genético ADN (ácido desoxirribonucleico) obtenido del tejido de un individuo, se refiere al que se encuentra en las células de un tejido biológico, como por ejemplo piel, músculo, hígado, etc (Couton et al., 2023).

1.2.6 HAPLOTIPO

Son secuencias únicas en una población, agrupaciones físicas de variantes genómicas (polimorfismos) que tienden a heredarse juntos, un haplotipo específico normalmente refleja una combinación única de variantes que residen cerca unas de otras en un cromosoma (Hubert, 2024). Los haplotipos pueden corresponder a secuencias cortas o largas, por ejemplo, secuencias diferentes obtenidas para un mismo marcador molecular (e.g. COI-5P) entre diferentes individuos

pueden ser consideradas como diferentes haplotipos, es esa definición que se está considerando en esta tesis.

Figura 2

Ejemplo de Haplotipos.

JH22-14	158	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	G	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		Haplotipo 1
JH22-01	158	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		
JH22-02	158	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		
Na01-03	157	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		
Na01-04	157	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		
Na01-06	157	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		
Na01-09	157	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		Haplotipo 2
Na01-10	157	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		
JH22-13	158	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		
JH22-15	158	T	C	A	T	A	C	A	T	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	A	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	A	A	A		
Na01-05	159	T	C	A	T	A	C	A	C	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	C	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	G	A	A		
Na01-07	159	T	C	A	T	A	C	A	C	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	C	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	G	A	A		
Na01-08	159	T	C	A	T	A	C	A	C	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	C	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	G	A	A		
Na01-11	159	T	C	A	T	A	C	A	C	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	C	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	G	A	A		Haplotipo 3
Na01-12	159	T	C	A	T	A	C	A	C	C	A	A	C	A	G	T	T	G	A	C	C	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	G	G	A	A		

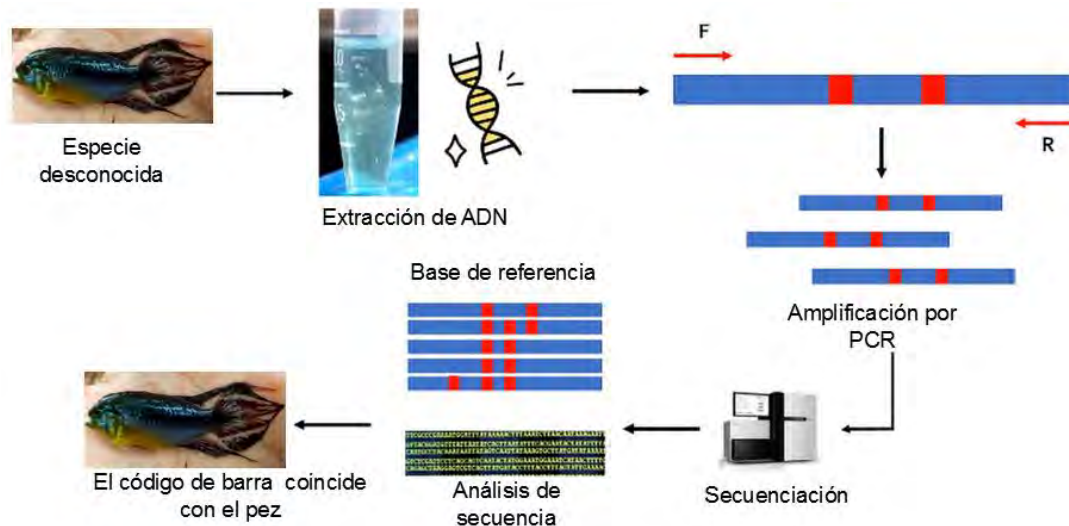
1.2.7 BARCODING de ADN

El barcoding de ADN, o simplemente barcoding, es un método que integra la taxonomía tradicional (basada en la identificación morfológica de las especies) con la biología molecular, mediante la secuenciación de un marcador estándar para la identificación y autenticación de especies (Hubert & Hanner, 2015; Trivedi et al., 2018). Este enfoque permite la construcción de bases de datos de referencia (Hubert & Hanner, 2015; Trivedi et al., 2020); una vez que una especie se asocia a la secuencia del marcador estándar (barcode de referencia), ya no es necesario disponer del organismo completo para su identificación, pues basta con la secuencia de ADN. El barcoding de ADN se ha utilizado con éxito en la identificación taxonómica de diversos subproductos, como carne, harinas, huevos y larvas de peces, carne de monte y madera (Hubert & Hanner, 2015; Mariac et al., 2018; Trivedi et al., 2018, 2020).

En práctica el barcoding se realiza de la siguiente forma (figura 3): Extracción de ADN a partir de una pequeña muestra de tejido de un individuo que se necesita identificar, amplificación de la región de interés específica de ADN, en el caso de los vertebrados generalmente se utiliza los genes mitocondriales porque presentan un alto número de copias por célula (> 1000) por lo que puede ser utilizado en muestras degradadas, la elección de los marcadores depende del uso por ejemplo para identificar las especies se utiliza marcadores de la región COI-5P porque es conservado dentro de las especies y variable entre especies (Hebert et al., 2003; Leray et al., 2013), pero también se utiliza en estudios intraespecíficos (Jenkins et al., 2018). Para estudios poblacionales se ha usado mayormente la región de control mitocondrial (D-loop), conocida por tener una alta resolución intraespecífica para los peces (Ardura et al., 2013) El siguiente paso del barcoding de ADN es la secuenciación (secuenciación Sanger) donde se determina la secuencia de nucleótidos (A,T,C,G). Finalmente se compara la secuencia obtenida con las bases de datos de referencia (NCBI, Bold). En general si la secuencia es similar a más de 98% con una secuencia de la base de dato de referencia se le asigna el nombre de la especie de la secuencia de referencia correspondiente (el valor de identidad varía en función del marcador molecular utilizado, (ver barcoding gap)).

Figura 3

Flujograma del barcoding de ADN.



Nota. Figura adaptada de: (¿What is DNA Barcoding? How does it works? Importance and Applicaitons - YouTube).

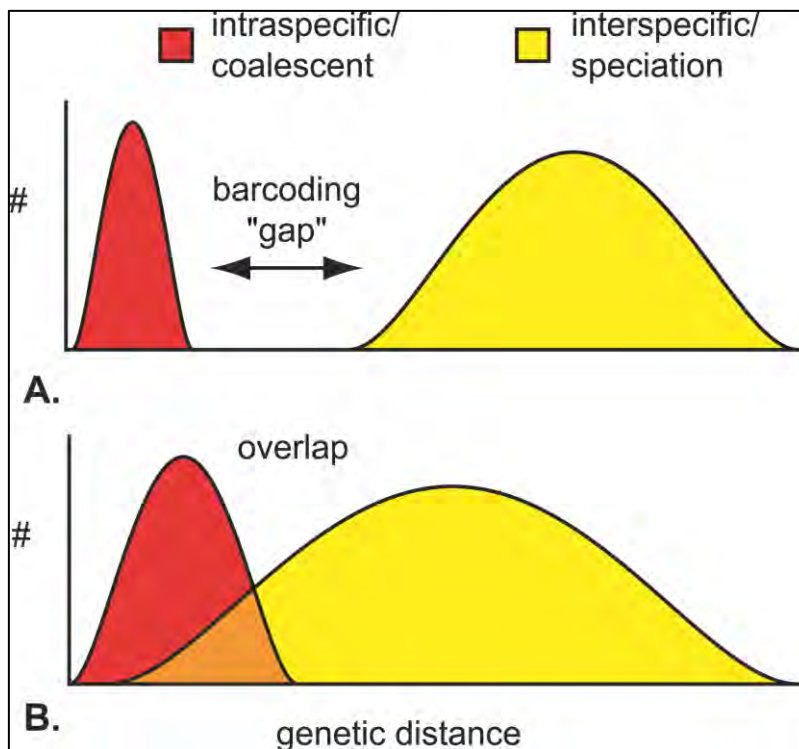
1.2.8 BARCODING GAP

La eficiencia del método barcoding de ADN depende del grado de divergencia de secuencia entre especies, y las identificaciones a nivel de especie son relativamente sencillas cuando la distancia genética máxima entre individuos dentro de una especie no excede la distancia genética mínima entre especies (Hubert et al., 2008). Depende directamente del grado de divergencia dentro de las especies y este grado de divergencia puede variar en función del marcador utilizado, para ello el barcoding gap implementa umbrales de distancia genéticas, elegidos para separar la variación intraespecífica de las diferencias interespecíficas (Meyer & Paulay, 2005). Hebert et al. (2003) sugieren que una amplia brecha entre la variación intraespecífica e interespecífica hace que un enfoque de umbral sea prometedor (figura 4). Entonces si por ejemplo la divergencia intraespecífica es de cómo máximo 0.02 (2%) y que no hay superposición con la divergencia

interespecífica podemos considerar que todas las secuencias que son al menos idénticas al 98% (100% -2%) pertenecen a la misma especie.

Figura 4

Esquema del barcoding gap.



Nota. Figura adaptada de (Meyer & Paulay, 2005) donde en rojo se muestra la variación intraespecífica, y en amarillo la divergencia interespecífica. (A) Mundo ideal para códigos de barras, con distribuciones discretas y sin superposición (barcoding gap). (B) Una versión alternativa del mundo con superposición significativa y sin brecha.

1.2.9 METABARCODING de ADN

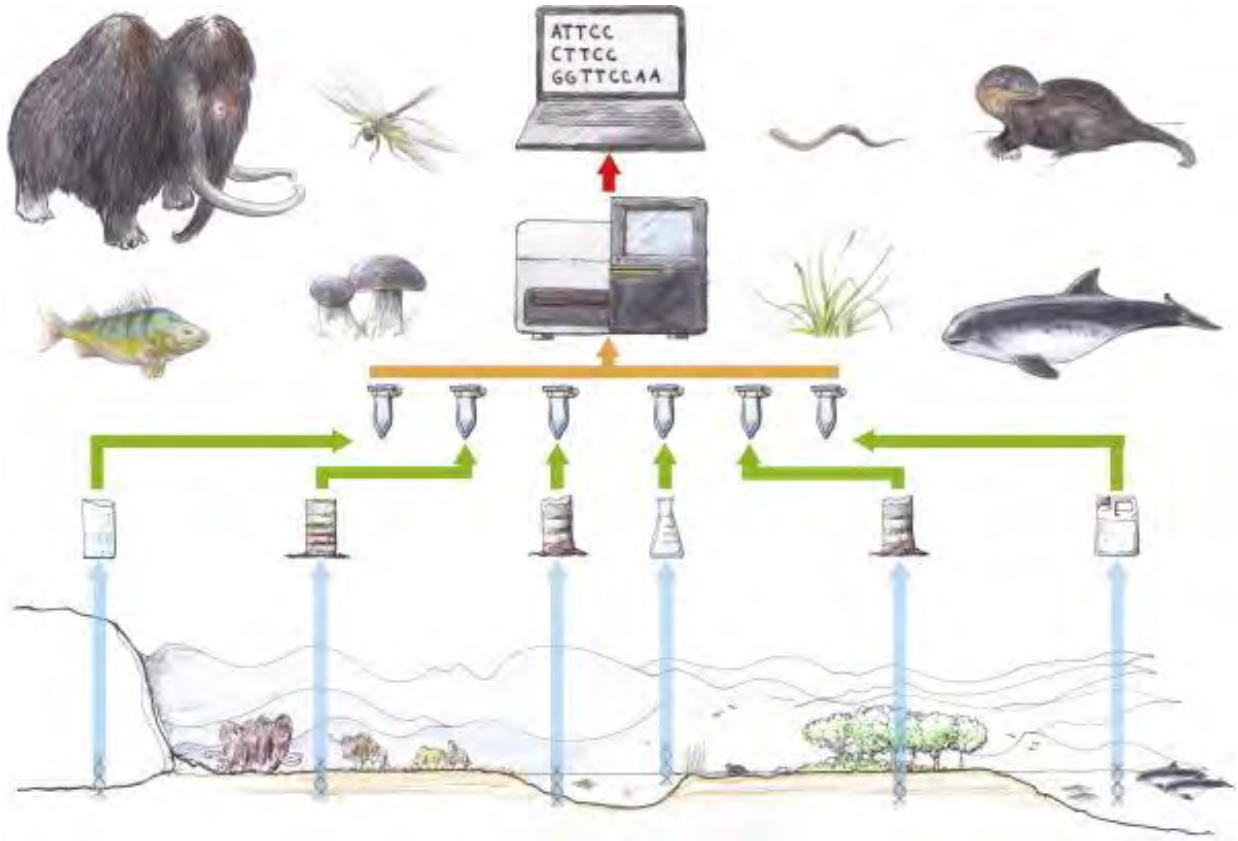
La metabarcodificación del ADN o metabarcoding de ADN, es una técnica molecular que permite la identificación de los barcode de múltiples especies a partir de mezclas de ADN (mooc de ADN o ADN_a, mediante la amplificación y secuenciación de un marcador genético estandarizado (Taberlet et al., 2012, 2018). El metabarcoding de ADN_a, es un método no invasivo

que permite inventariar las especies, incluso especies difíciles de observar con métodos tradicionales, especies en peligro de extinción y en una variedad de ecosistemas (Sahu et al., 2023). Recientemente el ADN_a se ha planteado como un enfoque prometedor para los estudios en genética de poblaciones, donde varios estudios han mostrado la viabilidad de este enfoque, especialmente en especies de vertebrados (Couton et al., 2023).

El metabarcoding de ADN_a incluye las siguientes etapas: 1) recolección de muestras de ADN ambiental como agua, suelo, aire, o material biológico como heces (Taberlet et al., 2018; Thomsen & Willerslev, 2015), 2) extracción del ADN presente en la muestra con la mayor integridad posible (Schrader et al., 2012), 3) amplificación por PCR del marcador o de los marcadores moleculares (Piñeros et al., 2023), 4) construcción de las librerías, en esta fase es necesario ligar mediante PCR los adaptadores e índices de nucleótidos a los marcadores moleculares, lo cual permitirá identificar al momento de los análisis bioinformáticos las bibliotecas de los sitios de colecta y de los marcadores moleculares utilizados (Alberdi et al., 2019; Miya et al., 2020), 5) secuenciación NGS de las librerías a menudo con tecnología Illumina (i.e., MiSeq y NextSeq) (Piñeros et al., 2023). 6) análisis bioinformáticos para extraer, filtrar los polimorfismos de las secuencias e identificar taxonómicamente los organismos presentes en cada una de las muestras analizadas (Piñeros et al., 2023).

Figura 5

Flujo de trabajo general para los estudios de metabarcoding de ADN.



Nota. Figura tomada de Thomsen & Willerslev (2015), p. 6.

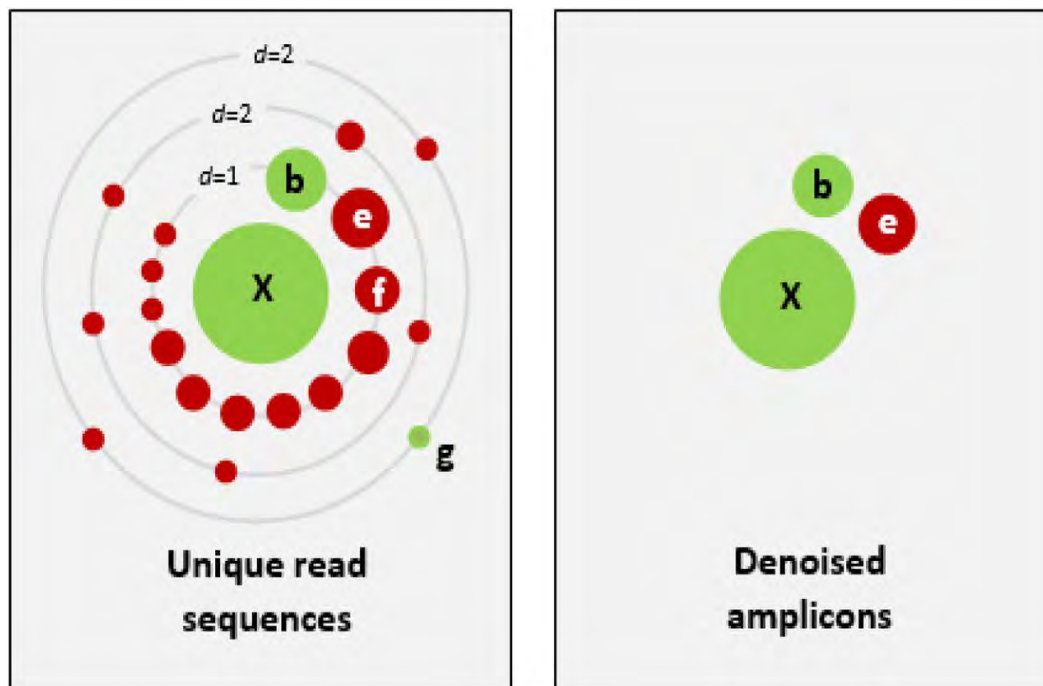
En comparación con los análisis bioinformáticos para inventariar a las especies, los análisis para estudios poblacionales constan de más etapas de filtración de los datos para evitar la presencia de falsos haplotipos al finalizar los análisis.

Se ha utilizado el pipeline de análisis JAMP para realizar los análisis poblacionales (Elbrecht et al., 2018). Este pipeline incluye las siguientes etapas: 1) demultiplexación que permite organizar las secuencias NGS por librerías (sitios de colecta, réplicas, marcadores), 2) luego se asocian los reads (R1 y R2) complementarios, 3) se eliminan las secuencias de los primers

moleculares, 4) las secuencias de mala calidad son eliminadas según el máximo error esperado y 5) filtración de las abundancias de los reads, eliminación de los falsos haplotipos a partir de estrategia de Unoise (Edgar, 2016) y organización de los haplotipos en unidades taxonómicas operativas (OTU). La estrategia Unoise consiste en identificar y eliminar los haplotipos considerados como falsos con base en sus abundancias y su distancia al haplotipo más abundante (Figura 5).

Figura 6

Estrategia de Unoise para eliminar los falsos haplotipos.



Nota. Adaptado de (Edgar, 2016).

1.2.10 PRINCIPIOS DE LA GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones es una rama de la genética que se basa sobre la caracterización de la variabilidad genética (e.g. diversidad genética, frecuencias alélicas) junto con los principios fundamentales de la genética mendeliana (herencia de caracteres), herramientas matemáticas, estadísticas y modelos matemáticos para poder inferir sobre la historia evolutiva de las poblaciones.

La historia evolutiva de las poblaciones es consecuencia de las interacciones entre las principales fuerzas evolutivas: mutación, deriva genética, migración, y selección natural (Fernandez Piqueras et al., 2002; Halkett & Mita, 2017).

1.2.10.1 Genética mendeliana

La genética mendeliana tiene su origen con los trabajos realizados por el monje católico, Gregor Mendel, a mediados del siglo XIX sobre plantas de guisantes. Describió cómo se heredan los rasgos morfológicos de los padres a hijos a través de la transmisión de la información genética (Pierce & Pierce, 2017). La genética mendeliana describe los principios básicos de la herencia y permite predecir matemáticamente las características de la siguiente generación a partir del genotipo de los padres (Vizmanos Pérez, 2014).

1.2.10.2 Teoría de la evolución

Los fundamentos de la teoría de la evolución se basan sobre los trabajos de Charles Darwin y Alfred Russel Wallace. Parte de los trabajos más famosos de Charles Darwin fueron sobre los pinzones de las islas Galápagos. Mostró que los diferentes tipos de picos estaban adaptados a diferentes regímenes alimenticios y propuso que la evolución biológica de las especies se da a

partir de la selección natural, por competencia, la reproducción y los recursos alimenticios (Darwin, 1859). Alfred Russel Wallace trabajó en la misma época sobre las mariposas *Ornithoptera croesus* y vio cómo los animales eran seleccionados según su color, a partir de ello propuso que la evolución de las especies se da mediante la selección natural.

1.2.10.3 Ley de Hardy-Weinberg (HW)

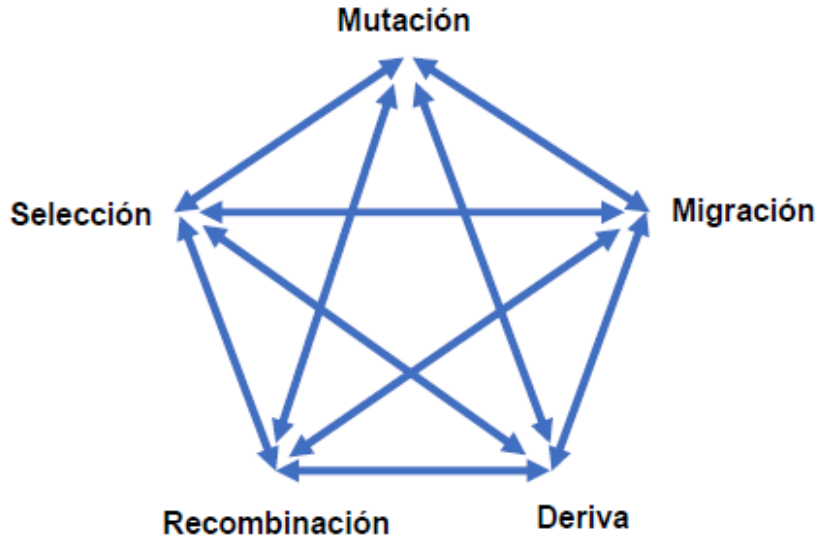
La ley de HW o conocida también como equilibrio de Hardy-Weinberg (modelo nulo), formulada por Godfrey Harold Hardy y Wilhelm Weinberg en 1908, describe cómo se distribuyen las frecuencias génicas y genotípicas en una población ideal que difícilmente se observa en condición natural. Pues, bajo esa ley, la población no puede evolucionar porque se considera que es una población aislada con talla infinita, en la cual no hay mutación, no hay selección natural y los individuos se reproducen al azar (panmixia), (Pierce & Pierce, 2017). Los desvíos a esa ley permiten evidenciar los cambios en las frecuencias alélicas y genotípicas para poder inferir sobre el régimen de reproducción, la estructura poblacional, los patrones de migración, el tamaño poblacional (N_e) y la historia evolutiva.

1.2.10.4 FUERZAS EVOLUTIVAS

Las fuerzas evolutivas son los mecanismos que explican cómo cambian las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones biológicas a lo largo del tiempo, estas fuerzas interactúan aumentando o al contrario reduciendo la variabilidad genética de las poblaciones (Vizmanos Pérez, 2014).

Figura 7

Interacción de las fuerzas evolutivas.



Notas. Adaptado de Halkett & Mita (2017).

1.2.10.4.1 Las Mutaciones

Las mutaciones son cambios aleatorios en la secuencia de ADN de un organismo debido a errores en el proceso de duplicación del ADN o por alteración debido a mecanismos externos por ejemplo UV o irradiación. La mutación es la fuente fundamental del polimorfismo genético ya que conduce a cambios directos en la secuencia de ADN (Fernandez Piqueras et al., 2002; Halkett & Mita, 2017). Las mutaciones modifican la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes, muchas de estas variantes suelen ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas pueden tener éxito y fijarse en la especie (Vizmanos Pérez, 2014). En las especies que se reproducen sexualmente, las mutaciones que tienen un efecto sobre la evolución son aquellas que ocurren en la línea germinal (Halkett & Mita, 2017; Pierce & Pierce, 2017), solo estas mutaciones se pueden

ser heredadas por la descendencia. La probabilidad de que ocurra una mutación en la línea germinal es muy pequeña, por lo tanto, las mutaciones por sí solas no tienen mucho efecto en las frecuencias alélicas de una población. Las mutaciones pueden ser neutras, ni afecta la expresión de un gen y ni el fenotipo, y las mutaciones favorables o deletéreo modifican la expresión del gen.

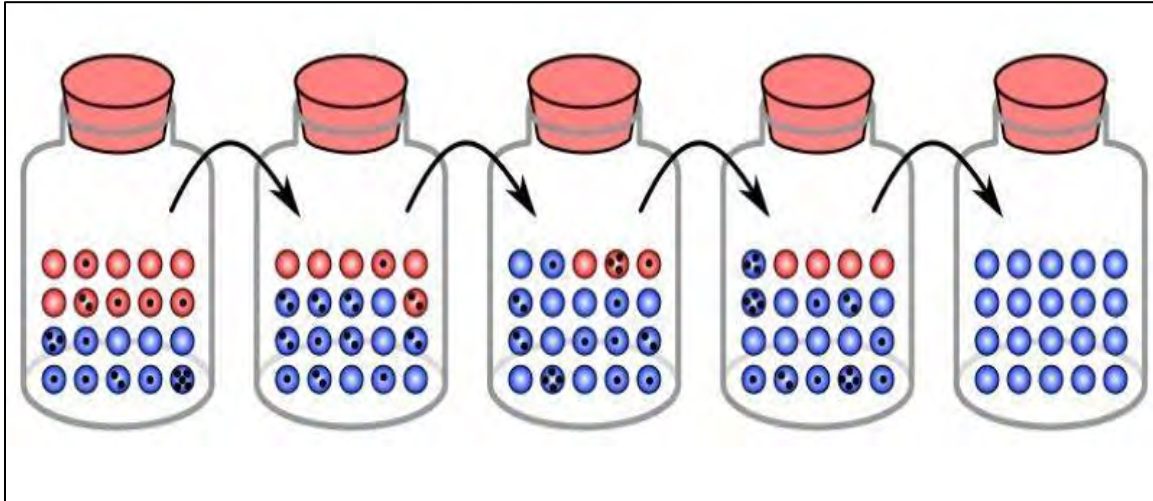
1.2.10.4.2 La deriva genética

La deriva genética es la variación de las frecuencias alélicas entre generaciones debido al efecto de un sorteo aleatorio de los alelos entre generaciones (Griffiths et al., 2002; Honnay, 2013), por consecuencia del muestreo no aleatorio en la reproducción, en cada generación se lleva a un cambio en las frecuencias alélicas que, a lo largo de las generaciones, puede llevar a la pérdida y la fijación de unos alelos en una población. En general, se pierden los alelos menos frecuentes y se fijan los alelos más frecuentes, resultando una disminución de la diversidad genética de la población. El efecto de la deriva genética es muy importante en las poblaciones de pequeño tamaño y a partir de un cierto incremento de tamaño, este efecto deja de tener importancia y se estabilizan las frecuencias génicas si no hay procesos de selección ni mutaciones según el equilibrio de Hardy-Weinberg (Vizmanos Pérez, 2014).

En la naturaleza se pueden observar eventos que favorecen a la deriva genética como los efectos fundadores, cuando se establece una población a partir de unos pocos individuos (colonización de un nuevo hábitat) o los efectos de cuello de botella debido a reducción del tamaño de una población (e.g. epidemia) (Vizmanos Pérez, 2014).

Figura 8

Deriva genética.



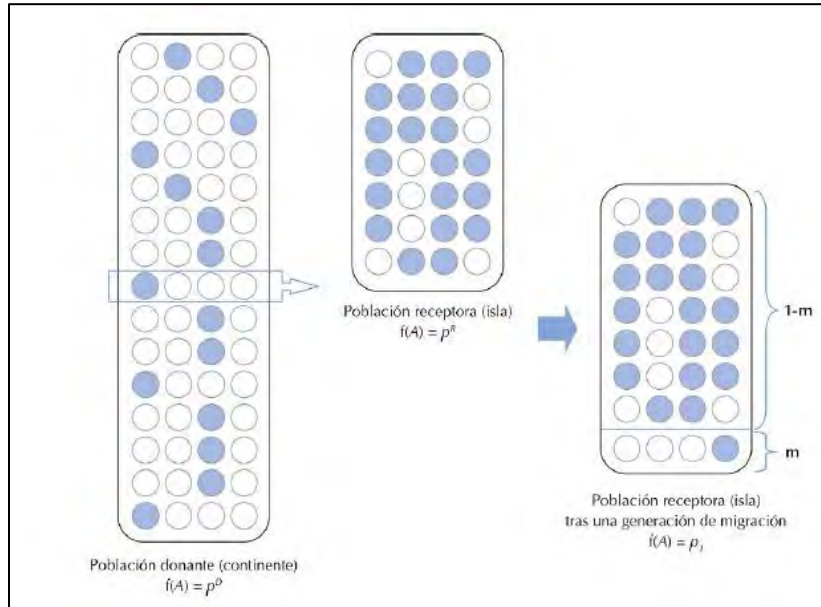
Nota. La contribución de las frecuencias alélicas en cada generación varía algunos se eliminan y otros se fijan.

1.2.10.4.3 La migración

El proceso de migración consiste en el cambio en la frecuencia alélica de una población mediante la introducción de alelos de otra población, el efecto de la migración depende tanto de la magnitud de la migración y de la diferencia en las frecuencias alélicas entre la población de origen y receptora (Pierce & Pierce, 2017), la migración es una fuerza de mayor intensidad que la mutación, tiende a homogeneizar las frecuencias en ausencia de otras fuerzas.

Figura 9

Modelo de Migración.



Notas. Figura adaptada de (Vizmanos Pérez, 2014) pag. 88 dónde tasa m de individuos de la población donante entran a formar parte de la población receptora. En la siguiente generación m alelos de la isla serán originarios de la población donante (y por ello tendrán sus mismas frecuencias alélicas), mientras que el resto $(1 - m)$ serán originarios de la población de la isla. El nuevo acervo genético deberá tener en cuenta la entrada de los nuevos alelos.

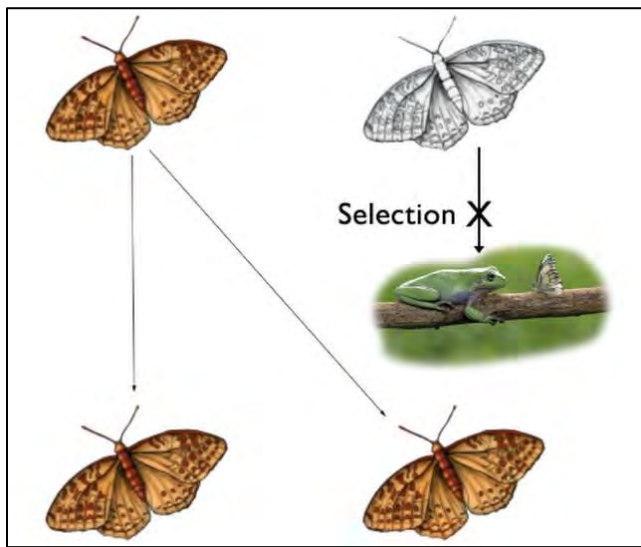
1.2.10.4.4 Selección Natural

La selección natural está relacionada con una reproducción diferencial entre variantes genéticas, algunas de ellas tienen una mayor probabilidad de supervivencia y entonces una mayor probabilidad de reproducirse y transmitir la variación favorable a la siguiente generación (Vizmanos Pérez, 2014). La selección natural solamente actúa sobre los genes involucrados en el proceso de selección (e.g. color, Figura 10) en oposición a la deriva genética que actúa sobre todo el genoma. La selección depende del valor selectivo de los alelos, un alelo favorable aumenta en

frecuencia dentro de una población y un alelo desfavorable disminuye en frecuencia dentro de una población, mientras que un alelo neutro sin selección fluctúa dentro de la población bajo la deriva genética hasta su fijación o descarte (Griffiths et al., 2002). La selección natural puede disminuir la diversidad alélica de un gen, pero puede mantener el polimorfismo.

Figura 10

Modelo simple de selección natural.



Notas. la mariposa blanca es visible para la rana mientras que mariposas marrones si pueden mimetizarse y se va incrementar su genotipo dentro de la población.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 ÁREA DE PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Las muestras de ADN, las aletas caudales, y los individuos de *A. agassizii* fueron colectados en 3 zonas, en las cuales se encuentran pequeñas redes de quebradas tributarios de los ríos; Ucayali, Marañón y Nanay, ubicados en la región Loreto. En estas zonas el complejo de especies *A. agassizii* es muy abundante y ocurren las especies Sp1 y Sp3 (Estivals et al., 2020). Permiso de colecta con resolución directoral N° 00819-2024-PRODUCE/DGPCHDI.

A. Zona 1

Es la zona principal de muestreo del estudio, corresponde a los alrededores del distrito de Jenaro Herrera, Loreto. Está conformada por una red compleja de arroyos que desembocan en diferentes partes a la margen derecha del río Ucayali. En esta zona se definieron cinco sitios de colecta en los cuales se colectaron, muestras de agua para el ADN, tejido de *A. agassizii*, e individuos de uno de los cinco sitios de colecta (Tabla 1). Cabe recalcar que en la zona 1 solo se encuentra la especie *A. agassizii* Sp1.

B. Zona 2

Pertenece al distrito Nauta, margen izquierdo del río Marañón dentro del sistema de la quebrada Zaragoza. Dentro de esta zona se ha definido un sitio de colecta en el cual se colectó muestras de agua para, ADN, tejido de *A. agassizii* e individuos (Tabla 1). En la zona 2 solamente se encuentra *A. agassizii* Sp1, las poblaciones de la zona 2 son geográficamente aisladas de las otras poblaciones de la zona 1 y muy diferenciadas (Estivals et al. 2022).

C. Zona 3

Corresponde a la llanura aluvial de la margen derecha del río Nanay, ubicada cerca del pueblo de Santa Clara. En esta zona, se encuentra solamente *A. agassizii* Sp3. Cabe indicar que *A. agassizii* Sp3 fue utilizada en este estudio como grupo externo y probar la especificidad de la metodología diseñada para *A. agassizii* Sp1. Los individuos fueron colectados en un solo sitio de colecta.

Tabla 1

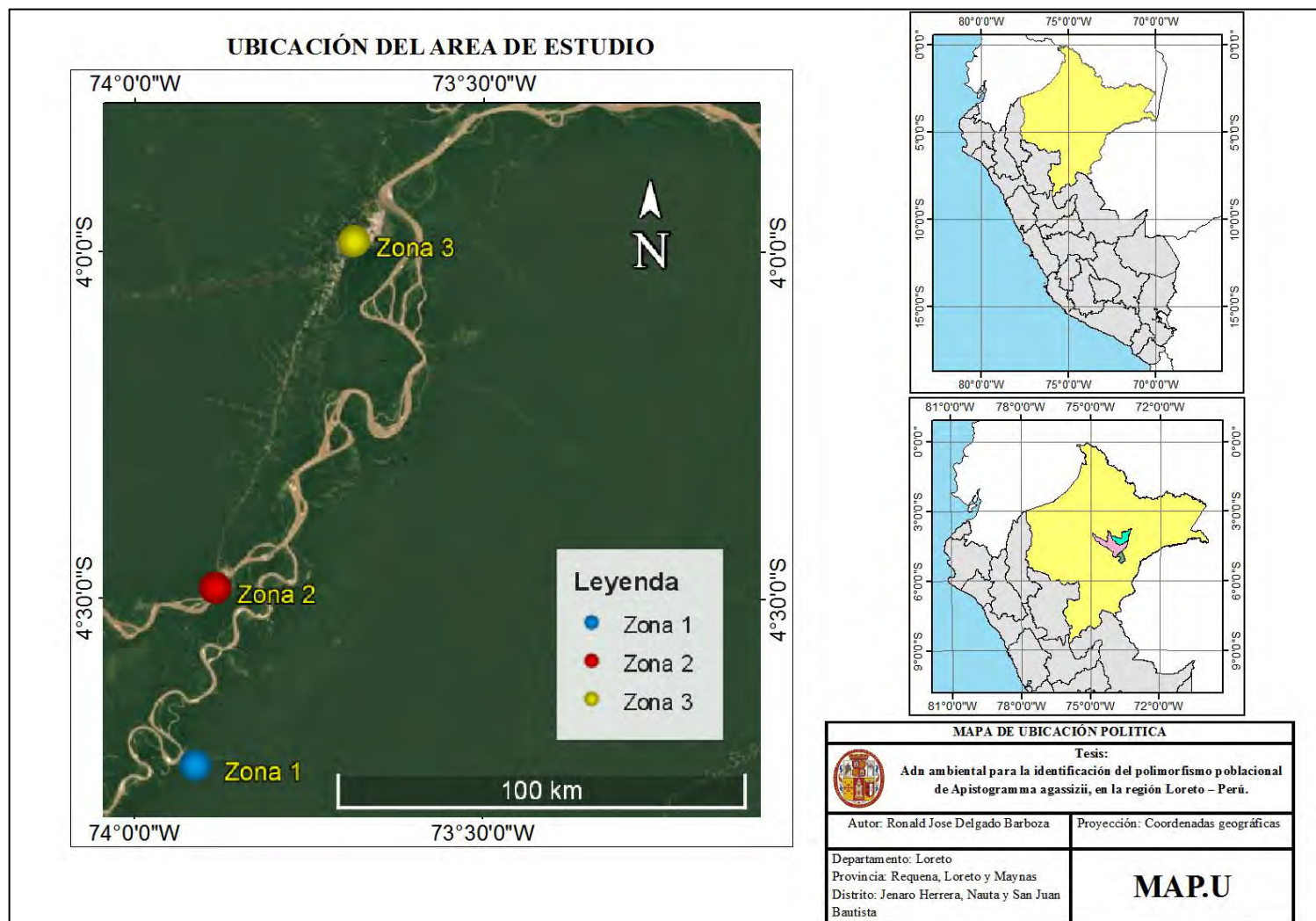
Datos de colecta de muestras de aleta de tejido, individuos de A. agassizii y ADN, en las tres zonas de estudio.

Id zona	Sitios	Número de Individuos	Número de Cartuchos de ADN	Litros Filtrados (L)	Coordenadas	
					Longitud	Latitud
1	JH9	19 (solo aletas)	1	33	-73.657508	-4.941098
1	JH11	42 (solo aletas)	1	21	-73.6538611	-4.9273056
1	JH18-1	22 (solo aletas)	1	16	-73.64666667	-4.8993333
1	JH19-2	38 (solo aletas)	1	22	-73.6551667	-4.8881667
1	JH22	28	1	38	-73.66	-4.9119167
2	NAUTA-1	32	1	14	-73.5993889	-4.4743333
3	Nanay	5	-	-		
	Blanco en campo	0	1	14		
	Acuario*	15	1	20		
	Blanco en acuario	0	1	20		

Nota. *de los 15 individuos, cinco pertenece al sitio JH22 (Zona 1), cinco al sitio Nauta-1 (Zona 2) y cinco al sitio Nanay (Zona

Figura 11

Ubicación del área de estudio.



Nota. Fuente: Elaboración propia con imágenes extraídas de Google Earth Pro

2.1.2 ÁREA DE PROCESAMIENTO

El diseño de la condición controlada, y la construcción de la base de referencia (extracción, amplificación y secuenciación Sanger), se realizaron en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM), del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana IIAP-Iquitos. La extracción de ADN, amplificación, construcción de las bibliotecas genómicas y la secuenciación NGS fueron realizadas en el Instituto de Ciencias de la Evolución de Montpellier (ISEM, Montpellier, Francia) y la plataforma Genseq (Montpellier, Francia) bajo la dirección de Dr. Guillain Estivals (IIAP) y Dr. Nicolas Hubert (IRD). Mientras todos los análisis bioinformáticos e inferencias poblacionales fueron realizados en el (LBGM) IIAP- Iquitos.

Figura 12

Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) IIAP-Iquitos.



2.1.3 Material Biológico

- 4 mg de aleta caudal de *A. agassizii* de 196 individuos
- 15 individuos de *A. agassizii* (5 del sitio JH 22 de la zona 1, 5 del sitio Na-1 de la zona 2 y 5 de la zona 3)
- 9 cartuchos de ADN ambiental (1 en condición de pecera + 1 blanco, 6 en condición natural (i.e. sitios de colecta) + 1 blanco)

2.1.4 Materiales de laboratorio

A. Equipos

- Analizador genético marca Applied Biosystems modelo ABI 3500XL de 24 capilares
- Termociclador marca Eppendorf modelo Mastercycler® nexus gradient.
- Thermomixer marca Eppendorf modelo Thermomixer® C.
- Qubit marca Invitrogen™ modelo Qubit™ 4.
- Espectrofotómetro marca Thermo Scientific™ modelo NanoDrop™ Eight.
- Centrífuga refrigerada marca Eppendorf modelo 5430 R.
- Centrífuga al vacío marca Eppendorf modelo Concentrator plus.
- Cámara de bioseguridad marca Labconco modelo Purifier® Logic®+ Clase II, Tipo A2.
- Autoclave marca Yamato Scientific modelo SE 310.
- Estufa marca Memmert modelo Serie UN.
- Congelador menos -20°C marca Bosch modelo intelligent freezer 32.
- Fotodocumentador marca UVP modelo UVsolo touch.
- Impresora marca Mitsubishi electric modelo P95DW.

- Balanza analítica marca Sartorius modelo Extend.
- Cámara de electroforesis marca Cleaver Scientific modelo MultiSUB Choice.
- Fuente de electroforesis marca Biometra modelo power pack p25T.
- Destilador marca Daihan Scientific modelo WST-4.
- Sistema para preparar agua ultrapura marca Merck modelo Milli-q.
- Baño maría marca VWR modelo General Purpose Water Bath.
- Micropipetas marca Eppendorf modelo Research® plus.
- Pipeta multicanal marca Sartorius.
- Vortex marca Thermo scientific modelo maxi mix II.
- Mini centrífuga marca Thermo scientific modelo myspin 6.
- Cámara de flujo laminar marca StarLab. Modelo GuardOne®.
- Bomba de presión de agua marca SEAFLO modelo SFDP1-012-035-21.
- Acuario
- Computadora marca hp modelo Z2 core i9 128Gb RAM sistema operativo Linux Ubuntu
- Computadora marca Dell modelo Optiplex 7000 core i7.

B. Reactivos

- Buffer de extracción de ADN (CTAB 5%, NaCl 5M, EDTA 0.5M pH 8, Tris 1M,)
- Buffer longmire para conservación de ADNa (Tris-HCL 1 M pH 8.0, EDTA 0.5 M pH 8.0, NaCl 5 M, SDS al 20% (p/v)
- Buffer ATL (Qiagen)
- Proteinasa K 10mg/ml

- Cloroformo marca (Merck)
- Eugenol 10%
- Isopropanol absoluto
- Isopropanol al 65%
- Agua milli-Q
- Agua ultra pura invitrogen
- Hipoclorito de sodio 2.5% (lejía)
- Alcohol etílico 96%
- Alcohol etílico 70%
- Alcohol etanol 60%
- Primers D-loop Forward y Reverse 10 μ M (Eurogentec)
- Primers Cytb Forward y Reverse 10 μ M (Eurogentec)
- Primers ND5 Forward y Reverse 10 μ M (Eurogentec)
- Primers tRNA Forward y Reverse 10 μ M (Eurogentec)
- Kit de amplificación KOD Hot Start DNA polymerase (Novagen)
- Kit de amplificación AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems)
- Kit de extracción NucleoSpin soil (Macherey-Nagel)
- Marcado de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA (thermo scientific)
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Buffer TBE 1X
- GelRed 1.5% p/v
- Agarosa 2.5 %

- ExoSAP-IT (Applied Biosystem)
- Kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystem)
- Formamida

C. Consumibles y fungibles

- 9 cartuchos filtrantes (Watterra).
- Manguera transparente de 1/4''
- Tubos nalgene centrifuge ware de 50 ml (thermo scientific)
- Tubos de 1.5 y 2 ml
- Microtubos de 0.2 y 0.5 ml
- Tiras de tubos de 0.2 y 0.5 ml
- Tips con filtros y sin filtro de 10, 200, 1000, 10000 ml
- Cajas para tubos de 1.5ml
- Gradilla para microtúbulos.
- Frascos para autoclave
- Bolsas de plásticos 25x35cm
- Mandiles
- Guantes de nitrilo
- Hielo

D. Programas bioinformáticos

- Sistema operativo Linux Ubuntu
- Software Ugene versión 52.1

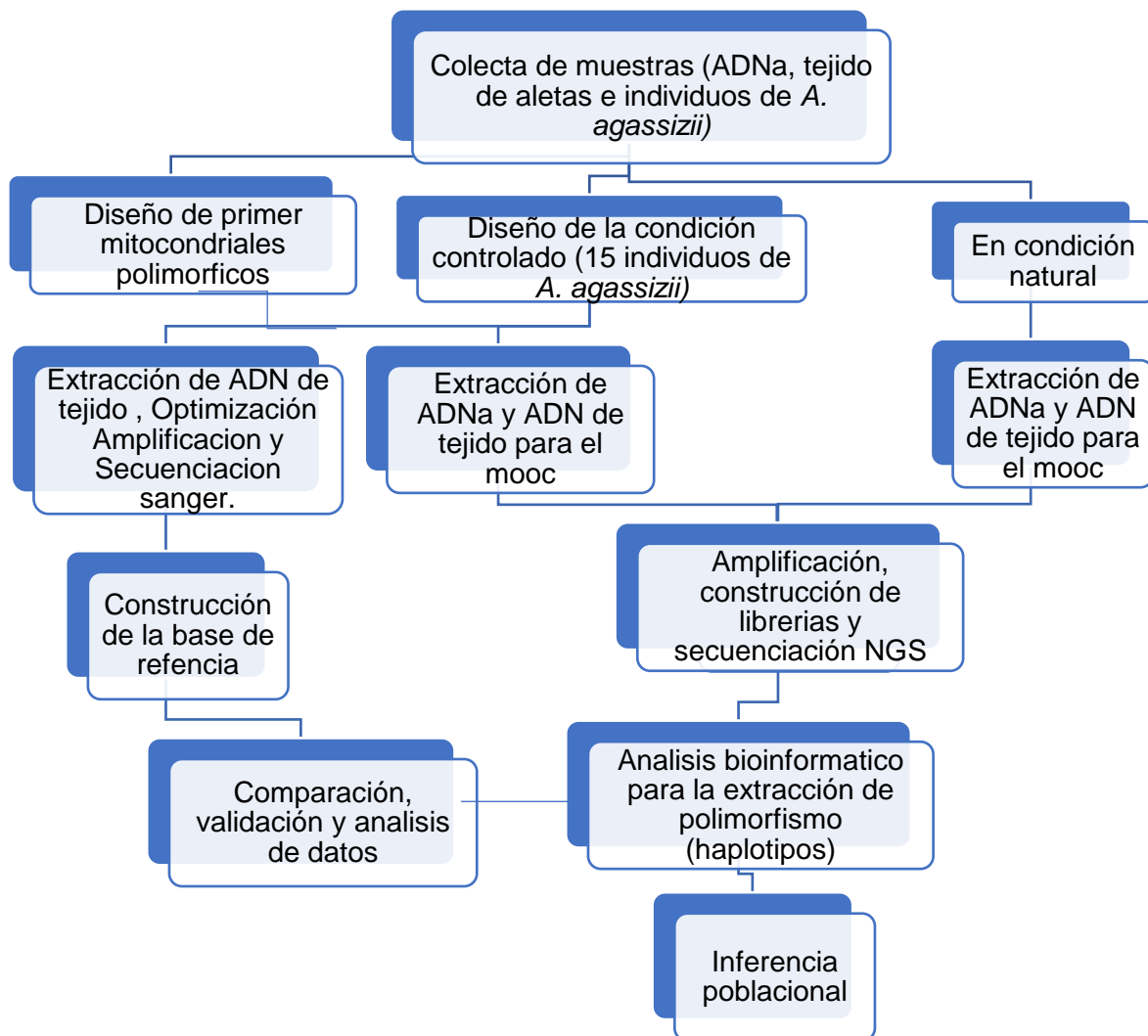
- Software Primer3 versión 2.6.1
- Software ClustalX versión 2.1
- DnaSP versión 6.5
- Software R
- Notepad++ versión 8.6.7
- IQ-TREE versión 3.0.1
- Fig Tree versión 1.4.4

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La Investigación es de tipo básica aplicada enfoque cuantitativo, nivel descriptivo y corte transversal, de alcance explicativo y según el diseño es de tipo no experimental.

2.2.2 FLUJOGRAMA DE LA INVESTIGACIÓN



2.3. MÉTODOS

2.3.1 PLANTEAMIENTO DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA

Para determinar si a partir del metabarcoding de ADN se puede identificar el polimorfismo poblacional de *A. agassizii* en la región Loreto, se ha buscado las regiones más polimórficas del genoma mitocondrial de *A. agassizii* y se ha diseñado primers moleculares para amplificar específicamente las regiones identificadas. La optimización de la amplificación fue realizada primero a partir de ADN extraídos de las aletas de individuos de *A. agassizii*. Después, una primera fase de validación del enfoque de metabarcoding de ADN fue realizada en una pecera. El objetivo de esa fase de validación preliminar fue de determinar si en una condición controlada (pecera) es posible amplificar y secuenciar el ADN de 15 individuos *A. agassizii* y a partir del agua (ADNa). Esa primera fase de validación ha necesitado primero la construcción de una base de datos de referencia a partir de las secuencias de cada marcador molecular (secuenciados por método Sanger) obtenidos para cada uno de los 15 individuos introducidos en la pecera. Así, se pudo determinar el número de variante (haplotipo) de los cuatro marcadores moleculares dentro de los 15 individuos utilizados en la condición pecera y comparar esa información con los haplotipos obtenidos a partir del metabarcoding de ADN (secuenciación NGS) del agua de la pecera y también, a partir de una mezcla equimolar de los ADN (mooc) extraídos de los 15 individuos. Para ser validado el método, se debería obtener el mismo número de haplotipos entre los tres tipos de ADN y metodología de secuenciación. Una última fase de validación fue realizada en condición natural comparando, para cada sitio de colecta, el número de haplotipos obtenidos a partir del metabarcoding ADN y el número de haplotipos obtenidos a partir del metabarcoding de mezclas equimolares ADN (mooc) extraídos de las aletas de los individuos colectados. Para ser validado el método, el número de

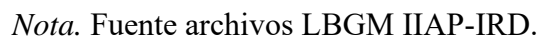
haplotipo identificado a partir del metabarcoding de ADNa debería ser igual o mayor al número de haplotipos identificados a partir de las mezclas de ADN.

2.3.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES POLIMÓRFICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE *A. agassizii* Y DISEÑO DE LOS PRIMERS

A partir de mitogenomas obtenidos para las tres especies de *A. agassizii* (Sp1, Sp2 y Sp3, IIAP-IRD), se diseñaron cuatro pares de primers (D-loop, ND5, Cytb y tRNA) correspondientes a los cuatro genes mitocondriales más polimórficos. Para identificar las regiones más polimórficas, se alinearon las secuencias de los mitogenomas con el software UGENE (Okonechnikov et al., 2012) y se buscó el mayor polimorfismo del genoma mitocondrial utilizando el software DNAsp (Rozas et al., 2017) con una ventana corrediza de 250 pb y un paso de 25 pb. El tamaño de 250 pb corresponde al tamaño generalmente enfocado en los estudios de metabarcoding de ADNa debido al estado de degradación del ADN dentro de las muestras ambientales y el tipo de secuenciación (2 x 300 pb, Miseq Illumina).

A partir del número de sustituciones encontrado por cada ventana corrediza de 250pb se ordenó el número de sustituciones del más grande al más pequeño y se diseñaron los primers dentro de las regiones que presentaban las mejores características para los primers (talla del primer, especificidad, contenido en GC, autoincompatibilidad) y el mayor polimorfismo de las secuencias con la ayuda del programa Primer3 (Untergasser et al., 2012).

Genoma mitocondrial de Apistogramma agassizii sp1.



37

para cada marcador que consiste en agregar una extensión en la parte 5' de la secuencia forward y reversa TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG y GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG, respectivamente. Estas extensiones son necesarias para la fijación de los index en la etapa de construcción de las librerías. Además, entre las extensiones y las secuencias de los primers se agregaron de 1 a 3 nucleótidos (N) para evitar la saturación de la señal al momento de la secuenciación Illumina Miseq (Tabla 3).

Tabla 2

Secuencia de los Primers usados para la secuenciación Sanger.

Nombre de Primers	Secuencias (5'-3')
D-loop_F	5'-GTTTCTTCGCGCCTAAACCC-3'
D-loop_R	5'-CTTCGGCGTGTGAAAACATTA-3'
tRNA_F	5'-GCCAGGATTCTGGCTAAACTAC-3'
tRNA_R	5'-TGGGGACTTGGTATAACTAGACTG-3'
ND5_F	5'-CCGTAACAGTTCTTGGCCTC-3'
ND5_R	5'-GAGGTAGGTTTTTACCAGGCCT-3'
Cytb_F	5'-GGCCTCTGCCTAGTCTCCCA-3'
Cytb_R	5'-GTAGCCCACGAAAGCGGTT-3'

Tabla 3

Cócteles de 3 pares de Primers para cada marcador utilizado en la secuenciación NGS.

Nombre de Primers	Secuencias (5'-3')
D-loop_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNGTTTCTTCGCGCCTAAACCC
D-loop_F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNGTTTCTTCGCGCCTAAACCC
D-loop_F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGTTTCTTCGCGCCTAAACCC
tRNA_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNGCCAGGATTCTGGCTAAACTAC
tRNA_F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNGCCAGGATTCTGGCTAAACTAC
tRNA_F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGCCAGGATTCTGGCTAAACTAC
ND5_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNCCGTAACAGTTCTTGGCCTC
ND5_F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNCCGTAACAGTTCTTGGCCTC
ND5_F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNCCGTAACAGTTCTTGGCCTC
Cytb_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNGGCCTCTGCCTAGTCTCCCA
Cytb_F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNGGCCTCTGCCTAGTCTCCCA
Cytb_F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGGCCTCTGCCTAGTCTCCCA
D-loop_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNCTTCGGCGTGTGAAAACATTA
D-loop_R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNCTTCGGCGTGTGAAAACATTA
D-loop_R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNCTTCGGCGTGTGAAAACATTA
tRNA_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNTGGGGACTTGGTATAACTAGACTG
tRNA_R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNTGGGGACTTGGTATAACTAGACTG
tRNA_R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNTGGGGACTTGGTATAACTAGACTG
ND5_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNGAGGTAGGTTTTTACCAGGCCT
ND5_R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNGAGGTAGGTTTTTACCAGGCCT
ND5_R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGAGGTAGGTTTTTACCAGGCCT
Cytb_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNGTAGCCACGAAAGCGGTT
Cytb_R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNGTAGCCACGAAAGCGGTT
Cytb_R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGTAGCCACGAAAGCGGTT

2.3.3. OPTIMIZACIÓN, AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES Y CONSTRUCCIÓN DE LA BASE DE DATOS DE REFERENCIA

2.3.3.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LOS TEJIDOS

La extracción del ADN de los 15 individuos fue realizada a partir de un protocolo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) modificado de Doyle & Doyle (1987). Cada individuo fue anestesiado previamente con una solución de Eugenol al 10% (1 ml de Eugenol al 10% para 1L de agua), se cortó un pedazo de aleta (4 mg) y se agregó a un tubo de 1,5 ml con 500 µl de tampón CTAB (CTAB 5%, NaCl 5M, EDTA 0,5M pH 8, Tris 1M), 10 µl de proteinasa K (10mg.ml⁻¹) y se incubó a 60°C durante dos horas. Después, se agregaron 500 µl de cloroformo en cada tubo, se agitaron muy lentamente durante 5 min y se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min. El sobrenadante de la fase superior se pipeteó y se añadió a un nuevo tubo de 1,5 ml con 600 µl con isopropanol a -20°C y se almacenó a -20°C durante 2 horas. Después se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 600 µl de etanol al 70%, se agitaron los tubos en vórtex, se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante, renovando la operación una vez. Se colocaron los tubos en una estufa regulada a 37°C para secar el precipitado y se añadieron 50 µl de agua ultrapura para resuspender el ADN (UltraPure Distilled Water, Invitrogen).

Cada muestra fue posteriormente, cuantificada por espectrofotometría con un equipo NanoDrop Eight de la marca Thermo Scientific. La concentración de ADN se evaluó a partir de la absorbancia a 260 nm, y la calidad del ADN se estimó mediante el cociente 260/280, siendo aceptable un valor entre 1.8 y 2.0.

2.3.3.2 AMPLIFICACIONES, SECUENCIACIONES Y EDICIONES DE LAS SECUENCIAS

Las amplificaciones se realizaron para cada uno de los marcadores mitocondriales (D-loop, ND5, Cytb y tRNA) con los primers moleculares diseñados (Tabla 2) a partir de las extracciones de ADN de los 15 individuos de *A. agassizii*.

2.3.3.2.1 Optimización y amplificación del marcador D-loop

Las muestras de ADN fueron amplificadas utilizando un kit de amplificación de KOD Hot Start DNA Polymerase Novagen, a partir de la configuración de reacción estándar del kit de amplificación para un volumen de 10 µl (tabla 4). La optimización de la amplificación se realizó primero a partir de una gradiente de temperatura sobre la temperatura de hibridación (55°C, 56.3°C, 57.2°C, 58.1°C, 58.9°C, 59.8°C, 60.7°C y 61.8°C), sobre siete muestras de ADN y un blanco para controlar eventuales problemas de contaminaciones, con un termociclador de marca Eppendorf flexlid. La calidad de la amplificación fue controlada a partir de una electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % en una solución de TBE 1X. El gel polimerizado fue depositado en una cubeta de electroforesis llenada con buffer TBE 1X. Dentro de cada pozo, se depositaron una mezcla de 3 µl de producto PCR con 3 µl de GelRed (intercalante de ADN). Cada muestra y el control negativo fue depositado en pozos independientes y se colocó en otro pozo 0.5 µl de marcador molecular de peso 100 pb a 1000 pb para controlar el tamaño de los productos amplificados. La migración fue realizada a 100 voltios por 40 minutos. Al cabo de la migración el gel de agarosa fue visualizado en un transiluminador UVP UV solo touch e impreso en Print MITSUBISHI ELECTRIC.

Se determinó que las mejores amplificaciones fueron a 58.9°C de temperatura de hibridación. Después, se realizó otra amplificación con los mismos individuos fijando la temperatura de hibridación a 58.9°C con una gradiente de volúmenes de MgSO₄: 0.4 µl, 0.5 µl, 0.6 µl, y 0.7 µl. Se determinó que las mejores amplificaciones fueron con 0.6 µl de MgSO₄. Las 15 muestras de ADN fueron después amplificadas a partir de las nuevas condiciones (Tabla 4 y 5), y un control negativo.

Tabla 4

Volúmenes de reacción utilizados para la amplificación del marcador D-loop.

Componentes	Volumen
H₂O	5.6 µl
10x Buffer	1 µl
dNTPs	1 µl
MgSO₄	0.6 µl
D-loop Forward	0.3 µl
D-loop Reverse	0.3 µl
Taq polimerase	0.2 µl
ADN	1 µl
Volumen total de reacción	10 µl

Nota. La secuencia de oligonucleótidos de primers D-loop ver en la (Tabla 2)

Tabla 5

Condiciones del programa de amplificación (PCR) para el marcador D-loop.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Activación de la polimerasa	94 °C	10 min	
Denaturación	94 °C	30 sec	} 35 ciclos
Hibridación	58.9 °C	30 sec	
Extensión	72 °C	15 sec	
Extensión final	72 °C	5 min	

2.3.3.2.2 Optimización y amplificación del marcador ND5

Las muestras fueron amplificadas a partir de extractos totales de ADN, para lo cual se utilizó el kit AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems), la fase optimización se realizó a partir de 7 muestras +1 blanco, siguiendo el protocolo del fabricante, así mismo se agregó 2 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) un compuesto orgánico con la finalidad de aumentar la especificidad (Tabla 6), en las condiciones del programa de amplificación se agregó una fase touchdown con la finalidad de aumentar la especificidad y evitar la amplificación de secuencias no deseadas (Tabla 7), la amplificación se corroboró mediante electroforesis, y después se amplificó las muestras restantes.

Tabla 6

Volúmenes de reacción utilizados para la amplificación del marcador ND5.

Componentes	Volumen 1x
AmpliTaq Gold 360	10 µl
H₂O	6.4 µl
DMSO	2 µl
ND5 Forward	0.3 µl
ND5 Reverse	0.3 µl
ADN	1 µl
Volumen total de reacción	20 µl

Nota. La secuencia de oligonucleótidos de primers ND5 ver en la (Tabla 2)

Tabla 7

Condiciones del programa de amplificación (PCR) para el marcador ND5

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Activación de la polimerasa	95 °C	10 min	
	95 °C	30 sec	} 10 ciclos
TouchDown	*68 °C	30 sec	
	72 °C	20 sec	
Denaturación	95 °C	30 sec	} 35 ciclos
Hibridación	58.9 °C	30 sec	
Extensión	72 °C	15 sec	
Extensión final	72 °C	5 min	

Nota. * En la fase de TouchDown la temperatura descende en 1°C en cada ciclo hasta llegar a la temperatura de Hibridación.

2.3.3.2.3 Optimización y amplificación del marcador Cytb

Las muestras de ADN fueron amplificadas con el kit KOD Hot Start DNA Polymerase de Novagen, en la fase de optimización se trabajó con una concentración de ADN de 50 ng/ μ l siguiendo el protocolo del fabricante con las 7 primeras muestras + 1 blanco (Tabla 8), y las condiciones de amplificación de la (Tabla 9), donde las muestras amplificaron correctamente y fueron corroborados mediante electroforesis y después se amplificó las restantes muestras de ADN.

Tabla 8

Volúmenes de reacción utilizados para la amplificación del marcador Cytb.

Componentes	Volumen 1x
H₂O	5.6 μ l
10x Buffer	1 μ l
dNTPs	1 μ l
MgSO₄	0.6 μ l
Cytb Forward	0.3 μ l
Cytb Reverse	0.3 μ l
Taq polimerase	0.2 μ l
ADN	1 μ l
Volumen total de reacción	10 μ l

Nota. La secuencia de oligonucleótidos de primers Cytb ver en la (tabla 2)

Tabla 9

Condiciones del programa de amplificación (PCR) para el marcador Cytb.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Activación de la polimerasa	94°C	10 min	
Denaturación	94 °C	30 sec	} 35 ciclos
Hibridación	58.9 °C	30 sec	
Extensión	72 °C	15 sec	
Extensión final	72 °C	5 min	

2.3.3.2.4 Optimización y amplificación del marcador tRNA

La amplificación del marcador tRNA se realizó con el kit AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems), con muestras de ADN con una concentración de 20 ng/ µl, y se agregó BSA (albúmina sérica bovina) 0.6 µl por cada reacción (Tabla 10) y las condiciones de amplificación del termociclador se detalla en la (Tabla 11). La fase optimización se realizó con 7 muestras + 1 blanco y se corroboraron mediante electroforesis y luego se amplificaron las restantes 8 muestras.

Tabla 10

Volúmenes de reacción utilizados para la amplificación del marcador tRNA.

Componentes	Volumen 1x
AmpliTaq Gold 360	10 µl
H₂O	8.24 µl
BSA	0.16 µl
ND5 Forward	0.3 µl
ND5 Reverse	0.3 µl
ADN	1 µl
Volumen total de reacción	20 µl

Nota. La secuencia de oligonucleótidos de primers tRNA ver en la (tabla 2)

Tabla 11

Condiciones del programa de amplificación (PCR) para el marcador tRNA.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Activación de la polimerasa	95 °C	10 min	
	95 °C	30 sec	} 10 ciclos
TouchDown	*68 °C	30 sec	
	72 °C	20 sec	
Denaturación	95 °C	30 sec	} 35 ciclos
Hibridación	58.9 °C	30 sec	
Extensión	72 °C	15 sec	
Extensión final	72 °C	5 min	

Nota. * En la fase de TouchDown la temperatura descende en 1°C en cada ciclo hasta llegar a la temperatura de Hibridación.

2.3.4 SECUENCIACIÓN

2.3.4.1 Purificación de los productos PCR con EXO SAP

Los productos PCR de cada uno de los individuos (15) y por cada marcador fueron purificados para eliminar los restos de primers y de nucleótidos. Para cada uno de ellos, se pipeteo 6 µl de producto PCR, se agregó un volumen de 2.4 µl de EXO SAP y se incubó a 37° C por 15 minutos y 80°C por 15 minutos.

2.3.4.2 Reacción de secuenciación

A partir de los productos PCR purificados (6 µl + 2.4 µl) para cada individuo y cada marcador, se realizaron dos reacciones de secuenciación, uno para el sentido forward y otro para el sentido reversa (Tabla 12), y las condiciones en el termociclador se detallan en la (Tabla 13).

Tabla 12

Reacción de secuenciación para el sentido forward y sentido reverse.

Reacción en sentido forward	Volumen 1X	Reacción en sentido reverse	Volumen 1X
H ₂ O	4.4 µl	H ₂ O	4.4 µl
Big Dye	0.8 µl	Big Day	0.8 µl
Primer Forward	0.8 µl	Primer Reverse	0.8 µl
Producto PCR	4 µl	Producto PCR	4 µl
VOLUMEN TOTAL	10 µl	VOLUMEN TOTAL	10 µl

Tabla 13*Condiciones de secuenciación.*

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
1	96 °C	1 min	1 ciclo
2	96 °C	15 sec	30 ciclos
3	50 °C	15 sec	
4	60 °C	4 min	

2.3.4.3 Purificación de la reacción de secuenciación.

La Purificación de las reacciones de secuenciación se realizó agregando 40 µl de Isopropanol al 65% (para una reacción de secuenciación de 10 µl), y se centrifugó por 30 segundos a 1400 rpm a 4°C, luego se dejó a temperatura ambiente en la centrífuga por 20 minutos, y después se centrifugaron a 14000 rpm por 25 minutos a 4°C. Se removieron el isopropanol por inversión de los tubos y se secó las tapas en papel y luego se agregaron 200 µl de etanol al 60%, se hizo un vortex antes de centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos a 4 °C (el lavado con etanol al 60% se repitió dos veces), después se dejó secar en la centrífuga al vacío por 15 minutos. Las muestras de la reacción de secuenciación se resuspendieron con 10 µl formamida se denaturaron a 95°C por 3 minutos y a 4°C por 2 minutos, finalmente se transfirieron a la placa de secuenciación y fueron analizados con el analizador genético ABI 3500XL de 24 capilares.

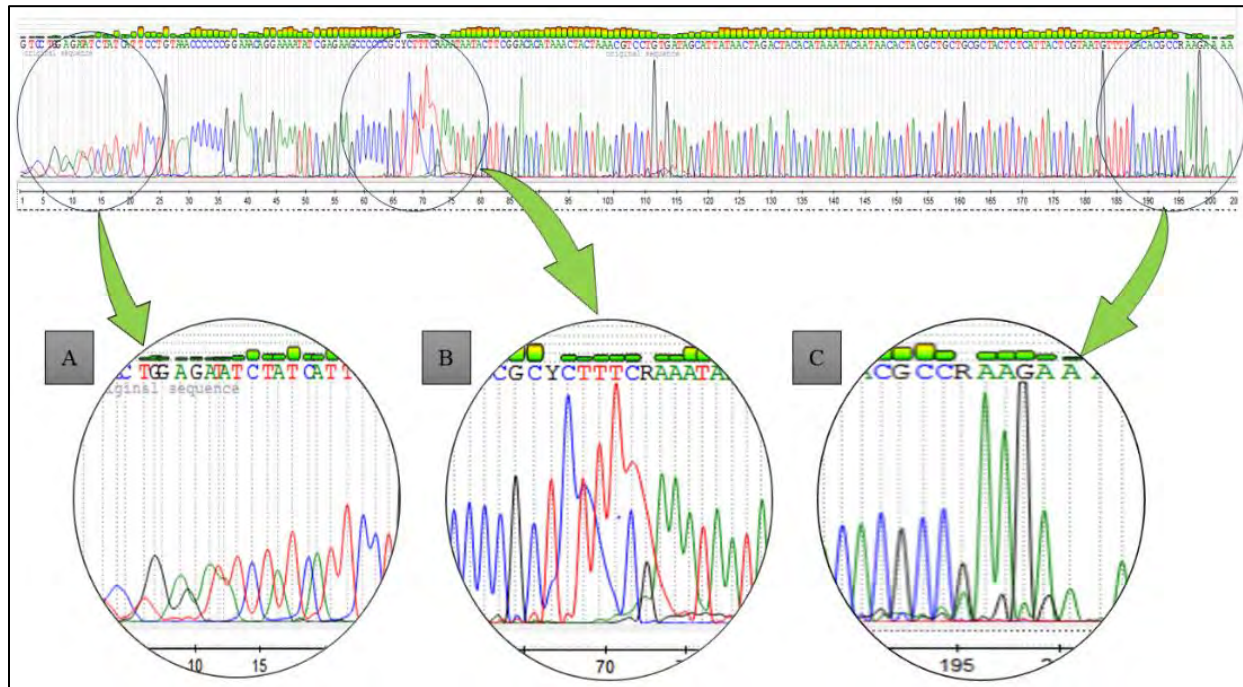
2.3.5. EDICIÓN DE SECUENCIAS SANGER

La edición y el alineamiento múltiple de las secuencias de ADN se realizaron utilizando el software UGENE 50.0 (Okonechnikov et al., 2012). A partir de los electroferogramas de las secuencias de ADN (forward y reverse) obtenidos del analizador genético ABI 3500XL en formato .ab1, cada una de las secuencias forward se observaron con detenimiento el electroferograma y se cortaron las partes de mala calidad (zonas con pequeñas probabilidades de buena asignación nucleotídica que generalmente se ubica al inicio y final de las secuencias) y también se tomaron decisiones de sobre las ambigüedades nucleotídicas (Figura 14), al final cada secuencia se guardó limpio y sin ambigüedades en formato FASTA. Se repitió el mismo procedimiento para cada una de las secuencias en reversa, una vez terminado con las secuencias en reverso se hizo un reverse complemento con la finalidad de obtener dos secuencias forward para cada individuo y luego las dos secuencias de cada individuo se compararon entre ellas, y cada vez que había diferencias se volvieron a mirar los electroferogramas para tomar la buena decisión con base en la mejor probabilidad de asignación. Posteriormente se alinearon mediante el algoritmo ClustalW del software, las secuencias consenso obtenidas a partir de la secuencia forward y reverse de cada individuo. A cada vez que se observó una mutación entre las secuencias de los individuos se volvió a revisar los electroferogramas para asegurarte que se trataba de una verdadera mutación (Figura 15).

Cabe indicar que se utilizó la misma metodología para los 15 individuos y cada uno de los cuatro marcadores mitocondriales (D-loop, ND5, Cytb y tRNA).

Figura 14

Electroferograma de secuencias sanger de A. agassizii mostrando calidad de picos.



Nota. A= Secuencias al inicio sin buena asignación nucleotídica. B= Secuencias con ambigüedades nucleotídicas. C= Secuencias al final sin buena asignación nucleotídica.

Figura 15

Secuencias de consenso con presencia de mutación.



Notas. A = Secuencias de consenso alineadas que presentan mutación. B = Electroferograma de la secuencia forward, donde se valida la mutación. C = Electroferograma de la secuencia reverse, donde comprueba que se trata de una verdadera mutación.

2.3.6. DISEÑO DE LA CONDICIÓN CONTROLADA (acuario)

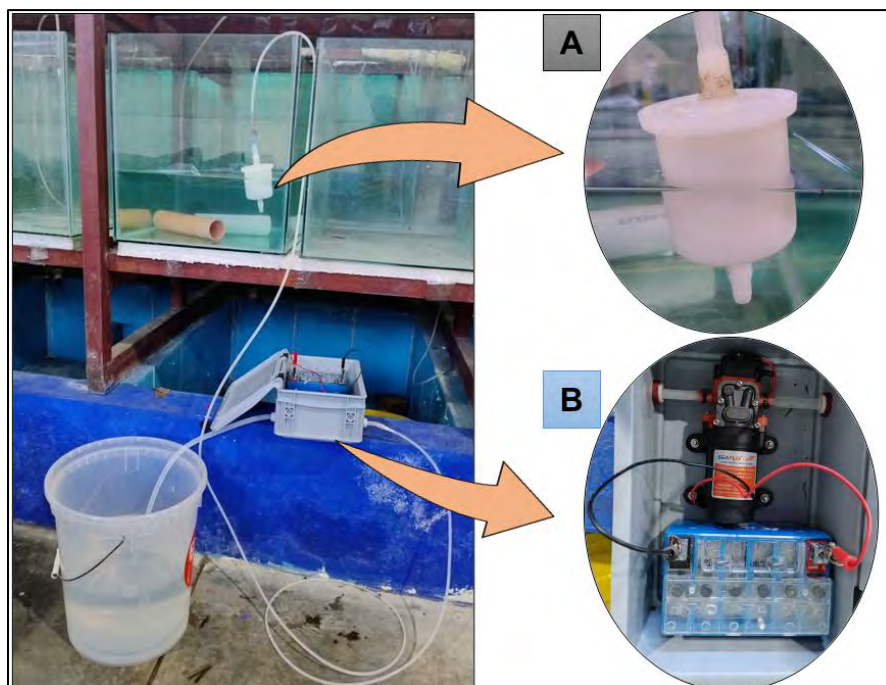
El ensayo en condiciones controladas (acuario) se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), sede Quistococha. Se utilizó un acuario con una capacidad de 100 litros, previamente desinfectado con una solución de lejía al 4% y llenado con 50 litros de agua de lluvia. Se instaló una manguera de aireación y se realizó un filtrado en blanco de 20 litros de agua a través de un cartucho filtrante Waterra estéril con una porosidad de 0.45 μm para poder identificar eventuales contaminaciones. Al finalizar la filtración, se llenó el cartucho con tampón de conservación Longmire y se almacenó a 4°C hasta la extracción de ADN en el laboratorio. Los 20 litros de agua filtrada fueron descartados y se agregaron otros

20 litros de agua de lluvia de la misma procedencia para mantener un volumen inicial de 50 litros en el acuario.

Posteriormente, se introdujeron en el acuario un conjunto de 15 individuos pertenecientes a dos especies del complejo *A. agassizii*. Diez individuos corresponden a la especie SP1 (cinco del sitio JH22 de Jenaro Herrera, zona 1; cinco del sitio Na-1 de Nauta, zona 2) y cinco individuos de la especie SP3 del río Nanay de la zona 3 (Figura 16).

Figura 16

Filtración de ADN ambiental en condición controlada (acuario).



Nota. Figura de elaboración propia. A = cartucho Waterra B = bomba de succión.

Después de 7 días se filtró 20 litros de agua de la pecera a través de un cartucho Waterra y después de terminar la filtración, el cartucho fue llenado con el tampón de conservación Longmire y almacenado a 4 °C hasta la extracción de ADN en el laboratorio.

2.3.6.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A PARTIR DEL MOOC Y ADN_a

2.3.6.1.1 ELABORACIÓN DEL MOOC

A partir de las extracciones de ADN de los 15 individuos se realizaron alícuotas diluidas a 3 ng.µl⁻¹ (una por cada individuo). Se pipetearon 5 µl de cada alícuota que se depositaron en un mismo tubo para constituir la mezcla equimolar de ADN total.

2.3.6.1.2. EXTRACCIÓN DEL ADN_a

El ADN_a contenido dentro de los dos cartuchos Waterra fue extraído con el siguiente protocolo: los cartuchos se introdujeron en una estufa regulada a 56°C durante 2 horas. Durante el proceso de incubación, los cartuchos se agitaron al menos 2 veces. El contenido de cada cartucho se vertió y pesó en un frasco de recogida de muestras biológicas y se distribuyó en tres partes idénticas en tres tubos de 50ml Oak Ridge High-Speed PPCO Centrifuge (NalgeneTM). Los tubos se centrifugaron a 15000 g durante 15 min a 6°C. Una vez centrifugado, el sobrenadante de cada tubo se pipetea de forma que quede 12 g del contenido dentro de cada tubo. Se añadieron 27 ml de etanol absoluto y 1,2 ml de acetato sódico 3M y los tubos se colocaron a -20°C durante la noche. A continuación, los tubos se centrifugaron a 15 000 g durante 15 min a 6°C y los sobrenadantes se descartaron por inclinación. A continuación, se añadieron 2 x 720 µl de tampón ATL (tampón de lisis tisular, Qiagen) a cada tubo y se agitaron ligeramente en vórtex para desalojar el precipitado «limpio» del fondo. El contenido de cada tubo se pipeteó, evitando recoger la parte «sucia», y se transfirió a tubos de 2 ml a los que se añadieron 20 µl de proteinasa K a 20 mg.µl⁻¹ y se incubaron 2 horas a 56°C en una incubadora eppendorf con agitación a 600 rpm. Para cada tubo se pipetearon 800 µl del contenido dos veces y se distribuyeron en tubos de 2 x 2 ml y se añadieron 250 µl de tampón SB a cada tubo. Los tubos se agitaron en vórtex y se centrifugaron con una centrífuga de

sobremesa aproximadamente 5 segundos y los sobrenadantes se depositaron en columnas que corresponden a la etapa 7 del kit NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) y se continuaron las extracciones con este protocolo. Al final de las extracciones de ADN. se obtuvieron para cada filtro Watterra, seis tubos de 2 ml que contenían cada uno 50 µl de ADN.

2.3.6.1.3. PREPARACIÓN DE LAS LIBRERÍAS GENÓMICAS Y SECUENCIACIÓN NGS (metabarcoding de ADN y mooc)

Las librerías genómicas fueron preparadas, para cada marcador, a partir del mooc de ADN, y para cada filtro, a partir de las tres (3/6) alícuotas con mayor cantidad de ADN, representando un total de siete muestras de ADN (1 del mooc, 3 filtros de pecera y 3 filtros blanco de pecera). Las librerías genómicas se prepararon de acuerdo con un PCR de dos pasos (Galan et al., 2018); en el primer paso de PCR, la muestra de ADN del mooc fue amplificada tres veces (triplicado de PCR, 1 x 3) y cada muestra de ADN dos veces (duplicado de PCR, 6x2=12). Se generaron un total de 96 librerías, que corresponde a 24 librerías (15 muestras + 9 blancos PCR) para cada uno de los cuatro marcadores. En el segundo paso de PCR, cada librería fue indexada utilizando combinaciones únicas de doble indexación para excluir de manera más eficiente los amplicones quiméricos durante el procesamiento bioinformático.

2.3.6.1.4. PARAMÉTRAJE DE LA HERRAMIENTA BIOINFORMÁTICA

Para extraer y filtrar el polimorfismo de las secuencias obtenidas después de la secuenciación Miseq, se utilizó el pipeline de análisis JAMP (Elbrecht et al., 2018) El paramétraje de la herramienta fue optimizados con base en trabajos de simulación y análisis de datos realizados en el laboratorio (artículo sometido, Estivals et al.). La herramienta JAMP utilizada se compone de seis etapas principales: **1) Demultiplexing_shifted():** Organización de los reads en distintos

archivos FASTQ de acuerdo con la combinación de los index, permite organizar los datos por sitio de colecta y marcador. **2) U_merge_PE():** Fusión de los reads emparejados en los sentidos forward y reverse (read 1 y read 2), permite asociar los reads complementarios. **3) Cutadapt():** Identificación y eliminación de las secuencias de los primers, permite la filtración de la región de interés. **4) U_max_ee():** Es la probabilidad del error esperado máximo, permite eliminar los reads de mala calidad a partir de la información de calidad contenida dentro del archivo fastq para cada nucleótido. **5) U_subset():** Estandarización del esfuerzo de secuenciación, permite homogeneizar los esfuerzos de secuenciación entre librerías (sitios de colecta) y poder comparar los resultados obtenidos entre ellas. **6) Denoise():** Eliminación de los falsos haplotipos a partir de la estrategia “unoise” y diferentes valores de abundancia, y organización de los haplotipos en unidades taxonómicas (OTU), permite organizar los verdaderos haplotipos en OTUs.

2.3.6.1.5. BARCODING GAP

La determinación del umbral de distancia máxima entre haplotipos de un mismo OTU (misma especie), se realizó mediante los paquetes Spider (Brown et al., 2012) y ape (Paradis et al., 2004) en entorno de R. El barcoding gap fue determinado para cada marcador, para identificar la distancia máxima dentro de la SP1 *A. agassizii* y la distancia mínima entre SP1 y SP3. Para cada uno de los marcadores utilizados no hay sobreposición de la distancia genética intraespecífica y de la distancia mínima interespecífica. Entonces se puede escoger un valor en el intervalo (Gap) entre las dos distribuciones.

2.3.6.1.6 EXTRACCIÓN Y FILTRACIÓN DEL POLIMORFISMOS DE SECUENCIAS (NGS)

La extracción y filtración del polimorfismo de los reads fue realizado para cada una de las 96 librerías con el pipeline de análisis JAMP (Elbrecht et al., 2018). Ese pipeline optimizado en el laboratorio, que consta de cinco etapas. **1) U_merge_PE():** fusión de las secuencias emparejadas en los sentidos forward y reverse (read 1 y read 2), permite asociar los reads complementarios. **2) Cutadapt():** identificación y eliminación de las secuencias de los primers, permite la filtración de la región de interés. **3) U_max_ee():** Es la probabilidad del error esperado máximo, permite eliminar los reads de mala calidad a partir de la información de calidad contenida dentro del archivo fastq para cada nucleótido. **4) U_subset():** Estandarización del esfuerzo de secuenciación, permite sortear un mismo número de reads entre librerías para poder comparar los resultados obtenidos entre ellas. **5) Denoise():** Eliminación de los falsos haplotipos a partir de la estrategia “unoise” y diferentes valores de abundancia, y organización de los haplotipos en unidades taxonómicas (OTU), permite organizar los verdaderos haplotipos en OTUs.

2.3.7. ANÁLISIS DE DATOS

2.3.7.1 CARACTERIZACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL ADN DE LA BASE DE DATOS DE REFERENCIA

El polimorfismo del ADN de los 15 individuos fue caracterizado para cada uno de los marcadores a partir del número total de sitios (NS), el número de sitios polimórficos (S), el número de haplotipos (h), la diversidad haplotípica (Hd) y la diversidad nucleotídica (Pi), utilizando el programa DNAsp. (Rozas et al., 2016).

2.3.7.2 COMPARACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS DE LA BASE DE DATOS DE REFERENCIA VS NGS (MOOC Y ADN_a)

Los haplotipos obtenidos a partir de la secuenciación Sanger de los 15 individuos, del mooc de ADN de los 15 individuos y del ADN_a extraído de la pecera donde se mantuvieron los 15 individuos, fueron comparados con un árbol filogenético de máxima verosimilitud a partir del mejor modelo de evolución determinado con el criterio de inferencia bayesiana (BIC) utilizando el servidor en línea IQTREE (Nguyen et al., 2015). El árbol fue enraizado a partir de los haplotipos de *A. agassizii* Sp3 y organizado con el programa Figtree (Rambaut, A. 2018).

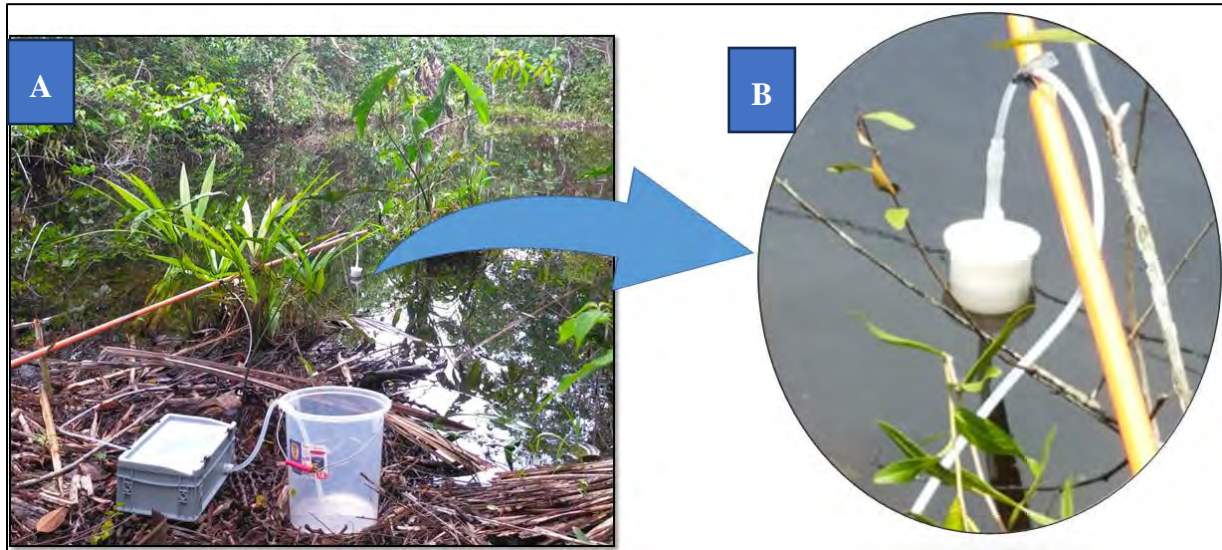
2.3.8 EVALUACIÓN EN CONDICIÓN NATURAL (*In situ*)

2.3.8.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Para cada sitio, se colectaron primero las muestras de ADN_a y después los peces para no remover el sedimento y perjudicar la filtración del agua. Se filtraron un aproximado de 20 litros de agua por sitio de colecta a través de un cartucho filtrante estéril Waterra con una porosidad de 0.45 μm , utilizando una bomba de presión de agua SEAFLO (Figura 17 y Tabla 1). Después de la colecta, cada cartucho se llenó con tampón de conservación Longmire y se almacenó a 4°C hasta la extracción de ADN en el laboratorio. Al finalizar los muestreos, se realizó un blanco filtrando 20 l de agua embotellada para identificar eventuales problemas de contaminación.

Figura 17

Filtración de ADN en condición natural (in situ).



Nota. A: Sistema de filtración; B: Cartucho de filtración Waterra.

En la mayoría de los sitios de colecta, se capturaron individuos de *A. agassizii* utilizando redes de playa (Figura 18). Se recogieron las puntas de las aletas de un aproximado de 30 individuos por sitio (Tabla 1), previamente anestesiados con eugenol, y tras el muestreo, fueron liberados una vez despiertos. Cada punta de aleta se depositó individualmente en tubos de 2 ml, etiquetados con un código y llenados con alcohol de 96°, hasta la extracción de ADN.

Figura 18

Colecta de individuos A. agassizii con redes de pesca.



Nota. Figura de elaboración propia

2.3.8.2. EXTRACCIÓN DE ADN_a, SECUENCIACIÓN Y FILTRACIÓN DE POLIMORFISMO

La extracción de ADN_a se realizó con el kit NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo descrito en la condición controlada (acuario). La construcción de las librerías genómicas se preparó de acuerdo a un PCR de dos pasos (Galan et al., 2018), descritas a detalle en la parte de condición controlada. La extracción y la filtración del polimorfismo se realizó con el pipeline de análisis JAMP (Elbrecht et al., 2018).

2.3.8.3 ANALISIS DE DATOS

2.3.8.3.1 RELACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS OBTENIDOS A PARTIR DEL METABARCODING DE ADN DEL MOOC VS EL ADN_a (validación del enfoque ADN_a)

Fueron comparados con un árbol filogenético de máxima verosimilitud a partir del mejor modelo de evolución determinado con el criterio de inferencia bayesiana (BIC) utilizando el servidor en línea IQTREE (Trifinopoulos et al., 2016). El árbol fue enraizado a partir de los haplotipos de *A. agassizii* Sp3 y organizado con el programa Figtree (Rambaut, A. 2018), este procedimiento se realizó para cada marcador.

2.3.8.3.2 ESTRUCTURA POBLACIONAL A PARTIR DEL METABARCODING DE ADN_a

A partir de los diferentes haplotipos identificados con los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud, y los reads obtenidos de la secuenciación NGS, se calculó la abundancia relativa en porcentaje (%) que es igual a la cantidad de reads de un haplotipo encontrado en un sitio de colecta dividido por el total de reads encontrados en un sitio de colecta y multiplicado por 100.

$$Abundancia\ relativa\ (\%) = \frac{Cantidad\ de\ reads\ de\ un\ haplotipo\ por\ sitio}{Cantidad\ de\ reads\ total\ por\ sitio} \times 100$$

Las proporciones de abundancia relativa (%) y los haplotipos se posesionaron en un mapa de los sitios de colecta, con la finalidad de observar la distribución de los haplotipos en la zona de estudio y la estructura poblacional. Cabe resaltar que se realizó para los cuatro marcadores.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

3.1.1 CONDICIÓN CONTROLADA

3.1.1.1 Base de datos de referencia

Se obtuvo un total de 60 secuencias consenso, cuatro marcadores para cada uno de los 15 individuos (ver Anexo 1). Para el marcador D-loop se ha obtenido cuatro haplotipos, 15 sitios polimórficos, con una diversidad haplotípica de 0.771 y una diversidad nucleotídica de 0.03960 (Tabla 18). Para el marcador tRNA se obtuvo cinco haplotipos, 31 sitios polimórficos, y una diversidad haplotípica de 0.781 y la diversidad nucleotídica de 0.05414 (Tabla 18). En cuanto el marcador ND5 se encontraron siete haplotipos, 22 sitios polimórficos, y una diversidad haplotípica de 0.838 y un valor de 0.03532 para la diversidad nucleotídica (Tabla 18). Así mismo para el marcador Cytb se obtuvieron cinco haplotipos, 24 sitios polimórficos, con una diversidad haplotípica de 0.781 y la diversidad nucleotídica de 0.04476. (Tabla 18).

Tabla 14

Caracterización del polimorfismo de la base de referencia.

Primers	Número total de sitios (NS)	Número de sitios polimórficos (S)	Número de haplotipos (h)	Diversidad haplotípica (Hd)	Diversidad nucleotídica (Pi)
D-loop	185	15	4	0.771	0.03960
tRNA	273	31	5	0.781	0.05414
ND5	254	22	7	0.838	0.03532
Cytb	243	24	5	0.781	0.04476

3.1.1.2 Valores obtenidos para el barcoding gap

Tabla 15

Barcoding gap para el marcador D-loop.

	Apistogramma_Sp1_JH22-01	Apistogramma_Sp1_JH22-02	Apistogramma_Sp1_JH22-13	Apistogramma_Sp1_JH22-14	Apistogramma_Sp1_JH22-15	Apistogramma_Sp1_Na01-03	Apistogramma_Sp1_Na01-04	Apistogramma_Sp1_Na01-06	Apistogramma_Sp1_Na01-09	Apistogramma_Sp1_Na01-10	Apistogramma_Sp3_Na01-05	Apistogramma_Sp3_Na01-07	Apistogramma_Sp3_Na01-08	Apistogramma_Sp3_Na01-11	Apistogramma_Sp3_Na01-12
Apistogramma_Sp1_JH22-02	0.004														
Apistogramma_Sp1_JH22-13	0.000	0.004													
Apistogramma_Sp1_JH22-14	0.000	0.004	0.000												
Apistogramma_Sp1_JH22-15	0.004	0.000	0.004	0.004											
Apistogramma_Sp1_Na01-03	0.022	0.021	0.022	0.022	0.021										
Apistogramma_Sp1_Na01-04	0.022	0.021	0.022	0.022	0.021	0.000									
Apistogramma_Sp1_Na01-06	0.022	0.021	0.022	0.022	0.021	0.000	0.000								
Apistogramma_Sp1_Na01-09	0.022	0.021	0.022	0.022	0.021	0.000	0.000	0.000							
Apistogramma_Sp1_Na01-10	0.022	0.021	0.022	0.022	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000						
Apistogramma_Sp3_Na01-05	0.063	0.058	0.063	0.063	0.058	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053					
Apistogramma_Sp3_Na01-07	0.063	0.058	0.063	0.063	0.058	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.000				
Apistogramma_Sp3_Na01-08	0.063	0.058	0.063	0.063	0.058	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.000	0.000			
Apistogramma_Sp3_Na01-11	0.063	0.058	0.063	0.063	0.058	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.000	0.000	0.000		
Apistogramma_Sp3_Na01-12	0.063	0.058	0.063	0.063	0.058	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.000	0.000	0.000	0.000	

Nota. Los valores en amarillo corresponden las distancias intraespecíficas y en verde las distancias interespecíficas, y en azul es el valor máximo de la distancia intraespecífica de SP1. En este caso es inferior al valor mínimo interespecífico (0.053)

Tabla 16

Barcoding gap para el marcador ND5.

	Apistogramma_Sp1_J H22-01	Apistogramma_Sp1_J H22-02	Apistogramma_Sp1_J H22-13	Apistogramma_Sp1_J H22-14	Apistogramma_Sp1_J H22-15	Apistogramma_Sp1_ Na01-03	Apistogramma_Sp1_ Na01-04	Apistogramma_Sp1_ Na01-06	Apistogramma_Sp1_ Na01-09	Apistogramma_Sp1_ Na01-10	Apistogramma_Sp3_ Na01-05	Apistogramma_Sp3_ Na01-07	Apistogramma_Sp3_ Na01-08	Apistogramma_Sp3_ Na01-11	Apistogramma_Sp3_ Na01-12
Apistogramma_Sp1_J H22-02	0.007														
Apistogramma_Sp1_J H22-13	0.003	0.010													
Apistogramma_Sp1_J H22-14	0.000	0.007	0.003												
Apistogramma_Sp1_J H22-15	0.003	0.003	0.007	0.003											
Apistogramma_Sp1_ Na01-03	0.021	0.021	0.024	0.021	0.017										
Apistogramma_Sp1_ Na01-04	0.021	0.021	0.024	0.021	0.017	0.000									
Apistogramma_Sp1_ Na01-06	0.021	0.021	0.024	0.021	0.017	0.000	0.000								
Apistogramma_Sp1_ Na01-09	0.021	0.021	0.024	0.021	0.017	0.000	0.000	0.000							
Apistogramma_Sp1_ Na01-10	0.021	0.021	0.024	0.021	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000						
Apistogramma_Sp3_ Na01-05	0.053	0.053	0.057	0.053	0.049	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053					
Apistogramma_Sp3_ Na01-07	0.053	0.053	0.057	0.053	0.049	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.000				
Apistogramma_Sp3_ Na01-08	0.061	0.061	0.064	0.061	0.057	0.060	0.060	0.060	0.060	0.060	0.007	0.007			
Apistogramma_Sp3_ Na01-11	0.053	0.053	0.057	0.053	0.049	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.000	0.000	0.007		
Apistogramma_Sp3_ Na01-12	0.053	0.053	0.057	0.053	0.049	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.000	0.000	0.007	0.000	

Nota. Los valores en amarillo corresponden las distancias intraespecíficas y en verde las distancias interespecíficas, y en azul es el valor máximo de la distancia intraespecífica de SP1. En este caso es inferior al valor mínimo interespecífico (0.049)

Tabla 17

Barcoding gap para el marcador Cytb.

	Apistogramma_Sp1_ H22-01	Apistogramma_Sp1_ H22-02	Apistogramma_Sp1_ H22-13	Apistogramma_Sp1_ H22-14	Apistogramma_Sp1_ H22-15	Apistogramma_Sp1_ Na01-03	Apistogramma_Sp1_ Na01-04	Apistogramma_Sp1_ Na01-06	Apistogramma_Sp1_ Na01-09	Apistogramma_Sp1_ Na01-10	Apistogramma_Sp3_ Na01-05	Apistogramma_Sp3_ Na01-07	Apistogramma_Sp3_ Na01-08	Apistogramma_Sp3_ Na01-11	Apistogramma_Sp3_ Na01-12
Apistogramma_Sp1_ JH22-02	0.011														
Apistogramma_Sp1_ JH22-13	0.000	0.011													
Apistogramma_Sp1_ JH22-14	0.000	0.011	0.000												
Apistogramma_Sp1_ JH22-15	0.014	0.004	0.014	0.014											
Apistogramma_Sp1_ Na01-03	0.025	0.029	0.025	0.025	0.025										
Apistogramma_Sp1_ Na01-04	0.025	0.029	0.025	0.025	0.025	0.000									
Apistogramma_Sp1_ Na01-06	0.025	0.029	0.025	0.025	0.025	0.000	0.000								
Apistogramma_Sp1_ Na01-09	0.025	0.029	0.025	0.025	0.025	0.000	0.000	0.000							
Apistogramma_Sp1_ Na01-10	0.025	0.029	0.025	0.025	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000						
Apistogramma_Sp3_ Na01-05	0.072	0.076	0.072	0.072	0.080	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068					
Apistogramma_Sp3_ Na01-07	0.072	0.076	0.072	0.072	0.080	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.000				
Apistogramma_Sp3_ Na01-08	0.072	0.076	0.072	0.072	0.080	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.000	0.000			
Apistogramma_Sp3_ Na01-11	0.072	0.076	0.072	0.072	0.080	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.000	0.000	0.000		
Apistogramma_Sp3_ Na01-12	0.072	0.076	0.072	0.072	0.080	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.000	0.000	0.000	0.000	

Nota. Los valores en amarillo corresponden las distancias intraespecíficas y en verde las distancias interespecíficas, y en azul es el valor máximo de la distancia intraespecífica de SP1. En este caso es inferior al valor mínimo interespecífico (0.068)

Tabla 18

Barcoding gap para el marcador tRNA.

	Apistogramma_Sp1_JH22-01	Apistogramma_Sp1_JH22-02	Apistogramma_Sp1_JH22-13	Apistogramma_Sp1_JH22-14	Apistogramma_Sp1_JH22-15	Apistogramma_Sp1_Na01-03	Apistogramma_Sp1_Na01-04	Apistogramma_Sp1_Na01-06	Apistogramma_Sp1_Na01-09	Apistogramma_Sp1_Na01-10	Apistogramma_Sp3_Na01-05	Apistogramma_Sp3_Na01-07	Apistogramma_Sp3_Na01-08	Apistogramma_Sp3_Na01-11	Apistogramma_Sp3_Na01-12
Apistogramma_Sp1_JH22-02	0.003														
Apistogramma_Sp1_JH22-13	0.003	0.000													
Apistogramma_Sp1_JH22-14	0.003	0.006	0.006												
Apistogramma_Sp1_JH22-15	0.003	0.000	0.000	0.006											
Apistogramma_Sp1_Na01-03	0.029	0.026	0.026	0.033	0.026										
Apistogramma_Sp1_Na01-04	0.029	0.026	0.026	0.033	0.026	0.000									
Apistogramma_Sp1_Na01-06	0.029	0.026	0.026	0.033	0.026	0.000	0.000								
Apistogramma_Sp1_Na01-09	0.029	0.026	0.026	0.033	0.026	0.000	0.000	0.000							
Apistogramma_Sp1_Na01-10	0.029	0.026	0.026	0.033	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000						
Apistogramma_Sp3_Na01-05	0.091	0.088	0.088	0.091	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088					
Apistogramma_Sp3_Na01-07	0.091	0.088	0.088	0.091	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.000				
Apistogramma_Sp3_Na01-08	0.091	0.088	0.088	0.091	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.000	0.000			
Apistogramma_Sp3_Na01-11	0.091	0.088	0.088	0.091	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.000	0.000	0.000		
Apistogramma_Sp3_Na01-12	0.091	0.088	0.088	0.091	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.000	0.000	0.000	0.000	

Nota. Los valores en amarillo corresponden las distancias intraespecíficas y en verde las distancias interespecíficas, y en azul es el valor máximo de la distancia intraespecífica de SP1. En este caso es inferior al valor mínimo interespecífico (0.088).

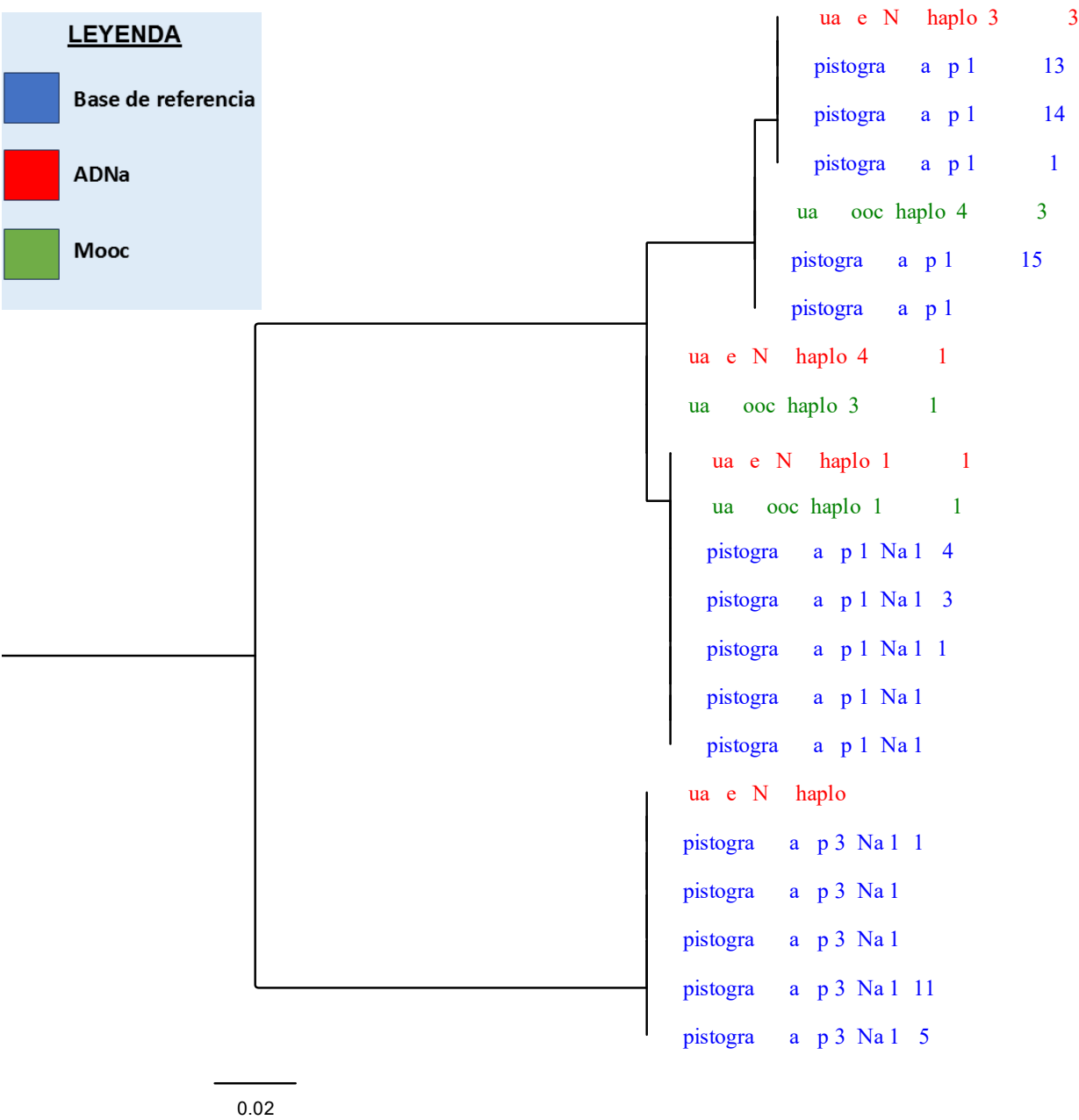
3.1.1.3 Comparación de los haplotipos de la base de datos de referencia vs obtenidos a partir del metabarcoding (mooc y ADN_a)

3.1.1.3.1 D-loop en condición controlada

Tres de cuatro haplotipos identificados a partir del metabarcoding de ADN_a fueron idénticos con los haplotipos de referencia. Para el mooc, dos de tres haplotipos identificados fueron idénticos con los haplotipos de referencia. Para la población de *Apistogramma Sp1* JH22 se identificó dos haplotipos, un haplotipo en común entre ADN_a y los individuos de JH22-13, JH22-14, JH22-01, y el otro haplotipo en común entre el mooc y los individuos JH22-15 y JH22-02. Así mismo para la población de *Apistogramma Sp1* Nauta se encontró un haplotipo en común entre ADN_a, mooc y los cinco individuos de referencia. También se encontró un haplotipo para los cinco individuos de la población de *Apistogramma Sp3* Nanay y de ADN_a. Solo un haplotipo, identificado con el mooc y el ADN_a no corresponde a un haplotipo de la base de datos de referencia.

Figura 19

Árbol filogenético para el marcador D-loop en condición controlada .



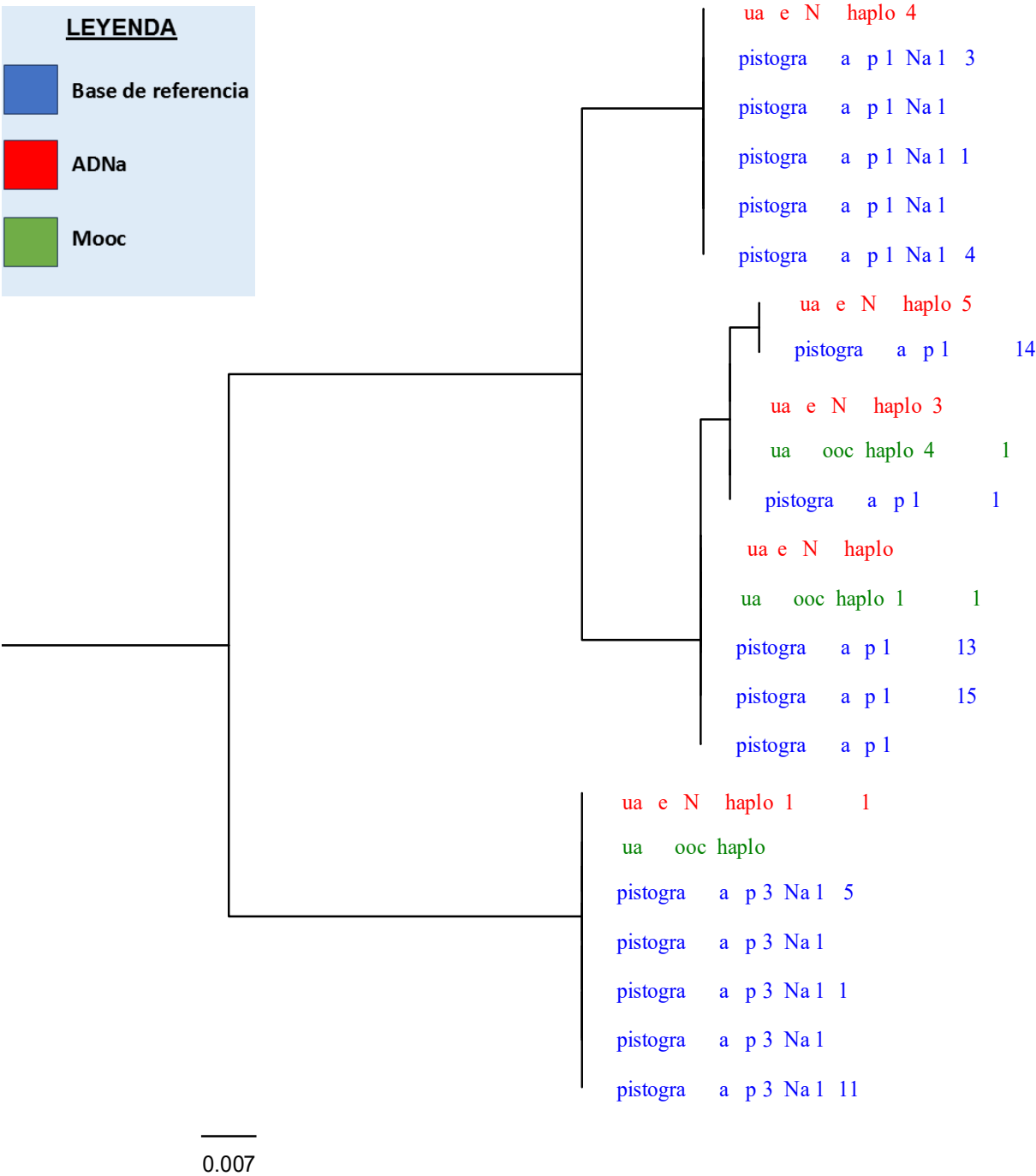
Notas. Grupo externo *Apistogramma SP3*

3.1.1.3.2 tRNA en condición controlada

Todos los haplotipos de la referencia fueron encontrados a partir del ADN_a (Figura 20). Para la población de Nauta los cinco individuos comparten el mismo haplotipo y fue encontrado con el ADN_a. Dentro de los cinco individuos de la población JH22 se observa tres haplotipos y cada uno de ellos fueron encontrados con el ADN_a. Un haplotipo corresponde al individuo JH22-14, un segundo haplotipo corresponde al individuo JH22-01, y un tercer haplotipo compartido por los individuos JH22-13, JH22-15, y JH22-02. Así mismo se muestra un haplotipo en común para la población de *Apistogramma Sp3* Nanay conformado por los 5 individuos, ADN_a y mooc. Cada uno de los haplotipos son diagnósticos de una población.

Figura 20

Árbol filogenético para el marcador tRNA en condición controlada.



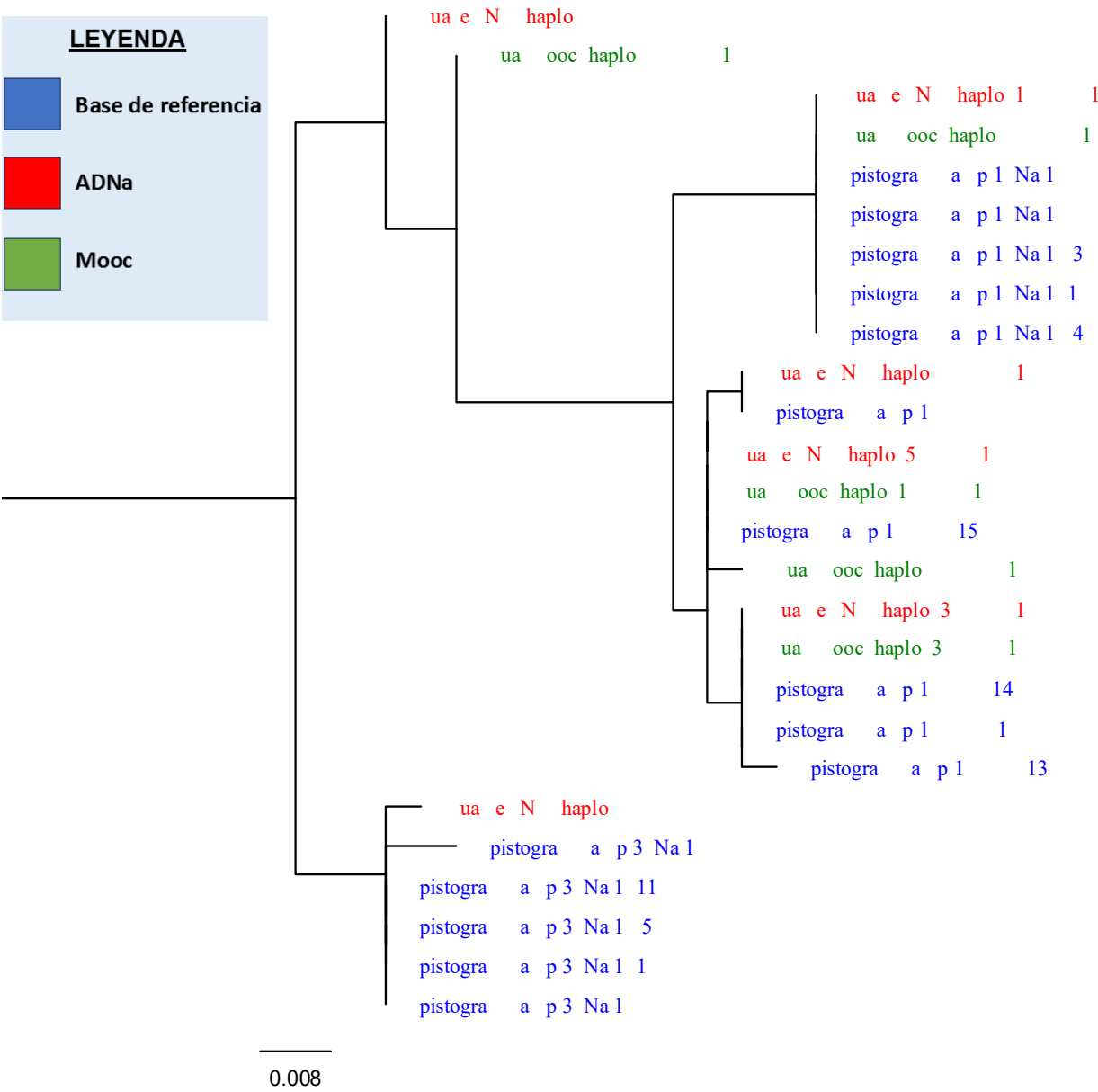
Notas. Grupo externo *Apistogramma SP3*

3.1.1.3.3 ND5 en condición controlada

A partir del ADN_a fueron encontrados cuatro de los siete haplotipos de referencia. Los cinco individuos de la población de Nauta comparten el mismo haplotipo y fue identificado a partir del ADN_a y del mooc. Los cinco individuos de la población JH22 son conformados por un total de cuatro haplotipos, un haplotipo que corresponde al individuo JH22-02 y fue encontrado a partir del ADN_a, un segundo haplotipo que corresponde al individuo JH22-15 que fue también encontrado a partir del ADN_a y del mooc, un tercer haplotipo entre los individuos JH22-14, JH22-01 que fue identificado a partir del ADN_a y del mooc, un cuarto haplotipo conformado solo por el individuo JH22-13. Para la población de *Apistogramma Sp3* Na, ninguno de los haplotipos fue encontrado a partir del ADN_a. También, tres haplotipos no están presentes dentro de la base de datos de referencia (figura 21).

Figura 21

Árbol filogenético para el marcador ND5 en condición controlada.



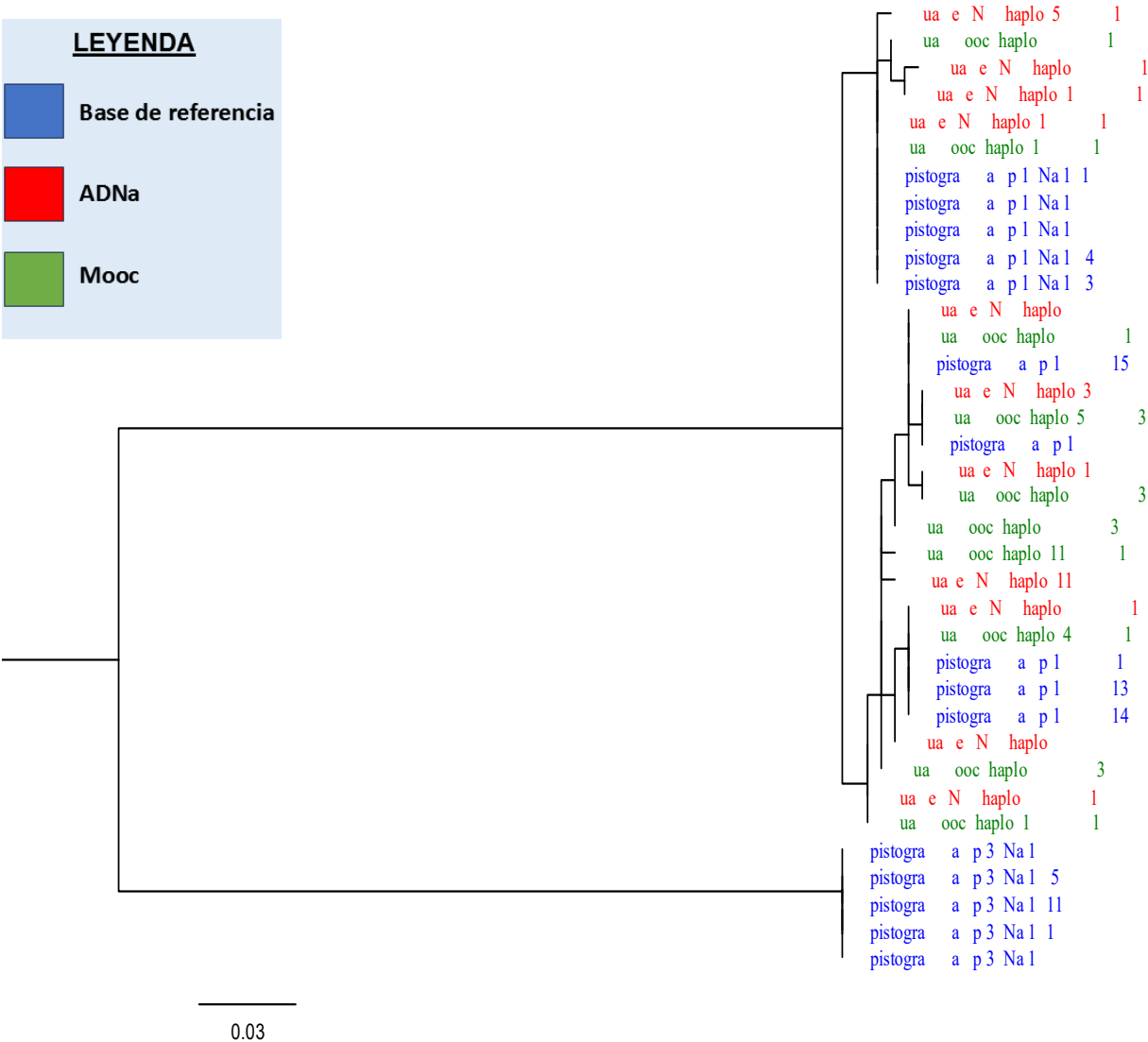
Notas. Grupo externo *Apistogramma SP3*

3.1.1.3.4 Cytb en condición controlada

Todos lo haplotipos de SP1 fueron encontrados a partir del ADN_a y del mooc, sin embargo, muchos haplotipos son diferentes de los haplotipos de referencia (Figura 22).

Figura 22

Árbol filogenético para el marcador Cytb en condición de controlada.



Notas. Grupo externo Apistogramma SP3

3.1.2 CONDICIÓN NATURAL

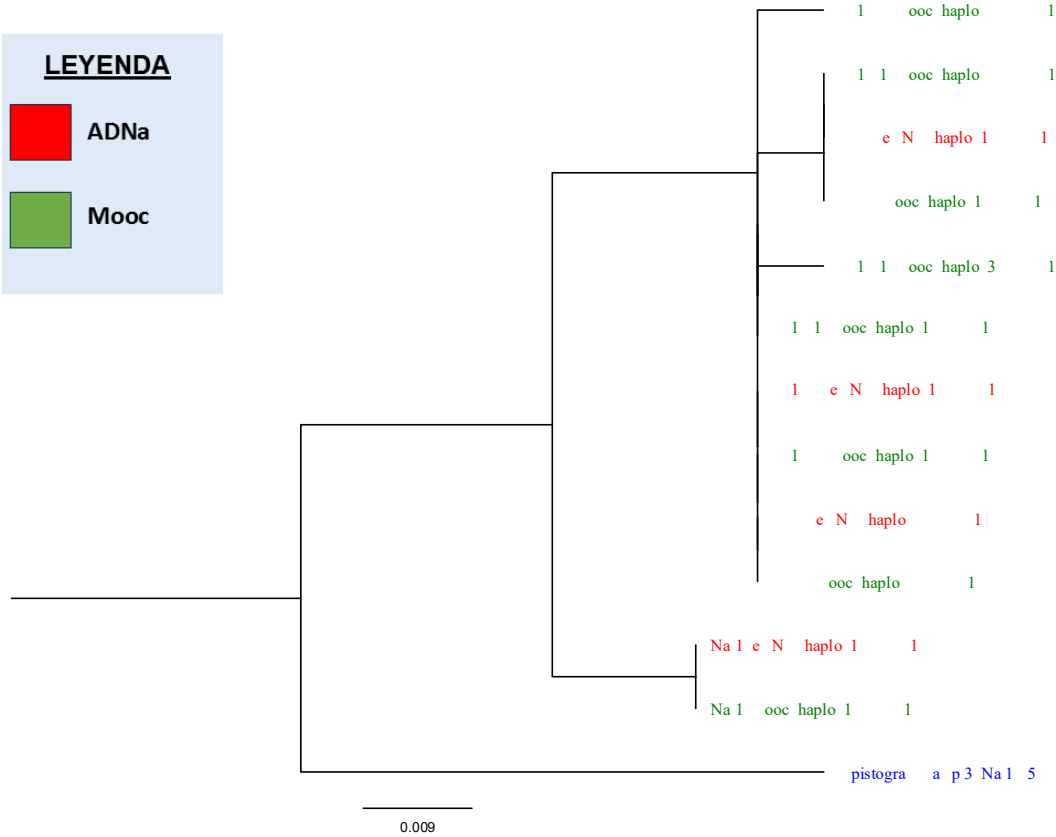
3.1.2.1. Comparación de los haplotipos obtenidos a partir del metabarcoding (mooc y ADNa)

3.1.2.1.1. D-loop en condición natural

Un total de cinco haplotipos fue identificado, tres haplotipos en común fueron obtenidos a partir de las muestras de ADNa y de los mooc: uno identificado en JH18-1 mooc, JH22- ADNa, y JH22 mooc. El segundo haplotipo fue identificado en JH18-1 mooc, JH19-2 ADNa, JH19-2 mooc, JH22- ADNa, y JH22 mooc (Figura 23), y un tercer haplotipo en Na-1 ADNa, y Na-1 mooc. Dos haplotipos fueron identificados solamente a partir de los mooc de ADN.

Figura 23

Árbol filogenético para el marcador D-loop en condición natural.



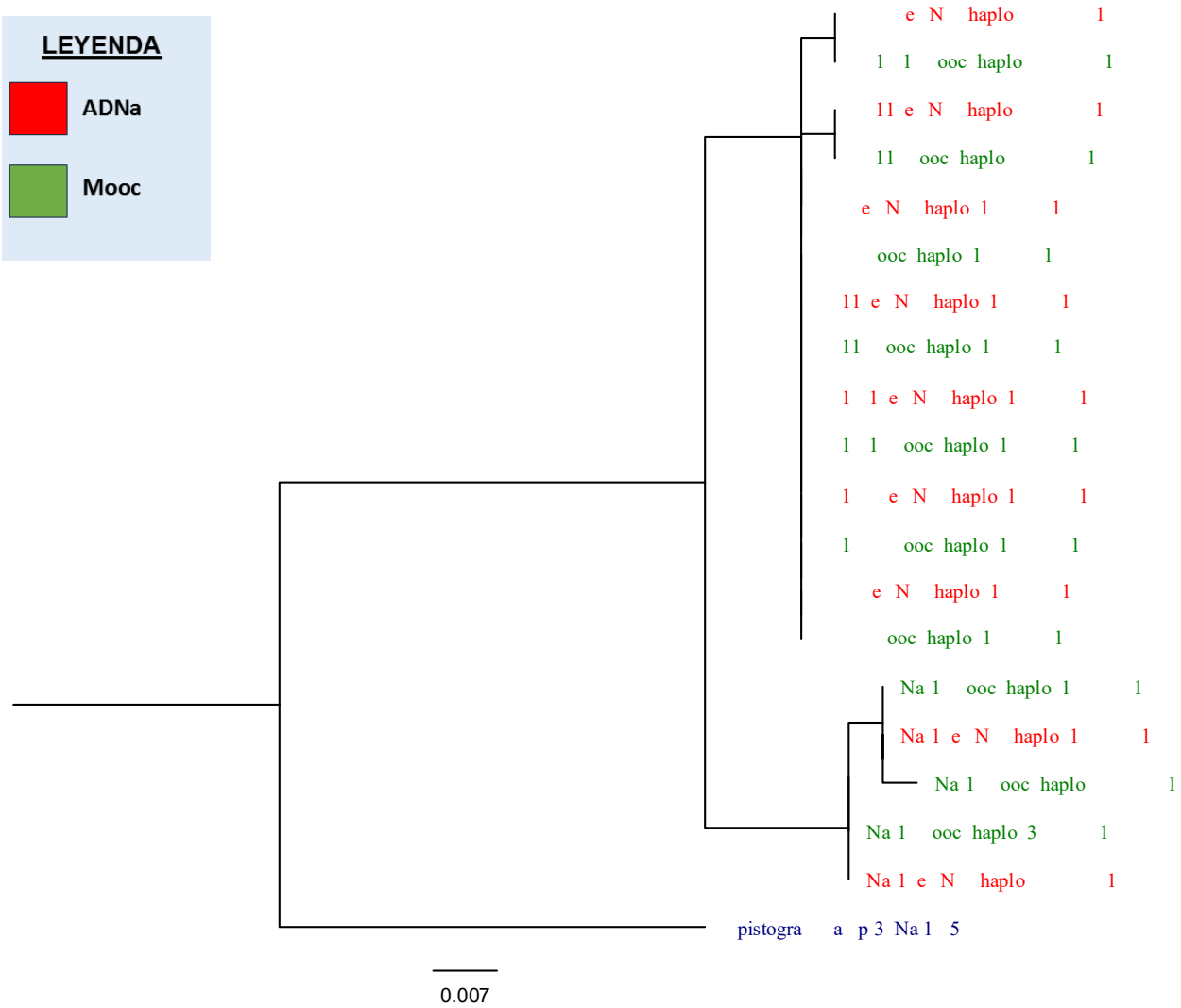
Nota. Enraizado con *Apistogramma Sp3 Na01-05*.

3.1.2.1.2 tRNA en condición natural

Cinco haplotipos en común fueron identificados a partir de las muestras de ADN_a y de los mooc de ADN (Figura 24). Solo un haplotipo fue solamente identificado a partir del mooc de ADN.

Figura 24

Árbol filogenético para el marcador tRNA en condición natural.



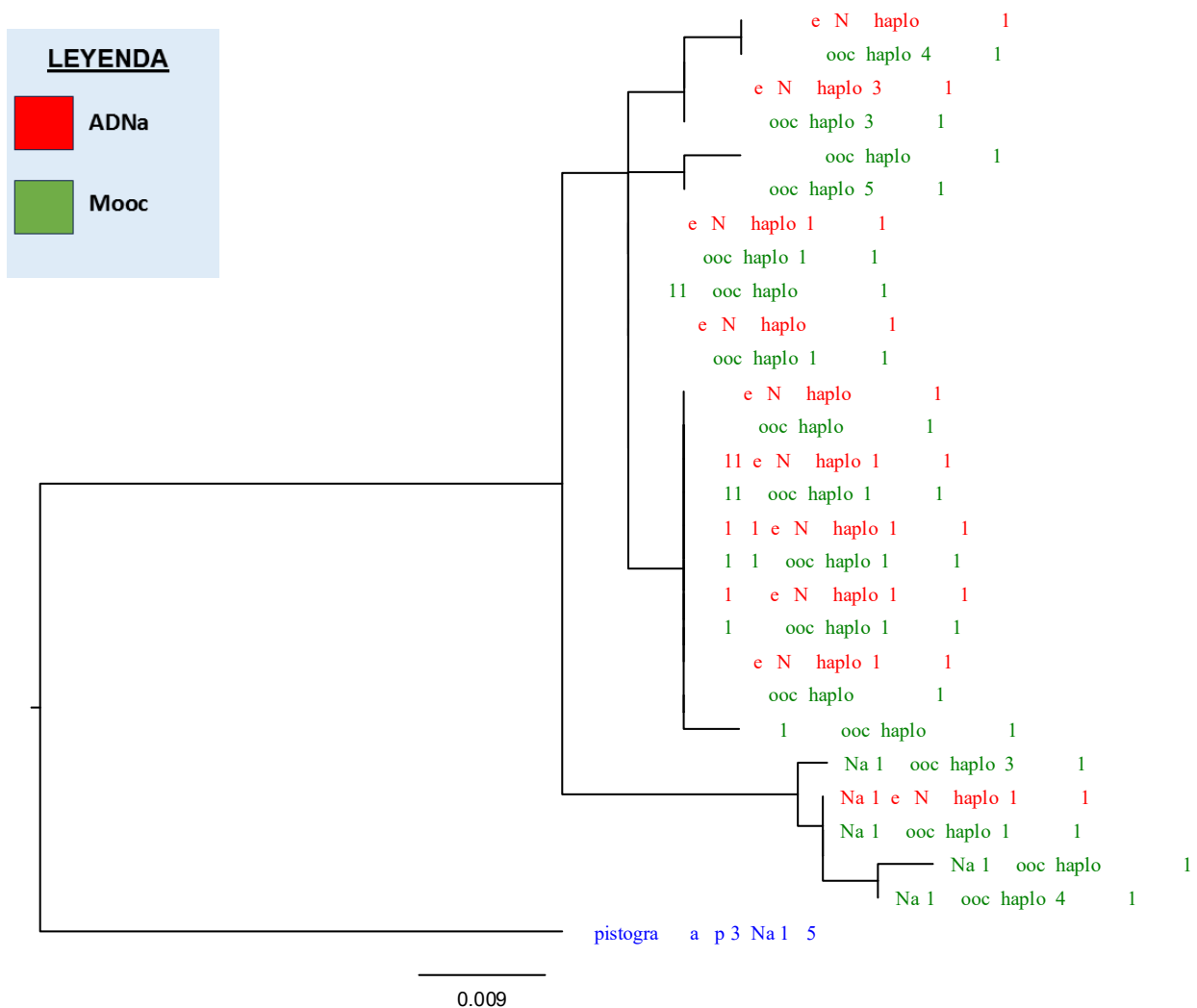
Nota. Enraizado con *Apistogramma Sp3 Na01-05*.

3.1.2.1.3 ND5 en condición natural

Para el marcador ND5, fueron identificados cinco haplotipos en común entre las muestras ADN_a y de los mooc de ADN. Seis haplotipos fueron encontrados solamente con los mooc de ADN (figura 25).

Figura 25

Árbol filogenético para el marcador ND5 en condición natural.



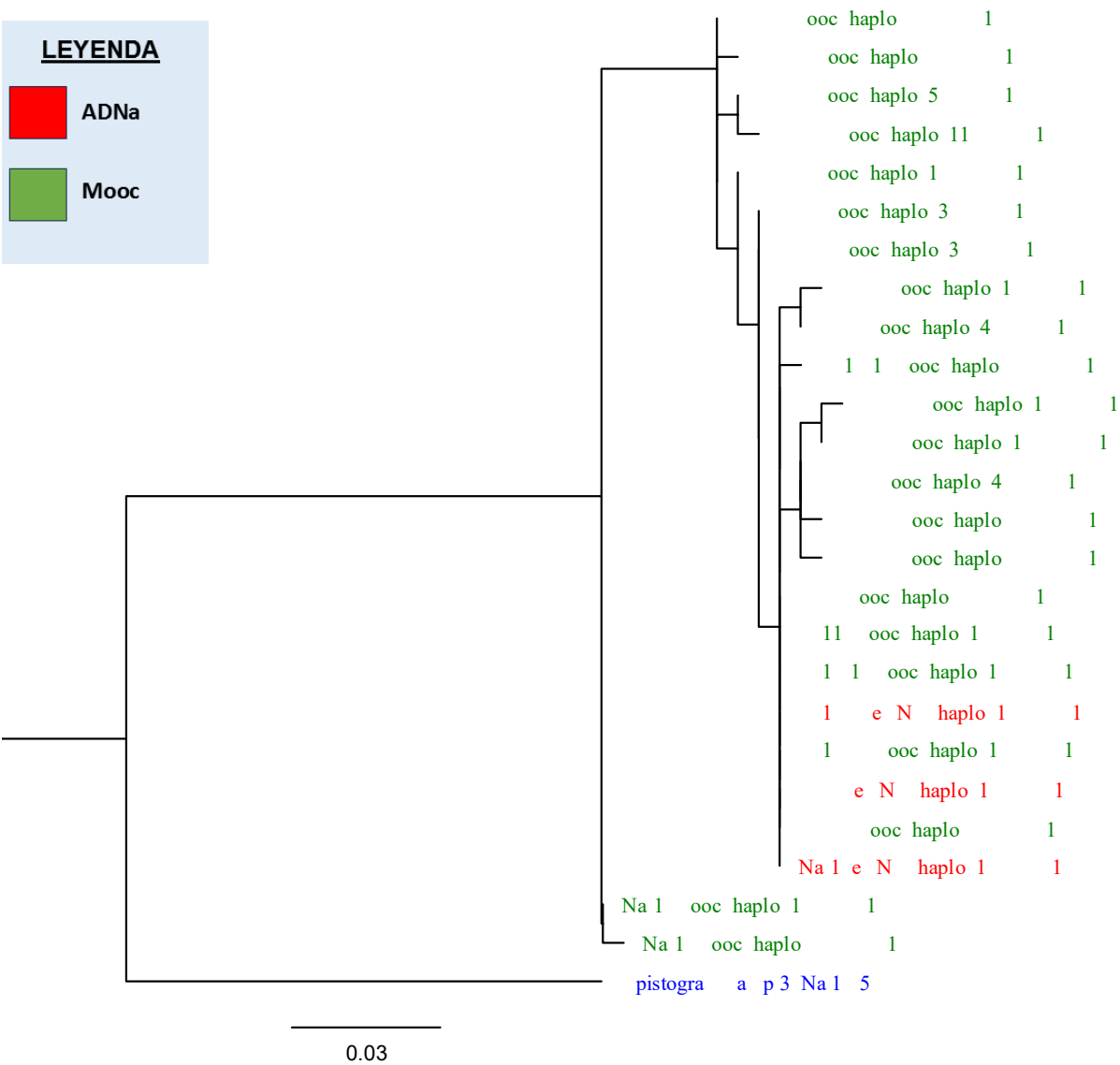
Nota. Enraizado con *Apistogramma Sp3 Na01-05*.

3.1.2.1.4 Cytb en condición natural

Solo se encontró un haplotipo en común con las muestras de ADN_a y de los mooc, y los 16 haplotipos restantes solamente se ha encontrado a partir de los mooc de ADN (Figura 26)

Figura 26

Árbol filogenético para el marcador Cytb en condición natural.



Nota. Enraizado con *Apistogramma Sp3 Na01-05*.

3.1.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL

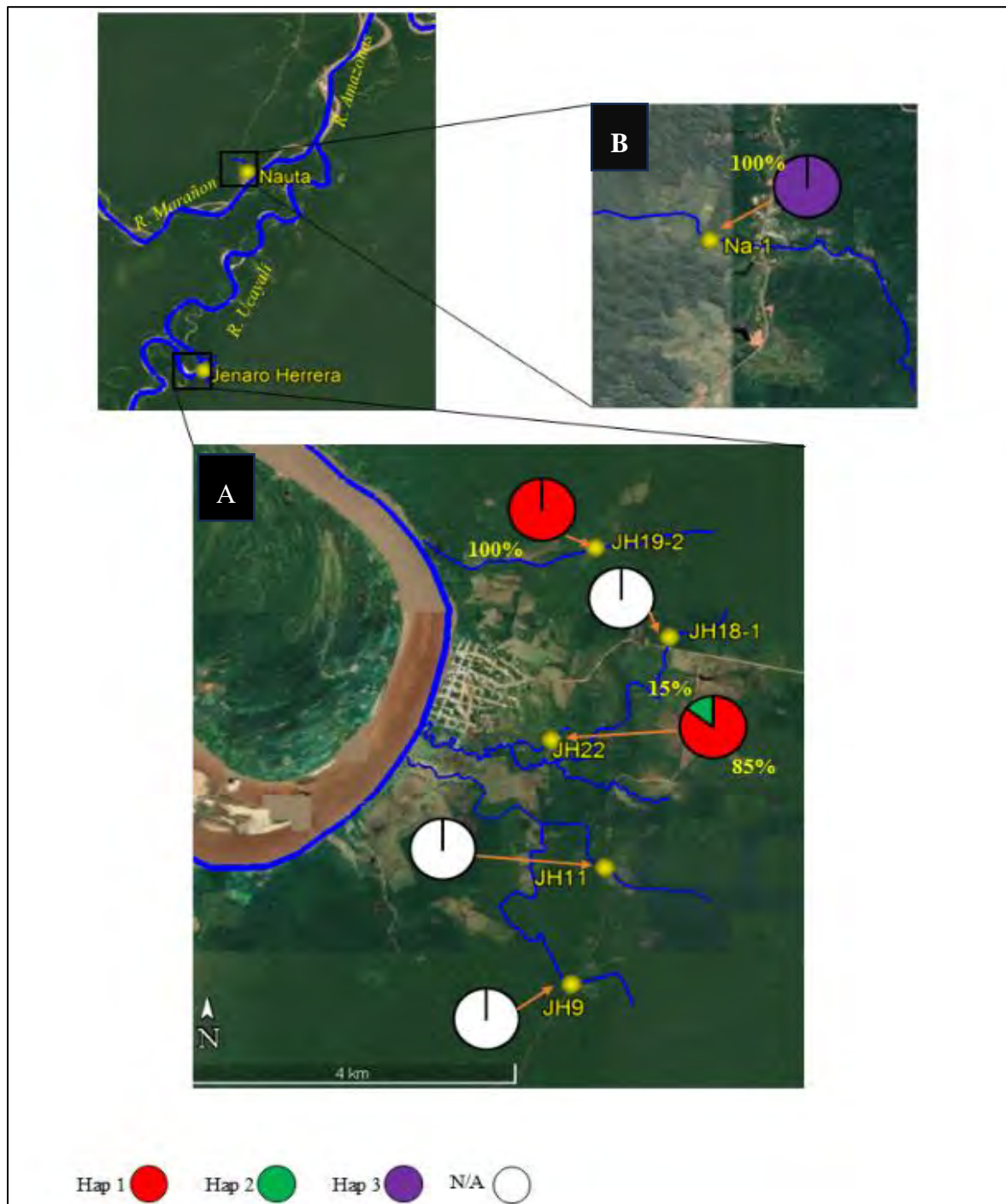
3.1.3.1 Distribución y abundancia relativa de los haplotipos dentro del área de estudio obtenidos a partir de ADN_a para los cuatro marcadores

3.1.3.1.1 Distribución y abundancia para el marcador D-loop

El haplotipo uno (Hap 1) se encuentra distribuido en los sitios JH19-2, con abundancia relativa de 100%, y JH22 con una abundancia relativa de 85%, Así mismo el haplotipo dos (Hap 2) se distribuye solamente en el sitio JH22, con una abundancia relativa de 15%. En tanto el haplotipo tres (Hap 3) se encuentra en el sitio Na-1, con una abundancia relativa de 100%. Ningún haplotipo fue encontrado dentro de los sitios JH9, JH11 y JH18-1.

Figura 27

Distribución y abundancia relativa en % para el marcador D-loop.



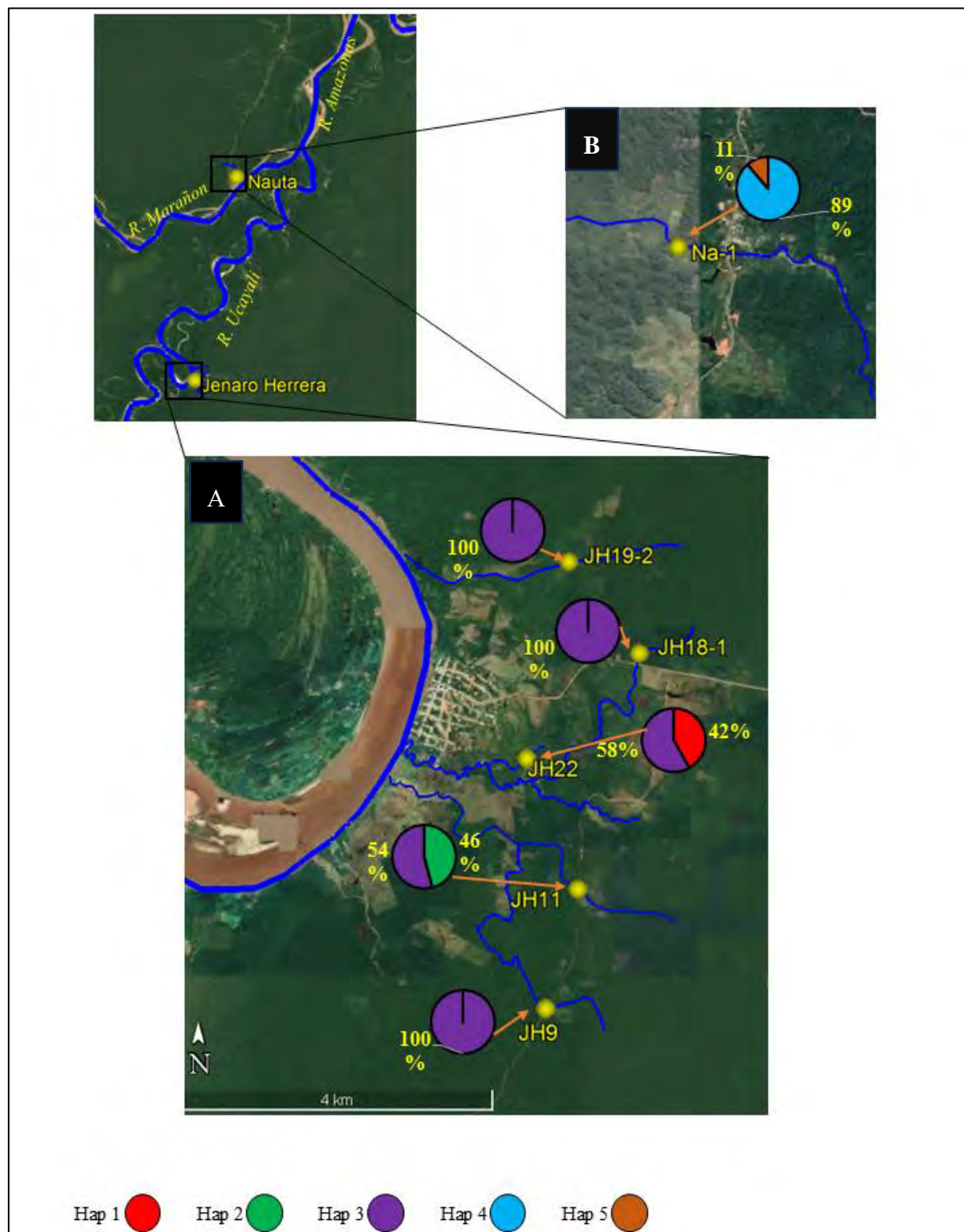
Nota. A: Zona 1; B: Zona 2

3.1.3.1.2. Distribución y abundancia para el marcador tRNA

El haplotipo tres (Hap 3) está distribuido en todos los sitios de Jenaro Herrera: tiene una abundancia relativa de 100% en los sitios JH9, JH18-1 y JH19-2. El haplotipo uno (Hap 1) tiene una abundancia relativa de 42% en el sitio JH22 y el haplotipo dos (Hap 2) de 46% en el sitio JH11. Por último, los haplotipos cuatro y cinco se encuentra únicamente en el sitio Na-1 con una abundancia relativa de 89 % y 11% respectivamente.

Figura 28

Distribución y abundancia relativa en % para el marcador tRNA.



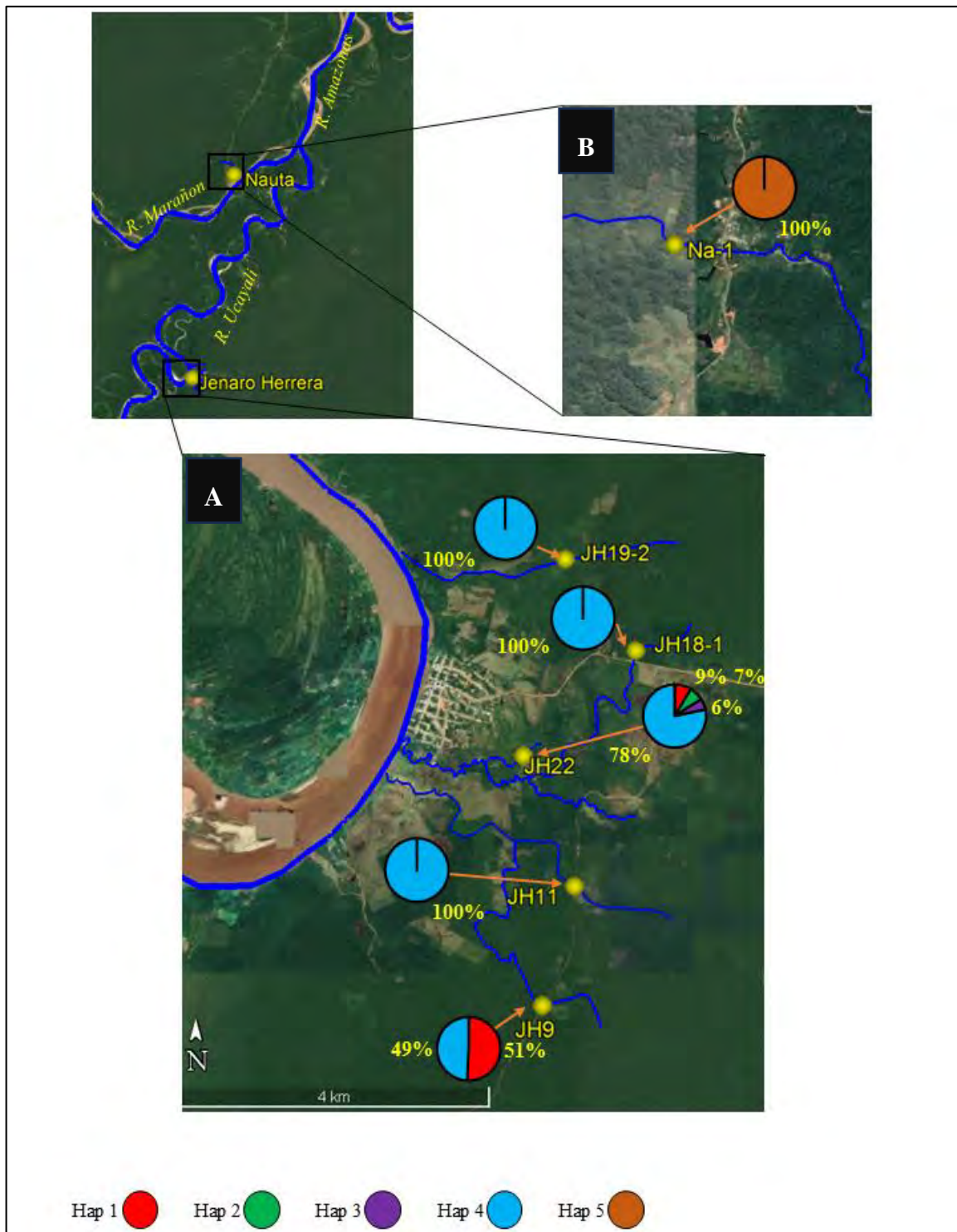
Nota. A: Zona 1; B: Zona 2

3.1.3.1.3. Distribución y abundancia para el marcador ND5

Para ND5, el haplotipo cuatro (Hap 4) está distribuido entre todos los sitios de Jenaro Herrera, con una abundancia relativa de 100% dentro de los sitios JH11, JH18-1 y JH19-2. En los sitios JH22 y JH9, este haplotipo tiene una abundancia relativa de 78% y 49%, respectivamente. El haplotipo uno (Hap 1) se encuentra distribuido en los sitios JH9 y JH22 con una abundancia de 51% y 9%, respectivamente. Los haplotipos dos (Hap 2) y tres (Hap 3) se distribuyen solamente en el sitio JH22, con una abundancia de 7% y 6%, respectivamente. El haplotipo 5 se distribuye solamente en el sitio Na-1 con una abundancia relativa de 100%.

Figura 29

Distribución y abundancia relativa para el marcador ND5.



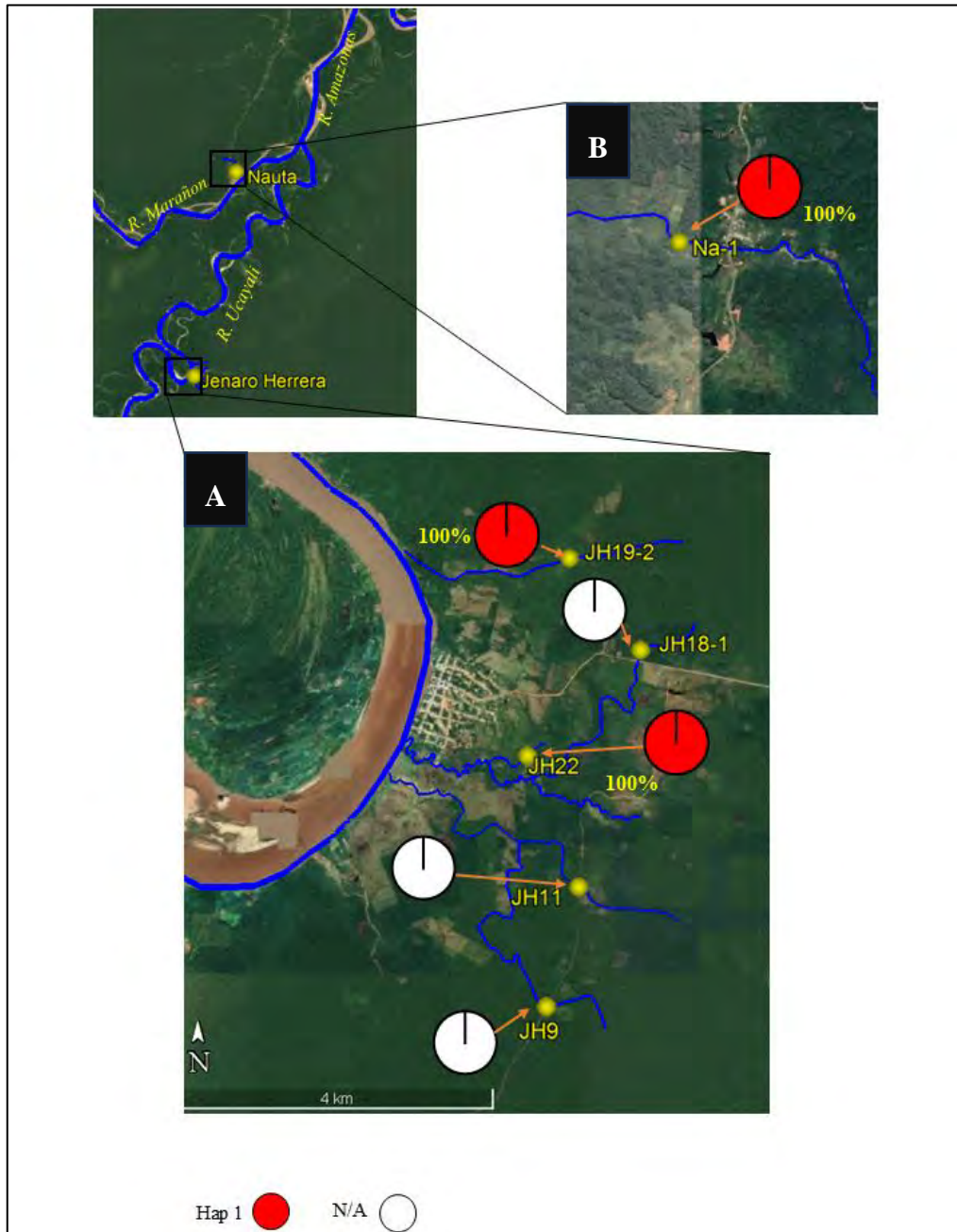
Nota. A: Zona 1; B: Zona 2

3.1.3.1.4 Distribución y abundancia para el marcador Cytb.

Solo un haplotipo fue identificado para el Cytb dentro de los sitios JH22, JH19-2 y Na-1.

Figura 30

Distribución y abundancia relativa para el marcador Cytb.



Nota. A: Zona 1; B: Zona 2

3.2 DISCUSIÓN

1. Condición controlada (pecera)

La eficiencia del metabarcoding de ADN_a en la condición controlada fue variable entre los diferentes marcadores utilizados. Los mejores resultados fueron obtenidos con el marcador molecular tRNA 5/5, los cinco haplotipos encontrados a partir del metabarcoding de ADN_a coinciden con los cinco haplotipos de la base de datos de referencia. Existen muy pocos estudios que evaluaron el enfoque de metabarcoding de ADN_a, en condición controlada (acuario), por ejemplo, para identificar los haplotipos o alelos al nivel intraespecífico, Andrés et al. (2021) documento hasta 121 alelos en ADN_a de 253 alelos totales identificados de individuos genotipados. Sin embargo, los estudios realizados al nivel de especies mostraron también la eficiencia del enfoque para identificar especies de moluscos como en los estudios de Marshall & Stepien, (2019), pudo identificar y distinguir simultáneamente entre los mejillones cebra y quagga. En peces y anfibios Evans et al. (2016) detectó nueve especies de nueve evaluadas en mesocosmos.

Los marcadores D-loop 3/4 y ND5 4/7 identificaron la mayoría de los haplotipos esperados en la base de referencia; sin embargo, algunas secuencias no coincidieron con la referencia, lo que sugiere la presencia de falsos haplotipos derivados de errores de secuenciación o de filtración bioinformática. Este patrón es congruente con lo señalado por Elbrecht et al. (2018), Thomsen & Willerslev (2015) y Zanovello et al. (2024). A pesar de ello, los tres marcadores permitieron identificar dos niveles de estructura poblacional en *A. agassizii*: (1) una separación clara entre Nanay (Zona 3) y las zonas Jenaro Herrera (Zona 1) y Nauta (Zona 2); y (2) la diferenciación entre haplotipos de JH22 y Na-1, lo cual coincide con los patrones descritos por Estivals et al. (2020, 2022).

En el caso de Cytb, los resultados no fueron interpretables debido a un error humano durante la construcción de librerías, confirmado por la revisión de los controles.

2. Condición natural (*in situ*)

Los resultados obtenidos entre los marcadores D-loop ($h=3$), tRNA ($h=5$) y ND5($h=5$) son bastantes coherentes entre ellos, los haplotipos encontrados en la zona 2 (Nauta) son diagnósticos de esta zona e igual que en la zona 1 (Jenaro Herrera), ningún haplotipo se comparte entre estas dos zonas. Esta segregación de los haplotipos entre ambas regiones es muy coherente con lo observado por Estivals et al. (2020, 2022) con marcadores nucleares y mitocondriales, quienes reportaron múltiples poblaciones genéticamente distintas aun a distancias muy reducidas.

Con el marcador D-loop no se pudo identificar haplotipos dentro de los sitios JH9, JH11 y JH18-1. Aunque D-loop presentó el menor número de reads por librería entre todos los marcadores moleculares amplificados, es muy probable que una mayor profundidad de secuenciación permita identificar haplotipos en los tres sitios. Esta posibilidad está respaldada por estudios como el de (Tsuji et al., 2020) que revelaron el alto poder de resolución del D-loop. Por ejemplo, en el pez *Plecoglossus altivelis*, este marcador fue capaz de detectar la totalidad de los nueve haplotipos previamente conocidos.

Los sitios de la zona 1 comparten generalmente el mismo haplotipo y es generalmente el más abundante. El sitio JH22 presentó la mayor diversidad haplotípica en los tres marcadores, lo que sugiere una mayor talla poblacional efectiva (N_e). Este resultado coincide con estudios que asocian la diversidad de haplotipos detectados mediante ADN_a con variaciones en abundancia o estructura efectiva de las poblaciones (Adams et al., 2023; Parsons et al., 2018).

El ADN puede revelar especies crípticas como es el caso de *A. agassizii* SP1 y *A. agassizii* SP3. Coinciden con los trabajos de Parsons et al. (2018) quienes identificaron haplotipos exclusivos en especies crípticas de marsopas.

La presencia de un número elevado de haplotipos exclusivos por zona también es coherente con los hallazgos de Sigsgaard et al. (2017), quienes demostraron que el ADN puede detectar más haplotipos que los métodos convencionales en especies con fuerte estructuración espacial, como en el tiburón ballena.

3. El metabarcoding de ADN para estudios intraespecíficos: una linda perspectiva

Comprender los mecanismos que subyacen a los patrones de diversidad genética en las poblaciones naturales ha sido una cuestión central en la biología evolutiva durante décadas (Avice, 2012; Ellegren & Galtier, 2016; Vellend & Geber, 2005). Dado que la diversidad genética de las poblaciones puede ayudar a documentar una amplia gama de mecanismos ecoevolutivos, desde la dispersión y el reclutamiento hasta la reproducción, resulta de interés para una gran variedad de disciplinas, entre ellas la biología de poblaciones y la conservación (Hastings & Harrison, 1994; Pulliam, 1988; Whiteley et al., 2015). El rápido desarrollo de las tecnologías de secuenciación durante las últimas décadas ha proporcionado un nivel de comprensión sin precedentes de la dinámica que influye en la diversidad genética de las poblaciones (Glenn, 2011; Shendure & Ji, 2008).

En este estudio se demostró que el metabarcoding del ADN puede ser utilizado para identificar polimorfismos poblacionales en el contexto de la mega biodiversidad de la amazonia peruana, al respecto (Adams et al., 2023; Marshall & Stepien, 2019; Parsons et al., 2018; Sigsgaard

et al., 2017; Stepien et al., 2019) demostraron el uso de ADN_a para estudios poblacionales en regiones subtropicales y frías. Estudios realizados en otras partes del mundo mostraron que el ADN_a puede identificar la variación haplotípica más abundante presente en una población, lo que respalda la idea del ADN_a para describir la diversidad genética dentro de una población como una herramienta de monitoreo a gran escala (Adams et al., 2023; Marshall & Stepien, 2019; Parsons et al., 2018; Sigsgaard et al., 2017; Stepien et al., 2019); Thomsen & Willerslev, 2015). El metabarcoding de ADN_a tiene un gran potencial para estudios ecológicos y el monitoreo de la biodiversidad en una amplia gama de ecosistemas acuáticos (Thomsen & Willerslev, 2015). En el presente estudio, se ha enfocado sobre marcadores mitocondriales, pero estudios de Andres et al. (2021, 2023) mostraron que el metabarcoding de ADN_a puede también ser utilizado para marcadores nucleares. Eso ofrece grandes perspectivas para identificar flujo genético entre poblaciones y evidenciar estructuras poblacionales más complejas. Se recalca que el éxito del uso del ADN_a depende mucho del marcador utilizado, pero también de las etapas de filtración de los ruidos de secuenciación para evitar de considerar dentro de los resultados falsos positivos. Los falsos haplotipos tienen tendencia a romper la estructura poblacional y hacer desaparecer la estructuración de las poblaciones. Se concuerda con los estudios de (Elbrecht et al., 2018a; Tsuji et al., 2020; Zanovello et al., 2024), que, mejorando la filtración, la corrección o eliminación de secuencias erróneas mejoran la precisión de las evaluaciones de diversidad genética intraespecífica mediante análisis de ADN_a y por ende las inferencias poblacionales.

CONCLUSIONES

1. El estudio demuestra que el metabarcoding de ADN es una herramienta eficaz y robusta para detectar el polimorfismo poblacional de *A. agassizii* en la Amazonía peruana, obteniendo resultados comparables a los derivados de ADN de tejido.
2. Los marcadores D-loop y tRNA fueron los más eficientes para identificar el polimorfismo de *A. agassizii* dentro de la zona de estudio. Destacando la importancia de probar múltiples marcadores moleculares para validar el método de ADN.
3. Se validó la metodología de ADN tanto en condiciones controladas como en condiciones naturales, demostrando capacidad para detectar variaciones genéticas a escala micro geográfica y haplotipos exclusivos.
4. En referencia a la estructura poblacional de *A. agassizii*, se identificó dos poblaciones fuertemente diferenciadas entre las zonas de Nauta y Jenaro Herrera y también se observó una diferenciación entre las microcuencas de la zona de Jenaro Herrera en especial de los sitios JH11 y JH22, atribuida a su baja dispersión y características ecológicas.

RECOMENDACIONES

Implementar el metabarcoding de ADN a como herramienta rutinaria para estudios de la biodiversidad de peces Amazónicos Su carácter no invasivo y costo-efectivo permite obtener información sin afectar a los individuos ni requerir grandes esfuerzos logísticos.

Integrar marcadores nucleares a los marcadores mitocondriales para estudios de flujo genético y dinámica de poblaciones.

Fortalecer la base de datos de secuencias de referencia, con individuos provenientes de diversas cuencas para tener una mayor representación del polimorfismo de la especie estudiada y para ayudar a identificar los falsos haplotipos.

Capacitar en bioinformática técnicas moleculares para consolidar redes de monitoreo en la Amazonía Peruana.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adams, C. I. M., Hepburn, C., Jeunen, G. J., Cross, H., Taylor, H. R., Gemmell, N. J., Bunce, M., & Knapp, M. (2023). Environmental DNA reflects common haplotypic variation. *Environmental DNA*, 5(5), 906–919. <https://doi.org/10.1002/EDN3.352>
- Adams, C. I. M., Knapp, M., Gemmell, N. J., Jeunen, G. J., Bunce, M., Lamare, M. D., & Taylor, H. R. (2019). Beyond Biodiversity: Can Environmental DNA (eDNA) Cut It as a Population Genetics Tool? *Genes* 2019, Vol. 10, Page 192, 10(3), 192. <https://doi.org/10.3390/GENES10030192>
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Bohmann, K., Gopalakrishnan, S., Lynggaard, C., Nielsen, M., & Gilbert, M. T. P. (2019). Promises and pitfalls of using high-throughput sequencing for diet analysis. *Molecular Ecology Resources*, 19(2), 327–348. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12960>;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
- Andres, K. J., Lodge, D. M., & Andrés, J. (2023). Environmental DNA reveals the genetic diversity and population structure of an invasive species in the Laurentian Great Lakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(37), e2307345120.
- Andres, K. J., Sethi, S. A., Lodge, D. M., & Andrés, J. (2021). Nuclear eDNA estimates population allele frequencies and abundance in experimental mesocosms and field samples. *Molecular Ecology*, 30(3), 685–697. <https://doi.org/10.1111/mec.15765>
- Angulo Chávez, C. (2016). *Filogenia molecular de especies del Género Apistogramma (regan, 1913) de la región Loreto*. (tesis de pregrado, UNAP).

- Ardura, A., Planes, S., & Garcia-Vazquez, E. (2013). Applications of DNA barcoding to fish landings: authentication and diversity assessment. *ZooKeys* 365: 49-65, 365(SPEC.ISSUE), 49–65. <https://doi.org/10.3897/ZOOKEYS.365.6409>
- Avise, J. C. (2012). *Molecular markers, natural history and evolution*. Springer Science & Business Media.
- Azevedo-Santos, V. M., Garcia-Ayala, J. R., Fearnside, P. M., Esteves, F. A., Pelicice, F. M., Laurance, W. F., & Benine, R. C. (2016). Amazon aquatic biodiversity imperiled by oil spills. *Biodiversity and Conservation*, 25(13), 2831–2834. <https://doi.org/10.1007/S10531-016-1192-9/METRICS>
- Batista, L. M., de Sá-Leitão, C. S., de Souza, É. M. S., dos Anjos-Santos, C. H., & de Almeida-Val, V. M. F. (2022). Addressing amazonian fish diversity using environmental DNA (eDNA): a first glance. *European Journal of Aquatic Sciences*, 1(1), 9–17.
- Bevilaqua, D. R., de Melo, S. A., de Carvalho Freitas, C. E., da Silva, A. C. V., & da Silva Batista, J. (2020). First environmental DNA (eDNA) record of central Amazon in a floodplain lake: extraction method selection and validation. *Brazilian Journal of Development*, 6(11), 87606–87621.
- Britzke, R., Oliveira, C., & Kullander, S. O. (2014). *Apistogramma ortegai* (Teleostei: Cichlidae), a new species of cichlid fish from the Ampiyacu River in the Peruvian Amazon basin. *Zootaxa*, 3869(4), 409–419. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.3869.4.5>

- Brown, S. D. J., Collins, R. A., Boyer, S., Lefort, M. C., Malumbres-Olarte, J., Vink, C. J., & Cruickshank, R. H. (2012). Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 562-565. <https://doi.org/10.1111/J.17550998.2011.03108.X>;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
- Butler, R. A. (2013). Amazon river ecosystems being rapidly degraded, but remain neglected by conservation efforts. *Mongabay*. <https://news.mongabay.com/2013/0208-amazon-river-threats.html>
- Castello, L., & Macedo, M. N. (2016). Large-scale degradation of Amazonian freshwater ecosystems. *Global Change Biology*, 22(3), 990–1007. <https://doi.org/10.1111/GCB.13173>,
- Castello, L., Mcgrath, D. G., Hess, L. L., Coe, M. T., Lefebvre, P. A., Petry, P., Macedo, M. N., Renó, V. F., & Arantes, C. C. (2013). The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. *Conservation Letters*, 6(4), 217–229. <https://doi.org/10.1111/CONL.12008>
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., & Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1(5). https://doi.org/10.1126/SCIADV.1400253/SUPPL_FILE/1400253_SM.PDF
- Cilleros, K., Valentini, A., Allard, L., Dejean, T., Etienne, R., Grenouillet, G., Iribar, A., Taberlet, P., Vigouroux, R., & Brosse, S. (2019). Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): A test with Guianese freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 27–46.

- Condachou, C., Coutant, O., Fouquet, A., Valentini, A., Brosse, S., & Murienne, J. (2025). Tropical Rainfall and eDNA Washout Impact Estimations of Amazonian Biodiversity Patterns From Environmental Samples. *Environmental DNA*, 7(3), e70141.
- Coutant, O., Jézéquel, C., Mokany, K., Cantera, I., Covain, R., Valentini, A., Dejean, T., Brosse, S., & Murienne, J. (2023). Environmental DNA reveals a mismatch between diversity facets of Amazonian fishes in response to contrasting geographical, environmental and anthropogenic effects. *Global Change Biology*, 29(7), 1741–1758.
- Couton, M., Viard, F., & Altermatt, F. (2023). Opportunities and inherent limits of using environmental DNA for population genetics. *Environmental DNA*, 5(5), 1048–1064. <https://doi.org/10.1002/EDN3.448;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Dagosta, F. C. P., & Pinna, M. De. (2019). The Fishes of the Amazon: Distribution and Biogeographical Patterns, with a Comprehensive List of Species. [https://doi.org/10.1206/0003-0090.431.1.1,2019\(431\),1–163](https://doi.org/10.1206/0003-0090.431.1.1,2019(431),1-163).<https://doi.org/10.1206/0003-0090.431.1.1>
- Darwin, Charles. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray.
- Davidson, E. A., De Araújo, A. C., Artaxo, P., Balch, J. K., Brown, I. F., Mercedes, M. M., Coe, M. T., Defries, R. S., Keller, M., Longo, M., Munger, J. W., Schroeder, W., Soares-Filho, B. S., Souza, C. M., & Wofsy, S. C. (2012). The Amazon basin in transition. *Nature*, 481(7381), 321–328.

<https://doi.org/10.1038/NATURE10717;SUBJMETA=106,158,242,2454,47,694,704;KWRD=BIOGEOCHEMISTRY,CLIMATE+CHANGE,FOREST+ECOLOGY,HYDROLOGY>

- Deiner, K., Renshaw, M. A., Li, Y., Olds, B. P., Lodge, D. M., & Pfrender, M. E. (2017). Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(12), 1888–1898. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12836>
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011). Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLOS ONE*, 6(8), e23398. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023398>
- Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv*, 081257. <https://doi.org/10.1101/081257>
- Elbrecht, V., Vamos, E. E., Steinke, D., & Leese, F. (2018). Estimating intraspecific genetic diversity from community DNA metabarcoding data. *PeerJ*, 2018(4), e4644. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.4644/SUPP-8>
- Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 422–433.
- Estivals, G., Duponchelle, F., García-Dávila, C., Römer, U., Mariac, C., & Renno, J. F. (2022). Exceptional Genetic Differentiation at a Micro-geographic Scale in *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875) from the Peruvian Amazon: Sympatric Speciation? In *Evolutionary Biology* (Vol. 50, Issue 1, pp. 1–17). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11692-022-09587-9>

- Estivals, G., Duponchelle, F., Römer, U., García-Dávila, C., Airola, E., Deléglise, M., & Renno, J. F. (2020). The Amazonian dwarf cichlid *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875) is a geographic mosaic of potentially tens of species: Conservation implications. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 30(8), 1521–1539. <https://doi.org/10.1002/aqc.3373>
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Pfrender, M. E., Lamberti, G. A., & Lodge, D. M. (2016). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 2941. <https://doi.org/10.1111/17550998.12433>;SUBPAGE:STRING:FULL
- Fernandez Piqueras, Jose., Fernandez Peralta, A. Maria., Santos Hernandez, Javier., & Gonzalez Aguilera, J. Jose. (2002). *Genética*. Ariel.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425. <https://doi.org/10.1098/RSBL.2008.0118>;CTYPE:STRING:JOURNAL
- Fraser, B. (2014). Deforestation: Carving up the Amazon. *Nature*, 509(7501), 418–419. <https://doi.org/10.1038/509418A>;SUBJMETA=106,158,172,35,631,672,704;KWRD=ATMOSPHERIC+SCIENCE,CLIMATE+SCIENCES,CONSERVATION+BIOLOGY,ENVIRONMENTAL+SCIENCES
- Galan, M., Pons, J., Tournayre, O., Pierre, É., Leuchtmann, M., Pontier, D., & Charbonnel, N. (2018). Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their

prey: Application to bat species diet analysis. *Molecular Ecology Resources*, 18(3), 474–489.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12749>

García Dávila, C. R., Estivals, G., Eduardo Mejia de Loayza, J., Almendra Flores Silva, M., Alberto Custodio Angulo Chávez, C., Sánchez Riveiro, H., Nolorbe Payahua, C., Castro Ruiz, D., Chuquipiondo Aurea García Vásquez, C., Ortega, H., Pinedo Tenazoa, L., de Oliveira, C., Römer, U., Mariac, C., Duponchelle, F., & Renno, J.-F. (2020). *PECES ORNAMENTALES DE LA AMAZONIA PERUANA: Vol. I*.

Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11(5), 759–769.

Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., & Lewontin, R. (2002). *Genética* (Interamericana-McGraw Hill, Ed.; 7°).

Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C., & Baird, D. J. (2011). Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLOS ONE*, 6(4), e17497.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017497>

Halkett, F., & Mita, S. de. (2017). *Introduction à la génétique et à la génomique des populations*. 68 p. <https://doi.org/10.34894/VQ1DJA>

Hastings, A., & Harrison, S. (1994). Metapopulation dynamics and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 167–188.

- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & DeWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1098/RSBL.2003.0025>
- Honnay, O. (2013). Genetic Drift. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 251–253. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00616-1>
- Hubert, N., y Hanner, R. (2015). Códigos de barras de ADN, delimitación de especies y taxonomía: una perspectiva histórica. *Códigos de barras de ADN*, 3 (1).
- Hubert, N. (2024). *Evolución molecular neutral y delimitación de especies*.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., BurrIDGE, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., Zhang, J., April, J., & Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLOS ONE*, 3(6), e2490. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002490>
- Hurd, L. E., Sousa, R. G. C., Siqueira-Souza, F. K., Cooper, G. J., Kahn, J. R., & Freitas, C. E. C. (2016). Amazon floodplain fish communities: Habitat connectivity and conservation in a rapidly deteriorating environment. *Biological Conservation*, 195, 118–127. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2016.01.005>
- Jenkins, T. L., Castilho, R., & Stevens, J. R. (2018). Meta-analysis of northeast Atlantic marine taxa shows contrasting phylogeographic patterns following post-LGM expansions. *PeerJ*, 2018(9), e5684. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.5684/SUPP-6>

- Jézéquel, C., Tedesco, P. A., Bigorne, R., Maldonado-Ocampo, J. A., Ortega, H., Hidalgo, M., Martens, K., Torrente-Vilara, G., Zuanon, J., Acosta, A., Agudelo, E., Barrera Maure, S., Bastos, D. A., Bogotá Gregory, J., Cabeceira, F. G., Canto, A. L. C., Carvajal-Vallejos, F. M., Carvalho, L. N., Cella-Ribeiro, A., Oberdorff, T. (2020). A database of freshwater fish species of the Amazon Basin. *Scientific Data*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/S41597-020-04364;SUBJMETA=158,2450,2459,631,670,704;KWRD=BIODIVERSITY,FRESHWATER+ECOLOGY,TROPICAL+ECOLOGY>
- Kornfield, I., & Smith, P. F. (2000). African cichlid fishes: Model systems for evolutionary biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31(Volume 31, 2000), 163–196. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.31.1.163/CITE/REFWORKS>
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J. T., & Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: Application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34/TABLES/2>
- López Fernández, H., Winemiller, K. O., & Honeycutt, R. L. (2010). Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3), 1070–1086. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.02.020>
- Marshall, N. T., & Stepien, C. A. (2019). Invasion genetics from eDNA and thousands of larvae: A targeted metabarcoding assay that distinguishes species and population variation of zebra

- and quagga mussels. *Ecology and Evolution*, 9(6), 3515–3538.
<https://doi.org/10.1002/ECE3.4985>
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLOS Biology*, 3(12), e422. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0030422>
- Miya, M., Gotoh, R. O., & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science* 2020 86:6, 86(6), 939–970. <https://doi.org/10.1007/S12562-020-01461-X>
- Myers, N., Mittermeyer, R. A., Mittermeyer, C. G., Da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858.
<https://doi.org/10.1038/35002501;KWRD=SCIENCE>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSU300>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS091>

- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289–290.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTG412>
- Parsons, K. M., Everett, M., Dahlheim, M., & Park, L. (2018). Water, water everywhere: Environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *Royal Society Open Science*, 5(8). <https://doi.org/10.1098/RSOS.180537>;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
- Pierce, B. A., & Pierce, B. A. (2017). Pierce, B. A. (2017). *Genética: Un enfoque conceptual* (5^a ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Piñeros, V. J., Calderón-Cortés, N., Piñeros, V. J., & Calderón-Cortés, N. (2023). Metabarcoding: una herramienta prometedora para el estudio de la ecología trófica de peces mexicanos. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 94.
<https://doi.org/10.22201/IB.20078706E.2023.94.4855>
- Pulliam, H. R. (1988). Sources, sinks, and population regulation. *The American Naturalist*, 132(5), 652–661.
- Rambaut, A. (2018). *Figtree ver 1.4.4*. Instituto de Biología Evolutiva, Universidad de Edimburgo, Edimburgo.
- Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., & Rocha, L. A. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 89(1), 12–47.
<https://doi.org/10.1111/JFB.13016>;WGROU:STRING:PUBLICATION

Römer, U. (2000). *Cichlid Atlas, Natural History of South American Dwarf Cichlids. I*, 1311.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302.
<https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSX248>

Sahu, A., Kumar, N., Pal Singh, C., & Singh, M. (2023). Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. *Journal for Nature Conservation*, 71, 126325.
<https://doi.org/10.1016/J.JNC.2022.126325>

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2012.05384.X>

Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145.

Sigsgaard, E. E., Jensen, M. R., Winkelmann, I. E., Møller, P. R., Hansen, M. M., & Thomsen, P. F. (2020). Population-level inferences from environmental DNA—Current status and future perspectives. *Evolutionary Applications*, 13(2), 245–262.
<https://doi.org/10.1111/EVA.12882>

Sigsgaard, E. E., Nielsen, I. B., Bach, S. S., Lorenzen, E. D., Robinson, D. P., Knudsen, S. W., Pedersen, M. W., Jaidah, M. Al, Orlando, L., Willerslev, E., Møller, P. R., & Thomsen, P. F. (2017). Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater

environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution* 2016 1:1, 1(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1038/s41559-016-0004>

Stat, M., Huggett, M. J., Bernasconi, R., Dibattista, J. D., Berry, T. E., Newman, S. J., Harvey, E. S., & Bunce, M. (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: Metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
[https://doi.org/10.1038/S41598-017-12501-](https://doi.org/10.1038/S41598-017-12501-5)
5;TECHMETA=23,45,77;SUBJMETA=158,208,2254,2464,514,631;KWRD=ECOLOGIC
AL+GENETICS,NEXT-GENERATION+SEQUENCING

Stepien, C. A., Snyder, M. R., & Elz, A. E. (2019). Invasion genetics of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* across North America: Differentiation of fronts, introgression, and eDNA metabarcode detection. *PLOS ONE*, 14(3), e0203012.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0203012>

Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*, 1–253. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001>

Taberlet, P., Prud'homme, M., Capone, E., Roy, J., Muehl, C., Behzad, W., Gielly, L., Rioux, D., Choler, P., Clément, J. C., Melodelima, C., Pompanon, F., & Coissac, E. (2012). Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, 21(8), 1816–1820.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2011.05317.X>

- Thomaz, E. L., Nunes, D. D., & Watanabe, M. (2020). Effects of tropical forest conversion on soil and aquatic systems in southwestern Brazilian Amazonia: A synthesis. *Environmental Research*, 183, 109220. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109220>
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4–18. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2014.11.019>
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W232–W235. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW256>
- Trivedi, S., Rehman, H., Saggu, S., Panneerselvam, C., & Ghosh, S. K. (2018). DNA Barcoding and Molecular Phylogeny. In *DNA Barcoding and Molecular Phylogeny*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-90680-5>
- Trivedi, S., Rehman, H., Saggu, S., Panneerselvam, C., & Ghosh, S. K. (2020). DNA barcoding and molecular phylogeny. In *DNA Barcoding and Molecular Phylogeny*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-50075-7>
- Tsuji, S., Miya, M., Ushio, M., Sato, H., Minamoto, T., & Yamanaka, H. (2020). Evaluating intraspecific genetic diversity using environmental DNA and denoising approach: A case study using tank water. *Environmental DNA*, 2(1), 42–52. <https://doi.org/10.1002/EDN3.44;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION>

- Turon, X., Antich, A., Palacín, C., Præbel, K., & Wangenstein, O. S. (2020). From metabarcoding to metaphylogeography: separating the wheat from the chaff. *Ecological Applications*, 30(2), e02036. <https://doi.org/10.1002/EAP.2036>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115–e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G., Geniez, P., Pont, R., Gillier, C., Baudoin, M., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942. <https://doi.org/10.1111/MEC.13428>
- Vellend, M., & Geber, M. A. (2005). Connections between species diversity and genetic diversity. *Ecology Letters*, 8(7), 767–781.
- Viana, V. (2020). Health Climate Justice and Deforestation in the Amazon. *Health of People, Health of Planet and Our Responsibility: Climate Change, Air Pollution and Health*, 165–174. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31125-4_13/FIGURES/1
- Vizmanos Pérez, J. L. (2014). Claves de la genética de poblaciones: los mecanismos genéticos de la evolución. *Elsevier España*. https://books.google.com/books/about/Claves_de_la_gen%C3%A9tica_de_poblaciones.html?hl=es&id=LogOngEACAAJ

Wallace, A. R. (1858). On the tendency of varieties to depart indefinitely from the original type. In *Evolution in Victorian Britain* (pp. 369–379). Routledge.

What is DNA Barcoding? How it works? Importance and applicaitons - YouTube. Retrieved June 16, 2025, from <https://www.youtube.com/watch?v=HpRHhIbDFd8&t=21s>

Whiteley, A. R., Fitzpatrick, S. W., Funk, W. C., & Tallmon, D. A. (2015). Genetic rescue to the rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1), 42–49.

Wright, S. J., & Muller L, H. C. (2006). The future of tropical forest species. *Biotropica*, 38(3), 287301. <https://doi.org/10.1111/J.17447429.2006.00154.X>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:17447429;WGROU:STRING:PUBLICATION

Zanovello, L., Martins, F. M. S., Girardi, M., Casari, S., Galla, G., Beja, P., Pedrini, P., Bertorelle, G., & Hauffe, H. C. (2024). Validation of an eDNA-based workflow for monitoring inter- and intra-specific CytB haplotype diversity of alpine amphibians. *Environmental DNA*, 6(5), e573. <https://doi.org/10.1002/EDN3.5>

ANEXO: 1 Base de datos de referencia

INDIVIDUOS	SECUENCIAS CONSENSO
D-LOOP	
Apistogramma_Sp1_JH22-01	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCGCTCTTTTCGAAATAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACA CATAAATACAATAAACTACGCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp1_JH22-02	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCGCTCTTTTCGAAACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTAC ACATAAATACAATAAACTACGCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp1_Na01-03	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCTACTCTTTTCGCAACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTA CACATAAATACAATAAACTACGCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp1_Na01-04	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCTACTCTTTTCGCAACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTA CACATAAATACAATAAACTACGCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp3_Na01-05	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCACTCTTTTCATAACAATACTTTGAACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGGTAACATTATAACTAGACTAC ACGTAAATACAATGGTACTACGCTGCTGCACTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp1_Na01-06	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCTACTCTTTTCGCAACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTA CACATAAATACAATAAACTACGCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp3_Na01-07	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCACTCTTTTCATAACAATACTTTGAACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGGTAACATTATAACTAGACTAC ACGTAAATACAATGGTACTACGCTGCTGCACTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp3_Na01-08	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCACTCTTTTCATAACAATACTTTGAACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGGTAACATTATAACTAGACTAC ACGTAAATACAATGGTACTACGCTGCTGCACTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp1_Na01-09	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCTACTCTTTTCGCAACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTA CACATAAATACAATAAACTACGCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp1_Na01-10	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCTACTCTTTTCGCAACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTA CACATAAATACAATAAACTACGCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp3_Na01-11	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCACTCTTTTCATAACAATACTTTGAACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGGTAACATTATAACTAGACTAC ACGTAAATACAATGGTACTACGCTGCTGCACTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp3_Na01-12	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCACTCTTTTCATAACAATACTTTGAACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGGTAACATTATAACTAGACTAC ACGTAAATACAATGGTACTACGCTGCTGCACTACTCTCACTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG

Apistogramma_Sp1_JH22-13	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCGCTCTTTTCGAAATAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACA CATAAATACAATAACACTACGCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp1_JH22-14	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCGCTCTTTTCGAAATAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACA CATAAATACAATAACACTACGCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
Apistogramma_Sp1_JH22-15	GTTTCTTCGCGCCTAAACCCCCCTACCCCCCTAAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAATA TCGAGAAGCCCCCGCTCTTTTCGAAACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCTGTGATAGCATTATAACTAGACTAC ACATAAATACAATAACACTACGCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCGTAATGTTTTACACGCCGAAG
tRNA	
Apistogramma_Sp1_JH22-01	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACGCTCTGCCAACC-CATCCGAGCTCTGCCAACC- CATCCGAGCTCTGCCAACCCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCT GATACATAATTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACATTTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAA AAATTATTAAATCCAAAAATTAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACC AAGTCCCCA
Apistogramma_Sp1_JH22-02	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACGCTCTGCCAACC-CATCCGAGCTCTGCCAACC- CATCCGAGCTCTGCCAACCCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCT AATACATAATTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACATTTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAA AAATTATTAAATCCAAAAATTAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACC AAGTCCCCA
Apistogramma_Sp1_Na01-03	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATCC- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGA TACTCCTAGATCTTTCCACATTTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATT AATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp1_Na01-04	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATCC- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGA TACTCCTAGATCTTTCCACATTTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATT AATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp3_Na01-05	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTT- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCTATGGTGTCTAATACATACTTTTAAGTAAGAT ACTCCTAGATCTTTCCACATTTCATACACCAACAGTTGACCTAAAAAATTTACCCAAACCAGGAAAAATTATTAATCCAAAAATTA ACTTCTAGTCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCTCAAAATCTTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp1_Na01-06	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATCC- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGA TACTCCTAGATCTTTCCACATTTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATT AATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp3_Na01-07	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTT- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCTATGGTGTCTAATACATACTTTTAAGTAAGAT ACTCCTAGATCTTTCCACATTTCATACACCAACAGTTGACCTAAAAAATTTACCCAAACCAGGAAAAATTATTAATCCAAAAATTA ACTTCTAGTCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCTCAAAATCTTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp3_Na01-08	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTT- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCTATGGTGTCTAATACATACTTTTAAGTAAGAT ACTCCTAGATCTTTCCACATTTCATACACCAACAGTTGACCTAAAAAATTTACCCAAACCAGGAAAAATTATTAATCCAAAAATTA ACTTCTAGTCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCTCAAAATCTTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA

Apistogramma_Sp1_ Na01-09	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATCC- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTAAGTAAGA TACTCCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATT AATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp1_ Na01-10	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATC-CACCCAAGCTCTGCCAATCC- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTAAGTAAGA TACTCCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATT AATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp3_ Na01-11	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTT- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCTATGGTGTCTAATACATACTTTAAGTAAGAT ACTCCTAGATCTTTCCACATTCATACACCAACAGTTGACCTAAAAAATTTACCCAAACCAGGAAAATTATTAATCCAAAAATTA ACTTCTAGTCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCTCAAAATCTTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp3_ Na01-12	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACTCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTT- TATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCTATGGTGTCTAATACATACTTTAAGTAAGAT ACTCCTAGATCTTTCCACATTCATACACCAACAGTTGACCTAAAAAATTTACCCAAACCAGGAAAATTATTAATCCAAAAATTA ACTTCTAGTCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCTCAAAATCTTCATCAGTCTAGTTATACCAAGTCCCCA
Apistogramma_Sp1_ JH22-13	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACGCTCTGCCAACC-CATCCGAGCTCTGCCAACC- CATCCGAGCTCTGCCAACCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCT AATACATAATTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAA AAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACC AAGTCCCCA
Apistogramma_Sp1_ JH22-14	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACGCTCTGCCAACC-CATCCGAGCTCTGCCAACC- CATCCGAGCTCTGCCAACCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCT GATACATAATTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAGCTAAAAAATTTACCCAAACCAGAA AAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACC AAGTCCCCA
Apistogramma_Sp1_ JH22-15	GCCAGGATTCTGGCTAAACTACGCTCTGCCAACC-CATCCGAGCTCTGCCAACC- CATCCGAGCTCTGCCAACCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAATATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCT AATACATAATTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAA AAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGGCCATATACCTCATCAGTCTAGTTATACC AAGTCCCCA
ND5	
Apistogramma_Sp1_ JH22-01	CCGTAACAGTTCTTGGCCTCATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAAACCTTACCC CCACCACTTCTCTAACATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTG TCGCCACCCAAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGC CACAAACAATCTCCAGCAAGGCCTGGTAAAAACCTACCTC
Apistogramma_Sp1_ JH22-02	CCGTAACAGTTCTTGGCCTCATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAAACCTTACCC CCACCACTTCTCTAACATGTTAGGATTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTG TCGCCACCCAAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGC CACAAACAATCTCCAGCAAGGCCTGGTAAAAACCTACCTC
Apistogramma_Sp1_ Na01-03	CCGTAACAGTTCTTGGCCTCATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATGACTAACAACAATTCAAGCCCACCCCAAAACCTTACCC CTACCACTTCTCTAACATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTCGGCCAATCTG TCGCCACCCAAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGC CACAAACAATCTCCAGCAAGGCCTGGTAAAAACCTACCTC

Apistogramma_Sp1_ JH22-15	CCGTAACAGTTCTTGGCCTCATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCTTACCC CCACCATTCTCTAACATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCTGGGCAATCTG TCGCCACCCAAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGC CACAAACAATCTCCAGCAAGGCCTGGTAAAAACCTACCTC
Cytb	
Apistogramma_Sp1_ JH22-01	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATTTACACATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp1_ JH22-02	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp1_ Na01-03	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp1_ Na01-04	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp3_ Na01-05	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATGCACTACACTGCTGACACCAGTATAGCTTTTACTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGGCTAATCCGAAATATACATGCTAACGGGACATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTATAAAGGAACATGGAGCATCGGGGTAATTCTACTACTACTAC TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp1_ Na01-06	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp3_ Na01-07	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATGCACTACACTGCTGACACCAGTATAGCTTTTACTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGGCTAATCCGAAATATACATGCTAACGGGACATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTATAAAGGAACATGGAGCATCGGGGTAATTCTACTACTACTAC TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp3_ Na01-08	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATGCACTACACTGCTGACACCAGTATAGCTTTTACTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGGCTAATCCGAAATATACATGCTAACGGGACATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTATAAAGGAACATGGAGCATCGGGGTAATTCTACTACTACTAC TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp1_ Na01-09	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC

Apistogramma_Sp1_ Na01-10	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp3_ Na01-11	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATGCACTACACTGCTGACACCAGTATAGCTTTTACTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGGCTAATCCGAAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTATAAAGGAACATGGAGCATCGGGGTAATTCTACTACTACTAC TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp3_ Na01-12	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATGCACTACACTGCTGACACCAGTATAGCTTTTACTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGGCTAATCCGAAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTATAAAGGAACATGGAGCATCGGGGTAATTCTACTACTACTAC TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp1_ JH22-13	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATTTACACATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp1_ JH22-14	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAGATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATTTACACATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC
Apistogramma_Sp1_ JH22-15	GGCCTCTGCCTAGTCTCCCAATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCAT CGCCACATCTGCCGAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATC TATCTACACATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAG TGATAATAACCGCTTTCGTGGGCTAC

ANEXO: 2 Secuencia de haplotipos en condición controlada (Acuario)

HAPLOTIPOS	SECUENCIAS
D-LOOP	
>Aqua_eDNA_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCCTACTCTTTTCGCA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCG
>Aqua_eDNA_haplo_4_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCCTACTCTTTTCGCA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>Aqua_eDNA_haplo_2_OTU_2	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAG-CCCCCCTACTCTTTTCATA ACAATACTTTGAACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGGTAACATTATAACTAGACTACACGTAAATACAATGGTACTAC GCTGCTGCACTACTCTCACTACTCG
>Aqua_eDNA_haplo_3_OTU_3	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAG-CCCCCCTACTCTTTTCGAA ATAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>Aqua_mooc_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCCTACTCTTTTCGCA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCG
>Aqua_mooc_haplo_3_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCCTACTCTTTTCGCA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>Aqua_mooc_haplo_4_OTU_3	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCCTACTCTTTTCGAA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
tRNA	
>Aqua_eDNA_haplo_1_OTU_1	TCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTT-TATGGTGACTAGTACATGTATGTAAT ATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCTATGGTGTCTAATACATACTTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACAT TCATACACCAACAGTTGACCTAAAAAATTTACCCAAACCAGGAAAAATTATTAATCCAAAAATTAACCTCTAGTCAAATG ATCGAAATTTAAGACCGAGCTCAAAATCTTCAT
>Aqua_eDNA_haplo_2_OTU_2	GCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCAACCCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAAT ATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACAT TCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAAATCAAATG ATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>Aqua_eDNA_haplo_3_OTU_2	GCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCAACCCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAAT ATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACAT TCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAAATCAAATG ATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>Aqua_eDNA_haplo_4_OTU_2	TCTCTGCCA-ATCCACCCAAGCTCTGCCA-ATCCACCCAAGCTCTGCCAATCC-TATGGTGACTAGTACATGTATGTAAT ATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACAT TCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAAATCAAATG ATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT

>Aqua_eDNA_haplo_5_OTU_2	GCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCAACCCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAAT ATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTGATACATAATTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACAT TCATACATCAACAGTTGAGCTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAATCAAATG ATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>Aqua_mooc_haplo_1_OTU_1	GCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCAACCCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAAT ATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACAT TCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAATCAAATG ATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>Aqua_mooc_haplo_4_OTU_1	GCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCA-ACCCATCCGAGCTCTGCCAACCCATATGGTGACTAGTACATGTATGTAAT ATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTGATACATAATTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACAT TCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAATTAATTTTAATCAAATG ATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>Aqua_mooc_haplo_2_OTU_2	TCTCTGCCATTTTCTCCGAGCTCTGCCATTTTCTTCCGAGCTCTGCCATTTT-TATGGTGACTAGTACATGTATGTAAT ATCACCATAAATTTATGTTAACCATATCTATGGTGTCTAATACATACTTTTAAGTAAGATACTCCTAGATCTTTCCACAT TCATACACCAACAGTTGACCTAAAAAATTTACCCAAACCAGGAAAAATTATTAATCCAAAAATTAACCTCTAGTCAAATG ATCGAAATTTAAGACCGAGCTCAAAATCTTCAT
ND5	
>Aqua_eDNA_haplo_1_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATGACTAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCCCTTACCCCTACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTCGGCCAATCTGTGCCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Aqua_eDNA_haplo_2_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTTTTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTGCCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Aqua_eDNA_haplo_3_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTGCCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Aqua_eDNA_haplo_5_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTGCCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Aqua_eDNA_haplo_6_OTU_2	TTTACCGCCCTGGAATTAGCCACTATAACTAACAAACAATTCAAACCCGCCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTATACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTCTGCCCACCC AAACCATCGACCTTGCTGATTAGAAAAAATTGGCCCAAAGCAATAATCCCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAACA
>Aqua_eDNA_haplo_7_OTU_2	TTTACCGCCCTGGAATTAGCCACTATAACTAACAAACAATTCAAACCCGCCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTATACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTGCCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Aqua_mooc_haplo_1_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTGCCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA

	AACAATCTCCAGCA
>Aqua_mooc_haplo_2_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATGACTAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCCCTTACCCCTACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTCGGGCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Aqua_mooc_haplo_3_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Aqua_mooc_haplo_6_OTU_1	TTTACCGCCCTGGAATTAGCCACTATAACTAACAAACAATTCAAACCCGCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Aqua_mooc_haplo_9_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCAAACCCCTTACCCCAACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAACA
Cytb	
>Aqua_mooc_haplo_1_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_mooc_haplo_2_OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_mooc_haplo_4_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATTTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_mooc_haplo_6_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_mooc_haplo_10_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_mooc_haplo_11_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT

>Aqua_mooc_haplo_5_OTU_3	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_mooc_haplo_7_OTU_3	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_mooc_haplo_8_OTU_3	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_mooc_haplo_9_OTU_3	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_1_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_2_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATTTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_5_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_6_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_7_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATTTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_10_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_3_OTU_2	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT

>Aqua_eDNA_haplo_8_OTU_2	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_9_OTU_2	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATTTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_11_OTU_2	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Aqua_eDNA_haplo_12_OTU_2	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGTCTTTACTTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT

ANEXO: 3 Secuencia de haplotipos en condición natural (*in situ*)

HAPLOTIPOS	SECUENCIAS
D-LOOP	
>JH19_2_eDNA_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCGCTC-TTTCGAA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>JH22_eDNA_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCC-CCCGCTC-TTTCGAA ATAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>JH22_eDNA_haplo_2_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCGCTC-TTTCGAA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>Na_1_eDNA_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCTACTCTTTTCGCA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCG
>JH18_1_mooc_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCGCTC-TTTCGAA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>JH18_1_mooc_haplo_2_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCC-CCCGCTC-TTTCGAA ATAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>JH18_1_mooc_haplo_3_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCTCCGCTC-TTTCGAA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG

>JH19_2_mooc_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCGCTC-TTTCGAA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>JH19_2_mooc_haplo_2_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCTCCCGCTC-TTTCGAA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>JH22_mooc_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCC-CCCGCTC-TTTCGAA ATAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>JH22_mooc_haplo_2_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCGCTC-TTTCGAA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTGTGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCATTACTCG
>Na_1_mooc_haplo_1_OTU_1	AAAGCTCCTGAGATATCTATCATTCTGTAAACCCCCCGGAAACAGGAAAAATATCGAGAAGCCCCCTACTCTTTTCGCA ACAATACTTCGGACACATAAACTACTAAACGTCCTATGATAGCATTATAACTAGACTACACATAAAATACAATAACACTAC GCTGCTGCGCTACTCTCACTACTCG
tRNA	
>JH11_eDNA_haplo_1_OTU_1	-----GCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTATGGTGAC TAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACT CCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAAT TAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>JH11_eDNA_haplo_2_OTU_1	-----GCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTATGGTGAC TAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACT CCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAAT TAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>JH18_1_eDNA_haplo_1_OTU_1	-----GCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTATGGTGAC TAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACT CCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAAT TAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>JH19_2_eDNA_haplo_1_OTU_1	-----GCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTATGGTGAC TAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACT CCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAAT TAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>JH22_eDNA_haplo_1_OTU_1	-----GCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTATGGTGAC TAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACT CCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAAT TAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>JH22_eDNA_haplo_2_OTU_1	-----ACTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTATGGTGAC TAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACT CCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAAT TAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
>JH9_eDNA_haplo_1_OTU_1	-----GCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTCCGAGCTCTGCCAACCCTATGGTGAC TAGTACATGTATGTAATATCACCATAAAATTTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACT CCTAGATCTTTCCACATTCATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAATCCAAAAAT TAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT

>Na_1_mooc_haplo_3_OTU_1	TCTCTGCCAATCCACCCAAGCTCTGCCAATCCACCCAAGCTCTGCCAATCCACCCAAGCTCTGCCAATCC-TATGGTGAC TAGTACATGTATGTAATATCACCATAAATTATGTTAACCATATCCATGGTGTCTAATACATAATTTTAAGTAAGATACT CCTAGATCTTTCCACATTATACATCAACAGTTGAACTAAAAAATTTACCCAAACCAGAAAAATTATTAAATCCAAAAAT TAATTTTAAATCAAATGATCGAAATTTAAGACCGAGCCCATATACCTCAT
ND5	
>JH11_eDNA_haplo_1_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTTTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH18_1_eDNA_haplo_1_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTTTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH19_2_eDNA_haplo_1_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTTTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH22_eDNA_haplo_1_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTTTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH22_eDNA_haplo_2_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH22_eDNA_haplo_3_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH22_eDNA_haplo_6_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAACCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH9_eDNA_haplo_1_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH9_eDNA_haplo_2_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTTTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Na_1_eDNA_haplo_1_OTU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATGACTAACAACAATTCAAGCCACCCCCAAACCCTTACCCCTACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTCGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA

	AACAATCTCCAGCA
>JH9_mooc_haplo_1_OT U_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>JH9_mooc_haplo_2_OT U_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATAACCAACAAACAATTCAAGCCCACCCCCAAACCCTTACCCCCACCATTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGGCTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Na_1_mooc_haplo_1_O TU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATGACTAACAACAATTCAAGCCCACCCCCAAACCCTTACCCCTACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTCGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Na_1_mooc_haplo_2_O TU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATGACTAACAACAATTCAAGCCCACCCCCAAACCCTTACCCCTACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Na_1_mooc_haplo_3_O TU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATGACTAACAACAATTCAAGCCCACCCCCAAACCCTTACCCCTACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTGGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
>Na_1_mooc_haplo_4_O TU_1	ATTACCGCTCTGGGATTGGCCACTATGACTAACAACAATTCAAGCCCACCCCCAAACCCTTACCCCTACCATTTCTCTAA CATGTTAGGATTCTTTCCCCCATCATCCACCGACTTACACCCAAAATTAATCTTCTCCTCGGCCAATCTGTCGCCACCC AAACCATCGACCTCACCTGATTAGAAAAAATTGGCCCCAAAAGCAACAATCTCCCTCAACTCCCCCTTATCACCGCCACA AACAATCTCCAGCA
Cytb	
>JH11_mooc_haplo_1_O TU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH18_1_mooc_haplo_1 _OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH18_1_mooc_haplo_2 _OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCACCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH19_2_mooc_haplo_1 _OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT

>JH22_mooc_haplo_12_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATTTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH9_mooc_haplo_1_OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH9_mooc_haplo_2_OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH9_mooc_haplo_3_OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH9_mooc_haplo_4_OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Na_1_mooc_haplo_1_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Na_1_mooc_haplo_2_OTU_1	GATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACACTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTTCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGGTGGCTGATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGGGGTCTCTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGAGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH19_2_eDNA_haplo_1_OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>JH22_eDNA_haplo_1_OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT
>Na_1_eDNA_haplo_1_OTU_1	AATCCTAACAGGCTTATTTCTCTCCATACATTACACTGCTGACACCAGTACAGCTTTTTCTCCATCGCCACATCTGCC GAGACGTAAACTACGGATGACTAATCCGGAATATACATGCTAACGGGAGCATCTTTTTCTTCATTTGCATCTATCTACAC ATCGGACGAGGTCTTTACTTCGGCTCTTATCTTTACAAAGAGACATGAAATATCGGGGTAATTCTACTACTATTAGTGAT AAT

ANEXO: 4 Cantidad y calidad de ADN de muestras tejido obtenidos para los 15 individuos de *A. agassizii* para la construcción de la base de referencia.

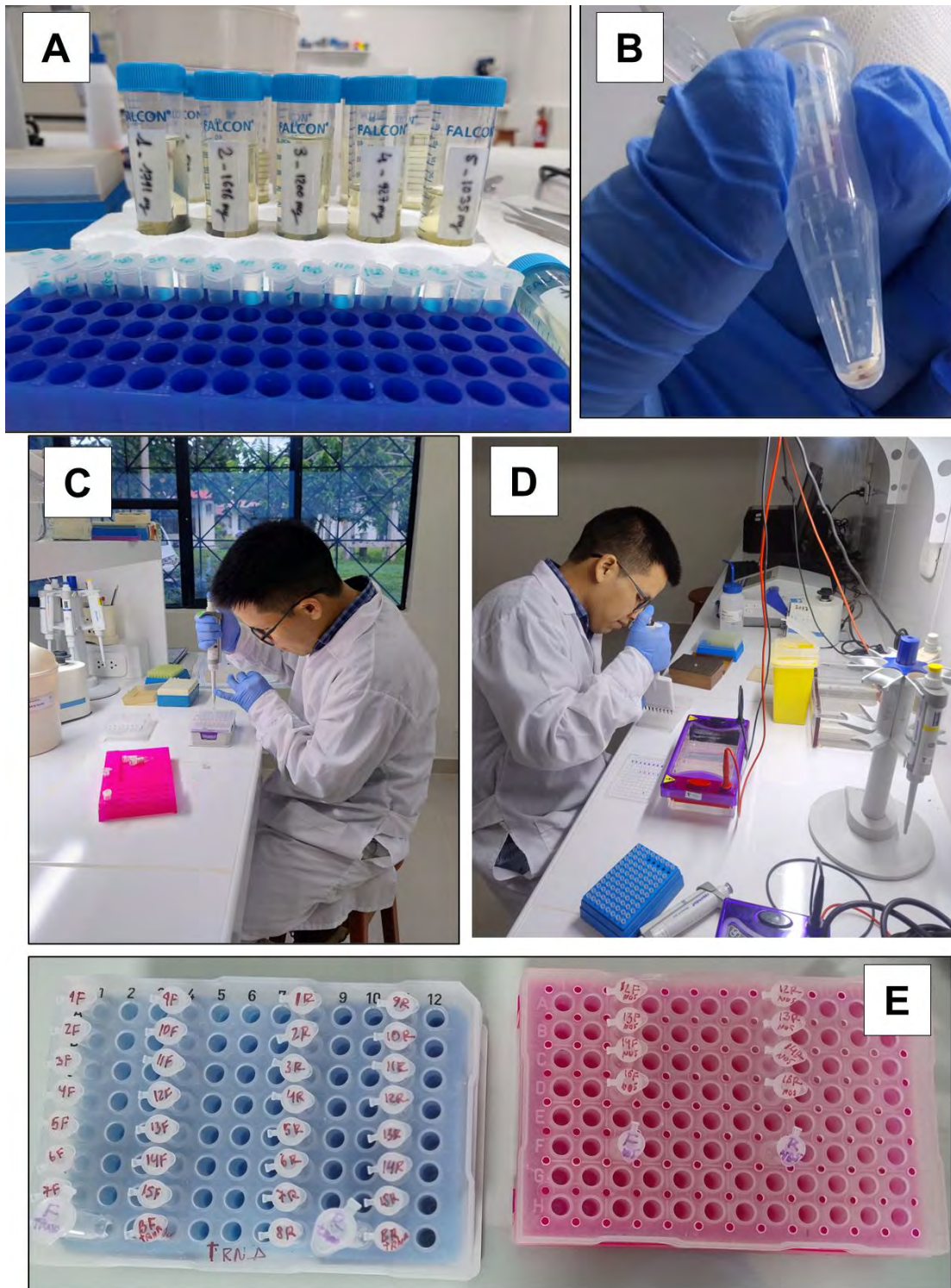
Id muestra	ng/μL	A260/A280
1F	156.3	1.99
2F	104.87	1.88
3F	98.34	1.97
4F	185.251	1.96
5F	107.85	1.93
6F	82.302	1.88
7F	166.33	1.93
8F	119.721	1.9
9F	132.293	1.94
10F	109.21	1.96
11F	174.796	1.99
12F	126.13	1.94
13F	110.581	1.99
14F	118.226	1.98
15F	115.378	2

ANEXO: 5 Misión de campo para colecta de muestras biológicas en las tres zonas de estudio.

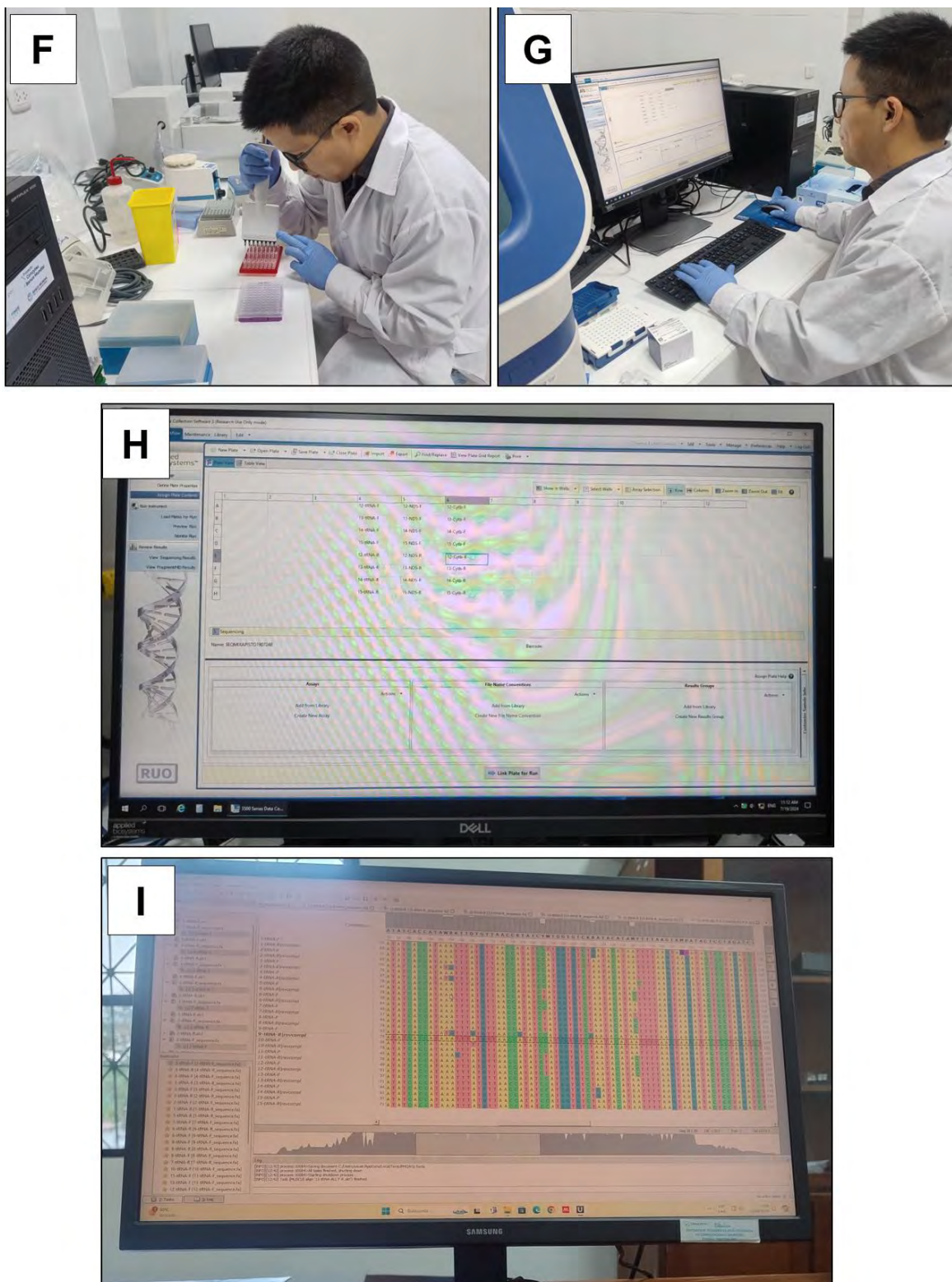


Nota. A: Sistema de filtrado de ADN, B: Cartuchos con ADN, C: Captura de individuos de *A. agassizii* con redes de malla, D: Individuos *A. agassizii* de, E: Muestras de aletas para la extracción de ADN, F: Personal de campo.

ANEXO: 6 Trabajo en laboratorio



Nota. A: Extracción de ADN, B: Pellet de ADN, C: Preparación para PCR, D: Electroforesis, E: Productos PCR para reacción de secuenciación.

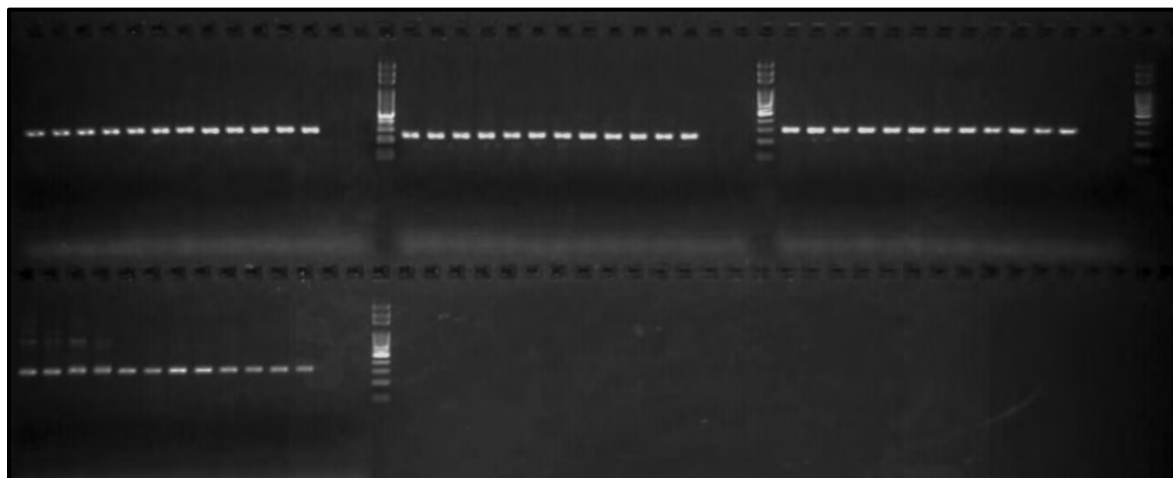


Nota. F: Transferencia a placa (analizador genético) de las reacciones de secuenciación, G: Etiquetado de muestras de la reacción de secuenciación, H: Etiquetado de muestras de la reacción de secuenciación, I: Análisis bioinformático.

ANEXO: 7 Script para la extracción y filtración de polimorfismos (haplotipos)

```
1  #Script utilizado para la extracción y filtración de polimorfismos(haplotipos)
2  R
3  library("JAMP")
4  library("devtools")
5  setwd("definir el camino la carpeta de trabajo")
6  U_merge_PE(files="latest", file1 = c("../caminos de los archivos R1.fastq"), file2 = c(
7  "../caminos de los archivos R2.fastq"), fastq_pctid =75, fastq_minovlen=16)
8  Cutadapt(files="latest", forward="GTTTCTTCGCGCCTAAACCC", reverse="CTTCGGCGTGTGAAAACATTA",
9  bothsides=T, anchoring=F, exe="cutadapt", exe2="vsearch") # Para Dloop
10 Minmax(files="latest",min=185, max=205)
11 U_max_ee(files="latest", max_ee=0.2)
12 Denoise(files="latest", strategy="unoise3", unoise_alpha=5, minsize=10, minrelsize=0,
13 poolsamples=F, OTUmin=0, minhaplosize=0, withinOTU=1, eachsampleOTUmin=0, minHaploPresence=3,
14 minOTUPresence=3, renameSamples="(_.)_cut.*", heatmap=T, exe="vsearch", strand="plus",
15 otu_radius_pct=2)
```

ANEXO: 8 Figura de la amplificación de los primers en la fase de optimización



ANEXO: 9 Autorización para la colecta de muestras biológicas



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Nº 00819-2024-PRODUCE/DGPCHDI

05/12/2024

VISTOS: El escrito con registro N° 00019225-2024 de fecha 20 de marzo de 2024, presentado por el ciudadano **GUILLAIN JEREMY ESTIVALS**; así como los demás documentos relacionados con dicho registro; y,

CONSIDERANDO:

1. Mediante el escrito con registro N° 00019225-2024 de vistos, el ciudadano **GUILLAIN JEREMY ESTIVALS** (en adelante el administrado), solicitó autorización para efectuar investigación pesquera especializada sin uso de embarcación para ejecutar el plan de investigación denominado: **"Generando nuevas perspectivas del uso del ADN ambiental (ADNa) para la conservación de la biodiversidad"**, presentado en el marco del ordenamiento pesquero vigente;

2. Al respecto, el referido Decreto Supremo N° 023-2021-PRODUCE, publicado con fecha 8 de noviembre de 2021, aprobó el Texto Único de Procedimientos Administrativos del Ministerio de la Producción, estableciendo en su procedimiento para efectuar investigación pesquera especializada los siguientes requisitos: i) Solicitud con carácter de declaración jurada conforme a lo previsto en el artículo 124 del Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado mediante Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; ii) Plan de investigación debidamente suscrito por el responsable del proyecto; y, iii) Copia simple del certificado de matrícula o de registro, con traducción simple al español en caso corresponda, o del permiso de navegación conferido por la autoridad marítima;

3. En cuanto al requisito i), referido a la solicitud de autorización conforme a lo previsto en el artículo 124 del TUO de la Ley N° 27444, el ciudadano GUILLAIN JEREMY ESTIVALS, en su calidad de "Investigador", ha presentado el FORMULARIO DECHDI - 021, el cual tiene carácter de declaración jurada, debidamente lleno y suscrito, por el cual ha solicitado la autorización para la ejecución del plan de trabajo citado en el considerando 1 de la presente resolución. Por consiguiente, se ha dado cumplimiento al requisito antes descrito;

4. Con relación al requisito ii), sobre el plan de investigación debidamente suscrito por el responsable del proyecto; debe indicarse que obra en el expediente el plan de investigación reformulado denominado: **"Generando nuevas perspectivas del uso del ADN ambiental (ADNa) para la conservación de la biodiversidad"**, presentado mediante escrito con registro N° 00067806-2024; a ejecutarse por el periodo de dieciocho (18) meses; encontrándose suscrito por el ciudadano GUILLAIN JEREMY ESTIVALS citado en el considerando precedente, en su calidad de responsable del plan de investigación. En ese contexto, se tiene por cumplido el presente requisito;

Esta es una copia autenticada imprimible de un documento electrónico archivado por el MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 del D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas en la siguiente dirección web: "<https://edocumentostramite.produce.gob.pe/verificar/>" e ingresar clave: AU9JK3A9

Calle Uno Oeste N° 060 - Urbanización Córpac - San Isidro - Lima
T. (511) 616 2222
www.gob.pe/produce



5. Respecto al requisito **iii)**, de presentar copia del Certificado de matrícula; considerando que la administrada solicitó autorización para efectuar investigación pesquera especializada sin uso de embarcación, este requisito no resulta exigible;

6. De la revisión del expediente se advierte que el citado proyecto de investigación tiene como **objetivo general**: *“Generar nuevas perspectivas en el estudio de la biodiversidad, proponiendo nuevos métodos, para poder aportar al inventario masivo y no invasivo de la megadiversidad acuática que constituye la cuenca amazónica, tanto desde el punto de vista específico como poblacional”* y como **objetivos específicos**: (i) *“Diseño de nuevos barcode mitocondriales para incrementar los niveles de resolución taxonómicos para estudio poblacionales”*; (ii) *“Utilización y evaluación de los conjuntos de cebadores diseñados en muestras de ADN y de ADN a en condiciones experimentales e in situ”*; y, (iii) *“Evaluación de la estructura genética de Apistogramma agassizii SP1 a partir de ADN a colectado dentro de 6 zonas de colecta y perspectivas para el uso de este nuevo enfoque para la conservación de las especies”*;

7. De otro lado, cabe señalar que los literales a) y e) del artículo 4 de la Ley del Instituto del Mar del Perú, aprobado por Decreto Legislativo N° 95, modificado por Decreto de Urgencia N° 015-2020, establecen que corresponde al Instituto del Mar del Perú (IMARPE) aprobar, ejecutar y evaluar planes, programas y proyectos de investigación científica y tecnológica, vinculados a su finalidad; y, proporcionar al Ministerio de la Producción las bases científicas para la administración racional de los recursos marinos y continentales;

8. Al respecto, mediante Oficios N° 0000604-2024-PRODUCE/DECHDI y N° 0000770-2024-PRODUCE/DECHDI, se solicitó opinión técnica al IMARPE respecto al plan de investigación referido en el considerando 1 de la presente resolución y, se remitió a la aludida entidad los documentos de levantamiento de observaciones alcanzados por la administrada, respectivamente. Dicha entidad mediante Oficio N° 0045-2024-IMARPE/PE, remitió su opinión técnica en la que concluyó: *“El proponente remite información adecuada que subsana las observaciones formuladas”*. En ese sentido, se colige que el plan de investigación no cuenta con observaciones pendientes de subsanación;

9. Por su parte, el numeral 4.4 del artículo 4 del Reglamento de Ordenamiento Pesquero de la Amazonía Peruana, aprobado por Decreto Supremo N° 015-2009-PRODUCE, establece que en caso se efectúe el proyecto de investigación en una zona de la Amazonía Peruana, la investigación realizada mediante pesca exploratoria o experimental requiere de la opinión previa favorable del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP);

10. Respecto a lo señalado en el numeral precedente, mediante Oficio N° 00000606-2024-PRODUCE/DECHDI, se solicitó opinión técnica al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) respecto al plan de investigación antes señalado; dicha entidad remitió el Oficio N° 0120-2024-IIAP-PE, por el cual se adjuntó el Memorando N° 0267-2024-IIAP-AQUAREC/D que contiene la “Opinión técnica de conformidad al plan de investigación presentado por GUILLAIN JEREMY ESTIVALS”, en la que comenta y concluye: *“Apistogramma agassizii, es el modelo de especie ideal para realizar este tipo de estudio porque presenta una estructura poblacional compleja en Amazonía. De resultar la validación de esta técnica no invasiva sería una herramienta muy valiosa para conocer el estado poblacional de las especies amazónicas (evaluar la estructuración entre sus poblaciones, el flujo genético, entre otros). Estos resultados fortalecerán los programas de manejo y conservación de los recursos. Asimismo, este trabajo sería el primero que aplicará el enfoque de ADN ambiental para estudios poblacionales en*

Esta es una copia autenticada imprimible de un documento electrónico archivado por el MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 del D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas en la siguiente dirección web: “<https://edocumentostramite.produce.gob.pe/verificar/>” e ingresar clave: AU9JK3A9

Calle Uno Oeste N° 060 - Urbanización Córpac - San Isidro - Lima
T. (511) 616 2222
www.gob.pe/produce



Amazonía peruana (...) El estudio está bien planteado, la metodología es adecuada, por lo tanto, la presente investigación, estaría apto para continuar con los procesos que conducen a la obtención del permiso de investigación”;

11. Por lo antes expuesto, y en atención a la opinión favorable efectuadas por el IMARPE a través del Oficio N° 0045-2024-IMARPE/PE y del Memorando N° 0267-2024-IIAP-AQUAREC/D que contiene la “Opinión técnica de conformidad al plan de investigación presentado por GUILLAIN JEREMY ESTIVALS [remitido a través del Oficio N° 0120-2024-IIAP-PE], respectivamente, se colige que el administrado ha cumplido con los requisitos establecidos en las normas sustantivas del ordenamiento pesquero vigente, por lo que resulta procedente otorgar a su favor la autorización para efectuar investigación pesquera especializada sin uso de embarcación, para ejecutar el plan de investigación denominado: **“Generando nuevas perspectivas del uso del ADN ambiental (ADNa) para la conservación de la biodiversidad”**, presentado mediante el escrito con registro N° 00019225-2024 de vistos, reformulado a través del escrito adjunto con registro N° 00067806-2024;

12. Estando a lo informado por la Dirección de Extracción para Consumo Humano Directo e Indirecto a través del Informe Técnico N° 00000155-2024-LCERNA; de conformidad con las normas citadas precedentemente; y, en uso de las facultades conferidas por el literal s) del artículo 70 del Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de la Producción, aprobado por Decreto Supremo N° 002-2017-PRODUCE, modificado por Decreto Supremo N° 009-2017-PRODUCE;

SE RESUELVE

Artículo 1.- Otorgar a favor del ciudadano GUILLAIN JEREMY ESTIVALS, la Autorización para efectuar investigación pesquera especializada sin uso de embarcación., conforme a los términos contenidos en el plan de investigación denominado: **“Generando nuevas perspectivas del uso del ADN ambiental (ADNa) para la conservación de la biodiversidad”**, presentado mediante escrito con registro N° 00019225-2024, reformulado a través del escrito con registro N° 00067806, por el periodo de dieciocho (18) meses contados a partir del día siguiente de la notificación de la presente Resolución Directoral. El referido plan comprende las siguientes circunscripciones territoriales: El referido plan comprende las circunscripciones territoriales detalladas en anexo que forma parte integrante de la presente Resolución Directoral.

N°	ESTACIONES DE MUESTREO HIDROBIOLÓGICO (ZONA 18S)		UBICACIÓN GEOGRÁFICA		
	ESTE	NORTE	DISTRITO	PROVINCIA	DEPARTAMENTO
1	648848.7	9453695.0	Requena	Requena	Loreto
2	649255.3	9455220.6			
3	648377.3	9456730.4			
4	650059.4	9458311.8			
5	648977.5	9459548.7			
6	655396.5	9505293.5	Nauta	Loreto	

Artículo 2.- La extracción de los recursos se deberá realizar dentro del plazo señalado en el artículo 1 de la presente resolución, y mediante el empleo de los equipos y metodología indicados en el plan de investigación.

Esta es una copia autenticada imprimible de un documento electrónico archivado por el MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 del D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas en la siguiente dirección web: "<https://edocumentostramite.produce.gob.pe/verificar/>" e ingresar clave: AU9JK3A9

Calle Uno Oeste N° 060 - Urbanización Córpac - San Isidro - Lima
T. (511) 616 2222
www.gob.pe/produce



Artículo 3.- El ciudadano **GUILLAIN JEREMY ESTIVALS** es responsable de aplicar las medidas de seguridad y eliminación de impactos que se puedan producir por las actividades propias de la investigación.

Artículo 4.- El ciudadano **GUILLAIN JEREMY ESTIVALS**, dentro de los sesenta (60) días calendarios posteriores a la culminación del plazo concedido en la autorización correspondiente, se encuentra obligada a presentar la información completa relativa a los resultados de la investigación realizada.

Artículo 5.- En la ejecución del plan de trabajo, el ciudadano **GUILLAIN JEREMY ESTIVALS**, deberá observar estrictamente lo dispuesto en el artículo 27 de la Ley N° 26839, Ley sobre la Conservación y Aprovechamiento Sostenible de la Diversidad Biológica, el cual establece que los derechos otorgados sobre recursos biológicos no otorgan derechos sobre los recursos genéticos.

Artículo 6.- La presente autorización no constituye el otorgamiento de otro derecho a favor del titular del plan de trabajo.

Artículo 7.- Remitir copia de la presente resolución, a la Dirección General de Supervisión, Fiscalización y Sanción del Despacho Viceministerial de Pesca y Acuicultura del Ministerio de la Producción; al Instituto del Mar del Perú (IMARPE); y, al Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (SERNANP); así como disponer su publicación en el Portal Institucional del Ministerio de la Producción (www.gob.pe/produce).

Regístrese, comuníquese y publíquese



Firmado digitalmente por HERBOZO COLQUE
Ricardo Gabriel FAU 20504794637 hard
Entidad: Ministerio de la Producción
Motivo: Autor del documento
Fecha: 2024/12/05 21:37:16-0500

RICARDO GABRIEL HERBOZO COLQUE

Director General

Dirección General de Pesca para Consumo
Humano Directo e Indirecto



Visado por LAGUNA DUEÑAS Lenin Ernesto
FAU 20504794637 hard
Fecha: 2024/12/05 21:08:46-0500

Esta es una copia autenticada imprimible de un documento electrónico archivado por el MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 del D.S. 070-2013- PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas en la siguiente dirección web: "<https://edocumentostramite.produce.gob.pe/verificar/>" e ingresar clave: AU9JK3A9

Calle Uno Oeste N° 060 - Urbanización Córpac - San Isidro - Lima
T. (511) 616 2222
www.gob.pe/produce

