



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**Diversidad taxonómica y *DNA Barcoding* de la  
ictiofauna en la Laguna Yarinacocha (Ucayali)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en  
Hidrobiología y Pesquería

**AUTOR**

Katia Milagros AYLAS HERNÁNDEZ

**ASESOR**

Dr. Ricardo BRITZKE

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Aylas, K. (2022). *Diversidad taxonómica y DNA Barcoding de la ictiofauna en la Laguna Yarinacocha (Ucayali)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Katia Milagros Aylas Hernández
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46145264
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-3086-3830">https://orcid.org/0000-0002-3086-3830</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Ricardo Britzke
Tipo de documento de identidad	Carné de extranjería emitido en Perú
Número de documento de identidad	BR /001314410
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-1042-2544">https://orcid.org/0000-0002-1042-2544</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Jorge Luis Ramírez Malaver
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43352480
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Giovanna Elizabeth Sotil Caycho
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25836223
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Max Henry Hidalgo del Águila
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07758954
<b>Miembro del jurado 3</b>	
Nombres y apellidos	Ricardo Britzke.
Tipo de documento	Carné de extranjería emitido en Perú

Número de documento de identidad	BR /001314410
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	A.1.1.3. Diversidad Genética
Grupo de investigación	Evolución Molecular de la Biota en el Perú - EMBPE
Agencia de financiamiento	Perú. Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT). ADN ambiental Metabarcoding: una poderosa herramienta para la evaluación y monitoreo de ecosistemas contaminados en Perú. N.º 022-2019-FONDECYTBM-INC.INV
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Urbanización: Ciudad Universitaria Calle: Av. República de Venezuela Latitud: -12.059777 Longitud: -77.082241
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Octubre 2020 – Diciembre 2021
URL de disciplinas OCDE	Biología marina, Biología de agua dulce, Limnología <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00</a> Genética, Herencia <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN HIDROBIOLOGÍA Y PESQUERÍA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 16:XX horas del 25 de octubre de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/ncs-xstq-zsq>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga con mención en Hidrobiología y Pesquería** de **KATIA MILAGROS AYLAS HERNÁNDEZ**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20220027511, la titulando expuso su tesis: **DIVERSIDAD TAXONÓMICA Y DNA BARCODING DE LA ICTIOFAUNA EN LA LAGUNA YARINACocha (UCAYALI)**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **18**, calificativo: **Aprobado con mención honrosa**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga con mención en Hidrobiología y Pesquería** a **KATIA MILAGROS AYLAS HERNÁNDEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:55 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 25 de octubre de 2022.

---

**Dr. JORGE RAMIREZ MALAVER**  
(PRESIDENTE)

---

**Dr. RICARDO BRITZKE**  
(ASESOR)

---

**Mg. GIOVANNA SOTIL CAYCHO**  
(MIEMBRO)

---

**Blgo. MAX HIDALGO DEL AGUILA**  
(MIEMBRO)



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INFORME DE EVALUACION DE ORIGINALIDAD**

ESCUELA PROFESIONAL : CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL : DR. PABLO SERGIO RAMÍREZ ROCA  
OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMATICO DE SIMILITUDES: Feedback Studio

DOCUMENTO EVALUADO\* : **DIVERSIDAD TAXONÓMICA Y DNA BARCODING DE LA ICTIOFAUNA EN LA LAGUNA YARINACOCHA (UCAYALI)**  
AUTOR DEL DOCUMENTO\*\* : AYLAS HERNÁNDEZ KATIA MILAGROS  
FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO : 07/octubre/2022  
FECHA DE APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMATICO : 10/octubre/2022  
SOFTWARE UTILIZADO :  
TURNITIN ( X )  
ITHENTICATE ( )  
OTRO

CONFIGURACION DEL PROGRAMA DE SIMILITUDES  
Excluye textos entrecomillados ( X )  
Excluye bibliografía ( X )  
Excluye cadenas menores a 40 palabras ( X )  
Otro criterio ( ) (especificar)

PORCENTAJE DE SIMILITUDES \*\*\* : SIETE (07%)

FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS \*\*\*\* :

**DIVERSIDAD TAXONÓMICA Y DNA BARCODING DE LA ICTIOFAUNA EN LA LAGUNA YARINACOCHA (UCAYALI)**

INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>7</b> %	<b>7</b> %	<b>2</b> %	<b>0</b> %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

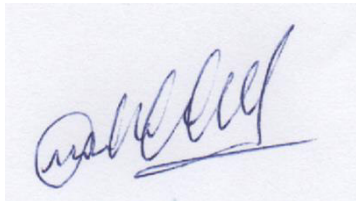
<b>1</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>3</b> %
<b>2</b>	<b>cybertesis.unmsm.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>3</b>	<b>repositorio.ucp.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>4</b>	<b>repositorio.uns.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %

OBSERVACIONES: Ninguna

CALIFICACION DE ORIGINALIDAD:

- Documento cumple criterios de originalidad sin observaciones ( x )
- Documento cumple criterios de originalidad con observaciones ( )
- Documento no cumple criterios de originalidad ( )

FECHA DEL INFORME 10/octubre/2022



---

FIRMA DEL EVALUADOR



Firmado digitalmente por RAMIREZ  
ROCA Pablo Sergio FAU  
20148092232 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 10.10.2022 19:19:49 -05:00

---

FIRMA DEL DIRECTOR EP

- \* Tesis para grado o título de pregrado
- \*\* Apellidos y nombres completos
- \*\*\* En letras y números
- \*\*\*\* Indicarlas en orden decreciente y su respectivo porcentaje



## **Dedicatoria**

A Elena Guerra Vasquez Vda. de Hernández, por ser ejemplo de grandes luchas y bien merecidos logros, por mostrar una sincera sonrisa en tiempos adversos y contagiar esa felicidad hasta donde te dieron las fuerzas, y por el amor brindado como sabías hacerlo.

Gracias por todo lo que nos diste.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, a mis queridos padres y mis hermanos quienes siempre estuvieron para apoyarme y alentarme en todo momento crucial para llegar hasta aquí.

A Ricardo López por ser un gran amigo, consejero, gran colega, y mi gran compañero de vida que sin su gran apoyo no hubiese podido llevar a cabo este proyecto; y a mis bellos hijos por ser el impulso de avanzar con más confianza en cada una de mis metas.

Al profesor Mag. Hernán Ortega Torres por sus sabias enseñanzas, por mi formación en la Ictiología, su valiosa experiencia en taxonomía, sus excelentes sugerencias, sus correcciones y la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación.

A mi asesor, Dr. Ricardo Britzke, por su gran apoyo en campo, por compartirme su experiencia tanto en la taxonomía de peces como en el trabajo molecular y por sus buenos consejos y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A mi coasesora Dra. Daniela Núñez Rodríguez por su paciencia, dedicación y consejos para iniciarme en el campo de la Biología Molecular, por el gran trabajo durante el muestreo en campo, apoyo en el laboratorio, en la revisión de especímenes, sus sugerencias y buenos ánimos siempre.

A cada uno de los investigadores que han compartido sus conocimientos y experiencias. Al Dr. Jorge Ramírez por permitirme participar en este proyecto, por compartirme sus conocimientos y consejos tanto teóricos como prácticos; a la Dra. Rina Ramírez por transmitir su valiosa experiencia y conocimiento en el área molecular, y por cada una de sus sugerencias para mejorar los resultados; a la Dra. Raquel Siccha por sus enseñanzas, comentarios, dedicación y su ayuda en el tiempo compartido; y al profesor José Riofrío por su apoyo y consejos para realizar los muestreos.

A todo el equipo de muestreo en campo, en especial a Roberto Quispe por compartir su gran experiencia en campo, liderar el equipo de muestreo, el apoyo en la pesca, la clasificación de especímenes y su ayuda en la identificación de especies.

Al Departamento de Ictiología del Museo de Historia Natural por brindarme el material necesario para realizar los muestreos y por brindarme sus instalaciones para poder identificar los especímenes. A los miembros del Departamento Julio Ramírez y Gian Pier Valenzuela por su ayuda en la identificación de especímenes. Y al Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía, y al Laboratorio de Genómica y Bioinformática de la Biodiversidad por brindarme el espacio y equipos para desarrollar mi trabajo de investigación.

Al FONDECYT y al Banco Mundial por financiar este proyecto (N.º 022-2019-FONDECYT-BM-INC.INV.)

## ÍNDICE

RESUMEN .....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	12
1.1. Antecedentes .....	14
2. MARCO TEÓRICO .....	19
2.1. Diversidad de la ictiofauna en la cuenca Amazónica.....	19
2.2. <i>DNA barcoding</i> .....	22
2.3. Biblioteca de referencia .....	24
3. OBJETIVOS .....	25
3.1. Objetivo general .....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1. Población de estudio.....	26
4.2. Área de estudio.....	26
4.3. Captura de ejemplares y fijación de muestras.....	28
A. Captura de ejemplares .....	28
B. Fijación de muestras .....	28
4.4. Identificación y catalogación de las especies.....	30
4.5. Descripción de la composición taxonómica.....	31
4.6. <i>DNA barcoding</i> .....	31
A. Extracción de <i>DNA</i> , PCR y secuenciación.....	32
C. Análisis de datos .....	35
D. Delimitación de especies .....	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Composición taxonómica de las especies .....	38
5.2. Caracterización molecular de la Ictiofauna en la laguna Yarinacocha utilizando el marcador COI.....	45
5.3. Delimitación de especies .....	49
6. DISCUSIÓN .....	53
7. CONCLUSIONES .....	56
8. RECOMENDACIONES .....	57
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
10. ANEXOS .....	66
ANEXO 1: MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	67

ANEXO 2: ESFUERZO DE MUESTREO REALIZADO POR ARTE DE PESCA PARA CADA ESTACIÓN.....	70
ANEXO 3: MATERIAL BIOLÓGICO POR ESTACIÓN DE COLECTA INGRESADO A LA COLECCIÓN ICTIOLÓGICA DEL MHN-UNMSM .....	71
ANEXO 4: RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 00132-2021-PRODUCE/DGPCHDI.....	75
ANEXO 5: LISTA DE ESPECIES POR ESTACIÓN DE MUESTREO REGISTRADA EN LA LAGUNA YARINACocha .....	79
ANEXO 6: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN KIT Wizard® SV Genomic DNA Purification System.....	82
ANEXO 7: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON SOLUCIÓN SALINA ...	84
ANEXO 8: ÁRBOL NJ EXPANDIDO BASADO EN DISTANCIAS K2P .....	85
ANEXO 9: MEDIA DISTANCIA INTRAESPECÍFICA, MÁXIMA DISTANCIA INTRAESPECÍFICA, ESPECIE MÁS PROXIMA Y DISTANCIA AL VECINO MÁS PRÓXIMO (NND) PARA LAS ESPECIES CON MÁS DE UNA SECUENCIAS COI ...	88
ANEXO 10: MOTUs CONSENSO OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE PTP, BPTP Y GMYC. EN ROJO MOTUS NO CONCORDANTES CON LA TAXONOMÍA .....	89
ANEXO 11: FOTOGRAFÍAS DE ALGUNAS ESPECIES DE PECES REGISTRADAS EN ESTE ESTUDIO .....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Especies de peces de agua dulce de la región Neotropical por orden taxonómico (extraído y modificado de Albert <i>et al.</i> , 2020).....	20
<b>Figura 2.</b> Mapa de Gran Amazonia (en verde) incluye las cuencas de Amazonas y Orinoco y las zonas ribereñas de Guayanas (AOG) (extraído y modificado de van der Sleen & Albert, 2018)20	
<b>Figura 3.</b> Composición de especies (izquierda) y géneros (derecha) de especies de peces por órdenes taxonómicos, expresado en porcentaje, en la región AOG (extraído y modificado de van der Sleen & Albert, 2018) .....	21
<b>Figura 4.</b> Taxones con mayor riqueza de especies en la ictiofauna de la AOG. (A) 19 órdenes que representan todas las especies de peces en la AOG y (B) Top 20 familias que representan el 87% de las especies de peces en la AOG (extraído y modificado de van der Sleen & Albert, 2018) .	22
<b>Figura 5.</b> Peces de la Amazonia peruana: Riqueza (%) por órdenes (extraído y modificado de Ortega et al., 2012).....	22
<b>Figura 6.</b> El marcador estándar de <i>DNA barcoding</i> para animales: citocromo c oxidasa sub unidad I (COI) presente en el genoma mitocondrial (extraído y modificado de Centre for Biodiversity Genomics, University of Guelph, 2021).....	23
<b>Figura 7.</b> Esquema del <i>barcoding gap</i> inferido donde se muestra la distribución de la divergencia intraespecífica (rojo) y la divergencia interespecífica (amarillo). (A) Esquema ideal del <i>DNA barcoding</i> con distribuciones sin superposiciones. (B) Versión alternativa con una superposición significativa y sin brechas (extraído y modificado de Meyer & Paulay, 2005).....	24
<b>Figura 8.</b> Descripción general del desarrollo de una Biblioteca de referencia y sus medidas de garantía y control de calidad (extraído y modificado de Weigand <i>et al.</i> , 2019).....	25
<b>Figura 9.</b> Mapa de las estaciones de muestreo en la laguna Yarinacocha. Puntos de coordenadas en UTM WGS84 .....	26
<b>Figura 10.</b> Estaciones de muestreo en la laguna Yarinacocha agrupados según el tipo de hábitat: a=Yarina 1, b=Yarina 2, c=Yarina 4 y d=Yarina 9 zonas de orilla; e=Yarina 5. f=Yarina 8, g=Yarina 7, h=Yarina 10 y i=Yarina 12 arroyos; j=Yarina 13 poza; y k=Yarina 3, l=Yarina 6 y m=Yarina 11 zona limnética .....	27
<b>Figura 11.</b> Agrupación de especímenes por morfotipo realizado en campo. Peces de las familias A. Characidae, B. Anostomidae, C. Cichlidae, D. Gasteropelecidae y E. Loricariidae .....	29
<b>Figura 12.</b> Extracción de tejido muscular, preservación y etiquetado del espécimen voucher para el procedimiento de <i>DNA barcoding</i> .....	30
<b>Figura 13.</b> Flujograma de trabajo de <i>DNA barcoding</i> desde la recolección de muestras hasta la carga de secuencias y metadata. Las flechas azules indican los datos de carga al BOLD .....	32

<b>Figura 14.</b> Sistema de electroforesis horizontal. Se observa el gel de agarosa 1% cargado con los productos de PCR.....	34
<b>Figura 15.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos amplificados con el primer Fish2, correspondientes a la región COI del DNA extraído a los especímenes de la laguna Yarinacocha. M: marcador de peso molecular de 1kb (Gene ruler <sup>TM</sup> DNA ladder); 1=LSMFF126, 2=LSMFF127, 3=LSMFFF129, 4=LSMFF141, 5=LSMFF143, 6=LSMFF160, 7=LSMFF162, 8=control positivo (LSMFF446) y 9=control negativo.....	34
<b>Figura 16.</b> Observación de secuencias y electroferogramas <i>foward</i> y <i>reverse</i> en el programa CodonCode Aligner .....	35
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de diagrama de dispersión de máxima distancia intraespecífica y distancia al vecino más próximo (NN) expresados en porcentaje (extraído y modificado de Centre for Biodiversity Genomics, University of Guelph, 2021) .....	36
<b>Figura 18.</b> Distancias COI intraespecíficas en comparación con las distancias interespecíficas (K2P) para especies individuales (extraído y modificado de Herbert <i>et al.</i> , 2004).....	37
<b>Figura 19.</b> Riqueza relativa (%) por órdenes de especies de peces recolectados en la laguna Yarinacocha .....	42
<b>Figura 20.</b> Gráfico de barras de la riqueza relativa (%) por familias de especies de peces recolectados en la laguna Yarinacocha.....	43
<b>Figura 21.</b> Abundancia relativa (%) por órdenes de peces recolectados en la laguna Yarinacocha .....	43
<b>Figura 22.</b> Gráfico de barras de la abundancia relativa (%) por familia de peces recolectados en la laguna Yarinacocha .....	44
<b>Figura 23.</b> Gráfico de barras de las especies más abundantes recolectadas en la laguna Yarinacocha .....	44
<b>Figura 24.</b> Riqueza de especies de peces por órdenes en la laguna Yarinacocha obtenidas mediante secuenciación.....	45
<b>Figura 25.</b> Representación gráfica del número de secuencias COI obtenidas por especie .....	45
<b>Figura 26.</b> Gráfica de dispersión de la máxima distancia intraespecífica vs. la mínima distancia interespecífica .....	47
<b>Figura 27.</b> Gráfico de distribución de distancias intraespecíficas (rojo) e interespecíficas (azul), la línea naranja representa el barcoding gap .....	47
<b>Figura 28.</b> Árbol NJ compacto de distancias K2P mostrando las 74 especies de peces de la laguna Yarinacocha secuenciadas en este estudio. En paréntesis se muestra el número de secuencias por especie y en verde <i>H. malabaricus</i> con distancia intraespecífica mayor a 2%).....	48
<b>Figura 29.</b> Árbol NJ de las secuencias COI de la especie <i>H. malabaricus</i> obtenidas en este estudio.....	49

<b>Figura 30.</b> Vista ventral de <i>H. malabaricus</i> donde se observa la convergencia de los márgenes mediales de los dentarios en forma de “V”. En A. ejemplar de <i>H malabaricus</i> subclado I y B. ejemplar de <i>H. malabaricus</i> subclado II.....	49
<b>Figura 31.</b> Gráfica de cuadrantes de las 74 especies nominales con un valor de corte de 2%....	50
<b>Figura 32.</b> Árbol bayesiano que muestra 75 MOTUs obtenidas por el análisis de delimitación de especies (GMYC, PTP, bPTP y consenso) para las secuencias COI de peces de la laguna Yarinacocha. La escala representa las sustituciones nucleotídicas por sitio .....	52
<b>Figura 33.</b> Análisis del barcoding gap usando la distribución de distancias genéticas para las 75 MOTUs obtenidas usando los modelos GMYC, PTP y bPTP. A. Distancias intra-MOTU (rojo), B. Distancias inter-MOTU (negro) y C. <i>Barcoding gap</i> entre ambas distancias (línea naranja).53	
<b>Figura A1.</b> Representantes del orden Characiformes.....	93
<b>Figura A2.</b> Representantes del orden Siluriformes: Loricariidae (amarillo), Callichthyidae (rojo), Heptapteridae (naranja), Auchenipteridae (azul) y Pimelodidae (verde).....	94
<b>Figura A3.</b> Representantes de los órdenes Cichliformes (amarillo), Gymnotiformes (morado), Clupeiformes (celeste) y Carangiformes (marrón).....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Georreferenciación y tipo de hábitat de las estaciones de muestreo de la laguna Yarinacocha. Puntos de coordenadas en UTM WGS84 .....	28
<b>Tabla 2.</b> <i>Primers</i> utilizados para el marcador COI en peces de la laguna Yarinacocha .....	33
<b>Tabla 3.</b> Lista de especies de peces y número de especímenes colectados por especie de la laguna Yarinacocha .....	39
<b>Tabla 4.</b> Riqueza y abundancia de peces por órdenes de la laguna Yarinacocha .....	42
<b>Tabla 5.</b> Valores mínimos, máximos y promedio de las distancias (K2P) intraespecíficas e interespecíficas (excluyendo las especies representadas por una sola secuencia COI) .....	46
<b>Tabla 6.</b> Distancias genéticas intraespecíficas, intrasubclado e intersubclado de <i>H. malabaricus</i> .....	49
<b>Tabla 7.</b> Distancias inter e intra MOTUs .....	50
<b>Tabla 8.</b> Resumen de valores de distancia intraespecífica de estudios de <i>DNA barcoding</i> en peces de agua dulce. En verde, datos recopilados por Pereira <i>et al.</i> (2013) y en amarillo, datos recopilados por este estudio .....	55



## RESUMEN

La cuenca del Amazonas es la más grande y diversa del mundo, contiene el mayor conjunto de especies fluviales en la Tierra con 2800 especies de peces a través de múltiples tipos de hábitats acuáticos. Sin embargo, esta gran diversidad de especies hace que la identificación taxonómica sea un gran desafío. Yarinacocha es una laguna de origen meándrico, que formó parte del curso del río Ucayali, afluente del río Amazonas. Es una zona altamente turística y de importancia para la pesca comercial y de consumo local; pese a ello, presenta problemas de contaminación debido a la acumulación de residuos sólidos entre otros. El objetivo del estudio fue utilizar un enfoque integrador para realizar un inventario de la ictiofauna en la laguna Yarinacocha mediante la taxonomía tradicional y la técnica de *DNA barcoding* (utilizando el gen COI). En octubre de 2020 los peces fueron colectados en diversos hábitats (orillas, arroyos, la zona limnética y pozas), donde se utilizaron distintos artes de pesca y observaciones de pesca local. Para la identificación taxonómica se utilizaron datos morfológicos, morfométricos y merísticos para poder compararlos con las claves de identificación y descripciones de especies. En total se colectaron 1678 individuos correspondientes a 84 especies de peces, 23 familias y siete órdenes, representados principalmente por los órdenes Characiformes y Siluriformes (77.7%). Adicionalmente, se obtuvieron 141 secuencias COI que corresponden a 74 especies nominales y el *DNA barcoding* pudo diferenciar el 100% de las especies, además reveló la probable ocurrencia de una especie críptica. Esta idea también fue respaldada por el análisis de delimitación de especies basado en unidades taxonómicas operacionales (MOTU), separando a *Hoplias malabaricus* en dos MOTUs. El uso del enfoque integrador permitió mejorar la identificación de especies y proponer a *H. malabaricus* como una posible especie críptica, siendo el *DNA barcoding* una herramienta efectiva para caracterizar la biodiversidad de peces.

**Palabras clave:** Amazonia peruana, COI, peces, taxonomía.

## ABSTRACT

The Amazon Basin is the largest and most diverse freshwater basin in the world, containing the largest set of river species on Earth with 2,800 species of fish across multiple types of aquatic habitats. Nevertheless, this great diversity of species makes taxonomic identification a great challenge. Yarinacocha is an oxbow lake, which was part of the Ucayali River's main course, a tributary of the Amazon River. It is a highly tourist area and important for commercial and local consumption fishing; Despite this, it presents pollution problems due to the accumulation of solid waste and other contaminants. The objective of the study was to use an integrative approach to carry out an inventory of the ichthyofauna in the Yarinacocha lagoon through traditional taxonomy and the DNA barcoding technique (COI gene). In October, 2020, fishes were collected in covered diverse habitats (banks, streams, the limnetic zone and pools), using different fishing gear and observations of local fishing. For the taxonomic identification, morphological, morphometric and meristic data were used to be able to compare them with the identification keys and species descriptions. A total 1678 individuals were collected corresponding to 84 species of fishes, 23 families and seven orders, represented mainly by the orders Characiformes and Siluriformes (77.7%). Additionally, a total of 141 COI sequences were obtained corresponding to 74 species. Moreover, DNA barcoding was able to differentiate between previously identified species and revealed the probable occurrence of a cryptic species in *Hoplias malabaricus*. This idea was also supported by species delimitation analyzes using molecular operational taxonomic units (MOTU), separating *H. malabaricus* into two MOTUs. The use of the integrative approach allowed to improve species identification and the detection of cryptic species, becoming an effective tool to characterize fish biodiversity.

**Keywords:** COI, fish, Peruvian Amazon, taxonomy.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los peces conforman más de la mitad de las especies de vertebrados que existen en el planeta (Nelson *et al.*, 2016) y conformado en su gran mayoría (más de 32 000 especies) por “peces óseos” (Pough & Janis, 2019). Actualmente se conocen 36 292 especies de peces válidas, de los cuales 18 372 corresponden a especies de agua dulce (Fricke *et al.*, 2022); es decir, el 51% de las especies de peces conocidas viven en agua dulce (Hughes *et al.*, 2021), el cual representa aproximadamente el 1% de la superficie de la Tierra. Aunque los hábitats de agua dulce comprenden una pequeña fracción del total de los ambientes acuáticos en el planeta, mantienen un gran número de especies de peces en el mundo (Nelson *et al.*, 2016).

La cuenca del Amazonas, que comprende aproximadamente un tercio del área de Sudamérica (Dagosta y de Pinna, 2019), contiene el mayor conjunto de especies fluviales en la tierra, con 2800 especies de peces (7.8% de la diversidad de peces del planeta) que se distribuyen a través de múltiples tipos de hábitats acuáticos (Bogotá-Gregory *et al.*, 2020). La ictiofauna continental peruana se encuentra principalmente en la cuenca amazónica y representa el 88% (más de 900 especies) del total de especies registradas (Ortega *et al.*, 2012). En nuestra Amazonia, el río Ucayali es un río principal que tiene un recorrido meándrico de sur a norte atravesando 1452 km, con un caudal promedio anual de 11 260 m<sup>3</sup>/s, que es el 41% del caudal que va al río Amazonas (Lavado *et al.*, 2010).

Los peces representan un grupo de gran importancia debido a su diversidad, abundancia y por su papel en la vida del hombre amazónico (García-Dávila *et al.*, 2018), ya que son fuente de proteína para el poblador ribereño y el de las grandes ciudades lo que los convierte en el principal engranaje de la economía amazónica (Breñas *et al.*, 2020); sin embargo, la mayoría de estas especies están constantemente amenazadas por el cambio climático, fragmentación de hábitats, deforestación, modificación de caudales por las represas, sobrepesca, contaminación, tráfico de especies (Oberdorff *et al.*, 2014) y también debido a la introducción de especies invasoras relacionada a actividades como la acuicultura y el comercio de especies de acuario (Rodrigues *et al.*, 2021).

La laguna Yarinacocha es de origen meándrico y se formó por el desvío del cauce del río Ucayali. Se encuentra ubicada en el distrito de Yarinacocha, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, en la Amazonia peruana. Posee un área de 1470 ha y una profundidad máxima de 19 m. Su ancho promedio es de 650 m, con un valor máximo de 900 m y un mínimo de 400 m (Vela, 2000). Al igual que Pucallpa, presenta cuatro estacionalidades bien definidas: creciente o lluvioso (enero-marzo), transición a vaciante (abril-junio), vaciante (julio-setiembre) y transición a creciente (octubre-diciembre) (Wasiw *et al.*, 2012). Luego de la época de creciente, donde el río Ucayali abarca toda la laguna, ésta recibe agua de pequeños tributarios que nacen de otras cochas, los que son denominados como caños. Algunos de los tributarios más importantes son

Cashibocaño, Lobo Caño, Pacacaño, quebrada de Tushmo y quebrada de Maputay. Yarinacocha evacúa sus aguas principalmente por la zona de menor pendiente (zona norte) (Vivanco, 2010).

Esta laguna es una zona importante de pesca de consumo y de pesca comercial, es el principal atractivo turístico que tiene Pucallpa, y recibe visitantes locales y foráneos (por ejemplo, la presencia de albergues en el sector de la Restinga) lo que lo convierte en un ecosistema vulnerable. Estudios realizados por el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), reportaron problemas de contaminación por coliformes fecales, nitratos, plomo e hidrocarburos (MINAM, 2013).

Algunos grupos taxonómicos que habitan esta laguna cuentan con información tales como: anfibios (402 especies), aves (402 especies) y mamíferos (65 especies) (IIAP, 2006 y MINAM, 2013). Sin embargo, a pesar de contar con registros de especies de peces de importancia comercial (peces de consumo) (Waziw *et al.*, 2012 y Salazar-Ramirez *et al.*, 2021), aún no se cuenta con investigaciones completas y publicadas que caractericen la ictiofauna de esta laguna y que permitan un adecuado monitoreo de estas especies. Este problema se evidencia en la pesca, que es la principal actividad económica del poblador amazónico, una actividad difícil de monitorear debido al gran número de especies explotadas (García-Vásquez *et al.*, 2009; García-Dávila *et al.*, 2018). En su gran mayoría, estas especies son registradas erróneamente en los desembarques pesqueros, debido muchas veces a su parecido con otras especies similares, por ejemplo, especímenes registrados con el nombre de “lisa” pueden corresponder a diferentes especies de peces, y a tres diferentes géneros taxonómicos (ej. *Leporinus*, *Megaleporinus* y *Schizodon*) (García-Dávila *et al.*, 2018). Estas inconsistencias en la identidad de las especies para el comercio de peces de consumo, pueden obstaculizar el ingreso a mercados nacionales e internacionales, ocasionando fraude comercial y va en contra del derecho al consumidor; por tanto, la autenticidad de la información acerca de la identidad taxonómica (certificación) es indispensable (Carvalho *et al.*, 2011). La laguna Yarinacocha, al ser una zona de constantes desembarques, se hace difícil una adecuada identificación de los peces además de confusiones en la identidad de diferentes individuos que son vendidos con el mismo nombre comercial y que no permite el registro del número total de especies (Ríofrío, 1998 & Ríofrío *et al.*, 2008), lo que dificulta seguir protocolos de control adecuados. Es por eso que se precisa no solo conocer la ictiofauna de la laguna, sino también se requieren herramientas que permitan identificar con precisión muestras de distinta naturaleza y que garanticen un mayor control.

En los últimos años, se han incrementado los estudios de caracterización de la ictiofauna para implementar medidas de conservación, donde la taxonomía juega un rol importante, porque permite conocer la identidad de las especies. La taxonomía es la ciencia que se dedica a descubrir, describir, nominar e identificar especies, además representa y organiza a los seres vivos (Ebach

*et al.*, 2011), siendo el enfoque principal de la taxonomía identificar diferencias entre taxones relacionados y asignar caracteres que faciliten su reconocimiento (caracteres diagnósticos) (Grande, 2004). Las herramientas para identificar especies están basadas en el análisis morfológico de los especímenes (ej. coloración, formas, partes, morfometría y merística) utilizando claves taxonómicas (Ortega *et al.*, 2012). Sin embargo, muchas veces la gran diversidad específica puede ocasionar problemas para identificar adecuadamente especies morfológicamente muy similares (García-Dávila *et al.*, 2017); estas especies crípticas son muy difíciles de distinguir basándose únicamente en caracteres morfológicos (Vaz *et al.*, 2022). Además, el problema se complica en individuos en etapa de larva o juveniles cuya identificación taxonómica es dificultosa. Entonces, se necesita de un enfoque integrador en el que los científicos se beneficien al trabajar en colaboración para sintetizar los resultados de los datos derivados no solo de la morfología, sino de otros campos de investigación como por ejemplo el molecular (de Carvalho *et al.*, 2008).

Se ha demostrado, efectivamente, que el *DNA barcoding* es un método adecuado de levantamiento de la biodiversidad, que muestra altas tasas de congruencia con la taxonomía tradicional (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2021), ya que, con una base de datos existente, se puede identificar cada especie a partir de una secuencia de ADN, lo que garantiza el éxito de la identificación, aún en la etapa de huevo, larva o pez (Breñas *et al.*, 2020). La adopción de herramientas moleculares como el *DNA barcoding*, junto con la morfología tradicional, brinda mayor poder para investigar los límites taxonómicos entre especies lo que se conoce como taxonomía integradora (Guimarães *et al.*, 2021).

Es así que, el uso de la secuencia nucleotídica del gen mitocondrial citocromo oxidasa sub unidad I (COI), como marcador para el *DNA barcoding*, ha sido utilizado efizcamente como herramienta en la identificación molecular de especies en las que la identificación taxonómica utilizando caracteres morfológicos pueda volverse complicada (García-Dávila *et al.*, 2017; Astorga, 2008; Hajibabaei *et al.*, 2007). Este estudio utilizó ambas metodologías (morfológica y molecular) para poder proporcionar datos taxonómicos sólidos, proporcionar una lista de especies de peces y generar un banco de datos moleculares de la ictiofauna de la laguna Yarinacocha.

### **1.1. Antecedentes**

Se han realizado estudios respecto a la actividad pesquera y las comunidades acuáticas en la región Ucayali que incluye la ciudad de Pucallpa. Ríofrío (1998) publicó los resultados de la caracterización de la pesquería comercial (pescado fresco, congelado y salado) en Pucallpa durante el año de 1994, por acuerdo del IVITA-Pucallpa y la Dirección Regional de Pesquería de Ucayali (DIREPE-Ucayali, hoy PRODUCE-Ucayali); los principales objetivos fueron señalar los lugares de desembarques, registro de embarcaciones y los recursos explotados y se consideraron

cuatro puntos de desembarque incluyendo a Puerto Callao (Yarinacocha). En total se reportaron en los mercados 106 especies, correspondiente a 78 género, 20 familias y 6 órdenes (entre fresco, congelado y salado) siendo el orden Characiformes el grupo principalmente explotado (29.2% corresponde al “boquichico”) seguido del orden Siluriformes; sin embargo, se menciona que la DIREPE-Ucayali registró debidamente a solo a 30 grupos de peces debido a que muchas son incluidas bajo el mismo nombre común.

Luego, Riofrio *et al.* (2003) publicaron la descripción limnológica la laguna Cashibococha, ubicada en la provincia de Coronel Portillo, en el distrito de Yarinacocha (Ucayali), durante un estudio realizado en el año 2001. Se evaluaron las comunidades de macrófitas acuáticas, fitoplancton, zooplancton y peces. Se reportaron 66 especies de peces, conformado por 11 familias y cuatro órdenes; el orden dominante en diversidad y abundancia fue Characiformes.

Posteriormente el año 2010, se realizó una evaluación de impacto ambiental semidetallado (EIA-sd) para el proyecto “Acondicionamiento turístico del Lago Yarinacocha” (Geo Ambiental S.R.L, 2010); y en este estudio fueron reportados para la ictiofauna de la laguna 61 especies, agrupadas en siete órdenes y 19 familias; siendo los predominantes Characiformes y Siluriformes tanto en riqueza como en abundancia.

Continuando con los estudios de evaluación pesquera en el distrito de Yarinacocha, el Instituto del Mar de Perú (IMARPE) publicó un informe a cargo de Waziw *et al.* (2012), donde se realizó un monitoreo de la pesquería comercial en Pucallpa y Yarinacocha entre los años 2008 y 2010. Los autores mencionan la importancia de Pucallpa y Yarinacocha como zonas de desarrollo de la actividad pesquera; además que la laguna Yarinacocha abastece de pescado al distrito del mismo nombre y para ese año Yarinacocha registró la extracción de 44 especies comerciales y con mayor abundancia de boquichico (*Prochilodus nigricans*), sardina (*Triporthus* spp.) palometa (*Mylossoma* spp.), llambina (*Potamorhina* spp.), lisa (*Leporinus* spp.). Y en un estudio más actual realizado por Salazar-Ramirez *et al.* (2021), evaluaron los desembarques de la pesca comercial en Yarinacocha en el periodo de 2015 a 2019, y consideraron los desembarques totales y los desembarques por especie; estos desembarques no solo provienen de la laguna si no de otras zonas cercanas al río Ucayali como son Utiquinia y Callería. Se registraron un total de 63 especies por sus nombres comerciales (en su mayoría Siluriformes y Characiformes) en el desembarcadero de Yarinacocha, caracterizando a la actividad pesquera como multiespecífica; sin embargo, resaltan que muchas veces un nombre común puede comprender más de una especie por lo cual el número de especies sería mayor.

En cuanto a estudios de diversidad taxonómica de peces para el Perú, el año 2012, Ortega *et al.* publicaron la “Lista anotada de especies de aguas continentales del Perú”, que abarca la costa, los Andes y la Amazonia peruana. Se reportaron 1064 especies válidas de los cuales 395 especies son

Characiformes (37%), 393 especies son Siluriformes (37%) y 83 especies son Gymnotiformes (8%); los que en conjunto conforman Super Orden Ostariophysa (82%). Las familias más representativas en cuanto a número de especies fueron Characidae con 254 especies (25%), Loricariidae con 125 especies (12%) y Cichlidae con 75 especies (7%). La Amazonia peruana registró más de 900 especies con dominancia de estos grupos.

Un estudio más reciente de ictiofauna en la región Ucayali fue realizado por Quezada *et al.* (2017), donde presentan una lista comentada de especies de peces registradas en la cuenca del río Aguaytía; siendo la primera lista de especies para esta cuenca. Se registraron 211 especies contenidas en 28 familias y nueve órdenes. Los órdenes que presentaron mayor riqueza de especies fueron Characiformes y Siluriformes.

Respecto a estudios con *DNA barcoding*, en el año 2003, se postula una nueva metodología de identificación molecular, elaborada por Hebert *et al.* (2003a) en la cual se propone el código de barras genético (*DNA barcode*), una metodología para la identificación de especies del mundo. Se basa en el uso de una región de aproximadamente 650 pares de bases (pb) del gen COI utilizada como *barcode* estándar para muchos de los grupos de animales. En mayo del 2004, se lanzó el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL) y que incluía a más de 120 organizaciones de 45 naciones, para desarrollar alianzas internacionales necesarias para construir una biblioteca de códigos de barras. Es así que este potencial de información motivó al desarrollo de un sistema de datos de código de barras de la vida, y se lanzó una plataforma bioinformática el Sistema de Código de Barras de la Vida (BOLD): [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org) (Ratnasingham & Herbert., 2007). Y en el año 2008, es establecida la iniciativa Internacional de Códigos de Barras de la Vida (iBOL), una alianza de investigación entre los países con el objetivo de revolucionar la ciencia de la biodiversidad mediante la elaboración de bibliotecas de referencia de códigos de barras de ADN (<https://ibol.org/>).

En el año 2014, el Perú conjuntamente con Canadá (Universidad de Guelph), se da inicio al proyecto “Código de barras de ADN para apoyar la conservación de la biodiversidad, su aprovechamiento sostenible y el comercio”, con el financiamiento del Departamento de Asuntos Exteriores de Canadá, Comercio y Desarrollo (DFATD), enmarcado en el Programa de Asistencia Técnica Relacionado al Comercio Canadá – Américas (CATRTA). Con este proyecto se procura elaborar una Estrategia Nacional de Código de Barras de ADN para nuestro país y empezar a construir una biblioteca digital de referencia de los códigos de barras para la fauna y la flora peruana, constituyendo el PeBol: Peruvian Barcode of Life (<http://pebol.org/>).

Posteriormente, se desarrollaron estudios que utilizaron el *DNA barcoding* como metodología de identificación de especies en el Perú. En cuanto a ictiofauna, Campaña (2017), estudió la ictiofauna continental de la región Tumbes usando el método *del DNA barcoding*. Registró en

total 32 especies dentro de seis órdenes y 17 familias. Piñedo (2018), utilizó ambas metodologías morfológicas y moleculares (*DNA barcoding*) para caracterizar las especies de peces ornamentales comercializados en la ciudad de Iquitos. Estudió 75 especies de peces, de las cuales 52 ya contaban con registro en el Genbank y el resto no habían sido depositadas. Se generó un banco de secuencias COI de los peces ornamentales de mayor comercialización, y la ficha técnica de cada especie.

Un estudio enfocado en especies de peces comerciales fue realizado por IIAP y el Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Los resultados fueron publicados en un libro bajo el nombre de Peces de consumo de la Amazonia peruana (García-Dávila *et al.*, 2018), para la región de Loreto y Madre de Dios. Este estudio se realizó utilizando las herramientas de *DNA barcoding* y *metabarcoding* y cuya información de los principales peces de la pesquería amazónica y peces ornamentales, se encuentra en las plataformas BOLD y Gembank. En el año 2021, el IIAP publicó el libro titulado “Peces Ornamentales de la Amazonia Peruana”. Aquí proporciona información de 212 especies de peces Ornamentales, principalmente de la región de Loreto, de las cuales se han obtenido los códigos de barras de ADN para el gen COI, utilizando los primers FishF1 y FishR1 (Ward *et al.*, 2005) y cuyas secuencias están depositadas en el Genbank. Este libro también incluye información respecto a la información taxonómica, biología, ecología y distribución geográfica de estas especies.

Se han realizado estudios en otros países utilizando el *DNA barcoding* para estudiar la diversidad de peces de agua dulce en otros países, como el trabajo realizado por Valdez-Moreno *et al.* (2009) sobre la diversidad de peces de México y Guatemala, donde elaboraron una biblioteca de referencia para los peces en 24 tipos de hábitats de agua dulce desde México hasta Guatemala y obtuvieron secuencias COI de 427 especímenes correspondientes a 61 especies logrando diferenciar el 98 % de las especies, no pudiendo discriminar entre los miembros de los géneros *Bramocharax* y *Astyanax* debido a valores bajos de divergencia. En Sudamérica, Pereira *et al.* (2013) recolectaron 1244 peces en 208 diferentes puntos dentro de la cuenca alta del río Paraná, siendo la primera investigación en examinar un gran número de especies de peces de la región Neotropical para evaluar la efectividad del *DNA barcoding* en la distinción de especies de peces de esta región. Esto incluyó un gran número de especies y con más de dos secuencias por especie, donde el *DNA barcoding* pudo discriminar 252 de las 254 especies (99.2%) y el valor promedio de la distancia intraespecífica fue de 1.3%, además se detectó 23 casos de posibles nuevas especies. Gomes *et al.* (2015). utilizaron la taxonomía integrativa para detectar especies crípticas. Se desarrolló un inventario de peces de la cuenca del río Mucuri (Brasil) y posteriormente una biblioteca de referencia basada en una minuciosa identificación taxonómica; además, se utilizó el análisis de distancia para delimitar especies. Se obtuvieron 141 secuencias para 37 especies de peces, representando el 75% de la diversidad para la cuenca del río Mucuri; que está comprendida



en 30 géneros, 19 familias y cinco órdenes. La especie *Cypochacharax gilbert*, fue nombrada como candidata a especie críptica ya que no se encontraron diferencias morfológicas y la distancia intraespecífica fue mayor al 2%. Otro estudio fue realizado en las quebradas de orden inferior del río Tapajos por Guimarães *et al.* (2018), se utilizaron las herramientas morfológicas y moleculares para caracterizar la ictiofauna. Se reportaron 29 especies, 21 géneros y 11 familias; donde el orden Characiformes fue el más abundante (58.6%) seguido de Cichliformes (24.2%) y se reportaron especies con distancias intraespecíficas mayores al 2% (*Knodus sp.*, *H. malabaricus*, *Copella callolepis* y *Aequidens epae*). Por último, Pereira *et al.* (2021) realizaron un estudio integrativo utilizando herramientas taxonómicas y código de barras para estudiar la ictiofauna del arroyo y cabecera de la margen izquierda del Embalse de la Represa de Itaipú, localizada en la parte baja de la cuenca del Alto Paraná. Encontraron 48 especies correspondientes a 37 géneros y 13 familias. Los órdenes Characiformes y Siluriformes fueron los más representativos (75%); y la familia Characidae fue la más representativa (24%). Los autores mencionan que el enfoque integrador resultó muy para la identificación inequívoca de las especies en estudio, incluyendo aquellos casos donde los caracteres morfológicos no fueron concluyentes, permitió detectar casos de especies crípticas y 13 posibles nuevas especies. Estos estudios de *DNA barcoding* han detectado casos de especies crípticas, uno de los cuales incluye a *H. malabaricus*.

El género *Hoplias* agrupa a los peces carnívoros conocidos como “trairas” (Brasil), “tarairas” (Argentina) o “fasacos” (Perú), es el género más diverso de la familia Erythrinidae (Marques *et al.*, 2013) con 18 especies válidas (Fricke *et al.*, 2022) y se ha dividido en tres grupos taxonómicos de acuerdo a caracteres morfológicos (Oyakawa & Mattox, 2009): *H. aimara*, *H. lacerdae* y *H. malabaricus* (excluyendo a *H. microcephalus* y *H. patana*). El grupo *H. malabaricus*, con siete especies válidas (incluyendo a *H. malabaricus*), reúne las especies cuyos dentarios convergen abruptamente hacia la sínfisis mandibular (forma de “V” o “Y”) y con placas dentales en los huesos basihyal y basibramquial (Oyakawa & Mattox, 2009 y Guimarães *et al.* 2021). La especie *H. malabaricus* es considerado uno de los problemas taxonómicos más complejos en la sistemática de peces neotropicales, tiene una amplia distribución en la mayoría de hábitats de los drenajes de Sudamérica, encontrándose en lagunas, ríos y reservorios (Mattox *et al.*, 2014 y Guimarães *et al.*, 2022) y los caracteres morfométricos de los especímenes se superponen en gran medida a lo largo del rango de distribución de la especie (Mattox *et al.*, 2014 y Rosso *et al.*, 2018). Estudios moleculares han confirmado la existencia de un complejo de especies para *H. malabaricus*, como el elaborado por Marques *et al.* (2013) que encontraron valores de divergencia genética elevados en una población de *H. malabaricus* en la cuenca baja del Amazonas (Brasil). Cardoso *et al.* (2018), que estudiaron la diversidad molecular del género *Hoplias* en Suramérica utilizando el *DNA barcoding*, delimitaron 16 linajes mitocondriales para el complejo *H. malabaricus*. Recientemente, Guimarães *et al.* (2022) encontraron que este género abarca al

menos 23 especies y detectaron nuevas especies crípticas dentro de los grupos *H. malabaricus* y *H. lacerdae*. A pesar de que en los últimos años se han descrito especies utilizando un enfoque integrador que combina la taxonomía tradicional, morfometría geométrica y el *DNA barcoding*; por ejemplo *H. mbigua* (2015), *H. misionera* (2016) y *H. argentinensis* (2018) para la cuenca del río de la Plata, y *H. auri* (2021) para la cuenca alta del río Tapajós (Brasil); aún queda una fuerte incertidumbre taxonómica por resolver en la cuenca Amazónica y drenajes adyacentes (Guimarães *et al.*, 2022).

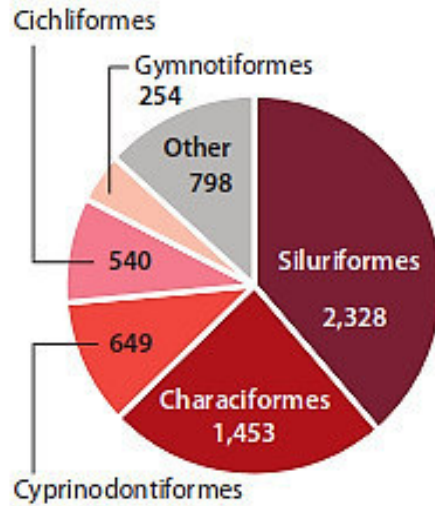
## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Diversidad de peces en la cuenca Amazónica**

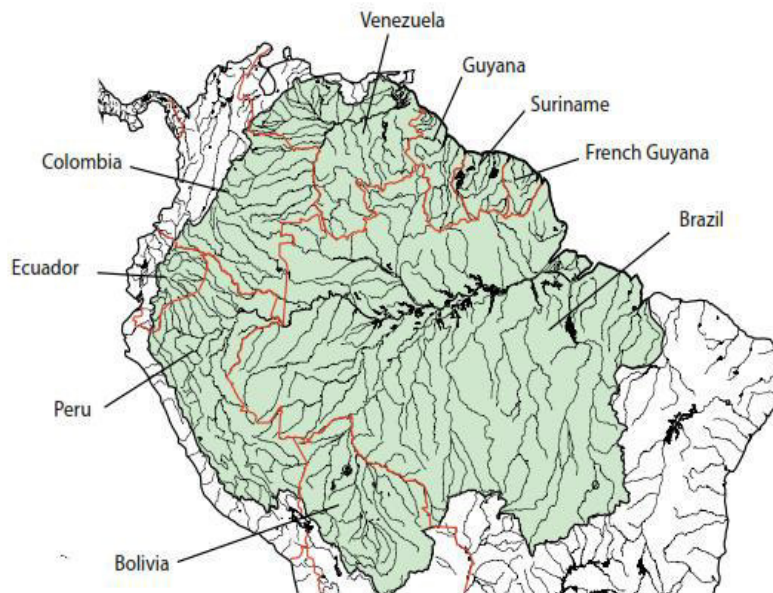
Los peces neotropicales de agua dulce (NFF) constituyen la fauna de vertebrados más diversos en la Tierra, con más de 6.200 especies que habitan en un espacio acuático que representa menos de 0.5% de la superficie de esta región (Albert *et al.*, 2020).

La diversidad la ictiofauna de agua dulce en el Neotrópico se distribuye de manera desigual entre los taxones superiores; de hecho, la mayoría de especies de peces se concentra en solo cinco clados principales clasificados convencionalmente como órdenes taxonómicos (Figura 1): Siluriformes (bagres), Characiformes (tetras, pirañas y aliados), Cyprinodontiformes (peces anuales, killis, rivúlidos y aliados), Cichliformes (cíclidos) y Gymnotiformes (peces eléctricos neotropicales) (Albert *et al.*, 2020). Estos cinco órdenes juntos representan el 87% de todas las especies en la región Neotropical y el 96% de las especies de peces amazónicos (Reis *et al.*, 2016).

El centro de la diversidad de peces de agua continental neotropical se encuentra en las cuencas hidrográficas de las tierras bajas húmedas en el norte de América del Sur, una región conocida como Gran Amazonia (Figura 2). Está vasta región comprende las cuencas del Amazonas y Orinoco, y la pequeña cuenca costera de Guayanas (AOG) (Albert *et al.*, 2020).



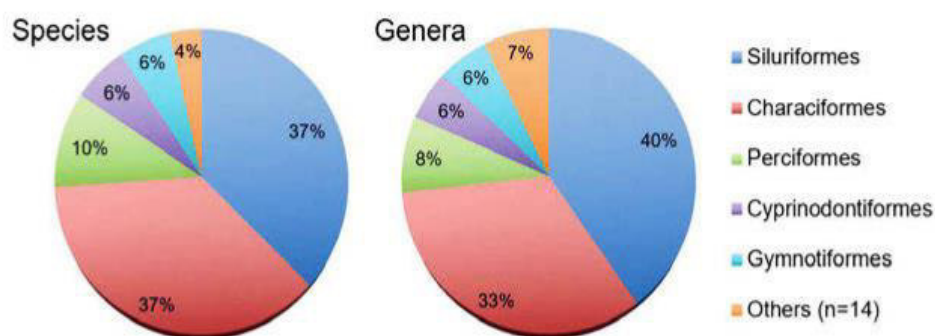
**Figura 1** Especies de peces de agua dulce de la región Neotropical por orden taxonómico (extraído y modificado de Albert *et al.*, 2020)



**Figura 2.** Mapa de Gran Amazonia (en verde) incluye las cuencas de Amazonas y Orinoco y las zonas ribereñas de Guayanas (AOG) (extraído y modificado de van der Sleen & Albert, 2018)

La ictiofauna en la Gran Amazonia refleja esa distribución desigual entre taxones superiores; más del 90% de las especies pertenecen a solo cuatro órdenes taxonómicos (Figura 3 y Figura 4A): Siluriformes, Characiformes, Cichliformes y Cyprinodontiformes. En la región AOG, la riqueza de especies a nivel de familia (Figura 4B) destaca la familia Characidae que incluye 581 especies o alrededor del 53% de todas las especies características para la región. También se puede resaltar

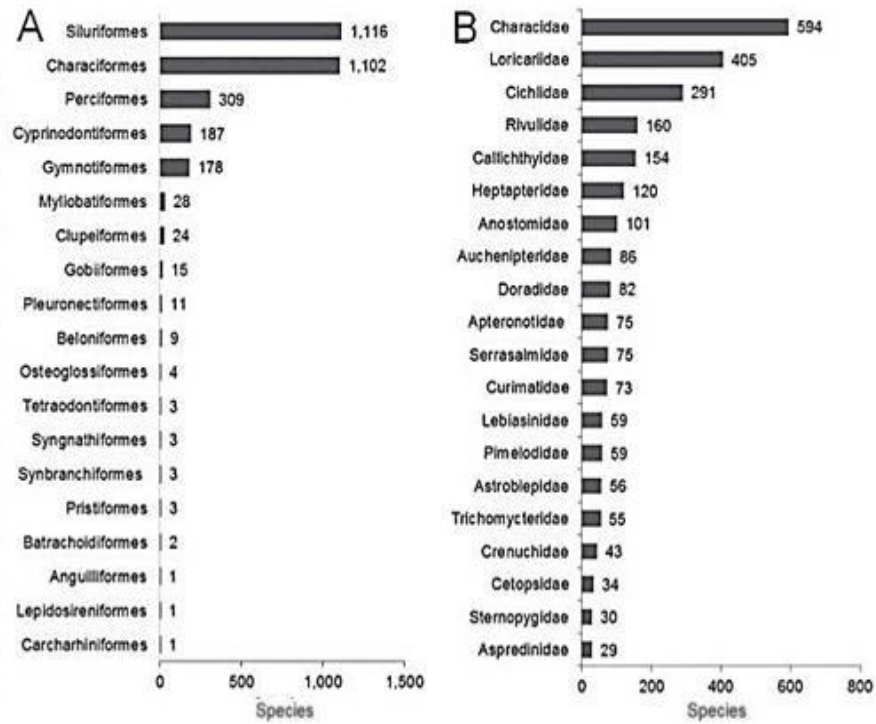
a la familia Loricariidae que incluye 403 especies en el AOG o aproximadamente el 36% de todas las especies de Siluriformes de la región AOG (van der Sleen & Albert, 2018).



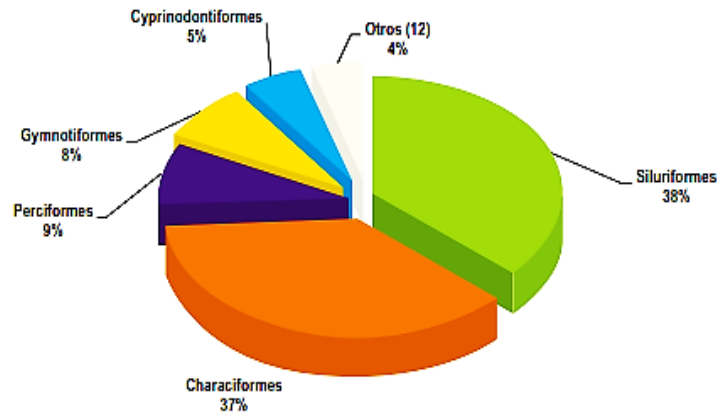
**Figura 3.** Composición de especies (izquierda) y géneros (derecha) de especies de peces por órdenes taxonómicos, expresado en porcentaje, en la región AOG (extraído y modificado de van der Sleen & Albert, 2018)

La cuenca del Amazonas comprende 7 131 000 km<sup>2</sup>, descarga 15% a 17% del total de agua dulce del planeta y drena los territorios de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil (Reis *et al.*, 2016). Su vasto tamaño es igualado por una fauna y flora igualmente vastas, convirtiéndose en el ecosistema más rico del planeta (Dagosta & de Pinna, 2019). Esta cuenca posee alrededor de 2800 especies de peces (Bogotá-Gregory *et al.*, 2020) de los cuales el 63% es endémica (D'agosta & De Pinna, 2019). Al igual que Sudamérica, la mayoría de peces en la cuenca amazónica pertenecen al Super Orden Ostariophysii (Characiformes, Siluriformes y Gymnotiformes) y cíclidos (Reis *et al.*, 2016).

En el Perú, esta cuenca comprende un área de 977 920 km<sup>2</sup>, lo que representa el 75 % del territorio nacional (DGAS, 1995). La ictiofauna amazónica peruana comprende el 82% (más de 800 especies) de las 1064 especies registradas para el Perú. El grupo de mayor importancia es el Super orden Ostariophysii, que incluye a los órdenes Siluriformes (38%), Characiformes (37%) y Gymnotiformes (6%) (Figura 5), juntos representan el 81% de las especies de peces amazónicas. Entre los peces No Ostariophysii, el orden Cichliformes (antes Perciformes) es el mejor representado (9%) e incluye a la familia Cichlidae. Los demás órdenes conforman un 10% (Ortega *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Taxones con mayor riqueza de especies en la ictiofauna de la AOG. (A) 19 órdenes que representan todas las especies de peces en la AOG y (B) Top 20 familias que representan el 87% de las especies de peces en la AOG (extraído y modificado de van der Sleen & Albert, 2018)

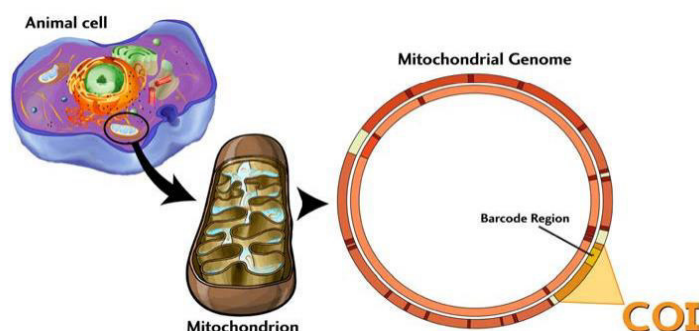


**Figura 5.** Peces de la Amazonia peruana: Riqueza (%) por órdenes (extraído y modificado de Ortega et al., 2012)

## 2.2. DNA barcoding

Es una herramienta que permite discriminar especies examinando la variación de secuencias en una región genética estandarizada, que representa una pequeña fracción del genoma completo.

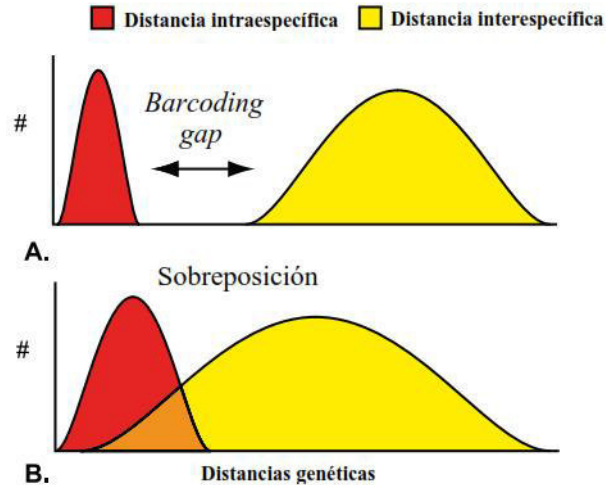
Fue propuesto por Herbert *et al.* (2003a) como un método de identificación de especies animales y posteriormente se extendió a otros grupos de vida multicelular (ej. plantas y hongos), y tiene dos principios fundamentales que son la estandarización (utilizando las mismas regiones genéticas a través de grandes grupos taxonómicos para facilitar las comparaciones) y el minimalismo (utilizando la menor cantidad de secuencia requerida para la identificación confiable de taxones).



**Figura 6.** El marcador estándar de *DNA barcoding* para animales: citocromo c oxidasa subunidad I (COI) presente en el genoma mitocondrial (extraído y modificado de Centre for Biodiversity Genomics, University of Guelph, 2021)

El *DNA barcoding* animal establece una secuencia de 650 pares de bases aproximadamente, entre las posiciones 59 y 705 del extremo 5' del gen *COI* (Figura 6), funcionando como un sistema universal para catalogar e identificar especies (Herbert *et al.*, 2003b).

La región COI se seleccionó debido a cuatro características clave: i) un mayor número de copias por célula que facilita la extracción y amplificación del *DNA* presentes en pequeñas cantidades de tejido o muestras degradadas; ii) es de herencia materna y falta de recombinación (no hay intercambio de material genético entre copias maternas y paternas de *DNA* mitocondrial); iii) una mayor tasa de sustitución nucleotídica en el *DNA* mitocondrial lo que se manifiesta en alta variación de secuencias entre especies del mismo género (Herbert *et al.*, 2003b); y iv) falta de intrones; es decir, regiones no codificantes dentro de los genes que pueden complicar la comparación de secuencias. Adicionalmente, el gen COI también fue elegido como marcador de código de barras para animales debido a su lenta tasa de mutación en relación con otros genes mitocondriales, lo que se manifiesta en una alta tasa de conservación de la secuencia a nivel genérico; y presenta alta variabilidad interespecífica (Centre for Biodiversity Genomics, University of Guelph, 2021).



**Figura 7.** Esquema del *barcoding gap* inferido donde se muestra la distribución de la divergencia intraespecífica (rojo) y la divergencia interespecífica (amarillo). (A) Esquema ideal del *DNA barcoding* con distribuciones sin superposiciones. (B) Versión alternativa con una superposición significativa y sin brechas (extraído y modificado de Meyer & Paulay, 2005)

Los fundamentos más importantes de esta técnica se basan en la monofilia fuertemente sustentada y las diferencias entre las divergencias genéticas interespecíficas e intraespecíficas, donde la variación genética entre individuos de la misma especie (variación intraespecífica) es menor que las observadas entre especies (variación interespecífica) (Herbert *et al.*, 2003a). Esta diferencia crea una brecha entre los valores de variación genética intraespecífica e interespecífica llamado *barcoding gap* (Meyer & Paulay, 2005). En cuanto a especies estrechamente relacionadas; es decir, especies hermanas, puede existir sobreposiciones entre las distancias intraespecíficas e interespecíficas, indicando que la brecha entre ellas no estaría bien definida (Figura 7) (Meyer & Paulay, 2005).

### 2.3. Biblioteca de referencia

La identificación precisa de especies usando *DNA barcoding* requiere de una base de datos molecular comparativa completa, contra las cuales las incógnitas puedan ser comparadas (Meyer & Paulay, 2005). Una biblioteca de referencia de secuencias COI, derivada del material de referencia, es el primer paso para asignar más organismos a especies al hacer coincidir la secuencia de una muestra desconocida con la biblioteca de referencia (Díaz *et al.*, 2016).

Es una herramienta robusta para la identificación de secuencias. La identificación eficaz de especies, utilizando *DNA barcoding*, requiere de bibliotecas de referencias con secuencias, una cobertura de información taxonómica completa y la calidad del contenido son importantes para una precisión suficiente (Weigand *et al.*, 2019).

Para el desarrollo de la misma, primero se debe implementar medidas de garantía de calidad (Figura 8), que es el primer paso para una gestión de calidad de los datos (Weigand *et al.*, 2019). Esto incluye:

- Una taxonomía válida, entonces la confiabilidad taxonómica de los códigos de barras de *DNA* generados debe verificarse exhaustivamente antes de la construcción de una biblioteca de referencia de secuencias COI (Díaz *et al.*, 2016).
- Secuencias de códigos de barra formalmente correctas, de 500 pb mínimo, <1% de bases ambiguas, incluir los *traces* (electroferogramas) y los primers utilizados).
- Depósito de *vouchers* en una colección científica.
- Amplia información de metadatos.



**Figura 8.** Descripción general del desarrollo de una Biblioteca de referencia y sus medidas de garantía y control de calidad (extraído y modificado de Weigand *et al.*, 2019)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

- Describir la ictiofauna de la laguna Yarinacocha mediante el análisis morfológico y *DNA barcoding*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Elaborar la lista de especies y describir la composición taxonómica de los peces de la laguna Yarinacocha, durante la época de transición a creciente, en el año 2020.
- Caracterizar molecularmente la ictiofauna de la laguna Yarinacocha utilizando el marcador COI y comparar los resultados obtenidos usando ambas metodologías.
- Analizar el posible caso de cripticismo de *H. malabaricus* evidenciado por el *DNA barcoding* en este estudio.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

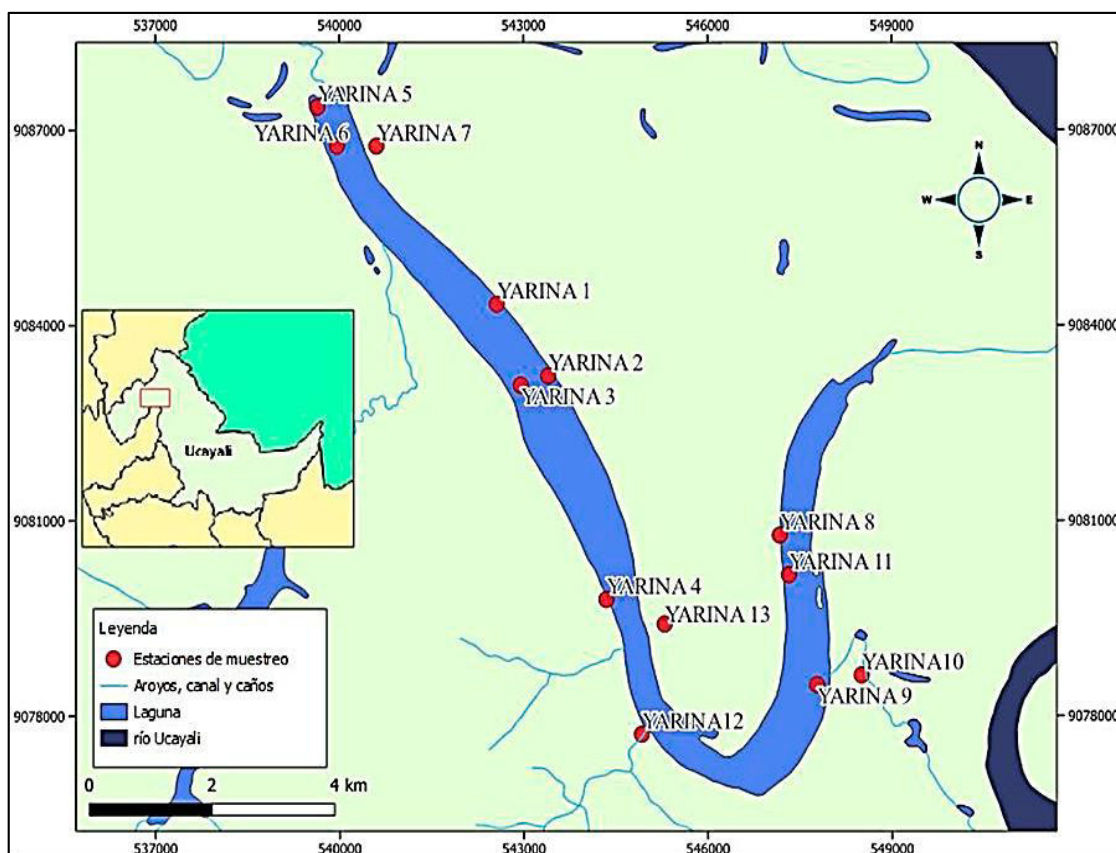
La lista de materiales y equipos utilizados puede ser consultada en el Anexo 1.

### 4.1. Población de estudio

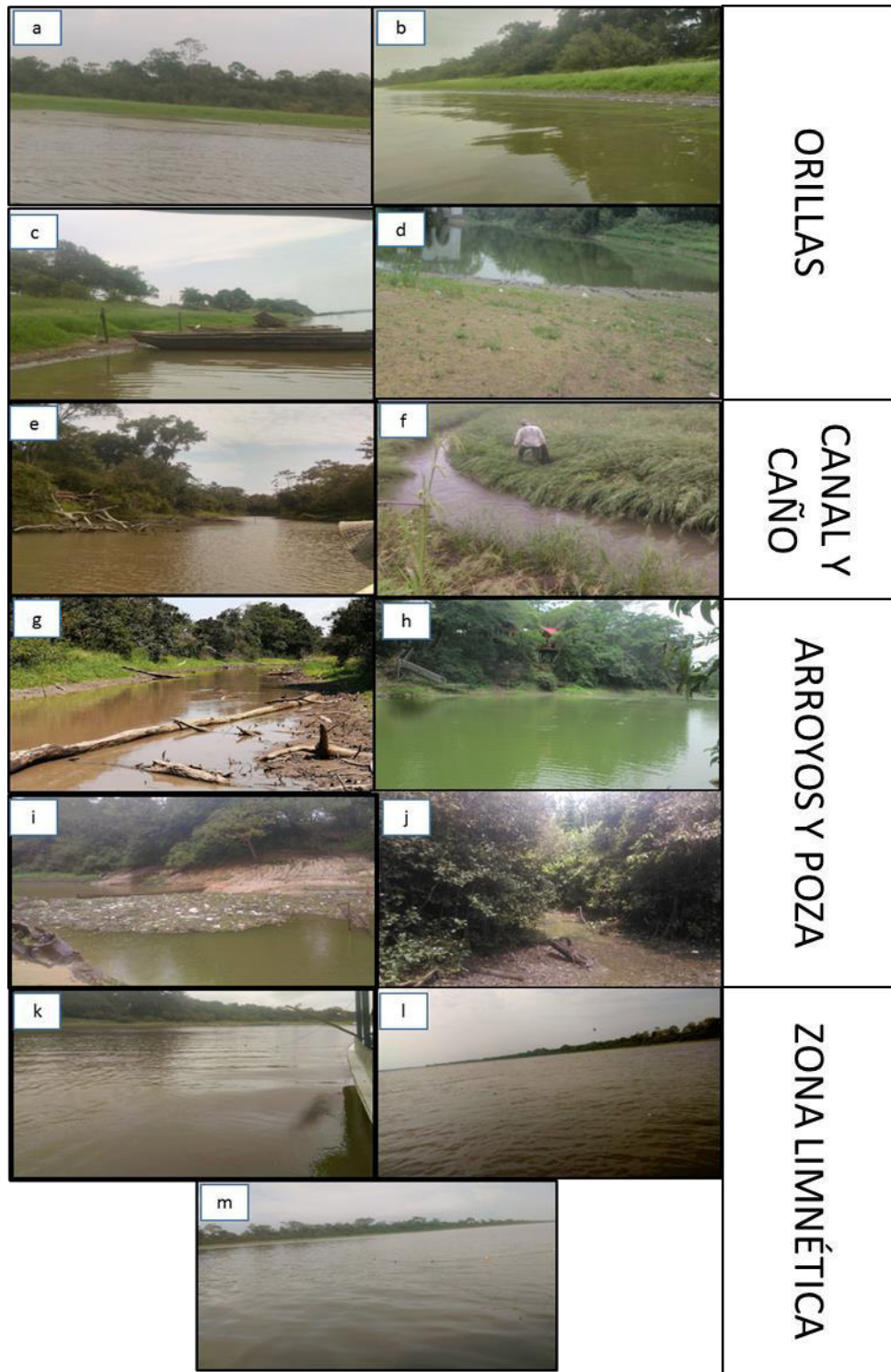
Conformado por 1678 peces capturados los días 12,13,14 y 15 de octubre del año 2020 (periodo de transición a creciente), con el permiso de colecta RD N° 00132-2021-PRODUCE/DGPCHDI (Anexo 5), en la laguna Yarinacocha, ciudad de Pucallpa ( $8^{\circ}18'29''\text{LS } 74^{\circ}36'05''\text{LO}$ ).

### 4.2. Área de estudio

En este estudio fueron evaluadas 13 estaciones tomando en cuenta los diferentes tipos de hábitats de la laguna como las zonas de orillas, zona limnética, canales, caños y pozas; las áreas seleccionadas fueron georreferenciadas en coordenadas UTM (Universal Transversal Mercator) con ayuda de un GPS marca Garmin (Figura 9 y Tabla 1), y se realizó el registro fotográfico respectivo (Figura 10).



**Figura 9.** Mapa de las estaciones de muestreo en la laguna Yarinacocha. Puntos de coordenadas en UTM WGS84



**Figura 10.** Estaciones de muestreo en la laguna Yarina-cocha agrupados según el tipo de hábitat: a=Yarina 1, b=Yarina 2, c=Yarina 4 y d=Yarina 9 zonas de orilla; e=Yarina 5, f=Yarina 8, g=Yarina 7, h=Yarina 10 y i=Yarina 12 arroyos; j=Yarina 13 poza; y k=Yarina 3, l=Yarina 6 y m=Yarina 11 zona limnética

**Tabla 1.** Georreferenciación y tipo de hábitat de las estaciones de muestreo de la laguna Yarinaochoa. Puntos de coordenadas en UTM WGS84

Estaciones	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Tipo de hábitat
Yarina 1	18 L542559	9084325	133	Orilla
Yarina 2	18L 543395	9083223	137	Orilla
Yarina 3	18L 542946	9083080	130	Zona limnética
Yarina 4	18L 544341	9079787	138	Orilla
Yarina 5	18L 539513	9087233	138	Canal al río Ucayali
Yarina 6	18L 539953	9086755	136	Zona limnética
Yarina 7	18L 540596	9086755	139	Quebrada
Yarina 8	18L 547169	9080773	138	Caño
Yarina 9	18L 547772	9078346	133	Orilla
Yarina 10	18L 548107	9078684	137	Quebrada
Yarina 11	18L 547316	9080163	133	Zona limnética
Yarina 12	18L 544917	9077716	146	Quebrada
Yarina 13	18L 545290	9079408	141	Poza

### 4.3. Captura de ejemplares y fijación de muestras.

#### A. Captura de ejemplares

Se siguió la metodología descrita por Samamez *et al.* (2014) para peces de agua dulce, para lo cual se utilizaron diferentes tipos de artes de pesca como redes de arrastre (15 m de longitud y 5 mm de apertura de malla), redes de espera (30 m de longitud y 3" de apertura de malla) y atarraya (10 m de longitud), lo que permitió coleccionar la mayor diversidad posible de especies cubriendo los diferentes tipos de hábitats.

La red de arrastre fue utilizada en zonas de playas de la laguna entre dos a tres personas, fue aplicada a lo largo de la orilla, preferiblemente manteniendo una distancia de al menos cinco metros entre cada arrastre. También fue utilizada en áreas de orilla cerca de las zonas de empalizadas y se coleccionaron los peces adaptados a estos hábitats como refugio. Para la zona limnética, se unieron dos redes de espera, colocadas al iniciar la jornada (8:30 am) por un periodo de 3 a 4 horas y la atarraya se utilizó para capturar peces de mayor tamaño y en las estaciones cuyo acceso al hábitat usando red de arrastre fuera complicado (Anexo 3). Adicionalmente, se recolectaron peces extraídos por pescadores locales de peces ornamentales y que fueron donados para este estudio (*Electrophorus vari*).

#### B. Fijación de muestras

Una vez capturados los peces fueron agrupados por morfotipos comparando diferentes caracteres morfológicos como forma del cuerpo, coloración, posición del hocico, forma de las aletas, presencia de escamas, etc.; y luego fotografiados. Se extrajo tejido del lado derecho del pez (aleta o músculo) y se fijó este material en tubos Eppendorf de 1.5 o 2 ml con alcohol de 96° (Figura 11

y Figura 12) y para el caso de especímenes muy pequeños, estos fueron colocados directamente en alcohol de 96°. Se colectaron de 5 a 10 muestras de tejido por morfotipo siempre que fuese posible. Se anotó en la libreta de campo los nombres de los especímenes “voucher” y su respectivo código de identificación; estos ejemplares fueron etiquetados utilizando el código LSMFF seguido del número de “voucher” correspondiente. Los tubos Eppendorf se guardaron en criocajas para microtubos de 1.5 ml y 2 ml y se colocaron los datos de lugar de colecta, los nombres del personal a cargo y el rango de códigos en cada una. Posteriormente estos tejidos fueron guardados en la colección de tejidos del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la UNMSM a -20°C y registrados en la base de datos correspondiente.



**Figura 11.** Agrupación de especímenes por morfotipo realizado en campo. Peces de las familias A. Characidae, B. Anostomidae, C. Cichlidae, D. Gasteropelecidae y E. Loricariidae

Luego de este procedimiento, todos los especímenes fueron fijados en formol al 10% durante un periodo de 48 horas con la respectiva etiqueta para cada estación. Después de este periodo fueron lavados con abundante agua potable para quitar los restos de formol e inmediatamente fueron envueltos en gasas humedecidas con alcohol al 70% y colocadas en bolsas con la respectiva etiqueta de la estación. En el caso de muestras que se hayan colectado el mismo día de traslado, fueron envueltas en paños de gasa humedecidos con formalina al 10%. Todas las muestras se guardaron en baldes de 20 litros para su movilización al Departamento de Ictiología del MHN-UNMSM en la ciudad de Lima.



**Figura 12.** Extracción de tejido muscular, preservación y etiquetado del espécimen voucher para el procedimiento de *DNA barcoding*

#### **4.4. Identificación y catalogación de las especies**

Para la identificación de los ejemplares se utilizaron datos de caracteres morfológicos externos (forma del cuerpo, posición del hocico, presencia de barbillas, patrones de coloración, etc.), morfométricos (altura del cuerpo, longitud total del cuerpo, longitud de las aletas, diámetro del ojo, etc.) y merísticos (número de escamas, número de placas, número de dientes, número de radios o espinas en las aletas, etc.), que se obtuvieron con ayuda de un microscopio estereoscopio BOECO BSZ-405 y un calibrador digital Mituoyo (precisión de 0.01 mm). Se determinó la identificación de los peces a nivel de especie siempre que fuese posible, y se siguió la nomenclatura y clasificación taxonómica del *Eschmeyer's Catalog of Fishes* (<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Este procedimiento se realizó en el Departamento de Ictiología del MHN-UNMSM consultando descripciones originales, revisiones taxonómicas, bibliografía especializada en identificación de especies de peces amazónicos como Galvis *et al.* (2006), Queiroz *et al.* (2013) y van der Sleen & Albert (2018); y para los grupos taxonómicos de Characiformes (Gery, 1977), Siluriformes (Burgess, 1989), Gymnotiformes (Mago-Leccia, 1984 y Albert, 2001) y Cichliformes (Kullander, 1986). Adicionalmente, se utilizaron artículos científicos recientes sobre algunas especies, por ejemplo: de Santana *et al.*, 2019 (especies del género *Electrophorus*) y Littmann *et al.*, 2021 (especies del género *Hypophthalmus*).

Algunas especies fueron nombradas con los términos “cf.” y “aff.” entre el nombre genérico y el nombre específico, donde “cf.” es abreviatura de conferre (parece) y “aff.” es abreviatura de affinis (especie estrechamente relacionada), El uso de “sp.”, significa una especie, indica que la especie aún no está descrita (por tanto, no tiene un nombre formal) o se desconoce a que nombre

científico pertenece al pez mencionado (van der Laan, 2022). En el caso de la especie *Leporinus* cf. *parae* se siguió la nomenclatura utilizada por Ramirez *et al.* (2016), Silva-Santos *et al.* (2018) y Valenzuela (2022) y en el caso de *Hemiodus* aff. *microlepis* se siguió la nomenclatura utilizada por Nogueira *et al.* (2020).

Los especímenes que presentaron dificultades en su determinación taxonómica fueron comparados con el material ya depositado en la Colección Científica del Departamento de Ictiología del MHN-UNMSM. En el caso específico del género *Hoplias* que presenta una taxonomía no resuelta (Nogueira *et al.*, 2020 y Guimarães *et al.*, 2021) se utilizó la siguiente bibliografía para su identificación Oyakawa & Mattox (2009), Rosso *et al.* (2018) y Guimarães *et al.* (2021)

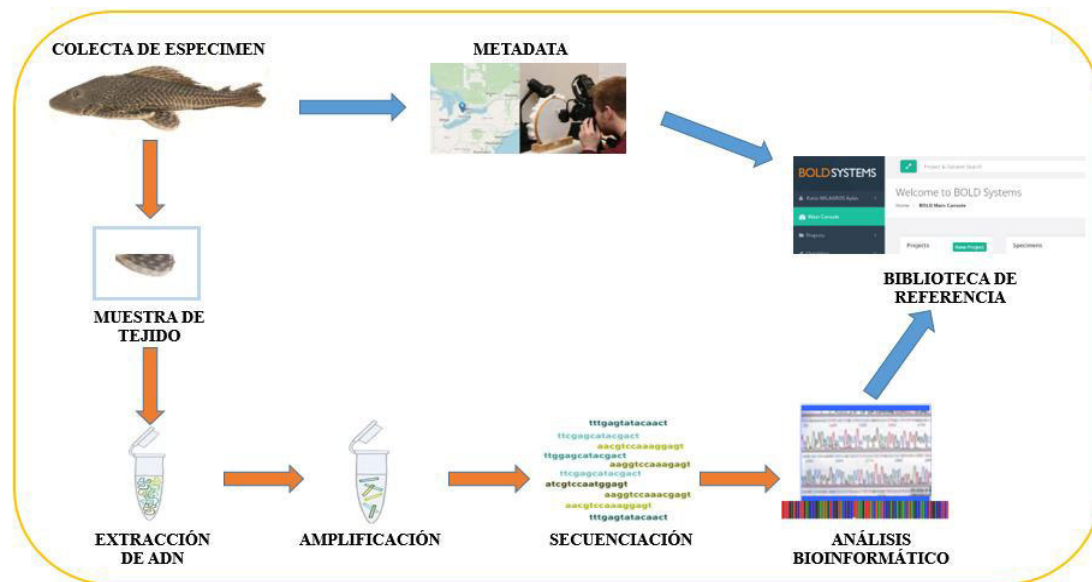
Luego del proceso de identificación, los peces se colocaron en frascos de plástico con alcohol a 70° con su etiqueta correspondiente, la cual contiene los datos de nombre de la especie, lugar de colecta, coordenadas, nombre del colector, nombre del identificador y un código de identificación. Finalmente, las especies fueron catalogadas e ingresadas a la Colección Científica del Departamento de Ictiología del MHN-UNMSM (Anexo 3).

#### **4.5. Descripción de la composición taxonómica**

Se elaboró una lista del total de especies utilizando las categorías taxonómicas de orden, familia, género y especie. La composición de la ictiofauna fue representada mediante gráficos de riqueza, abundancia y el ranqueo de las especies más abundantes. La riqueza relativa de especies es el número de especies dentro de una familia u orden expresado en datos absolutos y en porcentaje. La abundancia relativa de especies es el número de individuos de cada especie dentro de una familia u orden expresado en datos absolutos y en porcentaje para conocer la estructura poblacional.

#### **4.6. DNA barcoding**

El procedimiento de trabajo del *DNA barcoding* tiene tres componentes principales que son la recolección y manejo de muestras; análisis molecular (extracción de *DNA*, amplificación y secuenciación); y la bioinformática que culmina con la creación de la biblioteca de referencia de las secuencias COI de las especies analizadas (Figura 12).



**Figura 13.** Flujograma de trabajo de *DNA barcoding* desde la recolección de muestras hasta la carga de secuencias y metadata. Las flechas azules indican los datos de carga al BOLD

#### A. Extracción de *DNA*, PCR y secuenciación

El *DNA* genómico se extrajo de los tejidos de peces de la laguna Yarinacocha y se realizó en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía y el Laboratorio de Genómica y Bioinformática de la Biodiversidad, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El *DNA* total fue extraído utilizando el kit comercial de extracción *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante Anexo 6), y el protocolo de extracción de *salting-out* (solución salina) de Ajinabi & Martinez (1997) con algunas modificaciones (Anexo 7).

La cuantificación de *DNA* y la pureza del mismo fue medido por espectrofotometría utilizando el Nanodrop™ Lite. La pureza de *DNA* fue determinada por el valor de  $A_{260}/A_{280} > 1.77$  (Ajinabi & Martinez, 1997); donde  $A_{260}$  indica la absorbancia a 260 nm (absorbancia de los ácidos nucleicos) y  $A_{280}$  la absorbancia a 280 nm (absorbancia de los residuos de triptófano y tirosina de las proteínas).

Los segmentos del gen COI fueron obtenidos utilizando la combinación de *primers* para peces FishF1 y FishR1, FishF2 y FishR2 publicadas por Ward *et al.* (2005); y los *primers* AnosCOIF y AnosCOIR de Ramirez & Galetti (2015). Las secuencias de estos *primers* se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** *Primers* utilizados para el marcador COI en peces de la laguna Yarinacocha

<i>Primers</i>	<i>Secuencia 5'-3' forward y reverse</i>	<i>Referencia</i>
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Ward <i>et al.</i> (2005)
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	
AnosCOIF	ACAAACCACAAAGAYATYGG	Ramirez & Galetti (2015)
AnosCOIR	TCWGGGTGACCAAARAATCA	

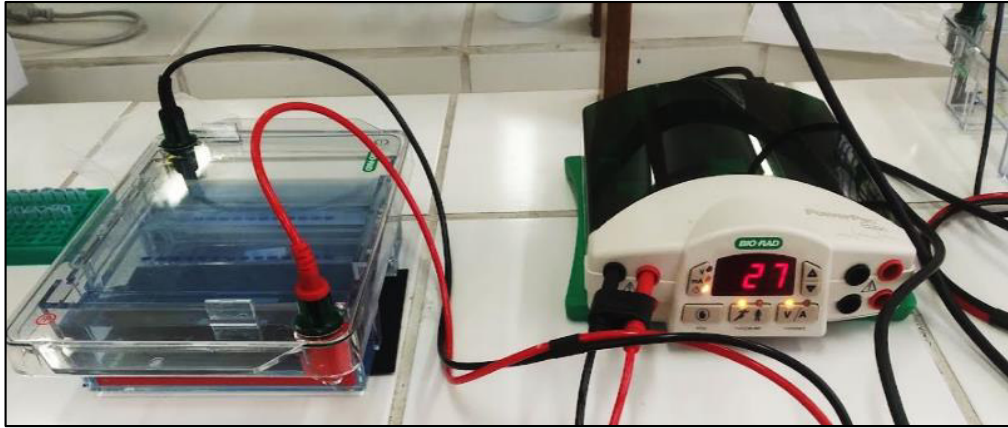
Donde F: cadena *forward* y R: cadena *reverse*

Cada reacción de PCR tuvo un volumen final de 15 µl que incluían 1.5 µl de *buffer* con MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µl de MgCl<sub>2</sub> (0.5 mM), 0.6 µl de cada *primer* (0.4 µM), 1.875 µl de dNTP (0.25 mM), 0.2 µl de *Taq* polimerasa (1 U/µl) abm® (Applied Biological Materials Inc.), 2 µl de *DNA* molde y 7.925 µl de agua estéril.

Las amplificaciones se realizaron utilizando el termociclador Bio Rad T100. El programa de amplificación térmica consistió en un paso inicial de predenaturación por 5 min a 92 °C, seguido de la etapa de denaturación de 35 ciclos de 92 °C por 45 segundos, una temperatura de *annealing* de 51 °C para Fish1 y Fish2 (Ward *et al.*, 2005) o 50° C para AnosCOI (Ramirez & Galetti, 2015) por 45 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C por 45 segundos, seguido a su vez por una extensión final de 72 °C por cinco minutos, y luego preservado a 4 °C hasta su retiro del termociclador.

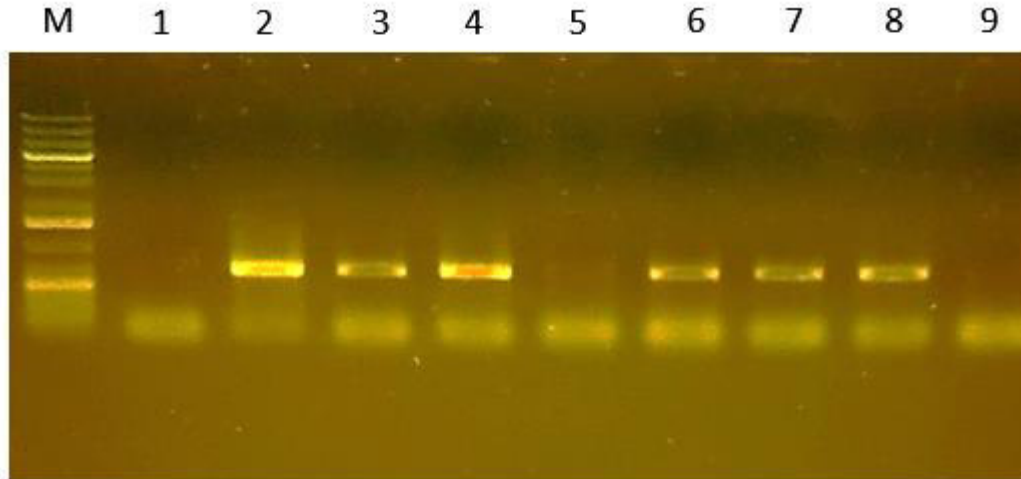
Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (que se preparó usando 0.50 g de agarosa 1% y 50 ml de *buffer* TAE 1X), donde fueron colocados los amplicones, el *ladder* GeneRuler™ de 1 kb, el control positivo y el control negativo, y se utilizaron dos tipos de intercalantes. El primer intercalante, Safe-Green™ (abm®), se utilizó agregando 2 µl de este producto junto con 3 µl del amplicón, y se agregó esta mezcla en cada pocillo del gel de agarosa 1%. El segundo intercalante, SYBER® Safe *DNA gel stain* (invitrogen), se utilizó agregando 3 µl de este producto a la mezcla de gel de agarosa 1% (este gel se mantuvo oculto de la luz antes y durante la corrida electroforética), una vez polimerizado se agregó 3 µl del amplicón junto con 1 µl de *loading buffer*, y se agregó esta mezcla en cada pocillo del gel de agarosa 1% polimerizado. El *DNA* en el gel de agarosa 1% estuvo sumergido en TAE 1X dentro de la cámara electroforética y fue corrido a 75 V por 30 minutos (Figura 15). Luego de este periodo, el gel fue colocado en un transiluminador de luz azul BlueView MBE-200<sup>a</sup>, y los amplicones positivos fueron visualizados en una banda entre 500 pb y 700 pb que corresponde al gen COI (655 pb).





**Figura 14.** Sistema de electroforesis horizontal. Se observa el gel de agarosa 1% cargado con los productos de PCR

En la Figura 16 se puede observar los resultados de una amplificación utilizando el par de *primers* Fish2 (Ward *et al.*, 2005) y como intercalante SYBER® Safe (Invitrogen). En donde la columna M representa el *ladder* con 15 bandas, las amplificaciones obtenidas se ubican entre las bandas de 500 pb y 700 pb correspondientes a la región COI. Las columnas 1 y 2 no lograron una amplificación; mientras que las columnas 2,3,4,6 y 7 muestran una amplificación positiva. Las columnas 8 y nueve muestran los controles positivo y negativo respectivamente.

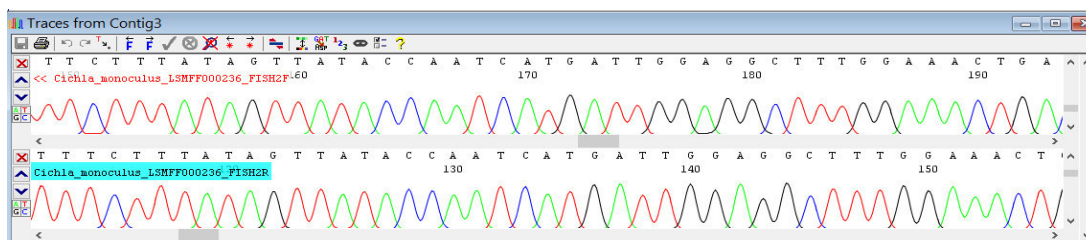


**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos amplificados con el primer Fish2, correspondientes a la región COI del DNA extraído a los especímenes de la laguna Yarinacocha. M: marcador de peso molecular de 1kb (Gene ruler™ DNA ladder); 1=LSMFF126, 2=LSMFF127, 3=LSMFFF129, 4=LSMFF141, 5=LSMFF143, 6=LSMFF160, 7=LSMFF162, 8=control positivo (LSMFF446) y 9=control negativo

Los amplicones positivos fueron purificados utilizando el método de *beads* o perlas magnéticas y posteriormente enviados a la empresa Macogen (Korea) donde se realizó el secuenciamiento de Sanger para ambas cadenas (*foward* y *reverse*).

### C. Análisis de datos

Para la edición de las secuencias y formación de *contigs* (secuencias consenso), fue utilizado el programa CodonCode Aligner versión 6.0.2. Primero se visualizaron la calidad de los electroferogramas de las secuencias de las cadenas *foward* y *reverse* (Figura 16), se cortaron los *primers* en ambas cadenas y las regiones de baja calidad fueron eliminadas obteniéndose secuencias consenso las cuales se guardaron en formato fasta. El alineamiento de las secuencias consenso se realizó utilizando el algoritmo *Muscle* (Edgar, 2004) bajo parámetros predeterminados y se utilizó el programa BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) para verificar visualmente los alineamientos.



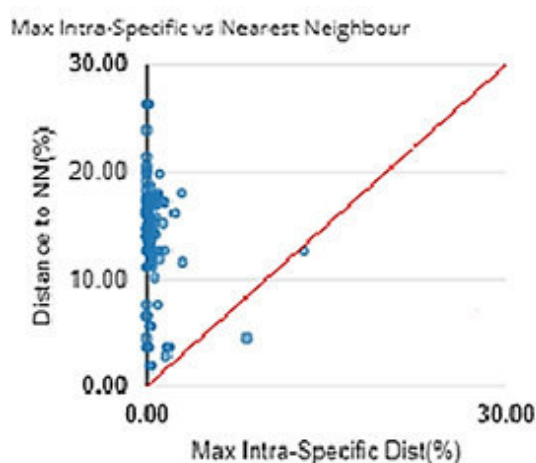
**Figura 16.** Observación de secuencias y electroferogramas *foward* y *reverse* en el programa CodonCode Aligner

Para confirmar la identificación taxonómica, las secuencias COI se compararon con las bases de datos de las plataformas BOLD systems v.4 (Ratnasingham & Hebert, 2007) utilizando la herramienta BOLD Identification Engine, y Genbank utilizando la herramienta BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se consideró un porcentaje mínimo de similitud de 98% (Ward, 2009; Pereira *et al.*, 2013, Costa-Silva *et al.*, 2018 y Pereira *et al.*, 2021) para confirmar el estatus taxonómico de especie. En los casos en que la identificación con secuencias COI arrojaron una especie diferente a la previa identificación morfológica, los especímenes fueron nuevamente revisados por posibles errores de identificación, y si el desacuerdo persistió se consideró la identificación morfológica. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la plataforma del BOLD systems (Ratnasingham & Hebert, 2007) bajo el nombre de proyecto *DNA Barcoding of Fish of Yarinacocha* (código YARIF).

Los valores de las distancias intraespecíficas e interespecíficas fueron calculados utilizando el modelo Kimura 2 parámetros (K2P) (Kimura, 1980) en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) y en la plataforma BOLDsystem utilizando la herramienta Distance summary (excluyendo las especies con una sola secuencia COI). Para observar gráficamente los agrupamientos de las

secuencias COI basado en estas distancias, se realizó el árbol Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), escogido por su histórico buen desempeño en el análisis de conjuntos de datos y así poder comparar los resultados obtenidos con otros estudios. Este se elaboró en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) utilizando el test de bootstrap 1000 replicaciones y el modelo de distancias de Kimura 2 parámetros (K2P) (Kimura, 1980), el cual fue elegido por presentar un mejor desempeño cuando las distancias genéticas son bajas (Herbert *et al.*, 2003a).

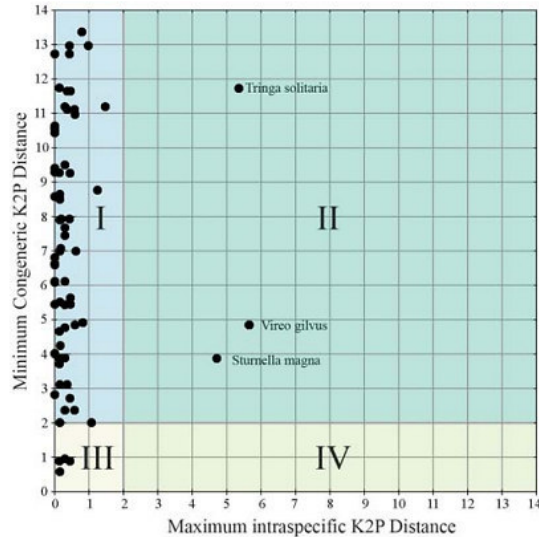
Se realizó una gráfica de dispersión comparando la máxima distancia intraespecífica y la mínima distancia interespecífica, donde se trazó una línea  $y=x$  que representa la igualdad de los valores de las distancias y los puntos por encima de esta línea indican que la mínima distancia interespecífica es mayor que la máxima distancia intraespecífica (Figura 17).



**Figura 17.** Ejemplo de diagrama de dispersión de máxima distancia intraespecífica y distancia al vecino más próximo (NN) expresados en porcentaje (extraído y modificado de Centre for Biodiversity Genomics, University of Guelph, 2021)

#### **D. Delimitación de especies**

Se utilizaron dos métodos para la delimitación de especies. El primero basado en distancias genéticas donde se consideró que la divergencia de las distancias intraespecíficas no debe ser mayor al 2% que fue propuesta por Herbert *et al.* (2004), utilizado por Ward (2009) para peces marinos y aves, y posteriormente por Pereira *et al.* (2013) para peces neotropicales de agua dulce. Se realizó una gráfica de distribución de frecuencias de distancias intraespecíficas e interespecíficas (Meyer y Paulay, 2005) y una gráfica de cuadrantes (Figura 18), en el programa Microsoft Excel



**Figura 18.** Distancias COI intraespecíficas en comparación con las distancias interespecíficas (K2P) para especies individuales (extraído y modificado de Herbert *et al.*, 2004)

En la Figura 18, se muestra el 2% como punto de corte entre los valores habituales para la variación intraespecífica e interespecífica. Esto divide el gráfico en cuatro cuadrantes que representan las siguientes categorías: (I) la distancia intraespecífica  $<2\%$  y la interespecífica  $>2\%$ , concordante con la clasificación taxonómica; (II) Las distancias intraespecífica e interespecífica  $>2\%$ , probable especie críptica (candidata a división taxonómica); (III) las distancias intraespecífica e interespecífica  $<2\%$ , reciente divergencia o sinonimia; y (IV) la distancia intraespecífica  $>2\%$  y la distancia interespecífica  $>2\%$ , probable error de identificación de especie (Herbert *et al.*, 2004).

La segunda metodología fue el análisis de delimitación de especies para un solo gen (el gen COI) basado en MOTUs y se comparó con la metodología de identificación de taxonomía clásica (especies nominales). Este modelo integrador es una poderosa herramienta que no depende de un valor umbral de corte y no necesita de información previa de las especies (Ramirez *et al.*, 2021), ha sido utilizada para estudios de diversidad de especies y para mostrar especies ocultas, como en el caso de los estudios realizados por Ramirez *et al.* (2018) para las especies del género *Megaleporinus*, Cañedo-Apolaya *et al.* (2021) para especies del género *Squatina* “tiburones angel” y Valenzuela (2022) para la delimitación de especies en la familia Anostomidae.

Se utilizaron tres modelos de delimitación: GMYC (*General Mixed Yule Coalescent*), PTP (Poisson tree Process) y bPTP (*Bayesian implementation of the PTP model*). El modelo GMYC (Yule, 1925) clasifica las ramas en un árbol ultramétrico como intra o interespecífico al maximizar la probabilidad de un modelo de evolución. Los eventos de ramificación entre especies se modelan asumiendo una tasa de especiación constante y sin extinción y los eventos de ramificación dentro

de las especies se modelan utilizando un proceso de coalescencia (Talavara *et al.*, 2013). El modelo PTP y el modelo bPTP (Zhang *et al.*, 2013) usan directamente el número de sustituciones en cada rama.

Para comparar estos modelos se construyó un árbol ultramétrico que se generó en el programa BEAUti v2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019) con un modelo de reloj normal relajado (*Relaxed Clock Log Normal*) y un Tree prior de nacimiento y muerte (*Birth Death model*), el modelo de sustitución utilizado fue GTR +I +G sugerido por el Criterio de Información Bayesiano (BIC) del programa JModeltest 2 (Darriba *et al.*, 2012). Además, el análisis se realizó con 300 millones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) almacenada cada 50 000 iteraciones, que fue ejecutado utilizando BEAST v2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019) implementado en línea en Cyber Infrastructure for phylogenetic Research (CIPRES v3.3; <https://www.phylo.org>, consultado el 17 de marzo de 2021) (Miller *et al.*, 2010). Luego se utilizó el programa TreeAnnotator v.2.6.2 para obtener un único árbol ultramétrico con un *burn-in* de 10%. Para visualizar y analizar la convergencia y tamaño de muestreo adecuado con un tamaño de muestra efectivomayor a 200 (ESS>200), se utilizó el programa Tracer v1.7 (Rambaut *et al.*, 2018). El árbol final fue observado en el programa FigTree v.1.4.4 y exportado como archivo newick (nwk). Finalmente, se utilizó el *pipeline* SPdel (<https://github.com/jolobito/SPdel>, consultado en marzo de 2022) que realizó la comparación de las metodologías escogidas (taxonomía tradicional, GMYC, PTP y bPTP) y generó la delimitación consenso de los tres modelos moleculares (MOTUs consenso) así como los archivos de imágenes de estos resultados que fueron editadas posteriormente. El grado de divergencia genética para los métodos de delimitación de especies utilizados también fueron obtenidos en el SPdel. calculando los valores de distancias genéticas K2P intra-MOTU e inter-MOTU.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Composición taxonómica de las especies

Fueron identificados 84 especies mediante los caracteres morfológicos (especies nominales), comprendidos en siete órdenes (Characiformes, Siluriformes, Cichliformes, Gymnotiformes, Clupeiformes, Carangiformes y Perciformes), 23 familias, 65 géneros (Tabla 3 y Anexo 5). El orden Characiformes presentó la mayor riqueza con 11 familias, seguido del orden Siluriformes con seis familias y el orden Gymnotiformes con dos familias; los demás órdenes (Cichliformes, Clupeiformes, Carangiformes y Perciformes) en conjunto conforman cuatro familias (Tabla 4) (Fotografías de algunas de estas especies están registradas en el Anexo 11).

Algunos especímenes no pudieron ser identificadas a nivel específico tales como *Astyanax* sp. y *Rineloricaria* sp. Las especies *Pimelodella* sp. 1 y *Pimelodella* sp. 2 fueron separadas en morfotipos considerando principalmente el carácter taxonómico de la longitud de barbilla maxilar

(que llega hasta el pedúnculo caudal en *Pimelodella* sp. 1, y que alcanza la base de la aleta anal en *Pimelodella* sp. 2) y el grosor de la línea mediolateral del cuerpo (delgada en *Pimelodella* sp. 1 y ancha en *Pimelodella* sp. 2) (Figura A2).

**Tabla 3.** Lista de especies de peces y número de especímenes colectados por especie de la laguna Yarinacocha

TAXON	N° de especímenes recolectados
<b>CLUPEIFORMES</b>	
<b>Engraulidae</b>	
<i>Anchoviella guianensis</i> (Eigenmann 1912)	1
<i>Jurengraulis juruensis</i> (Boulenger 1898)	24
<i>Lycengraulis batesii</i> (Günther 1868)	2
<b>Pristigasteridae</b>	
<i>Pristigaster cayana</i> Cuvier 1829	1
<b>CHARACIFORMES</b>	
<b>Anostomidae</b>	
<i>Abramites hypselonotus</i> (Günther 1868)	23
<i>Leporinus</i> cf. <i>parae</i>	40
<i>Megaleporinus trifasciatus</i> (Steindachner 1876)	1
<i>Schizodon fasciatus</i> Spix & Agassiz 1829	60
<b>Characidae</b>	
<i>Aphyocharax pusillus</i> Günther 1868	35
<i>Astyanax</i> sp.	3
<i>Brachychalcinus copei</i> (Steindachner 1882)	11
<i>Ctenobrycon hauxellianus</i> (Cope 1870)	356
<i>Cynopotamus amazonum</i> (Günther 1868)	1
<i>Galeocharax gulo</i> (Cope 1870)	1
<i>Moenkhausia barbouri</i> Eigenmann 1908	8
<i>Moenkhausia</i> aff. <i>dichrourea</i>	42
<i>Moenkhausia intermedia</i> Eigenmann 1908	108
<i>Odontostilbe fugitiva</i> Cope 1870	5
<i>Prionobrama filigera</i> (Cope 1870)	240
<i>Protocheirdodon pi</i> (Vari 1978)	3
<i>Roeboides affinis</i> (Günther 1868)	11
<i>Roeboides myersi</i> Gill 1870	2
<i>Tetragonopterus argenteus</i> Cuvier 1816	71
<b>Curimatidae</b>	
<i>Curimatella meyeri</i> (Steindachner 1882)	5
<i>Potamorhina altamazonica</i> (Cope 1878)	2
<i>Psectrogaster amazonica</i> Eigenmann & Eigenmann 1889	10
<i>Psectrogaster rutiloides</i> (Kner 1858)	2
<i>Steindachnerina dobula</i> (Günther 1868)	11
<i>Steindachnerina leucisca</i> (Günther 1868)	5

<b>Cynodontidae</b>	
<i>Cynodon gibbus</i> (Spix & Agassiz 1829)	1
<i>Hydrolycus scomberoides</i> (Cuvier 1819)	2
<b>Erythrinidae</b>	
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Spix & Agassiz 1829)	5
<i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch 1794)	8
<b>Gasteropelecidae</b>	
<i>Thoracocharax stellatus</i> (Kner 1858)	18
<b>Hemiodontidae</b>	
<i>Hemiodus</i> aff. <i>microlepis</i> .	4
<b>Prochilodontidae</b>	
<i>Prochilodus nigricans</i> Spix & Agassiz 1829	82
<b>Serrasalminidae</b>	
<i>Mylossoma albiscopum</i> (Cope 1872)	6
<i>Piaractus brachipomus</i> (Cuvier 1818)	1
<i>Pygocentrus nattereri</i> Kner 1858	4
<b>Triporthidae</b>	
<i>Triporthus albus</i> Cope 1872	142
<i>Triporthus angulatus</i> (Spix & Agassiz 1829)	26
<i>Triporthus curtus</i> (Garman 1890)	49
<i>Triporthus rotundatus</i> (Jardine 1841)	6
<b>GYMNOTIFORMES</b>	
<b>Gymnotidae</b>	
<i>Electrophorus varii</i> de Santana, Wosiacki, Crampton, Sabaj, Dillman, Mendes-Júnior & Castro 2019	4
<b>Sternopygidae</b>	
<i>Eigenmannia limbata</i> (Schreiner & Miranda Ribeiro 1903)	2
<i>Eigenmannia virescens</i> (Valenciennes 1836)	2
<i>Sternopygus macrurus</i> (Bloch & Schneider 1801)	1
<b>SILURIFORMES</b>	
<b>Auchenipteridae</b>	
<i>Epapterus dispilurus</i> Cope 1878	2
<b>Callichthyidae</b>	
<i>Corydoras multiradiatus</i> (Orcés V. 1960)	1
<i>Corydoras splendens</i> (Castelnau 1855)	1
<i>Hoplosternum littorale</i> (Hancock 1828)	8
<b>Doradidae</b>	
<i>Ossancora asterophysa</i> Birindelli & Sabaj Pérez 2011	3
<i>Ossancora punctata</i> (Kner 1855)	4
<i>Oxydoras niger</i> (Valenciennes 1821)	1
<i>Platydoras armatulus</i> (Valenciennes 1840)	1
<b>Heptapteridae</b>	
<i>Pimelodella</i> sp. 1	31
<i>Pimelodella</i> sp. 2	3
<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard 1824)	2
<b>Loricariidae</b>	

<i>Ancistrus alga</i> (Cope 1872)	6
<i>Farlowella amazonum</i> (Günther 1864)	4
<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i> (Kner 1853)	1
<i>Hypoptopoma gulare</i> Cope 1878	10
<i>Hypoptopoma psilogaster</i> Fowler 1915	7
<i>Hypoptopoma thoracatum</i> Günther 1868	1
<i>Hypostomus ericius</i> Armbruster 2003	12
<i>Loricaria simillima</i> Regan 1904	9
<i>Pterygoplichthys pardalis</i> (Castelnau 1855)	13
<i>Rineloricaria</i> sp.	8
<i>Rineloricaria wolfei</i> Fowler 1940	2
<i>Sturisoma nigrirostrum</i> Fowler 1940	7
<b>Pimelodidae</b>	
<i>Hypophthalmus oremaculatus</i> Nani & Fuster de Plaza 1947	1
<i>Pimelodus blochii</i> Valenciennes 1840	29
<i>Sorubim lima</i> (Bloch & Schneider 1801)	1
<b>CARANGIFORMES</b>	
<b>Achiridae</b>	
<i>Hypoclinemus mentalis</i> (Günther 1862)	2
<b>CICHLIFORMES</b>	
<b>Cichlidae</b>	
<i>Cichla monoculus</i> Spix & Agassiz 1831	8
<i>Cichlasoma amazonarum</i> Kullander 1983	3
<i>Crenicichla cyanonotus</i> Cope 1870	1
<i>Crenicichla proteus</i> Cope 1872	9
<i>Crenicichla sedentaria</i> Kullander 1986	6
<i>Heros efasciatus</i> Heckel 1840	9
<i>Mesonauta mirificus</i> Kullander & Silfvergrip 1991	8
<i>Pterophyllum scalare</i> (Schultze 1823)	9
<i>Satanoperca jurupari</i> (Heckel 1840)	7
<b>PERCIFORMES</b>	
<b>Sciaenidae</b>	
<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel 1840)	1
<b>TOTAL</b>	<b>1678</b>

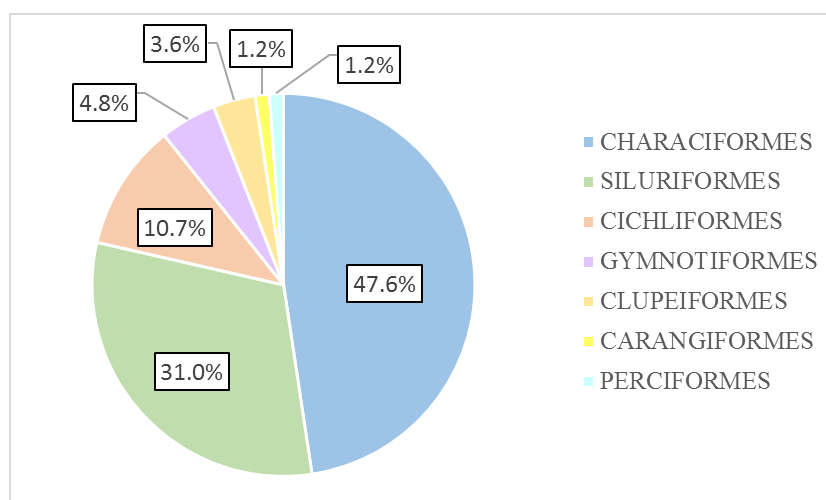


**Tabla 4.** Riqueza y abundancia de peces por órdenes de la laguna Yarinacochoa

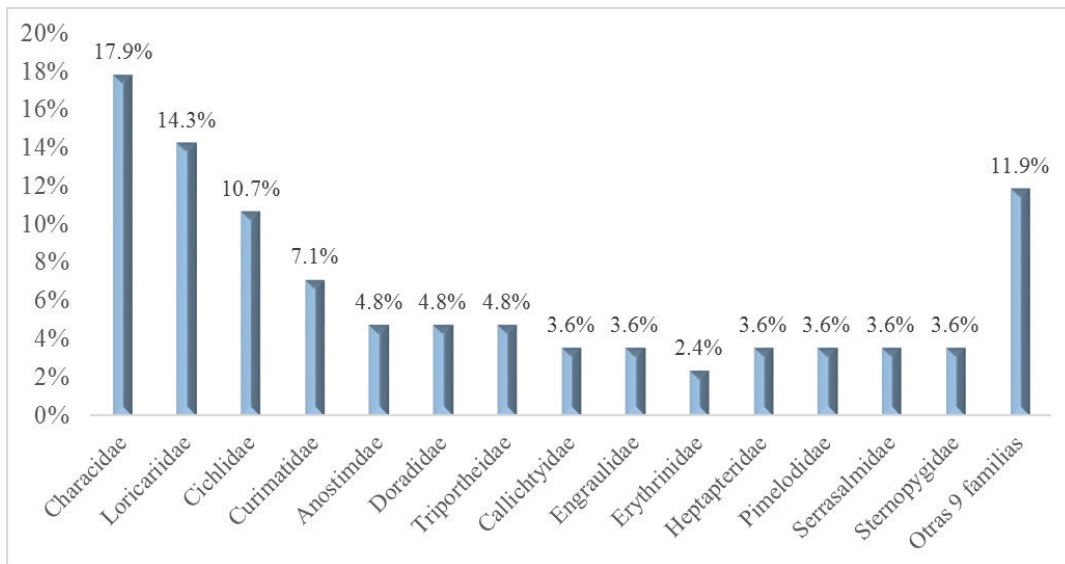
ÓRDENES	N° de familias	N° de géneros	N° de especies	N° de individuos
CHARACIFORMES	11	31	40	1411
SILURIFORMES	6	21	26	168
CICHLIFORMES	1	5	9	60
CLUPEIFORMES	1	3	3	27
GYMNOTIFORMES	2	3	4	9
CARANGIFORMES	1	1	1	2
PERCIFORMES	1	1	1	1
<b>Total general</b>	<b>23</b>	<b>65</b>	<b>84</b>	<b>1678</b>

El orden Characiformes presentó la mayor riqueza con 47.6%, seguido por el orden Siluriformes con 31% y Cichliformes con 10.7%. El resto de órdenes (Gymnotiformes, Clupeiformes, Carangiformes y Perciformes) representan el 10.7% del total de especies colectadas (Figura 19).

En cuanto a la riqueza por familias, las familias Characidae y Loricariidae representan juntos la mayor riqueza de especies (32.2%) con 17.9% (15 especies) y 14.3% (12 especies) respectivamente; seguidos de la familia Cichlidae con 10.7% (9 especies) y Curimatidae 7.1% (6 especies). El resto de familias representan un porcentaje menor a 5%; es decir, menos de 4 especies por familia (Figura 20).

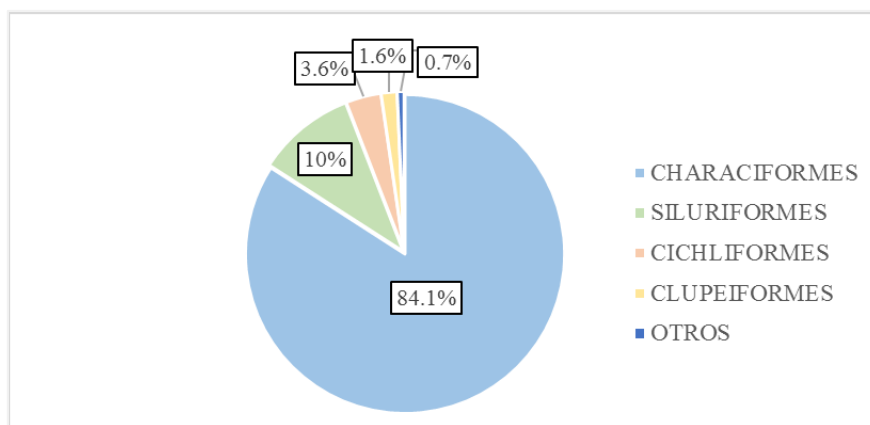


**Figura 19.** Riqueza relativa (%) por órdenes de especies de peces recolectados en la laguna Yarinacochoa



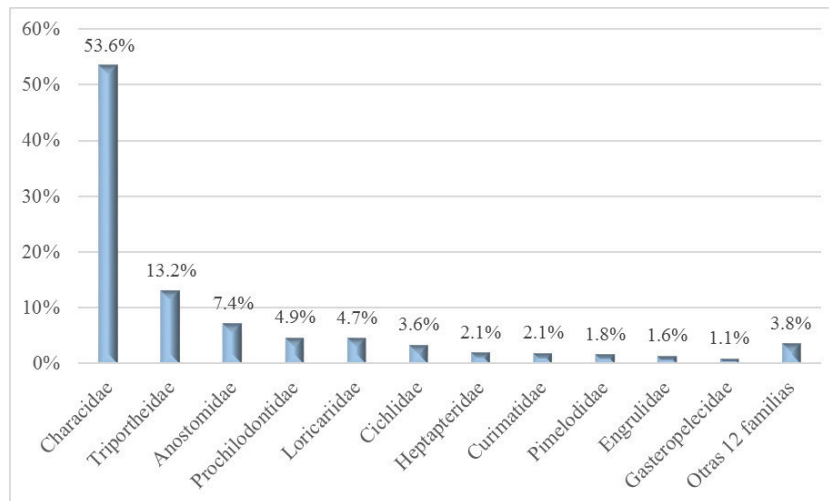
**Figura 20.** Gráfico de barras de la riqueza relativa (%) por familias de especies de peces recolectados en la laguna Yarinacocha

La mayor abundancia de individuos colectados fue registrada en el orden Characiformes con 1411 individuos, que representan el 84.1% de las especies; seguidos del orden Siluriformes (168 individuos) con 10%, Cichliformes (60 individuos) con 3.6% y Clupeiformes (27 individuos) con 1.6%. El resto de órdenes (Gymnotiformes, Carangiformes y Perciformes) representan sólo el 0.7% del total de individuos colectados (Figura 21).



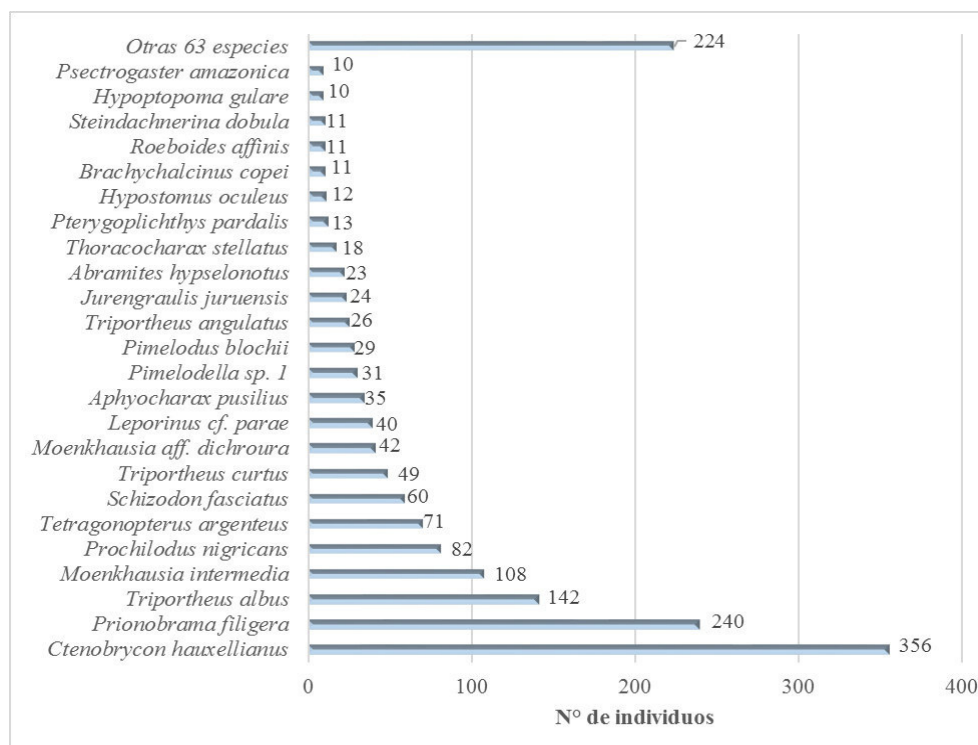
**Figura 21.** Abundancia relativa (%) por órdenes de peces recolectados en la laguna Yarinacocha

En cuanto a nivel de familia, el mayor número de individuos fue registrada en la familia Characidae (899 individuos) con 53.6%, seguido de la familia Triporthidae (223 individuos) con 13.2%, Anostomidae (124 individuos) con 7.4%, Prochilodontidae (82 individuos) con 4.9%, Loricariidae (79 individuos) con 4.7% y Cichlidae (60 individuos) con 3.6%. El resto de familias conforman el 12.6% de la abundancia con menos de 30 individuos (Figura 22).



**Figura 22.** Gráfico de barras de la abundancia relativa (%) por familia de peces recolectados en la laguna Yarinacocha

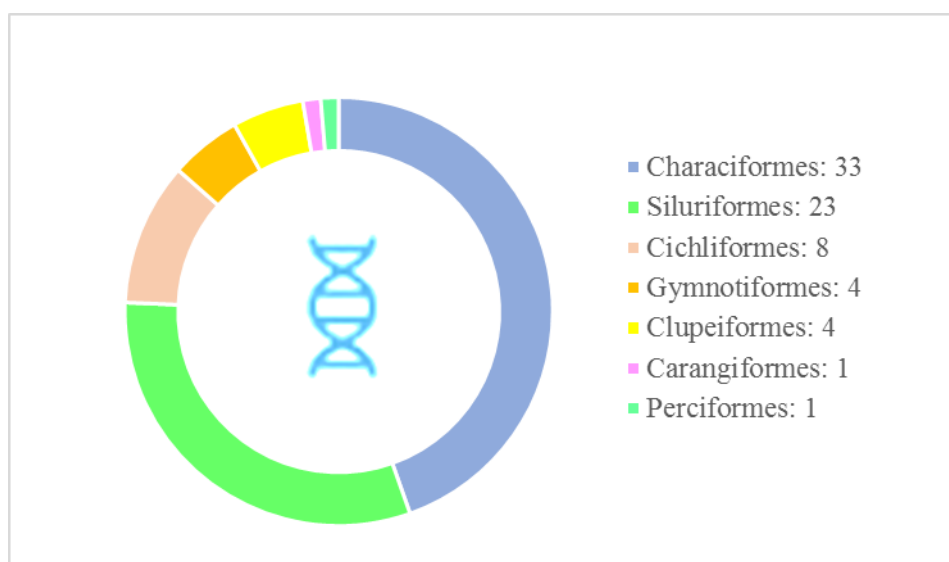
La especie colectada con el mayor número de individuos fue *Ctenobrycon hauxwellianus* con 356 individuos, seguido de *Prionobrama filigera* con 240 individuos, *Triporthes albus* con 142 individuos, *Moenkhausia intermedia* con 108 individuos, *Prochilodus nigricans* con 82 individuos y *Tetragonopterus argenteus* con 71 individuos; todos pertenecientes al orden Characiformes. En cuanto al orden Siluriformes, la especie más abundante fue *Pimelodella* sp. 1 y *Pimelodus blochii* con 31 y 29 individuos respectivamente (Figura 23).



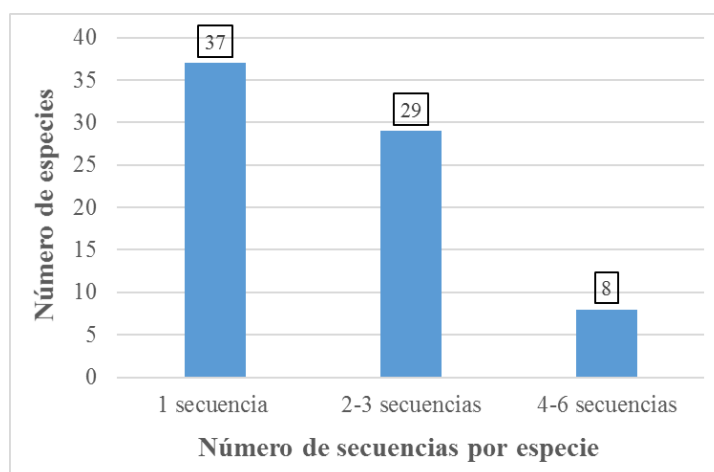
**Figura 23.** Gráfico de barras de las especies más abundantes recolectadas en la laguna Yarinacocha

## 5.2. Caracterización molecular de la Ictiofauna en la laguna Yarinacocha utilizando el marcador COI

En total, se obtuvieron 141 secuencias con ambas cadenas *forward* y *reverse* para el gen COI, (excepto para *Galeocharax gulo* representada por la secuencia *reverse*) correspondientes a 74 especies nominales agrupadas en 63 géneros, 21 familias y 7 órdenes, esto representa 88% de las especies reportadas mediante la morfología para la laguna Yarinacocha en este estudio (Figura 24). Casi todas las secuencias amplificadas tuvieron una longitud de 655 pb, excepto la secuencia de la especie *Hydrolycus scomberoides* con 617 pb y *Galeocharax gulo* 621pb. En este estudio las especies nominales están representadas desde una sola secuencia hasta seis secuencias COI, en donde 37 especies presentan una secuencia, 29 están representadas por dos a tres secuencias, y ocho están representadas por cuatro a seis secuencias (Figura 24).



**Figura 24.** Riqueza de especies de peces por órdenes en la laguna Yarinacocha obtenidas mediante secuenciación



**Figura 25.** Representación gráfica del número de secuencias COI obtenidas por especie

Se analizaron 104 secuencias que corresponden a 37 especies nominales representadas con más de una secuencia COI. Los valores de distancias genéticas intraespecíficas oscilaron entre 0% y 6.47% con un valor promedio de 0.46%; mientras que los valores de las distancias interespecíficas oscilaron entre 7% y 37.79% con un valor promedio de 23.53%, que es 50 veces mayor del valor promedio de la distancia intraespecífica (Tabla 5). Aproximadamente 95% de los valores de distancia intraespecífica son menores a 1% y el 5% restante son mayores a 2%, representado por la especie *H. malabaricus*.

**Tabla 5.** Valores mínimos, máximos y promedio de las distancias (K2P) intraespecíficas e interespecíficas (excluyendo las especies representadas por una sola secuencia COI)

	Mín. (%)	Máx. (%)	Promedio (%)	D.E.
Distancia intraespecífica	0.00	6.47*	0.46	0.01
Distancia interespecífica	7.00	37.79	23.53	0.08

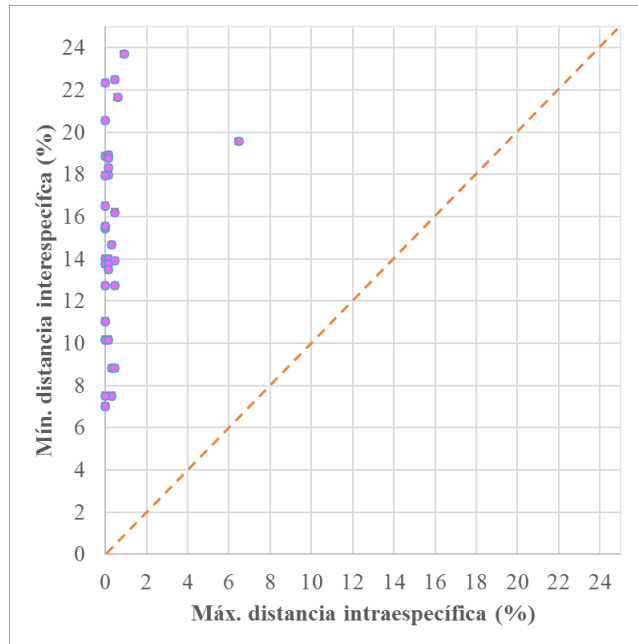
\* Valor elevado de diversidad intraespecífica mayor a 2%

En la gráfica de dispersión de la máxima distancia intraespecífica versus la mínima distancia interespecífica, se observa que todos los puntos se colocan por encima de la línea de igualdad de distancias, lo que indica que la mínima distancia interespecífica es mayor a la máxima distancia intraespecífica para cada especie nominal (Figura 26 y Anexo 9). La gráfica de distribución de frecuencias de las distancias intraespecíficas e interespecíficas muestra el *barcoding gap* ya que no se observa un entrecruzamiento entre los valores de ambas distancias, sin embargo, esta separación es corta debido al alto valor de distancia intraespecífica de *H. malabaricus* (Figura 27).

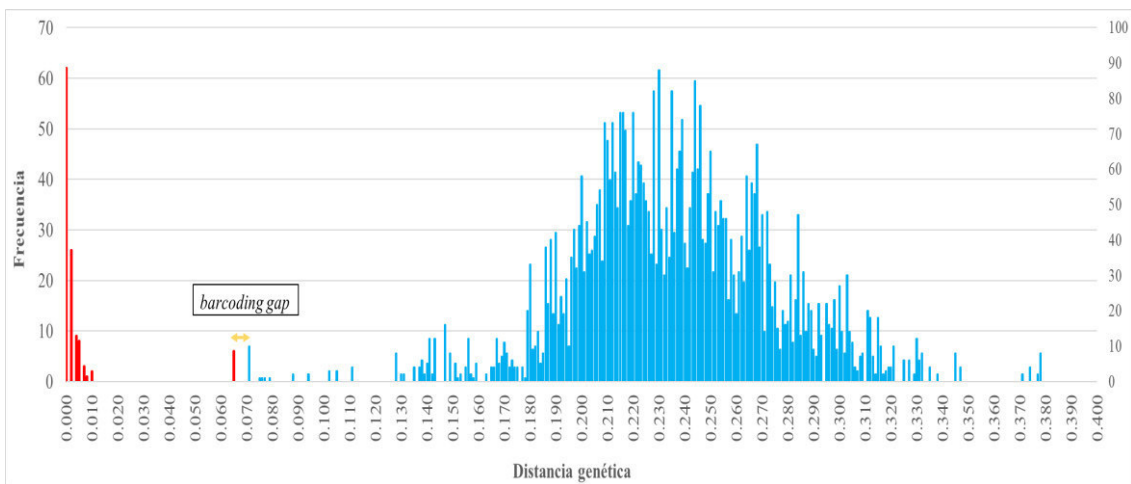
El árbol NJ (Figura 28 y Anexo 9) mostró que los agrupamientos para las secuencias COI de especímenes determinados como como congéneres tienden a agruparse con un alto valor de soporte de bootstrap. Adicionalmente, se puede observar en el árbol NJ la separación en dos subclados para la especie *H. malabaricus* que posee un valor de distancia intraespecífica mayor al 2% (Figura 29 y Anexo 8).

Se realizó la reexaminación de los vouchers de *H. malabaricus* y la identificación fue confirmada en base a los siguientes caracteres taxonómicos: márgenes mediales de los dentarios convergentes en forma de “V” o “Y” (Figura 30), cuatro poros a lo largo del sistema laterosensorial del dentario, 15-16 escamas predorsales, 37 a 39 escamas en la línea lateral, ii radios no ramificados en la aleta anal y ii,14-15 radios en la aleta caudal (Oyakawa y Mattox, 2009; Rosso *et al.*, 2018 y Guimarães *et al.*, 2021). El análisis de distancia entre los especímenes de *H. malabaricus* mostró que la distancia intraespecífica promedio fue de 3.91% (con una mínima distancia intraespecífica de 0% y la máxima distancia intraespecífica de 6.47%); la divergencia genética dentro de los subclados

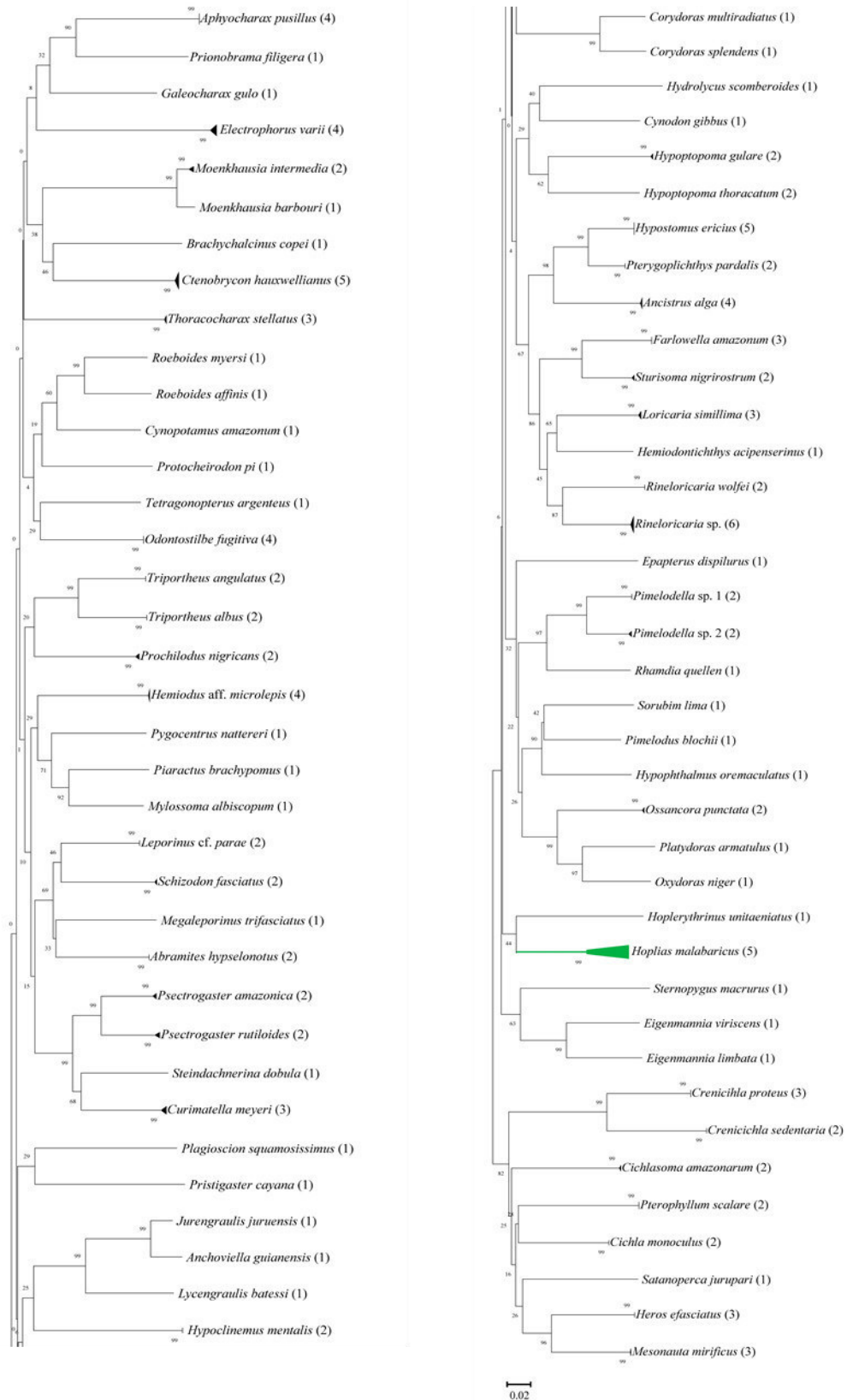
varió de 0% (subclado I) a 0.1% (subclado II); y la divergencia genética entre subclados fue 6.47% (Tabla 6).



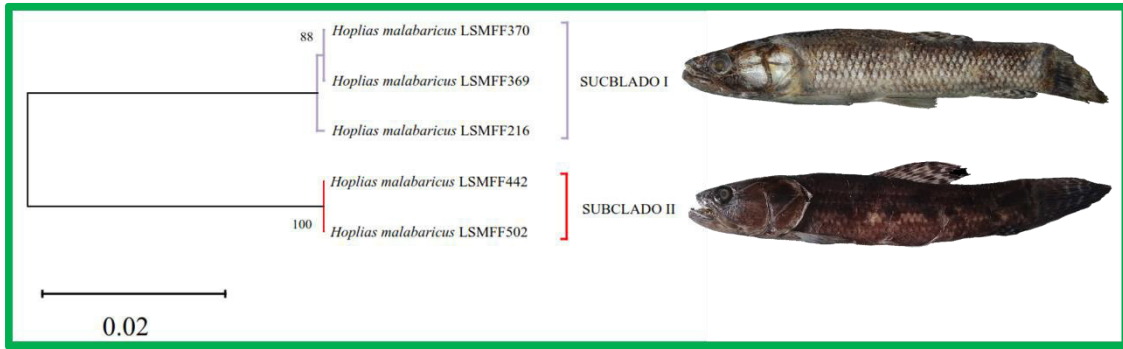
**Figura 26.** Gráfica de dispersión de la máxima distancia intraespecífica vs. la mínima distancia interespecífica



**Figura 27.** Gráfico de distribución de distancias intraespecíficas (rojo) e interespecíficas (azul), la línea naranja representa el *barcoding gap*



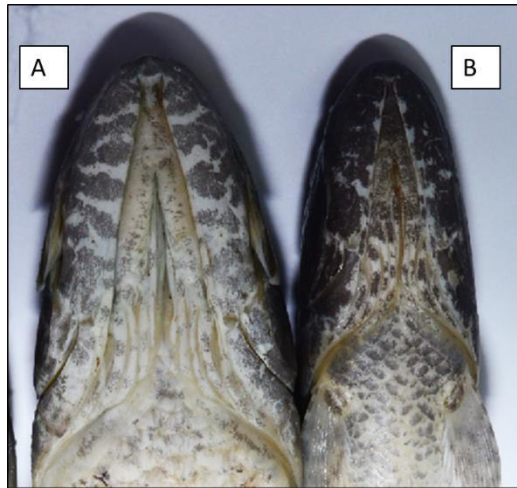
**Figura 28.** Árbol NJ compacto de distancias K2P mostrando las 74 especies de peces de la laguna Yarinacocha secuenciadas en este estudio. En paréntesis se muestra el número de secuencias por especie y en verde *H. malabaricus* con distancia intraespecífica mayor a 2%



**Figura 29.** Árbol NJ de las secuencias COI de la especie *H. malabaricus* obtenidas en este estudio.

**Tabla 6.** Distancias genéticas intraespecíficas, intrasubclado e intersubclado de *H. malabaricus*

	Divergencia intraespecífica (%)			N° de subclados	Divergencia intrasubclado (%)	Divergencia intersubclado (%)
	Mín.	Media	Máx			
<i>H. malabaricus</i>	0	3.91	6.47	2	I: 0.10 II: 0.00	6.47



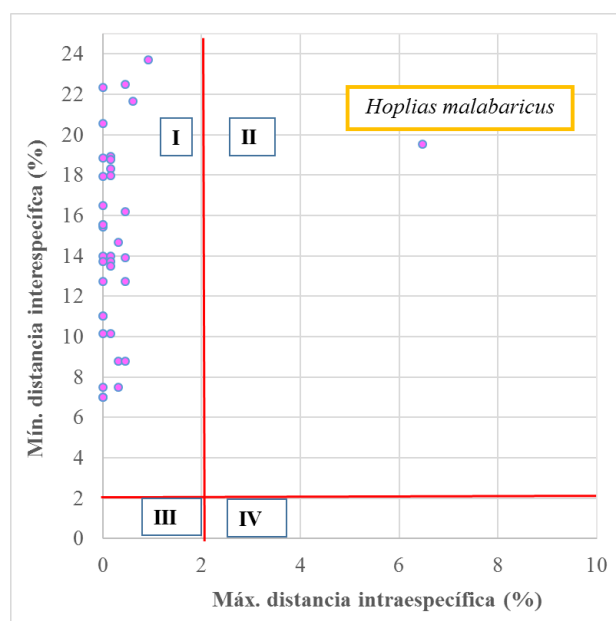
**Figura 30.** Vista ventral de *H. malabaricus* donde se observa la convergencia de los márgenes mediales de los dentarios en forma de “V”. En A. ejemplar de *H. malabaricus* subclado I y B. ejemplar de *H. malabaricus* subclado II

### 5.3. Delimitación de especies

Al realizar la gráfica de cuadrantes (Herbert *et al.*, 2004) se observa que la mayoría de los puntos que representan a 73 especies nominales se ubicaron dentro del primer cuadrante donde la mínima distancia interespecífica es mayor al 2 % y la máxima distancia intraespecífica es menor al 2 %; es decir, estas especies concuerdan con la clasificación taxonómica. La especie nominal *H.*



*malabaricus* se ubicó dentro del segundo cuadrante donde la mínima distancia interespecífica y la máxima distancia intraespecífica son mayor a 2 %; es decir, que esta especie es una posible especie críptica y candidata a una división taxonómica (Figura 31).

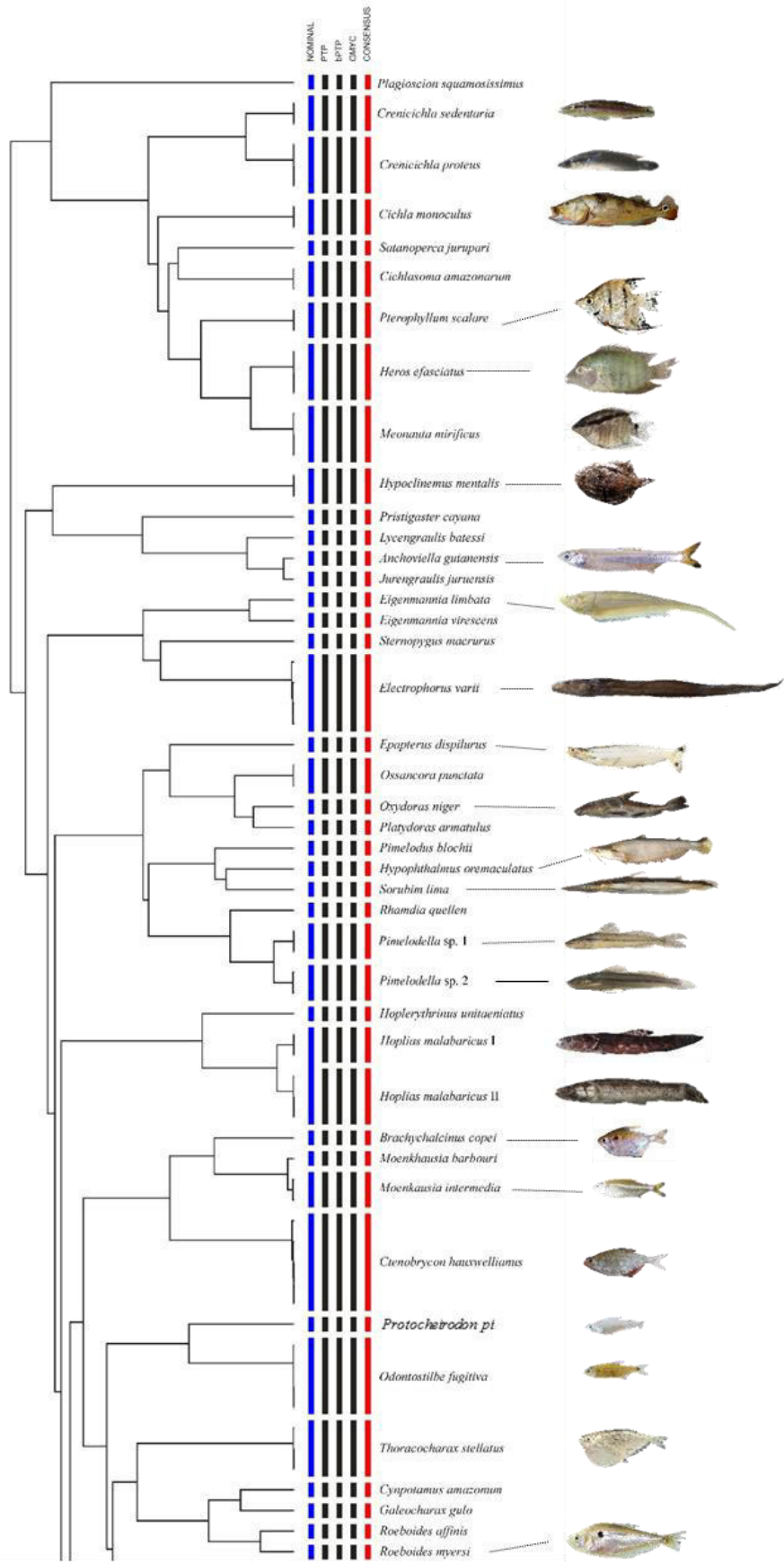


**Figura 31.** Gráfica de cuadrantes de las 74 especies nominales con un valor de corte de 2%

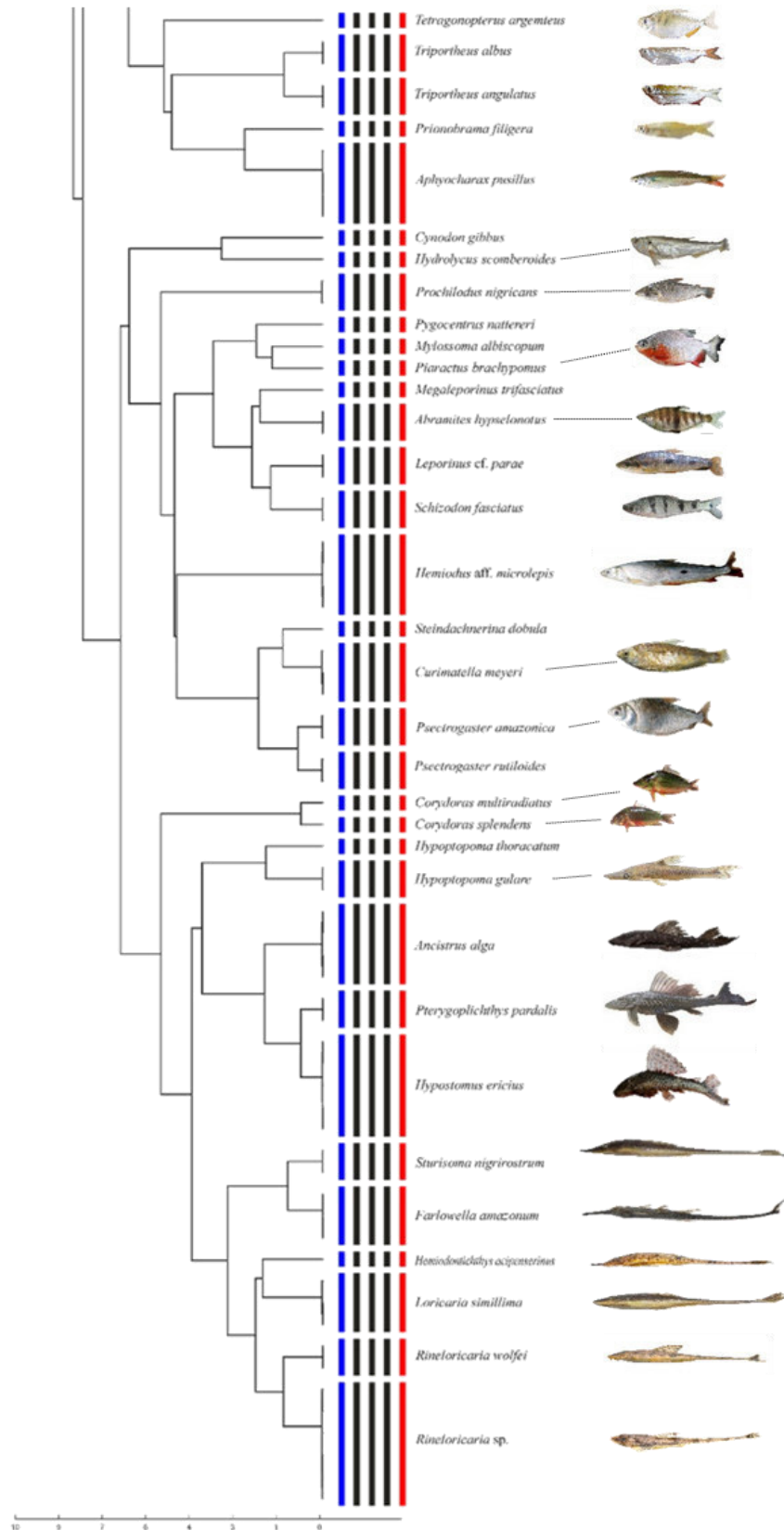
En cuanto al análisis de delimitación de especies basado en MOTUs, se comparó las 141 secuencias correspondientes a las 74 especies nominales. Los análisis de los tres modelos de delimitación de GMYC, PTP y bPTP y el análisis consenso delimitaron 75 MOTUs (Figura 32), donde 73 MOTUs concuerdan con el análisis taxonómico (especies nominales) y 2 MOTUs discordantes con la especie nominal *H. malabaricus* (Anexo 7). En comparación a las distancias obtenidas para especies nominales, los modelos GMYC, PTP y bPTP y el análisis consenso mostraron una distancia promedio intra-MOTU de 0.13% con un valor mínimo de distancia intra-MOTU de 0% y un valor máximo de distancia intra-MOTU igual a 0.92% (representado por *Electrophorus vari*) El promedio de las distancias inter-MOTU fue de 23.55%, la mínima distancia inter-MOTU fue de 2.65% (entre las MOTUs de *Moenkhausia intermedia* *Moenkhausia barbouri*) y una máxima distancia inter-MOTU de 37.79% (Tabla 7).

**Tabla 7.** Distancias inter e intra MOTUs

	Mínima (%)	Máxima (%)	Promedio (%)
Intra-MOTU	0.00	0.92	0.13
Inter-MOTU	2.65	37.79	23.55

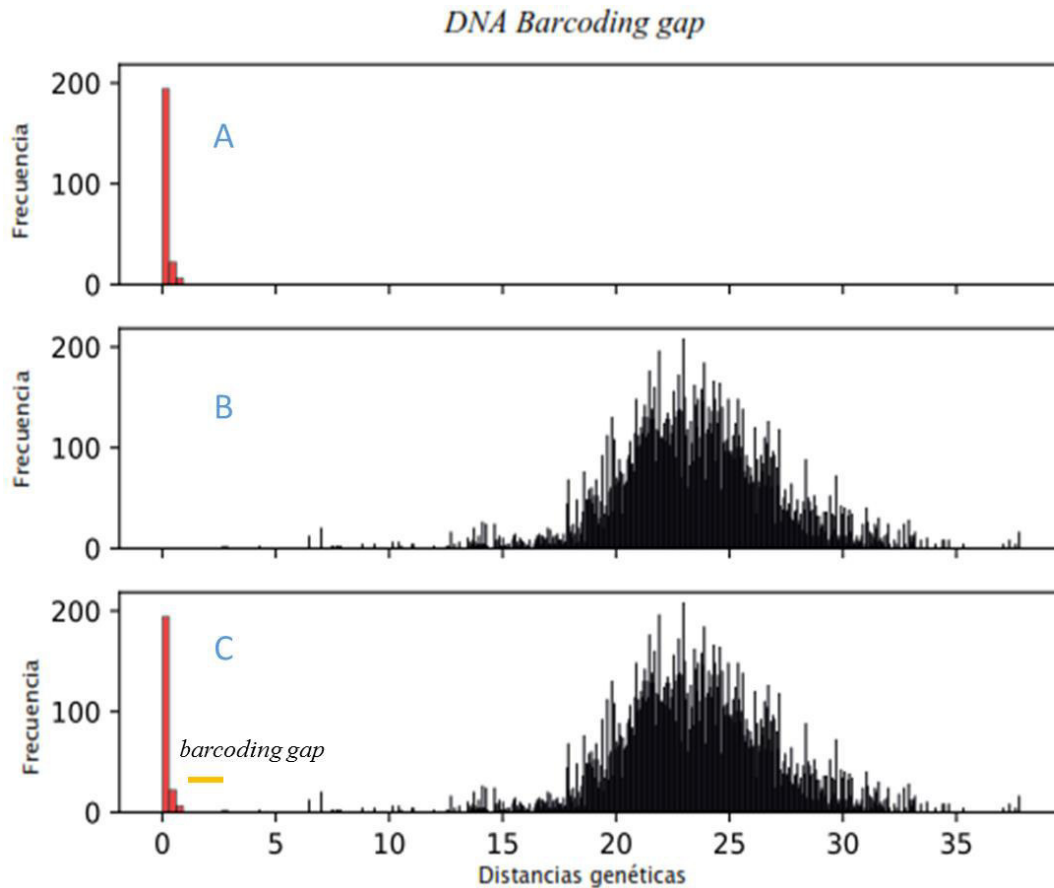


Continuación



**Figura 32.** Árbol bayesiano que muestra 75 MOTUs obtenidas por el análisis de delimitación de especies (GMYC, PTP, bPTP y consenso) para las secuencias COI de peces de la laguna Yarinacocha. La escala representa las sustituciones nucleotídicas por sitio

La gráfica de distribución de frecuencias de las distancias intra e inter-MOTU nos muestran una brecha entre ambas distancias (*barcoding gap*) separadas por el máximo valor intra-MOTU de 0.92% y el mínimo valor inter-MOTU 2.65% (Figura 33), y a comparación de la brecha observada considerando especies nominales (Figura 27) esta separación es mayor.



**Figura 33.** Análisis del *barcoding gap* usando la distribución de distancias genéticas para las 75 MOTUs obtenidas usando los modelos GMYC, PTP y bPTP. A. Distancias intra-MOTU (rojo), B. Distancias inter-MOTU (negro) y C. *Barcoding gap* entre ambas distancias (línea naranja).

## 6. DISCUSIÓN

Este trabajo proporcionó una lista de especies de peces para la laguna Yarinacocha, así como una biblioteca de referencia de secuencias COI de sus especies, y una evaluación de la coherencia de la identificación taxonómica utilizando la técnica de *DNA barcoding* y delimitación de especies.

Los órdenes Characiformes y Siluriformes conformaron la mayoría de las especies colectadas, representando el 78.6% del total de especies, observándose la predominancia del Super Orden Ostariophysii en este ecosistema. Esto es consistente con lo ya reportado para la región Neotropical (Reis *et al.* 2016; Albert *et al.*, 2020) y lo reportado para la Amazonia del Perú (Ortega *et al.*, 2012).

Las familias Characidae (16 especies y Loricariidae (12 especies) fueron la más representativa en cuanto a especies, seguido de la familia Cichlidae (9 especies) y Curimatidae (6 especies). Estos resultados son concordantes con estudios reportados en la región AOG (Amazonia-Orinoco y Guayanas) donde las Familias Characidae y Loricariidae son las más representativas en la región (van der Sleen & Albert, 2017); también concuerdan con lo obtenido por Ortega *et al.* (2012) donde Characidae es la familia más diversa en la Amazonia; y similar al estudio de Cashibococha (Riofrio *et al.*, 2003), en donde la familia Characidae fue la dominante (25 especies) con 37.9% seguida de Cichlidae (12 especies) con 18.2 % y Curimatidae (7 especies) con 10.6%.

La especie con mayor número de individuos fue *Ctenobrycon hauxwellianus* (356 especímenes), esta especie es muy abundante en lagunas de bosque inundable y en otros tipos de ambientes lénticos (van der Sleen & Alberts, 2017). Su abundancia se puede deber a su dieta omnívora la que incluye, larvas de insecto, gusanos, crustáceos y materia orgánica, los cuales se vieron presentes en este estudio. Las especies *Prionobrama filigera* (240 especímenes) y *Triportheus albus* (142 especímenes) también fueron las más recurrentes. *Prionobrama filigera* es una especie insectívora, suele habitar cerca de las orillas de ríos de aguas blancas o ambientes con flujo de corriente (van der Sleen & Albert, 2017); esta cualidad es la que probablemente le ha permitido adaptarse a estos ambientes de orilla ya que fue capturada en todos los puntos de muestreo. *Triportheus albus*, fue la especie con mayor abundancia dentro del género *Triportheus*, estos peces pueden sobrevivir en ambientes de condiciones hipóxicas (Malabarba, 2004) y su dieta varía de acuerdo a las condiciones del ambiente (Pereira *et al.*, 2011) ya que migran desde los ríos a zonas inundables (pueden pasar de una dieta omnívora a carnívora); estas adaptaciones probablemente han permitido que *Triportheus albus*, este dentro del ranking de las especies más abundantes.

El *DNA barcoding* logró diferenciar el 100% de las especies de peces secuenciadas para este estudio. El promedio de las distancias intraespecíficas fue significativamente menor al promedio de distancias interespecíficas (0.46% y 23.53% respectivamente), este resultado es lo esperado de la técnica de *DNA barcoding* ya que se basa en que las divergencias de las distancias son menores entre los individuos de una misma especie que entre las especies (Herbert *et al.*, 2004).

El valor promedio de la distancia intraespecífica es consistente a la mayoría de valores reportados en otros estudios de peces de agua dulce (Tabla 8). Pereira *et al.* (2013) recopilaron los valores promedios de distancia intraespecífica obtenidos en otros estudios hasta el año 2012 (Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Aquilino *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011; Rosso *et al.*, 2012 y Mejía *et al.*, 2012), el cual varió ente 0.13% y 0.78%, lo cual concuerda con estudios más recientes como el de Gomes *et al.* (2015), Campaña (2017) y Guimarães *et al.* (2018) con valores promedios de 0.74% y 0.46% respectivamente. En cambio, son menores a los resultados reportados por Pereira

*et al.* (2013) y Pereira *et al.* (2021) (1.3% y 1.2%), lo que puede deberse a que en estos estudios se han reportado un mayor número de especies crípticas que elevaron el valor promedio de sus distancias intraespecíficas.

**Tabla 8.** Resumen de valores de distancia intraespecífica de estudios de *DNA barcoding* en peces de agua dulce. En verde, datos recopilados por Pereira *et al.* (2013) y en amarillo, datos recopilados por este estudio

Lugar de estudio	Número de especies analizadas	Promedio de distancia intraespecífica (%)	Referencia
Laguna Yarinacocha	37	0.46	Presente estudio
México y Guatemala	61	0.45	Valdez-Moreno <i>et al.</i> (2009)
Lago Taal Filipinas	23	0.60	Aquilino <i>et al.</i> (2011)
Cuenca del río San Francisco	101	0.50	Carvalho <i>et al.</i> (2011)
Cuenca del Paraiba del Sur	58	0.13	Pereira <i>et al.</i> (2011)
Llanura de la Pampa Argentina	36	0.33	Rosso <i>et al.</i> (2012)
Complejo Pánuco–Tamesí México	31	0.78	Mejía <i>et al.</i> (2012)
Cuenca del Río Paraná	254	1.3	Pereira <i>et al.</i> (2013)
Río Mucuri	37	0.78	Gomes <i>et al.</i> (2015)
Río Tumbes	23	0.15	Campaña (2017)
Quebradas de la cuenca alta del Río Tapajós	29	0.46	Guimarães <i>et al.</i> (2018)
Cuenca alta del Río Paraná	48	1.3	Pereira <i>et al.</i> (2021)

La gráfica de dispersión de distancias genéticas mostró que todos los valores de la máxima distancia intraespecífica son menores a los valores de la mínima distancia interespecífica; y en la gráfica de distribución de frecuencias de ambas distancias se observa que estas distancias no se sobreponen reflejando el *barcoding gap* tal y como lo mencionan Meyer y Paulay (2005), pero esta brecha es muy corta debido al elevado valor de la máxima distancia intraespecífica de 6.47% (en la especie nominal *H. malabaricus*), en comparación al mínimo valor de distancia interespecífica (7.10%).

En este estudio se reportó un valor de divergencia genética de 6.47% entre los subclados de *H. malabaricus* concordando con Guimarães *et al.* (2022), que reportaron un valor máximo de 10.30% para las especies del grupo *H. malabaricus* (incluyendo las especies formalmente descritas y los linajes del complejo *H. malabaricus*). De acuerdo a los autores este alto valor de divergencia genética soporta la especiación críptica en este complejo de especies y refleja la complejidad taxonómica descrita por Rosso *et al.*, (2016) y Guimarães *et al.* (2021), debido a que los caracteres morfológicos son muy conservados entre las especies del complejo *H. malabaricus*.

Este resultado de posible especiación críptica también es soportado por los análisis de delimitación de especies. La delimitación utilizando como valor de corte el 2%, mostró a *H. malabaricus* como posible especie críptica al ubicarse la especie nominal en el segundo cuadrante de la gráfica propuesta por Herbert *et al.* (2004). Los análisis de delimitación basado en MOTUs (GMYC, PTP y bPTP) evidenciaron la existencia de diversidad oculta al obtenerse 2 MOTUs para *H. malabaricus*. En el estudio de Cardoso *et al.* (2018), mediante el análisis de delimitación de especies basado en OTUs (unidades taxonómicas operacionales), reportaron un linaje único para Perú en los ríos Huallaga y Ucayali que no tendría contacto con otros linajes de *H. malabaricus*. En el estudio realizado por Guimarães *et al.* (2022) se reportaron 11 putativas especies para el complejo *H. malabaricus*, que incluye a los linajes de los ríos Ucayali y Beni en Perú. Los autores además mencionan que los casos de crípticismo en *H. malabaricus* pueden darse entre cuencas y dentro de la misma cuenca hidrográfica, siendo el resultado obtenido un ejemplo de este hecho. Por lo tanto, en la Amazonia peruana *H. malabaricus* también presenta una incertidumbre taxonómica y requiere una revisión taxonómica más profunda.

## 7. CONCLUSIONES

- En este estudio, realizado en la época de transición a creciente, la ictiofauna en la laguna Yarinacocha estuvo conformada por 84 especies identificadas por la taxonomía tradicional, representada en su mayoría por los órdenes Characiformes y Siluriformes.
- El *DNA barcoding* fue congruente con la identificación taxonómica de 73 especies nominales correspondientes a 73 MOTUs, excepto en *H. malabaricus*.

- *H. malabaricus* fue designada como candidata a especie críptica obteniendo un elevado valor de divergencia genética y 2 MOTUs (dos posibles especies) para la laguna Yarinacocha.

## 8. RECOMENDACIONES

- Completar este estudio con las colectas en temporada seca y considerar los registros de las especies de peces de la laguna Yarinacocha en la Colección Ictiológica del MHN-UNMSM, para obtener una lista taxonómica más completa de las especies.
- Obtener un mayor número de secuencias COI por especie (mínimo dos secuencias) de ser posible para una mejor representatividad genética de las especies.
- Realizar una revisión taxonómica profunda de la especie *H. malabaricus* utilizando un enfoque integrador que permitan esclarecer la incertidumbre taxonómica encontrada en esta especie.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert, J. S. (2001). Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan, 190, 1–127.

Aljanabi, S. & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25. 4692-3. 10.1093/nar/25.22.4692.

Aquilino, S. V. L., Tango, J. M., Fontanilla, I. K. C., Pagulayan, R. C., Basiao, Z. U. & Ong, O. S. & Quilang, J. P. (2011). DNA barcoding of the ichthyofauna of Tall Lake, Philippines. *MolEcolResour* 11:612–619.

Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F .K., Müller, N .F., Ogilvie, H. A., du Plessis, L., Poppinga, A, Rasmussen, D., Siveroni, I., Suchard, M. A., Wu, C. H., Xie, D., Zhang, C., Stadler, T. & Drummond, A. J. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol.* (2019) Apr 8;15(4):e1006650. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006650. PMID: 30958812; PMCID: PMC6472827.

Cañedo-Apolaya, R. M., Ortiz-Alvarez, C., Alfaro-Cordova, E., Alfaro-Shigueto, J., Velez-Zuazo, X., Mangel, J. C., Siccha-Ramirez, R., Yamashiro, C. & Ramirez, J. L. (2021) Species Delimitation of Southeast Pacific Angel Sharks (*Squatina* spp.) Reveals Hidden Diversity through DNA Barcoding. *Diversity* 2021, 13, 177. <https://doi.org/10.3390/d13050177>



- Cardoso, Y. P., Rosso, J. J., Mabragaña, E., González-Castro, M., Delpiani, M., Avigliano, E., Bogan, S., Covain, R., Schenone, N. F. & Díaz de Astarloa, J. M. (2018). A continental-wide molecular approach unraveling mtDNA diversity and geographic distribution of the Neotropical genus *Hoplias*. PLoS ONE, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202024>
- Carvalho, D. C., Pimenta Neto, D. A., Brasil, B. & Oliveira, D. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. Mitochondrial DNA. 2011.
- Centre for Biodiversity Genomics, University of Guelph. (2021). The Global Taxonomy Initiative 2020: A Step-by-Step Guide for DNA Barcoding. Technical Series No. 94. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, 66 pages.
- Costa-Silva, G., Ashikaga, F., Dias, C., Pereira, L., Foresti, F. & Oliveira, C. (2018). DNA barcoding techniques used to identify the shared ichthyofauna between the Pantanal floodplain and Upper Paraná River. Mitochondr DNA 29(7):1063–1072. <https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1404046>
- Dagosta, Fernando & de Pinna, Mario. (2019). The Fishes of the Amazon: Distribution and Biogeographical Patterns, with a Comprehensive List of Species. Bulletin of the American Museum of Natural History. 431. 1. [10.1206/0003-0090.431.1.1](https://doi.org/10.1206/0003-0090.431.1.1).
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8), 722
- de Carvalho M. R., Bockmann F. A., Amorim D. S. & Brandão C. R. F. (2008). Systematics must embrace comparative biology and evolution, not speed and automation. Evolutionary Biology 35: 150–157.
- de Queiroz, L. J., Torrente-Vilara, G., Massaharu, W., Da Silva Pires, T. H., Zuanon, J. & Rodrigues, C. (2013). Peixes do rio Madeira. Sao Paolo: Diaeto Latin American Documentary.
- de Santana, C. D., Crampton, W. G. R., Dillman, C. B., Frederico, R. G., Sabaj, M. H., Covain, R., Ready, J., Zuanon, J., de Oliveira, R. R., Mendes-Júnior, R. N., Bastos, D. A., Teixeira, T. F., Mol, J., Ohara, W., Castro, N. C., Peixoto, L. A., Nagamachi, C., Sousa, L., Montag, L. F. A. & Wosiacki, W. B. (2019). Unexpected species diversity in electric eels with a description of the strongest living bioelectricity generator. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11690-z>
- Díaz, J., Villanova, G. V., Brancolini, F., Pazo, F., del Posner, V. M., Grimberg, A. & Arranz, S. E. (2016). First DNA barcode reference library for the identification of south American freshwater fish from the lower Paraná river. PLoS ONE, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157419>

- Ebach, M. C., Valdecasas, A. G. & Wheeler, Q. D. (2011). Impediments to taxonomy and users of taxonomy: Accessibility and impact evaluation. *Cladistics*, 27(5), 550–557. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2011.00348.x>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elías-Gutiérrez, M., Hubert, N., Collins, R. A. & Andrade-Sossa, C. (2021). Aquatic organisms research with DNA barcodes. *Diversity*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/d13070306>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, p. 783-791.
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Van der Laan, R. (eds). (2022). *ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES*. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed 10 ago 2022.
- Galvis, G., J., I. Mojica, S. R., Duque, C., Castellanos, P., Sánchez-Duarte, M., Arce, A., Guitiérrez, L. F., Jiménez, M., Santos, S., Vejarano Rivadeneira, F., Arbeláez, E., P. & Leiva, M. (2006). *Peces del medio Amazonas. Región de Leticia. Serie de Guías Tropicales de Campo N° 5. Conservación Internacional. Editorial Panamericana, Formas e Impresos. Bogotá, Colombia. 548 pp.*
- García-Dávila, C., Flores, M., Pinedo, L., Loyola R., Castro, D., Ângulo, C., Mejía, E., Sanchez, H., García, A., Chota, W., Estivals, G., Panduro, H., Nolorbe, C., Chuquipiondo, C., Duponchelle, F. & Renno, J-F. (2017). Aplicación del barcoding al manejo y conservación de peces y sus subproductos en la Amazonia Peruana. *Revista Folia Amazónica*. <https://doi.org/10.24841/fa.v26i2.329>.
- García-Dávila, C., Sánchez, H., Flores, M., Mejia, J., Angulo, C., Castro-Ruiz, D., Estivals, G., García, A., Vargas, G., Nolorbe, C., Núñez, J., Mariac, C., Duponchelle, F. & Renno, J-F. (2018). *PECES DE CONSUMO DE LA AMAZONÍA PERUANA. MINAM - Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Iquitos, Perú, 218 pp.*
- García-Vásquez, A., Sánchez, H., Rodríguez, R., Montreuil, V., Vargas, G., Tello, S. & Duponchelle, F. (2009). Hábitos alimenticios del dorado *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) en la Amazonía peruana. *Folia Amazónica*, 18(1): 7-13
- Geo ambiental S.R.L. (2010). Capítulo 4 LÍNEA BASE DEL PROYECTO. In: Estudio de impacto ambiental semidetallado del Proyecto: “Acondicionamiento Turístico del Lago Yarinacocha”.

- Gomes, L. C., Pessali, T. C., Sales, N. G., Pompeu, P. S. & Carvalho, D. C. (2015). Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica*, 143(5), 581–588. <https://doi.org/10.1007/s10709-015-9856-z>
- Guimarães, K. L. A., de Sousa, M. P. A., Ribeiro, F. R. V., Rebelo Porto, J. I. & Rodrigues, L. R. R. (2018). DNA barcoding of fish fauna from low order streams of Tapajós River basin. *PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209430>
- Guimarães K. L. A., Rosso, J. J., González-Castro, M., Souza, M. F. B., Díaz de Astarloa, J. M. & Rodrigues, L. R. R. (2021). A new species of *Hoplias malabaricus* species complex (Characiformes: Erythrinidae) from the Crepori River, Amazon basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 100(2), 425– 443. <https://doi.org/10.1111/jfb.14953>
- Grande, Lance. (2004). Categorizing various classes of morphological variation, and the importance of this to vertebrate paleontology.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. (2003a). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hubert, N., Kadarusman, W., A., Busson, F., Caruso, D., Sulandari, S., Nafiqoh, N., Pouyaud, L., Rüber, L., Avarre, J.C., Herder, F., Hanner, R., Keith, P. & Hadiaty, R. K. (2016). DNA Barcoding Indonesian freshwater fishes: challenges and prospects. *DNA Barcodes*, 3(1). <https://doi.org/10.1515/dna-2015-0018>
- Hughes, K., Harrison, I., Darwall, W., Lee, R., Muruven, D., Revenga, C., Claussen, J., Lynch, A.C, Pinder, A., Abell, R., Martinelli, P., Baltzer, M., Thieme, M., Jähnig, S., Opperman, J., Wanninger, H., Monroe, J., Patricio, H., Lyons, T. & Gollock, M. (2021). THE WORLD'S FORGOTTEN FISHES CONTENTS FOREWORD. [www.panda.org](http://www.panda.org).

- Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana IIAP. (2006). “Estrategia Regional de la Diversidad Biológica en Ucayali”. <http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/PUBL543.pdf>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kullander, R. S. (1986). Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru. Department of Vertebrate Zoology, Research Division, Swedish Museum of Natural History. Stockholm. Sweden.
- Littmann, M. W., Lundberg, J. G. & Rocha, M. S. (2021). Revision of the South American catfish genus *Hypophthalmus* (Siluriformes, Pimelodidae) with descriptions of two new species from the Amazon and Orinoco Basins
- Mago-Leccia, F. (1994). Electric fishes of the continental waters of America. Classification and catalogue of the electric fishes of the order Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi), with descriptions of new genera and species. *Fundación para el Desarrollo para las Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales*, 29, 1–206.
- Malabarba, M. C. S. L. (2004). Revision of the Neotropical genus *Triportheus* Cope, 1872 (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 2:167–204.
- Marques, D. F.; Santos, F.A.; Silva, S.S.; Sampaio, I. & Rodrigues, L.R.R. (2013). Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotropical Ichthyology*, v. 11, n.2, p. 459-466. 2013
- Mattox, G., Bifi, A. & Oyakawa, O. (2014). Taxonomic study of *Hoplias microlepis* (Gunther, 1864), a transAndean species of trahiras (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae). *Neotropical Ichthyology*, 12 (2): 343-352. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20130174>
- Mejía, O., León-Romero, Y. & Soto-Galera, E. (2012). DNA barcoding of the ichthyofauna of Pánuco–Tamesí complex: Evidence for taxonomic conflicts in some groups. *Mitochondrial DNA* 23:471–476.
- Meyer, C. P. & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>

Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.

Ministerio del Ambiente MINAM. (2016). Prospección, distribución y análisis socioeconómico de peces ornamentales en las regiones de Loreto y Ucayali. Elaborado por Asociación Urku Estudios amazónicos – Birell S.A.C. Informe final del Servicio de Consultoría del contrato N° 039-2016-MINAM-OGA

Oberdorff, T., Jézéquel, C., Campero, M., Carvajal-Vallejos F., Cornu, J. F., Dias, M. S., Duponchelle, F., Maldonado-Ocampo J. A., Ortega, H., Renno J-F. & Tedesco, P. (2014). Peces Amazónicos y Cambio Climático.

Nelson, J., Grande, T. & Wilson, M. V. H. (2016). Fishes of the world. Fifth Edition. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 707 pp.

Nogueira, A. F., Oliveira, C., Langeani, F. & Netto-Ferreira, A. L. (2021). Overlooked biodiversity of mitochondrial lineages in *Hemiodus* (Ostariophysi, Characiformes). *Zoologica Scripta*, 337–351. <https://doi.org/10.1111/zsc.12469>

Ortega, H., Hidalgo, M., Trevejo, G., Correa, E., Cortijo, A. M., Meza, V. & Espino, J. (2012). Lista anotada de los peces de aguas continentales del Perú: Estado actual del conocimiento, distribución, usos y aspectos de conservación. Segunda Edición. Ministerio del Ambiente, Dirección General de Diversidad Biológica - Museo de Historia Natural, UNMSM. 56 p.

Oyakawa, O. T. & Mattox, G. M. T. (2009). Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. In *Neotropical Ichthyology* (Vol. 7, Issue 2).

Pereira, J. d. O., da Silva M. T., Soares Vieira, L. J. & Fugi, R. (2011). Effects of flood regime on the diet of *Triporthus curtus* (Garman, 1890) in an Amazonian floodplain lake. *Neotropical Ichthyology* 9:623–628.

Pereira, L. H. G., Maia, G.M.G., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA* 22(Suppl 1):71–79. doi: 10.3109/19401736.2010.532213. Epub 2011 Jan 27. PMID: 21271849.

Pereira, L., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*. 14. 20. 10.1186/1471-2156-14-20.

- Pereira, T. L., Santos, U., Schaefer, C. E., Souza, G. O., Paiva, S. R., Malabarba, L. R., Schmidt, E. E. & Dergam, J. Á. (2013). Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography*, 40, 905-914.
- Pereira, L., Castro, J., Vargas, P., Gomez, J. A. M. & Oliveira, C. (2021). The use of an integrative approach to improve accuracy of species identification and detection of new species in studies of stream fish diversity. *Genetica*, 149(2), 103–116. <https://doi.org/10.1007/s10709-021-00118-6>
- Pinedo, R. (2018). Caracterización morfológica y molecular de las especies de peces ornamentales comercializados en la ciudad de Iquitos (Amazonia peruana). (2016). Tesis Título Profesional. UCP, Escuela Profesional de Ecología. San Juan.
- Pough, F. Harvey & Janis, C. (2019). *Vertebrate Life* (Ed., 10th). Oxford University Press.
- Quezada, M., Hidalgo, M., Tarazona, J. & Ortega, H. (2017). Ictiofauna de la cuenca del río Aguaytía, Ucayali, Perú. *Revista Peruana de Biología*. 24. 331. 10.15381/rpb.v24i4.14061.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M.A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. syy032. doi:10.1093/sysbio/syy032
- Rach, J., Desalle, R., Sarkar, I., Schierwater, B. & Hadrys, H. (2008). Character based DNA Barcoding Allows Discrimination of Genera, Species and Populations in Odonata. *Proc R Soc B*. 275(1632):237-247
- Ramirez, J. L. & Galetti P. M. Jr. (2015). DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. *Mol. Phylogenet. Evol.* 93, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.021>.
- Ramirez, J. L., Carvalho-Costa, L. F., Venere, P. C., Carvalho, D. C., Troy, W. P. & Galetti, P. M. (2016). Testing monophyly of the freshwater fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis. *Journal of Fish Biology*, 88(3), 1204–1214. <https://doi.org/10.1111/jfb.12906>
- Ramirez, J. L., Birindelli, J. L., Carvalho, D. C., Affonso, P. R. A. M., Venere, P. C., Ortega, H., Carrillo-Avila, M., Rodríguez-Pulido, J. A. & Galetti, P. M. (2017). Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Frontiers in Genetics*, 8 (OCT). <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00149>
- Ramirez, J. L., Simbine, L., Marques, C. G., Zelada-Mázmela, E., Reyes-Flores, L. E., López, A. S., Gusmão, J., Tavares, C., Galetti, P. M., Jr. & Freitas, P. D. (2021). DNA Barcoding of

Penaeidae (Decapoda, Crustacea): Non-Distance-Based Species Delimitation of the Most Economically Important Shrimp Family. *Diversity* 2021, 13, 460. <https://doi.org/10.3390/d13100460>

Ratnasingham, S. & Hebert, P. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular ecology notes*. 7. 355-364. 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.

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. *J Fish Biol*, 89: 12-47. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>

Riofrio, J. C. (1998). Características de la pesquería comercial de consumo en Pucallpa (Ucayali Perú). *Revistas de Investigaciones Pecuarias*, 9(1): 67-7.

Riofrio, J., Samanez, I., Carrasco, F. & Clavo, M. (2003). Caracterización limnológica de la laguna de Cashibococha (Ucayali Perú) durante el año 2001. *Revista Peruana de Biología*. 10. 10.15381/rpb.v10i2.2501.

Riofrio, J. C., Ferré, W. R. & Velarde, D. A. (2008). Contribuciones para el manejo de la pesquería comercial en Pucallpa (Ucayali, Perú). In: Pinedo, D., Soria, C. (Eds). *El manejo de las pesquerías en ríos tropicales de Sudamérica*. p. 205-234.

Rodrigues, C., Agudelo, E. C, Akama, A., Barros, B., Bonfim, M., Carneiro, L., Briglia-Ferreira, S., Carvalho, L., Bonilla, C., Charvet, P., Catâneo, D., Silva, H., García-Dávila, C., Beltrão, H., Duponchelle, F., Encalada, A., Fernandes, I., Florentino, A., Guarido, P. & Vitule, J. (2021). The Silent Threat of Non-native Fish in the Amazon: ANNF Database and Review. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 9. 646702. 10.3389/fevo.2021.646702.

Rosso, J. J., Mabragaña, E., Castro, M. G. & Díaz de Astarloa, M. (2012). DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Mol Ecol Res* 12:999–1011.

Rosso, J. J., González-Castro, M., Bogan, S., Cardoso, Y., Mabragaña, E., Delpiani, M. & Díaz de Astarloa, J. M. (2018). Integrative taxonomy reveals a new species of the *Hoplias malabaricus* species complex (Teleostei: Erythrinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 28, 235-252.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, Houston, v. 4, p. 406-425.

- Salazar-Ramírez, L., Riofrio, J., Zavaleta-Flores, J. & Rubio-Rodríguez, J. (2021). Análisis de los desembarques de la pesca comercial en Yarinacocha (Ucayali, Perú) entre 2015-2019. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 32. e20931. 10.15381/rivep.v32i4.20931.
- Samanez, I., Rimarachin, V., Arana, J., Ortega, H., Hidalgo, M. & Correa, E. V. (2014). Métodos de colecta, identificación y análisis de comunidades biológicas: plancton, perifiton, bentos (macroinvertebrados) y necton (peces) en aguas continentales del Perú. UNMSM, MHN–Ministerio del Ambiente, Lima, Perú. 75 p.
- Silva-Santos, R., Ramirez, J. L., Galetti Jr., P. M. & Freitas, P. D. (2018). Molecular Evidences of a Hidden Complex Scenario in *Leporinus cf. friderici*. *Frontiers in Genetics*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00047>
- Soili, H. (1984). The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses and river types. In: *The Amazon* (H. Sioli Editor, pp-127-165).
- Talavera, G., Dincă, V. & Vila, R. (2013). Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods Ecol Evol*, 4: 1101-1110. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12107>
- Valenzuela, G. (2022). DNA barcoding y delimitación de especies de la Familia Anostomidae en la cuenca amazónica peruana. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.
- van der Sleen, P. & Albert, J. (2018). *Field Guide to the fishes of the Amazon, Orinoco and Guianas*. Oxford: Princeton University Press, USA
- van der Laan, R. (2022). FRESHWATER FISH LIST an alphabetic scientific name list of the world's freshwater fishes and an overview of the scientific names used in the aquarium literature Thirty-fourth Edition.
- Vaz, D., Martinez, C., Friedman, S. T. & Rizzato, P. (2022). Morphological Descriptions and Taxonomy. Chapter 6 in *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Vela, A. J. (2000). Plan estratégico para el uso y conservación de los recursos naturales de la laguna de Yarinacocha. Pucallpa, Perú. 72 p.
- Vivanco-Pimentel, L. (2010). *Gran Enciclopedia de la Región Ucayali*. Lima: CECOSAMI Pre Prensa e Impresión Digital S.A.



Ward, R., Zemlak, T., Innes, B., Last, P. & Hebert, P. (2005). DNA Barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 360. 1847-57. [10.1098/rstb.2005.1716](https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716).

Ward, R. D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1077–1085. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02541.x>

Weigand, H., Beermann, A. J., Čiampor, F., Costa, F. O., Csabai, Z., Duarte, S., Geiger, M. F., Grabowski, M., Rimet, F., Rulik, B., Strand, M., Szucsich, N., Weigand, A. M., Willassen, E., Wyler, S. A., Bouchez, A., Borja, A., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Ferreira, S. & Ekrem, T. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. In *Science of the Total Environment* (Vol. 678, pp. 499–524). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.247>

Wasiw, J., Riofrio, J. & Muñoz, V. (2012). Monitoreo de la pesquería comercial en Pucallpa y Yarinacocha 2010 (Ucayali – Perú). *Informe IMARPE*, 39(3-4): 288-293

Yule George Udny. (1925). A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J. C. Willis, F. R. SPhil. *Trans. R. Soc. Lond.* B21321–87 <http://doi.org/10.1098/rstb.1925.0002>

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. (2019). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*. 2013 Nov 15,29(22):2869-76. doi: 10.1093/bioinformatics/btt499. Epub 2013 Aug 29. PMID: 23990417, PMCID: PMC3810850.

## 10. ANEXOS

## **ANEXO 1: MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO**

### **A. Materiales de campo**

- Fichas de campo
- Libreta de campo
- Lápiz y borrador
- Cámara fotográfica
- GPS marca Garmin
- Redes de arrastre, atarraya y espera
- Libreta de campo
- Lápiz, lapicero Artline 0.1 y plumón indeleble
- Etiquetas de papel vegetal
- Cámara fotográfica
- Tubos Eppendorf de 1.5 y 2 ml
- Criocajas para tubos de 1.5 ml
- Baldes de plástico de 8 litros y 20 litros
- Pinzas de punta fina
- Hilo macramé negro
- Bandejas de plástico
- Gasa de algodón
- Guantes quirúrgicos descartables
- Cinta de embalaje
- Bolsas de plástico Ziploc
- Alcohol de 70° y 96°
- Formol al 10%

### **B. Material biológico**

- Especímenes completos para el análisis morfológico
- Tejido muscular o aleta extraído de cada espécimen para el análisis molecular

### **C. Materiales para la identificación taxonómica**

- Pinzas de punta fina
- Bandejas de plástico
- Guantes

- Calibrador digital Mitutoyo 0.1
- Papel para etiqueta
- Lapiceros Artline 0.1
- Frascos y tapers de plástico
- Alcohol de 70°
- Bibliografía especializada

#### **D. Materiales de laboratorio**

- Guantes descartables
- Mascarilla
- Guardapolvo
- Criocaja
- Micropipetas de 10, 50, 200 y 1000  $\mu$ l
- Tubos de 1.5 ml y microtubos de 0.5 ml y 0.2ml
- Lápiz, indeleble, cuaderno de apuntes
- Pinza de punta fina
- Papel aluminio y papel toalla
- Hojilla de bisturí
- Beaker 50 ml
- Matraz de 50 ml
- Probetas de 100 y 500 ml
- Tips de 10, 200 y 1000  $\mu$ l

#### **E. Reactivos**

- Proteinasa K Promega
- Etanol 100% a -20°C
- Etanol 70% a -20°C
- Solución salina
- NaCl 5M
- Agua estéril
- Kit comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega)
- Kit para PCR *Applied Biological Materials Inc.* abm® (dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimerasa, *buffer* 10X con MgCl<sub>2</sub>)
- *Primers* COI FishF1 y FishR1, FishF2 y FishR2, y AnosCOIF y AnosCOIR
- Agarosa
- *Ladder* o marcador de peso molecular GeneRuler™
- Intercalantes abm® Safe Green™ y Sybr Safe

- TAE 10X y 1X

#### **F. Equipos**

- Microscopio estereoscopio BOECO BSZ-405
- Vortex-T Genie2
- Microcentrífuga MiniSpin plus
- Nanodrop <sup>TM</sup> Lite
- Termociclador Bio Rad T100
- Balanza analítica
- Microondas
- Sistema de electroforesis horizontal BIORAD
- Transiluminador BlueView MBE-200A

**ANEXO 2: ESFUERZO DE MUESTREO REALIZADO POR ARTE DE PESCA PARA CADA ESTACIÓN**

ARTE DE PESCA	ESFUERZO DE MUESTREO												
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13
ATARRAYA (# lances)	10	10		5	10			10		16			
ARRASTRE (# lances)	10	10		10	6		6	9	12			12	10
RED DE ESPERA (tiempo en horas)			4h			3h					3h		

**ANEXO 3: MATERIAL BIOLÓGICO POR ESTACIÓN DE COLECTA INGRESADO A LA COLECCIÓN ICTIOLÓGICA DEL MHN-UNMSM**

ESPECIE	CÓDIGO	ESTACIÓN
<i>Triportheus albus</i>	MUSM 69639	YARINA 1
<i>Aphyocharax pusillus</i>	MUSM 59640	YARINA 1
<i>Hypoclinemus mentalis</i>	MUSM 59641	YARINA 1
<i>Pimelodus blochii</i>	MUSM 59642	YARINA 1
<i>Prochilodus nigricans</i>	MUSM 59643	YARINA 1
<i>Schizodon fasciatus</i>	MUSM 59644	YARINA 1
<i>Leporinus cf. parae</i>	MUSM 59645	YARINA 1
<i>Mylossoma albiscopum</i>	MUSM 59646	YARINA 1
<i>Cichla monoculus</i>	MUSM 69739	YARINA 1
<i>Triportheus albus</i>	MUSM 69648	YARINA 2
<i>Moenkhausia intermedia</i>	MUSM 69649	YARINA 2
<i>Hypoclinemus mentalis</i>	MUSM 69650	YARINA 2
<i>Leporinus cf. parae</i>	MUSM 69652	YARINA 2
<i>Prochilodus nigricans</i>	MUSM 69653	YARINA 2
<i>Crenicichla proteus</i>	MUSM 69654	YARINA 2
<i>Pygocentrus nattereri</i>	MUSM 69740	YARINA 3
<i>Psectrogaster amazonica</i>	MUSM 69741	YARINA 3
<i>Curimatella meyeri</i>	MUSM 69742	YARINA 3
<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	MUSM 69744	YARINA 3
<i>Hemiodus aff. microlepis</i>	MUSM 69745	YARINA 3
<i>Schizodon fasciatus</i>	MUSM 70033	YARINA 4
<i>Cichla monoculus</i>	MUSM 70150	YARINA 4
<i>Hoplias malabaricus</i>	MUSM 70151	YARINA 4
<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	MUSM 70152	YARINA 4
<i>Prionobrama filigera</i>	MUSM 70153	YARINA 4
<i>Moenkhausia barbouri</i>	MUSM 70154	YARINA 4
<i>Triportheus angulatus</i>	MUSM 70155	YARINA 4
<i>Triportheus albus</i>	MUSM 70156	YARINA 4
<i>Pterophyllum scalare</i>	MUSM 70157	YARINA 4
<i>Moenkhausia intermedia</i>	MUSM 70158	YARINA 4
<i>Prochilodus nigricans</i>	MUSM 70159	YARINA 4
<i>Hypoptopoma gulare</i>	MUSM 70160	YARINA 4
<i>Pristigaster cayana</i>	MUSM 70161	YARINA 4
<i>Psectrogaster rutiloides</i>	MUSM 70162	YARINA 4
<i>Jurengraulis juruensis</i>	MUSM 70163	YARINA 4
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	MUSM 70164	YARINA 4
<i>Psectrogaster amazonica</i>	MUSM 70165	YARINA 4
<i>Pimelodella sp. 1</i>	MUSM 70166	YARINA 4
<i>Pimelodella sp. 2</i>	MUSM 70167	YARINA 4
<i>Pimelodus blochii</i>	MUSM 70168	YARINA 4
<i>Lycengraulis batesii</i>	MUSM 70169	YARINA 4
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	MUSM 70170	YARINA 4
<i>Aphyocharax pusillus</i>	MUSM 70171	YARINA 4

<i>Satanoperca jurupari</i>	MUSM 70172	YARINA 4
<i>Hypostomus ericius</i>	MUSM 70173	YARINA 4
<i>Hypoptopoma psilogaster</i>	MUSM 70174	YARINA 4
<i>Leporinus cf. parae</i>	MUSM 70175	YARINA 4
<i>Ossancora punctata</i>	MUSM 70176	YARINA 4
<i>Ossancora asterophysa</i>	MUSM 70177	YARINA 4
<i>Crenicichla cyanonotus</i>	MUSM 70178	YARINA 4
<i>Crenicichla sedentaria</i>	MUSM 70179	YARINA 4
<i>Crenicichla proteus</i>	MUSM 70180	YARINA 4
<i>Epapterus dispilurus</i>	MUSM 70181	YARINA 5
<i>Farlowella amazonum</i>	MUSM 70182	YARINA 5
<i>Oxydoras niger</i>	MUSM 70183	YARINA 5
<i>Eigenmannia limbata</i>	MUSM 70184	YARINA 5
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	MUSM 70185	YARINA 5
<i>Sturisoma nigrirostrum</i>	MUSM 70186	YARINA 5
<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	MUSM 70187	YARINA 5
<i>Loricaria simillima</i>	MUSM 70188	YARINA 5
<i>Sternopygus macrurus</i>	MUSM 70189	YARINA 5
<i>Eigenmannia virescens</i>	MUSM 70190	YARINA 5
<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i>	MUSM 70191	YARINA 5
<i>Rineloricaria wolfei</i>	MUSM 70192	YARINA 5
<i>Rineloricaria sp.</i>	MUSM 70193	YARINA 5
<i>Ancistrus alga</i>	MUSM 70194	YARINA 5
<i>Pimelodella sp. 1</i>	MUSM 70195	YARINA 5
<i>Pimelodus blochii</i>	MUSM 70196	YARINA 5
<i>Hypoptopoma gulare</i>	MUSM 70197	YARINA 5
<i>Hypostomus ericius</i>	MUSM 70198	YARINA 5
<i>Hypoptopoma thoracatum</i>	MUSM 70199	YARINA 5
<i>Platydoras armatulus</i>	MUSM 70200	YARINA 5
<i>Sorubim lima</i>	MUSM 70201	YARINA 5
<i>Pygocentrus nattereri</i>	MUSM 70202	YARINA 5
<i>Heros efasciatus</i>	MUSM 70203	YARINA 5
<i>Leporinus cf. parae</i>	MUSM 70204	YARINA 5
<i>Anchoviella guianensis</i>	MUSM 70205	YARINA 5
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	MUSM 70206	YARINA 5
<i>Brachyhalcinus copei</i>	MUSM 70207	YARINA 5
<i>Mylossoma albiscopum</i>	MUSM 70208	YARINA 5
<i>Roeboides affinis</i>	MUSM 70209	YARINA 5
<i>Roeboides myersii</i>	MUSM 70210	YARINA 5
<i>Thoracocharax stellatus</i>	MUSM 70211	YARINA 5
<i>Protocheirodon pi</i>	MUSM 70418	YARINA 5
<i>Psectrogaster rutiloides</i>	MUSM 69757	YARINA 6
<i>Psectrogaster amazonica</i>	MUSM 69758	YARINA 6
<i>Curimatella meyeri</i>	MUSM 69759	YARINA 6
<i>Potamorhina altamazonica</i>	MUSM 69760	YARINA 6
<i>Cynodon gibbus</i>	MUSM 69761	YARINA 6
<i>Pygocentrus nattereri</i>	MUSM 69762	YARINA 6

<i>Ancistrus alga</i>	MUSM 69869	YARINA 7
<i>Hypostomus ericius</i>	MUSM 69870	YARINA 7
<i>Hoplias malabaricus</i>	MUSM 69871	YARINA 7
<i>Farlowella amazonum</i>	MUSM 69872	YARINA 7
<i>Pimelodella</i> sp. 1	MUSM 69873	YARINA 7
<i>Prochilodus nigricans</i>	MUSM 69874	YARINA 7
<i>Cynopotamus amazonum</i>	MUSM 69875	YARINA 7
<i>Megaleporinus trifasciatus</i>	MUSM 69876	YARINA 7
<i>Corydoras multiradiatus</i>	MUSM 69877	YARINA 7
<i>Corydoras splendens</i>	MUSM 69878	YARINA 7
<i>Hypoptopoma gulare</i>	MUSM 69879	YARINA 7
<i>Prionobrama filigera</i>	MUSM 69880	YARINA 7
<i>Odontostilbe fugitiva</i>	MUSM 69881	YARINA 7
<i>Hypoptopoma thoracatum</i>	MUSM 69882	YARINA 7
<i>Eigenmannia limbata</i>	MUSM 70029	YARINA 7
<i>Abramites hypselonotus</i>	MUSM 70030	YARINA 8
<i>Galeocharax gulo</i>	MUSM 70031	YARINA 8
<i>Leporinus</i> cf. <i>parae</i>	MUSM 70032	YARINA 8
<i>Prionobrama filigera</i>	MUSM 7034	YARINA 8
<i>Moenkhausia</i> aff. <i>dichrourea</i>	MUSM 70055	YARINA 8
<i>Astyanax</i> sp.	MUSM 70056	YARINA 8
<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	MUSM 70035	YARINA 8
<i>Pimelodella</i> sp. 1	MUSM 70036	YARINA 8
<i>Aphyocharax pusillus</i>	MUSM 70037	YARINA 8
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	MUSM 70038	YARINA 8
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	MUSM 70039	YARINA 8
<i>Triportheus albus</i>	MUSM 70114	YARINA 9
<i>Triportheus angulatus</i>	MUSM 70115	YARINA 9
<i>Prochilodus nigricans</i>	MUSM 70040	YARINA 9
<i>Aphyocharax pusillus</i>	MUSM 70041	YARINA 9
<i>Loricaria simillima</i>	MUSM 70042	YARINA 9
<i>Mylossoma albiscopum</i>	MUSM 70043	YARINA 9
<i>Piaractus brachypomus</i>	MUSM 70044	YARINA 9
<i>Steindachnerina leucisca</i>	MUSM 70045	YARINA 9
<i>Steindachnerina dobula</i>	MUSM 70046	YARINA 9
<i>Ossancora punctata</i>	MUSM 70047	YARINA 9
<i>Schizodon fasciatus</i>	MUSM 70048	YARINA 9
<i>Pimelodella</i> sp. 2	MUSM 70049	YARINA 9
<i>Prionobrama filigera</i>	MUSM 70050	YARINA 9
<i>Crenicichla proteus</i>	MUSM 70051	YARINA 9
<i>Moenkhausia intermedia</i>	MUSM 70052	YARINA 9
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	MUSM 70053	YARINA 9
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	MUSM 70054	YARINA 9
<i>Leporinus</i> cf. <i>parae</i>	MUSM 69884	YARINA 10
<i>Prochilodus nigricans</i>	MUSM 69885	YARINA 10
<i>Hypoptopoma gulare</i>	MUSM 69886	YARINA 10
<i>Hoplias malabaricus</i>	MUSM 69887	YARINA 10



<i>Moenkhausia</i> aff. <i>dichroura</i>	MUSM 70023	YARINA 10
<i>Rineloricaria</i> sp.	MUSM 70024	YARINA 10
<i>Heros efasciatus</i>	MUSM 70025	YARINA 10
<i>Pterophyllum scalare</i>	MUSM 70026	YARINA 10
<i>Mesonauta mirificus</i>	MUSM 70027	YARINA 10
<i>Rhamdia quellen</i>	MUSM 70028	YARINA 10
<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	MUSM 69746	YARINA 11
<i>Electrophorus varii</i>	MUSM 70128	YARINA 12
<i>Steindachnerina leucisca</i>	MUSM 70129	YARINA 12
<i>Hypoptopoma gulare</i>	MUSM 70130	YARINA 12
<i>Aphyocharax pusillus</i>	MUSM 70131	YARINA 12
<i>Triportheus albus</i>	MUSM 70132	YARINA 12
<i>Pimelodella</i> sp. 2	MUSM 70133	YARINA 12
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	MUSM 70134	YARINA 12
<i>Pimelodus blochii</i>	MUSM 70135	YARINA 12
<i>Schizodon fasciatus</i>	MUSM 70136	YARINA 12
<i>Leporinus</i> cf. <i>parae</i>	MUSM 70137	YARINA 12
<i>Astyanax</i> sp.	MUSM 70138	YARINA 12
<i>Triportheus angulatus</i>	MUSM 70139	YARINA 12
<i>Roeboides affinis</i>	MUSM 70140	YARINA 12
<i>Hypoptopoma psilogaster</i>	MUSM 70141	YARINA 12
<i>Prionobrama filigera</i>	MUSM 70142	YARINA 12
<i>Steindachnerina dobula</i>	MUSM 70143	YARINA 12
<i>Moenkhausia</i> aff. <i>dichroura</i>	MUSM 70144	YARINA 12
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	MUSM 70145	YARINA 12
<i>Cichlasoma amazonarum</i>	MUSM 70146	YARINA 12
<i>Heros efasciatus</i>	MUSM 70147	YARINA 12
<i>Crenicichla proteus</i>	MUSM 70148	YARINA 12
<i>Mesonauta mirificus</i>	MUSM 70149	YARINA 12
<i>Hoplias malabaricus</i>	MUSM 69752	YARINA 13
<i>Cichlasoma amazonarum</i>	MUSM 69754	YARINA 13
<i>Hoplerethrinus unitaeniatus</i>	MUSM 69755	YARINA 13
<i>Hoplosternum littorale</i>	MUSM 69756	YARINA 13

## ANEXO 4: RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 00132-2021-PRODUCE/DGPCHDI



### RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Nº 00132-2021-PRODUCE/DGPCHDI

18/02/2021

**VISTOS:** El escrito con registro N° 00009775-2020 de fecha 3 de febrero de 2020, presentado por el señor **JORGE LUIS RAMÍREZ MALAVER**, así como los demás documentos relacionados con dicho registro; y,

#### CONSIDERANDO:

1. Mediante el escrito con registro N° 00009775-2020 de vistas, el señor **JORGE LUIS RAMÍREZ MALAVER** (en adelante el administrado), solicita autorización para efectuar investigación pesquera con extracción de muestras de especímenes hidrobiológicos, sin valor comercial y sin uso de embarcación pesquera para ejecutar el plan de investigación denominado: **"ADN Ambiental Metabarcoding: Una poderosa herramienta para la evaluación y monitoreo de ecosistemas contaminados en Perú"**, presentado en el marco del procedimiento N° 23 del Texto Único de Procedimientos Administrativos (TUPA) del Ministerio de la Producción, aprobado mediante Decreto Supremo N° 010-2015-PRODUCE, modificado por la Resolución Ministerial N° 010-2018-PRODUCE;

2. El procedimiento N° 23 del TUPA del Ministerio de la Producción referido precedentemente, establece los siguientes requisitos para obtener autorización de investigación, cuando se realice sin uso de embarcación pesquera: 1) solicitud dirigida al Director General de la Dirección General de Pesca para Consumo Humano Directo e Indirecto, y el compromiso formal de presentar los resultados de la investigación efectuada y de proporcionar los datos básicos e información que genere la investigación, según Formulario DECHDI-017; y, 2) copia del proyecto de investigación, suscrito y visado en cada hoja por el responsable del proyecto;

3. Al respecto, es menester indicar que mediante Decreto Supremo N° 004-2020-PRODUCE publicado con fecha 28 de febrero de 2020, se modificó, entre otros, el Reglamento de la Ley General de Pesca, aprobado por Decreto Supremo N° 012-2001-PE, estableciendo en su artículo 21 los siguientes requisitos para efectuar investigación pesquera especializada en los casos en que no se utilicen embarcaciones: I) solicitud de autorización conforme a lo previsto en el artículo 124 del Texto Único Ordenado (TUO) de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado mediante Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; y, II) plan de investigación debidamente suscrito por el responsable del proyecto;

4. En ese sentido, se procederá a evaluar el presente procedimiento de acuerdo a los requisitos que son aplicables conforme a lo establecido en el artículo 21 del Reglamento de la Ley General de Pesca antes glosado;

5. 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; cabe señalar que mediante el Formulario DECHDI-017, el cual tiene carácter de declaración jurada, el señor **JORGE LUIS RAMÍREZ MALAVER**, en su calidad de responsable del plan de investigación, ha solicitado la autorización del plan de investigación citado en el considerando 1 de la presente resolución. Por consiguiente, se ha dado cumplimiento al requisito antes descrito;

6. Con relación al requisito II), sobre el plan de investigación debidamente suscrito por el responsable del proyecto, debe indicarse que el administrado a través del escrito con registro N° 00009775-2020 de vistas, reformulado a través del escrito con registro N° 00009775-2020-1, presentó el plan de investigación denominado: **"ADN Ambiental Metabarcoding: Una poderosa herramienta para la evaluación y monitoreo de ecosistemas contaminados en Perú"**, el mismo que cuenta con veinte (20) estaciones de muestreo hidrobiológico ubicadas en los departamentos de Ucayali y de Puno, a ejecutarse por el periodo de veinticuatro (24) meses, el cual se encuentra suscrito por este último en su calidad de responsable de dicho plan. En ese contexto, se tiene por cumplido el presente requisito.

7. De la revisión del expediente se advierte que el citado proyecto de investigación tiene como **"objetivo principal"**, evaluar los cambios en la biodiversidad en el Lago Titicaca y en la laguna Yasnacocha causados por efectos antrópicos usando la metodología del ADN ambiental; y, como **"objetivos específicos"**, entre otros, realizar una biblioteca de referencia de la ictiofauna e invertebrados del Lago Titicaca y de la laguna Yasnacocha, a través de muestreos en zonas con bajo y alto impacto. Asimismo, de la revisión de dicho plan, se advierte que para la extracción de peces se utilizará, entre otros, una red de amastre a la orilla de 10 x 2.4 m y 20 mm de apertura de malla, en cuadrantes de 20 metros de largo. En tal sentido, se desprende que el plan de investigación contempla [como objetivo principal] el acceso a recursos genéticos, extremo que no se encuentra dentro de las competencias de esta dirección general; por lo que, para tales efectos, el administrado deberá solicitar dicho acceso a la Dirección General de Asuntos Ambientales Pesqueros y Acuícolas del Ministerio de la Producción una vez otorgada la autorización correspondiente a través de la presente resolución, correspondiendo a esta dirección general emitir pronunciamiento respecto al extremo de la extracción de los recursos hidrobiológicos.

8. 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 nacional de los recursos marinos y continentales;

9. Al respecto, mediante Oficio N° 00001069-2020-PRODUCE/DE/CHDI, se solicitó opinión técnica al IMARPE respecto al plan de investigación referido en el considerando 1 de la presente resolución. Dicha entidad mediante Oficio N° 755-2020-IMARPE/PE, remitió su opinión técnica en la que concluye: *"[...] El formulante presenta una propuesta adecuada que permitirá la colecta y procesamiento de las comunidades hidrobiológicas [...]"*.

10. Asimismo, 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 (IAP);

11. En ese contexto, mediante Oficios N° 00001627-2020-PRODUCE/DE/CHDI y N° 00002540-2020-PRODUCE/DE/CHDI se solicitó opinión técnica al IAP respecto al plan de investigación referido en el considerando 1 de la presente resolución. La aludida entidad mediante Oficio N° 0031-2021-IAP-PE, adjunta el Memorandum N° 006-2021-IAP-AQUAREC/LBGM/CRGD, por el cual se concluye lo siguiente: *"[...] el plan de trabajo está bien explicado y claro, por lo que se puede observar que la realización del proyecto no causará impactos biológicos, ecológicos ni económicos sobre los ecosistemas y su fauna a estudiar [...]"*.

12. Por lo antes expuesto, y en atención a las opiniones favorables efectuadas por el IMARPE y el IAP a través de los Oficios N° 755-2020-IMARPE/PE y N° 0031-2021-IAP-PE, respectivamente, se coge que la administrada 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 pesquera, conforme a los términos contenidos en el plan de investigación denominado: **"ADN Ambiental Metabarcoding: Una poderosa herramienta para la evaluación y monitoreo de ecosistemas contaminados en Perú"**.

presentado mediante escrito con registro N° 00009775-2020 de visos, reformulado a través del escrito con registro N° 00009775-2020-1;

13. Estando a lo informado por la Dirección de Extracción para Consumo Humano Directo e Indirecto a través del Informe Técnico N° 00000014-2021-ERAMOS; 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 al señor **JORGE LUIS RAMÍREZ MALAVER**, la autorización para efectuar investigación pesquera especializada sin uso de embarcación pesquera, conforme a los términos contenidos en el plan de investigación denominado: **"ADN Ambiental Metabarcoding: Una poderosa herramienta para la evaluación y monitoreo de ecosistemas contaminados en Perú"**, presentado mediante escrito con registro N° 00009775-2020, reformulado a través del escrito con registro N° 00009775-2020-1, por el periodo de veinticuatro (24) meses contados a partir del día siguiente de la notificación de la presente Resolución Directoral. El plan de investigación comprende los siguientes puntos de monitoreo hidrobiológico para su ejecución:

N°	PUNTOS DE MONITOREO (Zona IAS y IAP)		UBICACIÓN GEOGRÁFICA		
	ESTE	NORTE	DISTRITO	PROVINCIA	DEPARTAMENTO
1	546880	9078905	Tarinacocha	Coronel Portillo	Ucayali
2	546749	9078845			
3	544701	9078311			
4	544233	9078871			
5	539532.4	9087221			
6	539806	9087378			
7	540561.53	9088239			
8	541533.45	9083374			
9	543061.65	9083731			
10	544283.34	9081813			
11	453200	8228489	Condurini	El Collao	Puno
12	421389	8240932	Plateria	Puno	
13	413150	8272486	Capachica	Puno	
14	392487	8241421	Anapa	Anapuro	
15	418134	8304874	Condurini	El Collao	
16	404900	8288930	Acora	Puno	
17	402749	8275194	Coña	Puno	
18	443200	8300632	Condurini	El Collao	
19	499480	8202738	Acora	Puno	
20	500000	8231064	Condurini	El Collao	

**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.



Firmado digitalmente por RODRIGUEZ URIBE Martin Alexia FAU 20504794837 hard  
Fecha: 2021/02/18 23:34:48-0500

**Artículo 4.-** El señor **JORGE LUIS RAMÍREZ MALAVER**, dentro de los sesenta (60) días calendario posteriores a la culminación del plazo concedido en la autorización correspondiente, deberá presentar la información completa relativa a los resultados de la investigación realizada.

**Artículo 5.-** En la ejecución del plan de investigación, el señor **JORGE LUIS RAMÍREZ MALAVER** deberá observar estrictamente lo dispuesto en el artículo 27 de la Ley N° 26539, 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.-** El señor **JORGE LUIS RAMÍREZ MALAVER**, deberá solicitar a la Dirección General de Asuntos Ambientales Pesqueros y Acuícolas, el acceso al recurso genético contemplado en el plan de investigación referido en el artículo 1 de la presente resolución.

**Artículo 7.-** La presente autorización no constituye el otorgamiento de otro derecho a favor del titular del plan de investigación.

**Artículo 8.-** 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 Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IAP); así como disponer su publicación en el Portal Institucional del Ministerio de la Producción ([www.gob.pe/produce](http://www.gob.pe/produce)).

Se registra y se comunica.



Firmado digitalmente por CABALLERO GONZALES  
Veronica Carola FAU 20504794837 hard  
Fecha: Ministerio de la Producción  
Motivo: Añor del documento  
Fecha: 2021/02/19 12:22:59-0500

**VERÓNICA CAROLA CABALLERO GONZÁLES**  
Directora General  
Dirección General de Pesca para Consumo  
Humano Directo e Indirecto

## ANEXO 5: LISTA DE ESPECIES POR ESTACIÓN DE MUESTREO REGISTRADA EN LA LAGUNA YARINACOCHA

Taxón	Yarina 1	Yarina 2	Yarina 3	Yarina 4	Yarina 5	Yarina 6	Yarina 7	Yarina 8	Yarina 9	Yarina 10	Yarina 11	Yarina 12	Yarina 13	N
<b>CLUPEIFORMES</b>														
<b>Engraulidae</b>														
<i>Anchoviella guianensis</i>					1									1
<i>Jurengraulis juruensis</i>				24										24
<i>Lycengraulis batesii</i>				2										2
<b>Pristigasteridae</b>														
<i>Pristigaster cayana</i>				1										1
<b>CHARACIFORMES</b>														
<b>Anostomidae</b>														
<i>Abramites hypselonotus</i>								23						23
<i>Leporinus cf. parae</i>	5	4		3	G4			6	3	3		12		40
<i>Megaleporinus trifasciatus</i>							1							1
<i>Schizodon fasciatus</i>	1			4				1	7	10		37		60
<b>Characidae</b>														
<i>Aphyocharax pusillus</i>	1			11				1	20			2		35
<i>Astyanax sp.</i>								1				2		3
<i>Brachychalcinus copei</i>					11									11
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>				25	15		4	80	142	5		85		356
<i>Cynopotamus amazonum</i>							1							1
<i>Galeocharax gulo</i>								1						1
<i>Moenkhausia aff. dichroua</i>				21				2		11		8		42
<i>Moenkhausia barbouri</i>				8										8
<i>Moenkhausia intermedia</i>		1								107				108
<i>Odontostilbe fugitiva</i>				3			1	1						5
<i>Prionobrama filigera</i>				84	32		35	2	67			20		240
<i>Protocheiropodon pi</i>					2			1						3
<i>Roeboides affinis</i>					4							7		11
<i>Roeboides myersi</i>					2									2
<i>Tetragonopterus argenteus</i>				5	4			5	24	8		25		71
<b>Curimatidae</b>														
<i>Curimatella meyeri</i>			2			3								5
<i>Potamorhina altamazonica</i>				1		1								2
<i>Psectrogaster amazonica</i>			3	5		2								10
<i>Psectrogaster rutiloides</i>			2											2
<i>Steindachnerina dobula</i>						1			2			2		5
<i>Steindachnerina leucisca</i>									2			9		11
<b>Cynodontidae</b>														
<i>Cynodon gibbus</i>						1								1
<i>Hydrolycus scomberoides</i>					2									2
<b>Erythrinidae</b>														
<i>Hoplerethrinus unitaeniatus</i>													5	5
<i>Hoplias malabaricus</i>				2			2	1		1			2	8
<b>Gasteropelecidae</b>														

<i>Thoracocharax stellatus</i>				10					8		18	
Hemiodontidae												
<i>Hemiodus aff. microlepis</i>			4								4	
Prochilodontidae												
<i>Prochilodus nigricans</i>		8	3	1		4	28	11	10	2	15	82
Serrasalminae												
<i>Mylossoma albiscopum</i>	1			4				1				6
<i>Piaractus brachypomus</i>								1				1
<i>Pygocentrus nattereri</i>			2		1					1		4
Triportheidae												
<i>Tripорtheus albus</i>	3	16						123				142
<i>Tripорtheus angulatus</i>				1				5		20		26
<i>Tripорtheus curtus</i>	2			2						45		49
<i>Tripорtheus rotundatus</i>		1						5				6
GYMNOTIFORMES												
Gymnotidae												
<i>Electrophorus varii</i>										4		4
Sternopygidae												
<i>Eigenmannia limbata</i>				1		1						2
<i>Eigenmannia virescens</i>				2								2
<i>Sternopygus macrurus</i>				1								1
SILURIFORMES												
Auchenipteridae												
<i>Epapterus dispilurus</i>				2								2
Callichthyidae												
<i>Corydoras multiradiatus</i>						1						1
<i>Corydoras splendens</i>						1						1
<i>Hoplosternum littorale</i>											1	8
Doradidae												
<i>Ossancora asterophysa</i>			3									3
<i>Ossancora punctata</i>			3					1				4
<i>Oxydoras niger</i>				1								1
<i>Platydoras armatulus</i>				1								1
Heptapteridae												
<i>Pimelodella sp. 1</i>			1	3		1	4	5		17		31
<i>Pimelodella sp. 2</i>							3					3
<i>Rhamdia quellen</i>									2			2
Loricariidae												
<i>Ancistrus alga</i>				3		3						6
<i>Farlowella amazonum</i>						1		3				4
<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i>				1								1
<i>Hypoptopoma gulare</i>			6			1			1	2		10
<i>Hypoptopoma psilogaster</i>			1							6		7
<i>Hypoptopoma thoracatum</i>						1						1
<i>Hypostomus oculus</i>			5	3		1		3				12
<i>Loricaria simillima</i>				8				1				9

<i>Pterygoplichthys pardalis</i>				4	3			1	1	1	1	2		13
<i>Rineloricaria</i> sp.	1					4				3				8
<i>Rineloricaria wolfei</i>						2								2
<i>Sturisoma nigrirostrum</i>					7									7
Pimelodidae														
<i>Hypophthalmus edentatus</i>				1										1
<i>Pimelodus blochii</i>	1	1		1	1		1		1			1		29
<i>Sorubim lima</i>					1									1
CARANGIFORMES														
Achiridae														
<i>Hypoclinemus mentalis</i>	1	1												2
CICHLIFORMES														
Cichlidae														
<i>Cichla monoculus</i>	1			5						2				8
<i>Cichlasoma amazonarum</i>												2	1	3
<i>Crenicichla cyanonotus</i>		1		4				1				3		9
<i>Crenicichla proteus</i>				6										6
<i>Crenicichla sedentaria</i>				1										1
<i>Heros efasciatus</i>					2					5		2		9
<i>Mesonauta mirificus</i>										6		2		8
<i>Pterophyllum scalare</i>				9										9
<i>Satanoperca jurupari</i>	1			6										7
PERCIFORMES														
Sciaenidae														
<i>Plagioscion squamosissimus</i>				1										1
Total general	11	8	7	32	29	8	18	16	22	17	3	25	5	1678



## ANEXO 6: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN KIT Wizard® SV Genomic DNA Purification System

LABORATORIO DE SISTEMÁTICA MOLECULAR Y FILOGEOGRAFÍA  
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE TEJIDO ANIMAL  
KIT: Wizard® SV Genomic DNA Purification System

### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

#### PASO 1:

Encima de un pedazo de papel aluminio, corte una muestra de tejido de longitud aproximadamente de 3mm. En un pedazo de papel toalla limpio, coloque la muestra para que absorba el etanol en el que estuvo preservada. Triture la muestra de tejido en trozos bien pequeños y colóquelos en un tubo de 1,5 ml.

#### PASO 2:

Si trabaja con una sola muestra añada al tubo los volúmenes de los reactivos indicados en la tabla. Si trabaja con varias muestras, multiplique el volumen de cada reactivo indicado en la tabla por el número de muestras más uno (N+1, donde N= número de muestras), y añada el volumen total en un tubo. A esa mezcla la llamaremos *solución de digestión*. El volumen de solución de digestión para cada muestra será de 275 uL.

<b>Digestion Solution Master Mix</b>	<b>Volume per Sample</b>
Nuclei Lysis Solution	200µl
0.5M EDTA (pH 8.0)	50µl
Proteinase K, 20mg/ml	20µl
RNase A Solution, 4mg/ml	5µl
<b>Total Volume</b>	<b>275µl</b>

#### PASO 3:

Incube los tubos de muestra durante 1 a 3 horas a 55°C en el termo-mixer, manteniendo una revolución de 200 rpm. Verifique cada 15 minutos el tubo con la muestra y asegúrese de que el tejido está siendo lisado, de lo contrario homogenizar el volumen gentilmente con los dedos y vuelva a colocarlo en el termo-mixer.

*\*durante este tiempo asegúrese de que haya sido añadido etanol al 95% a la solución buffer de lavado o Column Wash Solution (CWA). El frasco debe tener una marca en la etiqueta y en la tapa indicando que ya contiene alcohol. Si trabaja con un frasco de CWA nuevo, agregue 315ml de etanol molecular al 95%. Para esto, diluya etanol absoluto hasta llegar a esta concentración, fíjese bien en la concentración exacta a la que se encuentra el etanol absoluto a ser utilizado.*

#### PASO 4:

Luego que termine la incubación y el tejido haya sido completamente lisado, añada 250 µl de tampón de lisis Wizard® SV a cada muestra. Luego vortexe vigorosamente.

## PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO DEL LISADO UTILIZANDO UNA MICROCENTRÍFUGA

### **PASO 6:**

Ensamble las minicolumnas dentro su respectivo tubo colector. Una por cada muestra.

Transfiera cada lisado de muestra del tubo de 1,5 ml dentro de la minicolumna respectiva. El volumen total debe ser aproximadamente 525 ul.

### **PASO 7:**

Centrifugue el ensamblaje a  $13.000 \times g$  durante 3 minutos.

### **PASO 8:**

Retirar la minicolumna del ensamblaje y desechar el líquido que fue depositado en el tubo colector por inversión. Luego vuelva a colocar la minicolumna dentro del mismo tubo colector evitando que el borde de la columna haga contacto con el tubo colector.

### **PASO 9:**

Agregue 650  $\mu$ l de solución de lavado de columna (CWA, verificar que fue agregado etanol al 95% al frasco) a cada ensamblaje. Centrifugar a  $13.000 \times g$  durante 1 minuto. Descartar el líquido del tubo colector. Repita este paso para un total de 4 lavados.

### **PASO 10:**

Deseche el líquido del tubo colector y vuelva a ensamblar la minicolumna. Centrifugar durante 2 minutos a  $13.000 \times g$  para secar la matriz de unión.

### **PASO 11:**

Transfiera la minicolumna a un nuevo tubo de 1,5 ml (lo llamaremos tubo de elución). Agregue 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Incubar durante 4 minutos a temperatura ambiente.

### **PASO 12:**

Centrifugue el conjunto de minicolumna con el tubo de elución a  $13.000 \times g$  durante 1 minuto.

No deseche el líquido en el tubo de elución. Reserve también la columna en un nuevo tubo de 1,5 ul.

### **PASO 13:**

El líquido del tubo de elución contiene el ADN purificado. Cuantifique el ADN en el Nanodrop (verificar el protocolo). Anote sus resultados.

En caso la concentración obtenida sea muy baja, utilizando la minicolumna reservada y un nuevo tubo de elución, vuelva a adicionar 100 ul de agua libre de nucleasas. Incubar durante 4 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue el conjunto de minicolumna con el tubo de elución a  $13.000 \times g$  durante 1 minuto. Cuantifique el líquido en el tubo de elución y anote sus resultados.

### **PASO 14:**

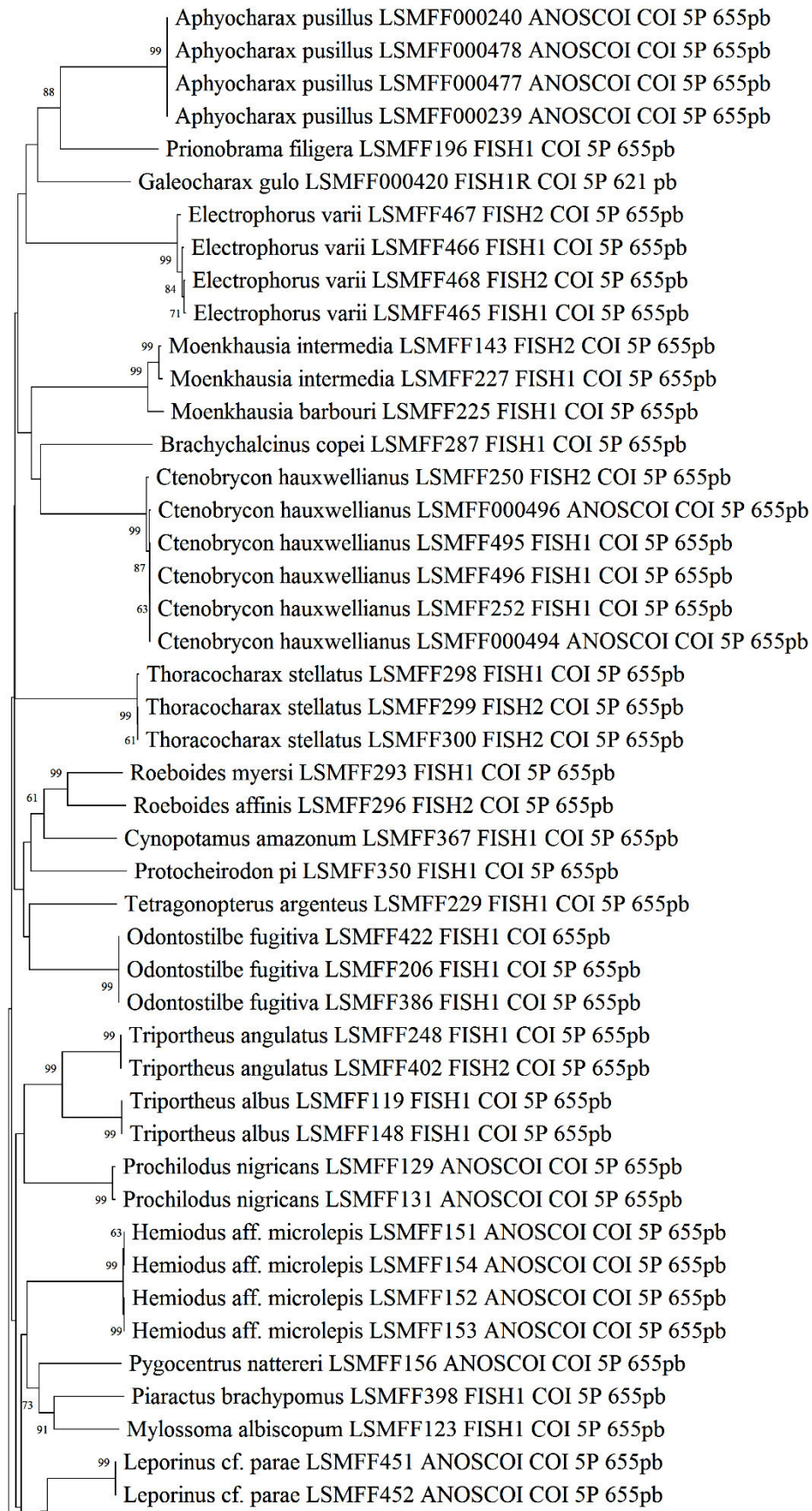
Descarte la minicolumna, etiquete el tubo y almacene el ADN purificado entre  $-20$  y  $-70$  ° C.

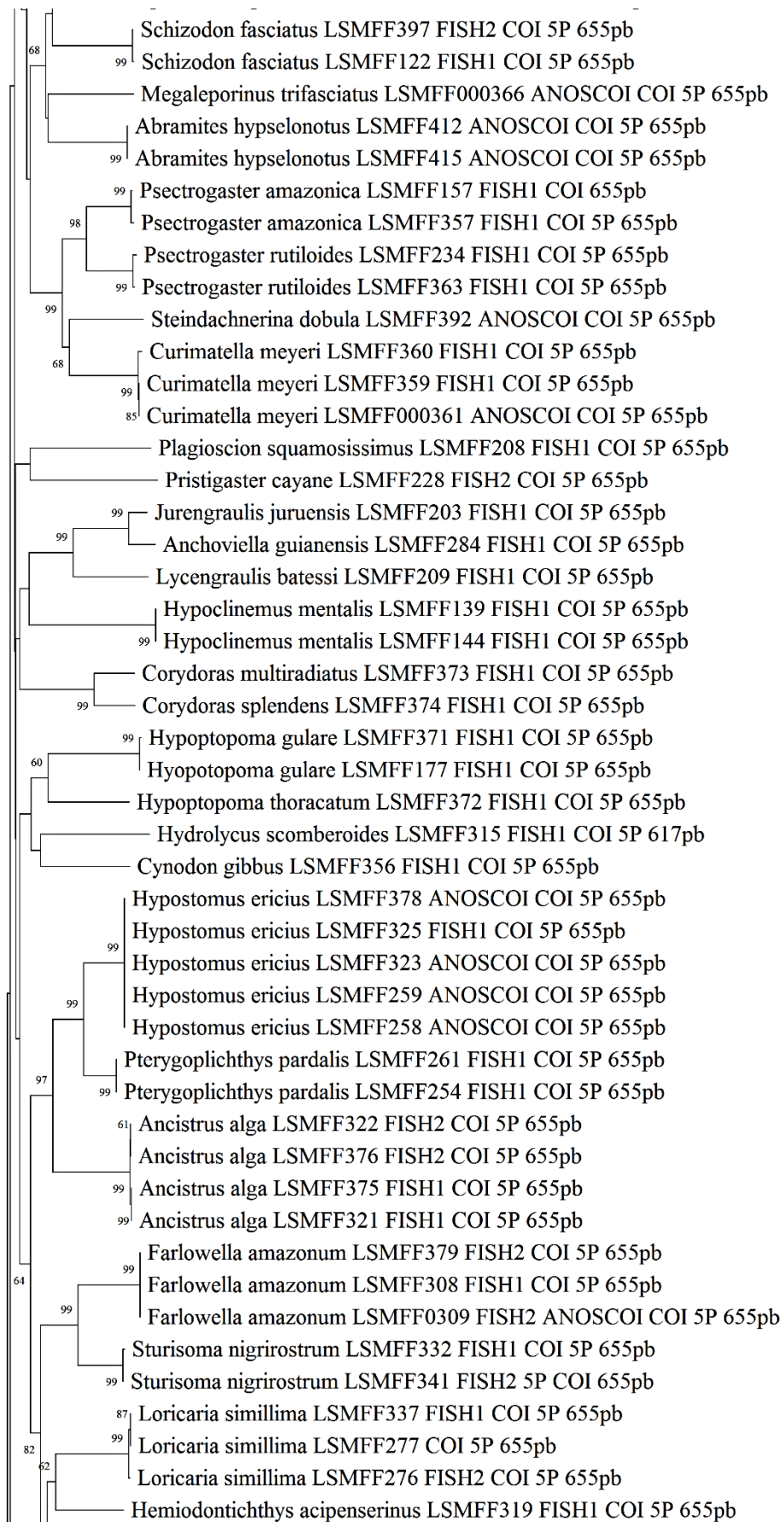
## **ANEXO 7: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON SOLUCIÓN SALINA**

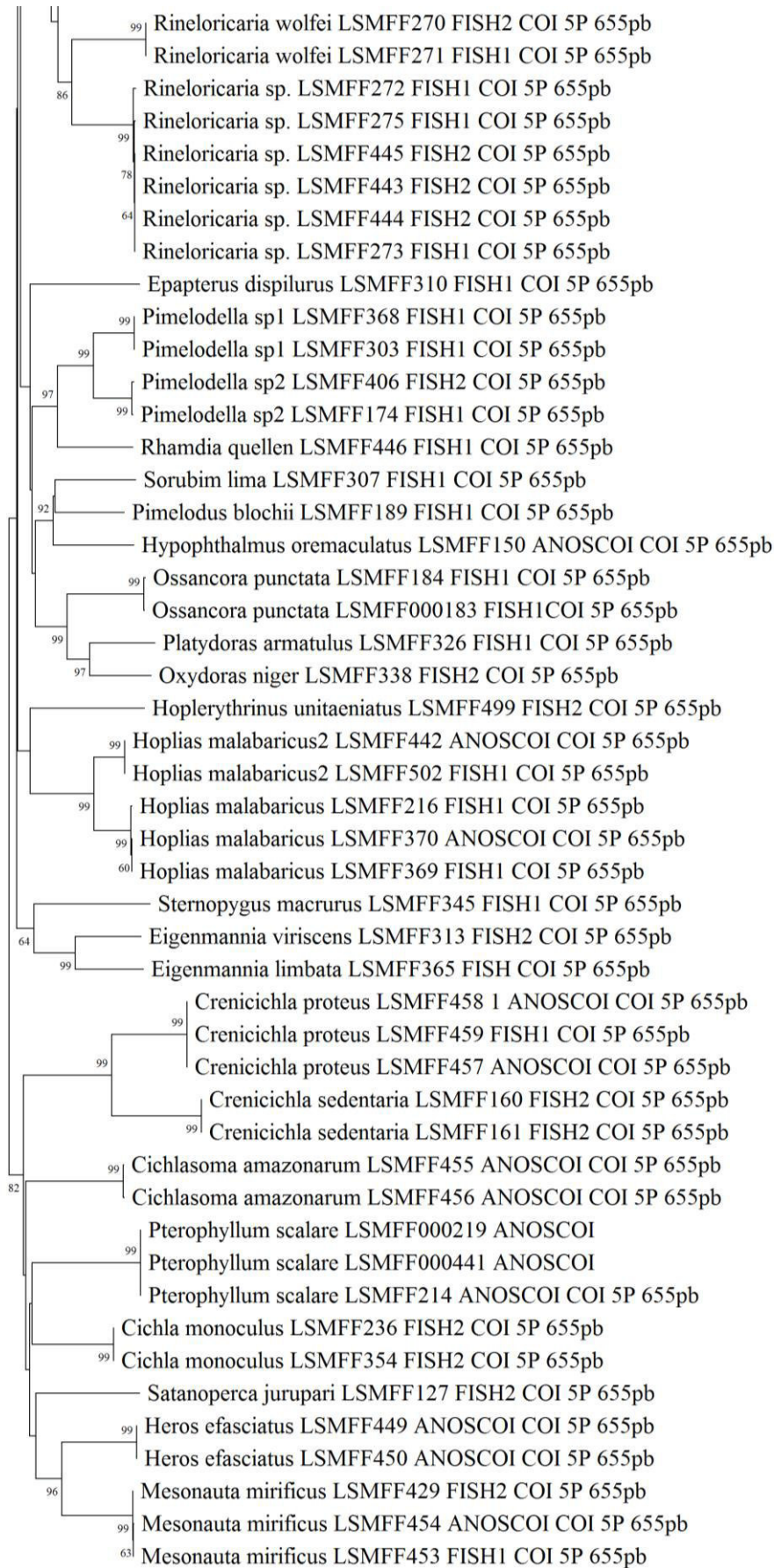
### **LABORATORIO DE SISTEMÁTICA MOLECULAR Y FILOGEOGRAFÍA PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON SOLUCIÓN SALINA**

1. Adicionar 290 ul de solución salina (solución tampón de lisis) (0.4 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 2 mM EDTA pH 8.0) y 10 ul de proteinasa K (20mg/ml) a cada muestra de tejido.
2. Incubar el tubo a 56°C hasta que el tejido esté completamente lisado. Vortexar vigorosamente de 15 en 15 minutos para ayudar a romper el tejido.
3. Adicionar 100 ul de NaCl 5M. Homogenizar la mezcla gentilmente invirtiendo el tubo por lo menos 20 veces.
4. Centrifugar a 10 000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo (nominar nuevamente el nuevo tubo usando lápiz). Descartar el tubo con el precipitado, tener cuidado de no traspasar el precipitado (descartarlo)
6. En el nuevo tubo que contiene el sobrenadante recolectado, adicionar 600uL de etanol absoluto (100%) helado.
7. Colocar la solución obtenida en el “freezer” (-20°C) por 2 horas. Se puede mantener la muestra en este paso hasta el día siguiente de ser necesario, pero no es recomendable.
8. Centrifugar por 30 minutos a 14 000 RPM, a 4°C. y descartar el etanol por inversión.
9. Adicionar 1 ml de etanol a 70% helado (preparado con agua estéril y mantenido en la refrigeradora).
10. Centrifugar por 5 minutos a 14 000 RPM.
11. Descartar etanol por inversión. Centrifugar nuevamente por 1 minuto a 14 000 RPM para descartar todo el etanol.
12. Con ayuda de la pipeta coleccionar el resto de etanol que pudo quedarse en el tubo, teniendo cuidado de no tocar la punta con el fondo del tubo, pues podría jalar el pellet que contiene el ADN.
13. Secar el ADN a 60° por 15 minutos con el tubo abierto y tapado con un papel servilleta nuevo. Se puede mantener la muestra en este paso hasta el día siguiente de ser necesario, pero no a 60 grados sino a temperatura ambiente con el tubo invertido; sin embargo, tampoco es recomendable dejar tantas horas.
14. Adicionar 50 uL de TE o agua estéril y conservar el ADN a -20°C hasta su procesamiento.

**ANEXO 8: ÁRBOL NJ EXPANDIDO BASADO EN DISTANCIAS K2P**







0.02

**ANEXO 9: MEDIA DISTANCIA INTRAESPECÍFICA, MÁXIMA DISTANCIA INTRAESPECÍFICA, ESPECIE MÁS PROXIMA Y DISTANCIA AL VECINO MÁS PRÓXIMO (NND) PARA LAS ESPECIES CON MÁS DE UNA SECUENCIAS COI**

Especies	Promedio intra.(%)	Máx. intra /%)	NND (%)	Vecino más próximo
<i>Abramites hypselonotus</i>	0	0	15.44	<i>Leporinus cf. parae</i>
<i>Leporinus cf. parae</i>	0	0	13.99	<i>Schizodon fasciatus</i>
<i>Schizodon fasciatus</i>	0.15	0.15	13.99	<i>Leporinus cf. parae</i>
<i>Aphyocharax pusillus</i>	0	0	22.34	<i>Triporthesus albus</i>
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	0.28	0.61	21.65	<i>Hoplias malabaricus</i>
<i>Moenkhausia intermedia</i>	0.46	0.46	22.48	<i>Prochilodus nigricans</i>
<i>Odontostilbe fugitiva</i>	0	0	18.86	<i>Triporthesus angulatus</i>
<i>Triporthesus albus</i>	0	0	11.04	<i>Triporthesus angulatus</i>
<i>Triporthesus angulatus</i>	0	0	11.04	<i>Triporthesus albus</i>
<i>Curimatella meyeri</i>	0.31	0.46	13.9	<i>Psectrogaster amazonica</i>
<i>Psectrogaster amazonica</i>	0.31	0.31	8.8	<i>Psectrogaster rutiloides</i>
<i>Psectrogaster rutiloides</i>	0.46	0.46	8.8	<i>Psectrogaster amazonica</i>
<i>Hoplias malabaricus</i>	3.91	6.47	19.55	<i>Odontostilbe fugitiva</i>
<i>Thoracocharax stellatus</i>	0.1	0.15	18.9	<i>Abramites hypselonotus</i>
<i>Hemiodus aff. microlepis</i>	0.1	0.15	18.3	<i>Prochilodus nigricans</i>
<i>Prochilodus nigricans</i>	0.46	0.46	16.2	<i>Leporinus cf. parae</i>
<i>Cichla monoculus</i>	0	0	16.51	<i>Mesonauta mirificus</i>
<i>Cichlasoma amazonarum</i>	0.15	0.15	17.97	<i>Heros efasciatus</i>
<i>Crenicichla proteus</i>	0	0	15.54	<i>Crenicichla sedentaria</i>
<i>Crenicichla sedentaria</i>	0	0	15.54	<i>Crenicichla proteus</i>
<i>Heros efasciatus</i>	0	0	13.74	<i>Mesonauta mirificus</i>
<i>Mesonauta mirificus</i>	0.1	0.15	13.74	<i>Heros efasciatus</i>
<i>Pterophyllum scalare</i>	0	0	17.94	<i>Cichla monoculus</i>
<i>Electrophorus varii</i>	0.59	0.92	23.7	<i>Triporthesus albus</i>
<i>Hypoclinemus mentalis</i>	0	0	20.55	<i>Hypostomus ericius</i>
<i>Ossancora punctata</i>	0.15	0.15	18.91	<i>Triporthesus albus</i>
<i>Pimelodella sp. 1</i>	0.31	0.31	7.49	<i>Pimelodella sp. 2</i>
<i>Pimelodella sp. 2</i>	0	0	7.49	<i>Pimelodella sp. 1</i>
<i>Ancistrus alga</i>	0.1	0.15	13.49	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>
<i>Farlowella amazonum</i>	0	0	10.15	<i>Sturisoma nigrirostrum</i>
<i>Hypoptopoma gulare</i>	0.15	0.15	18.77	<i>Sturisoma nigrirostrum</i>
<i>Hypostomus ericius</i>	0	0	7	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>
<i>Loricaria simillima</i>	0.31	0.31	14.66	<i>Rineloricaria sp.</i>
<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	0	0	7	<i>Hypostomus ericius</i>
<i>Rineloricaria sp.</i>	0.15	0.46	12.73	<i>Rineloricaria wolfei</i>
<i>Rineloricaria wolfei</i>	0	0	12.73	<i>Rineloricaria sp.</i>
<i>Sturisoma nigrirostrum</i>	0.15	0.15	10.15	<i>Farlowella amazonum</i>

**ANEXO 10: MOTUs CONSENSO OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE PTP, BPTP Y GMYC. EN ROJO MOTUS NO CONCORDANTES CON LA TAXONOMÍA**

Especies	MOTUs consenso	Secuencias
<i>Abramites hypselonotus</i>	MOTU 1	Abramites_hypselonotus_LSMFF412, Abramites_hypselonotus_LSMFF415
<i>Anchoviella guianensis</i>	MOTU 2	Anchoviella_guianensis_LSMFF284
<i>Ancistrus alga</i>	MOTU 3	Ancistrus_alga_LSMFF321, Ancistrus_alga_LSMFF322, Ancistrus_alga_LSMFF375, Ancistrus_alga_LSMFF376
<i>Aphyocharax pusillus</i>	MOTU 4	Aphyocharax_pusillus_LSMFF000239, Aphyocharax_pusillus_LSMFF000240, Aphyocharax_pusillus_LSMFF000477, Aphyocharax_pusillus_LSMFF000478
<i>Brachyhalcinus copei</i>	MOTU 5	Brachyhalcinus_copei_LSMFF287
<i>Cichla monoculus</i>	MOTU 6	Cichla_monoculus_LSMFF236, Cichla_monoculus_LSMFF354
<i>Cichlasoma amazonarum</i>	MOTU 7	Cichlasoma_amazonarum_LSMFF455, Cichlasoma_amazonarum_LSMFF456
<i>Corydoras multiradiatus</i>	MOTU 8	Corydoras_multiradiatus_LSMFF373
<i>Corydoras splendens</i>	MOTU 9	Corydoras_splendens_LSMFF374
<i>Crenicichla proteus</i>	MOTU 10	Crenicichla_proteus_LSMFF457, Crenicichla_proteus_LSMFF458, Crenicichla_proteus_LSMFF459
<i>Crenicichla sedentaria</i>	MOTU 11	Crenicichla_sedentaria_LSMFF160, Crenicichla_sedentaria_LSMFF161
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	MOTU 12	Ctenobrycon_hauxwellianus_LSMFF000494, Ctenobrycon_hauxwellianus_LSMFF000496, Ctenobrycon_hauxwellianus_LSMFF250, Ctenobrycon_hauxwellianus_LSMFF252, Ctenobrycon_hauxwellianus_LSMFF495
<i>Curimatella meyeri</i>	MOTU 13	Curimatella_meyeri_LSMFF000361, Curimatella_meyeri_LSMFF359, Curimatella_meyeri_LSMFF360
<i>Cynodon gibbus</i>	MOTU 14	Cynodon_gibbus_LSMFF356
<i>Cynopotamus amazonum</i>	MOTU 15	Cynopotamus_amazonum_LSMFF367
<i>Eigenmannia limbata</i>	MOTU 16	Eigenmannia_limbata_LSMFF365
<i>Eigenmannia virescens</i>	MOTU 17	Eigenmannia_virescens_LSMFF313

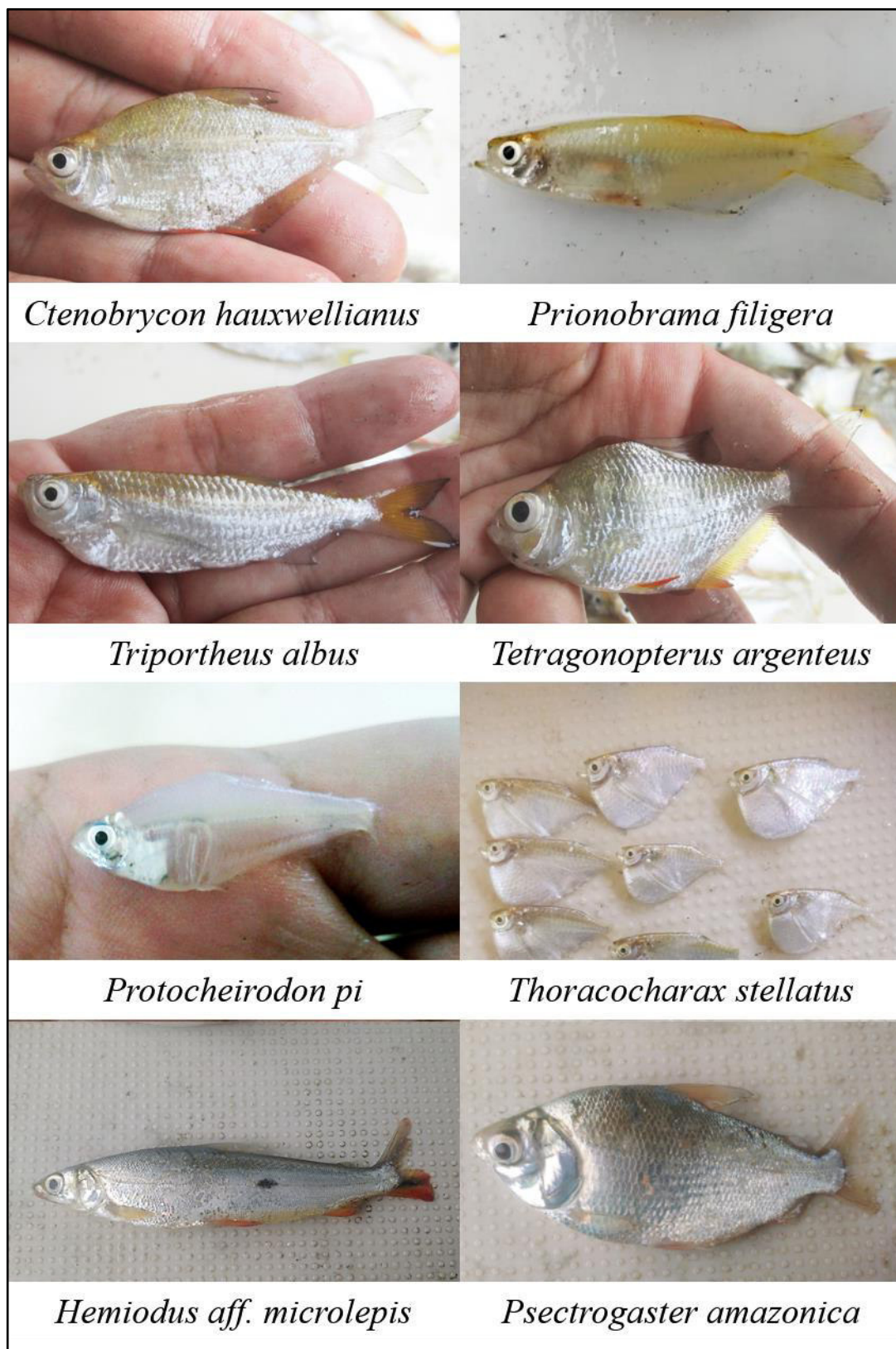


<i>Electrophorus varius</i>	MOTU 18	Electrophorus_varius_LSMFF465, Electrophorus_varius_LSMFF466, Electrophorus_varius_LSMFF467, Electrophorus_varius_LSMFF468
<i>Epapterus dispilurus</i>	MOTU 19	Epapterus_dispilurus_LSMFF310
<i>Farlowella amazonum</i>	MOTU 20	Farlowella_amazonum_LSMFF0309, Farlowella_amazonum_LSMFF308, Farlowella_amazonum_LSMFF379
<i>Galeocharax gulo</i>	MOTU 21	Galeocharax_gulo_LSMFF000420
<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i>	MOTU 22	Hemiodontichthys_acipenserinus_LSMFF319
<i>Hemiodus aff. microlepis</i>	MOTU 23	Hemiodus_aff_microlepis_LSMFF151, Hemiodus_aff_microlepis_LSMFF152, Hemiodus_aff_microlepis_LSMFF153, Hemiodus_aff_microlepis_LSMFF154
<i>Heros efasciatus</i>	MOTU 24	Heros_efasciatus_LSMFF000317, Heros_efasciatus_LSMFF449, Heros_efasciatus_LSMFF450
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	MOTU 25	Hoplerythrinus_unitaeniatus_LSMFF499
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	MOTU 26	Hydrolycus_scomberoides_LSMFF315
<i>Hypoclinemus mentalis</i>	MOTU 27	Hypoclinemus_mentalis_LSMFF139, Hypoclinemus_mentalis_LSMFF144
<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	MOTU 28	Hypophthalmus_oremaculatus_LSMFF150
<i>Hypoptopoma gulare</i>	MOTU 29	Hypoptopoma_gulare_LSMFF177, Hypoptopoma_gulare_LSMFF371
<i>Hypoptopoma thoracatum</i>	MOTU 30	Hypoptopoma_thoracatum_LSMFF372
<i>Hypostomus ericius</i>	MOTU 31	Hypostomus_ericus_LSMFF258, Hypostomus_ericus_LSMFF259, Hypostomus_ericus_LSMFF323, Hypostomus_ericus_LSMFF325, Hypostomus_ericus_LSMFF378
<i>Jurengraulis juruensis</i>	MOTU 32	Jurengraulis_juruensis_LSMFF203
<i>Leporinus cf. parae</i>	MOTU 33	Leporinus_cf_parae_LSMFF451, Leporinus_cf_parae_LSMFF452
<i>Loricaria simillima</i>	MOTU 34	Loricaria_simillima_LSMFF276, Loricaria_simillima_LSMFF277, Loricaria_simillima_LSMFF337
<i>Lycengraulis batesii</i>	MOTU 35	Lycengraulis_batesii_LSMFF209
<i>Megaleporinus trifasciatus</i>	MOTU 36	Megaleporinus_trifasciatus_LSMFF000366
<i>Mesonauta mirificus</i>	MOTU 37	Mesonauta_mirificus_LSMFF429, Mesonauta_mirificus_LSMFF453, Mesonauta_mirificus_LSMFF454
<i>Moenkhausia barboursi</i>	MOTU 38	Moenkhausia_barboursi_LSMFF225

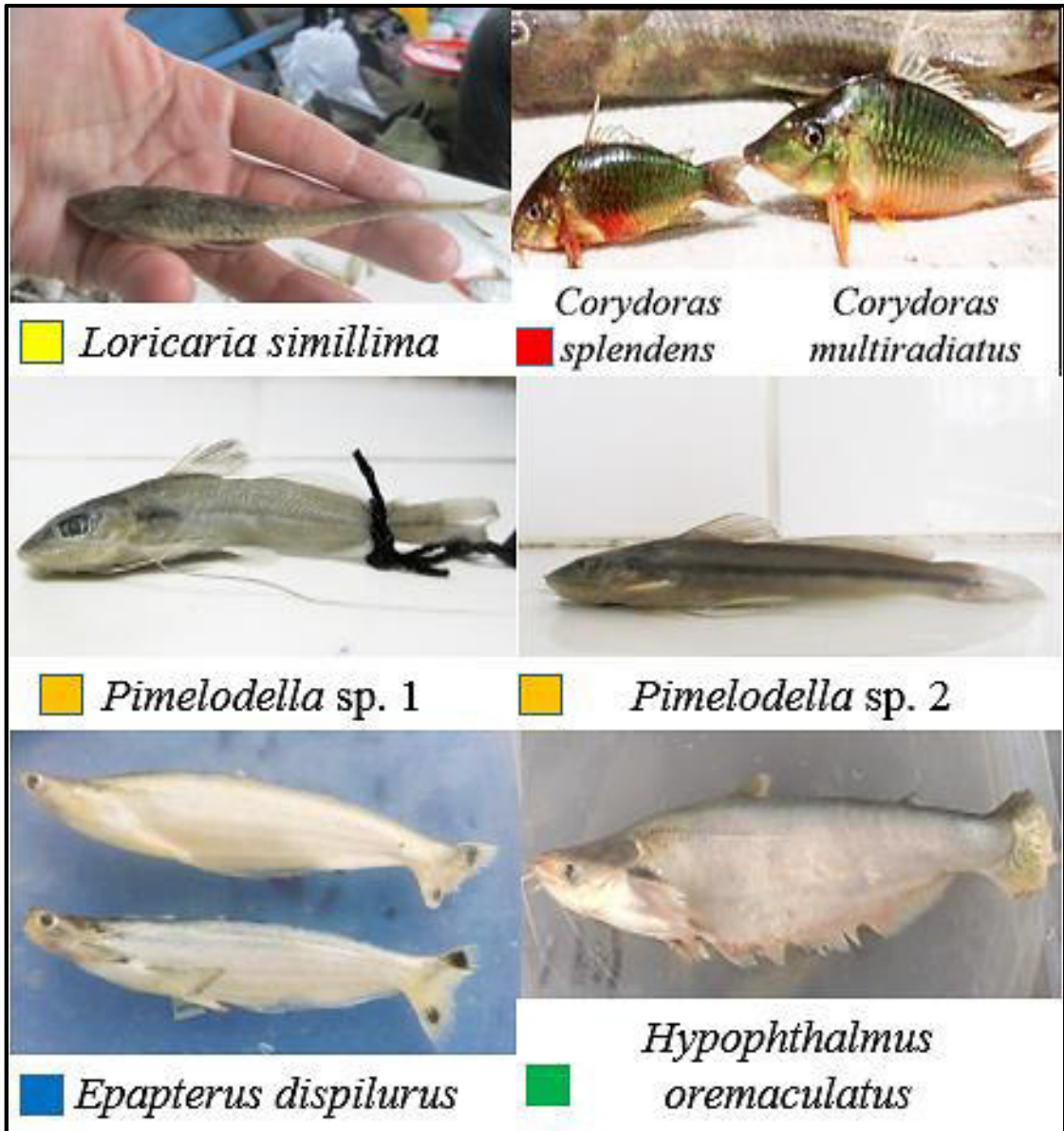
<i>Moenkhausia intermedia</i>	MOTU 39	Moenkhausia_intermedia_LSMFF143, Moenkhausia_intermedia_LSMFF227
<i>Mylossoma albiscopum</i>	MOTU 40	Mylossoma_albiscopum_LSMFF123
<i>Odontostilbe fugitiva</i>	MOTU 41	Odontostilbe_fugitiva_LSMFF000207, Odontostilbe_fugitiva_LSMFF206, Odontostilbe_fugitiva_LSMFF386, Odontostilbe_fugitiva_LSMFF422
<i>Ossancora punctata</i>	MOTU 42	Ossancora_punctata_LSMFF000183, Ossancora_punctata_LSMFF184
<i>Oxydoras niger</i>	MOTU 43	Oxydoras_niger_LSMFF338
<i>Piaractus brachypomus</i>	MOTU 44	Piaractus_brachypomus_LSMFF398
<i>Pimelodella</i> sp. 1	MOTU 45	Pimelodella_sp1_LSMFF303, Pimelodella_sp1_LSMFF368
<i>Pimelodella</i> sp. 2	MOTU 46	Pimelodella_sp2_LSMFF174, Pimelodella_sp2_LSMFF406
<i>Pimelodus blochii</i>	MOTU 47	Pimelodus_blochii_LSMFF189
<i>Plagioscion squamosissimus</i>	MOTU 48	Plagioscion_squamosissimus_LSMFF208
<i>Platydoras armatulus</i>	MOTU 49	Platydoras_armatulus_LSMFF326
<i>Prionobrama filigera</i>	MOTU 50	Prionobrama_filigera_LSMFF196
<i>Pristigaster cayana</i>	MOTU 51	Pristigaster_cayana_LSMFF228
<i>Prochilodus nigricans</i>	MOTU 52	Prochilodus_nigricans_LSMFF129, Prochilodus_nigricans_LSMFF131
<i>Protocheirodon pi</i>	MOTU 53	Protocheirodon_pi_LSMFF350
<i>Psectrogaster amazonica</i>	MOTU 54	Psectrogaster_amazonica_LSMFF157, Psectrogaster_amazonica_LSMFF357
<i>Psectrogaster rutiloides</i>	MOTU 55	Psectrogaster_rutiloides_LSMFF234, Psectrogaster_rutiloides_LSMFF363
<i>Pterophyllum scalare</i>	MOTU 56	Pterophyllum_scalare_LSMFF000441, Pterophyllum_scalare_LSMFF214
<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	MOTU 57	Pterygoplichthys_pardalis_LSMFF254, Pterygoplichthys_pardalis_LSMFF261
<i>Pygocentrus nattereri</i>	MOTU 58	Pygocentrus_nattereri_LSMFF156
<i>Rhamdia quellen</i>	MOTU 59	Rhamdia_quellen_LSMFF446
<i>Rineloricaria</i> sp.	MOTU 60	Rineloricaria_sp_LSMFF272, Rineloricaria_sp_LSMFF273, Rineloricaria_sp_LSMFF275, Rineloricaria_sp_LSMFF443, Rineloricaria_sp_LSMFF444, Rineloricaria_sp_LSMFF445
<i>Rineloricaria wolfei</i>	MOTU 61	Rineloricaria_wolfei_LSMFF270, Rineloricaria_wolfei_LSMFF271
<i>Roeboides affinis</i>	MOTU 62	Roeboides_affinis_LSMFF296

<i>Roeboides myersii</i>	MOTU 63	Roeboides_myersi_LSMFF293
<i>Satanoperca jurupari</i>	MOTU 64	Satanoperca_jurupari_LSMFF127
<i>Schizodon fasciatus</i>	MOTU 65	Schizodon_fasciatus_LSMFF122, Schizodon_fasciatus_LSMFF397
<i>Sorubim lima</i>	MOTU 66	Sorubim_lima_LSMFF307
<i>Steindachnerina dobula</i>	MOTU 67	Steindachnerina_dobula_LSMFF392
<i>Sternopygus macrurus</i>	MOTU 68	Sternopygus_macrurus_LSMFF345
<i>Sturisoma nigrirostrum</i>	MOTU 69	Sturisoma_nigrirostrum_LSMFF332, Sturisoma_nigrirostrum_LSMFF341
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	MOTU 70	Tetragonopterus_argenteus_LSMFF229
<i>Thoracocharax stellatus</i>	MOTU 71	Thoracocharax_stellatus_LSMFF298, Thoracocharax_stellatus_LSMFF299, Thoracocharax_stellatus_LSMFF300
<i>Triportheus albus</i>	MOTU 72	Triportheus_albus_LSMFF119, Triportheus_albus_LSMFF148
<i>Triportheus angulatus</i>	MOTU 73	Triportheus_angulatus_LSMFF248, Triportheus_angulatus_LSMFF402
<i>Hoplias malabaricus</i>	MOTU 74	Hoplias_malabaricus_LSMFF216, Hoplias_malabaricus_LSMFF369, Hoplias_malabaricus_LSMFF370
	MOTU 75	Hoplias_malabaricus_LSMFF442, Hoplias_malabaricus_LSMFF502

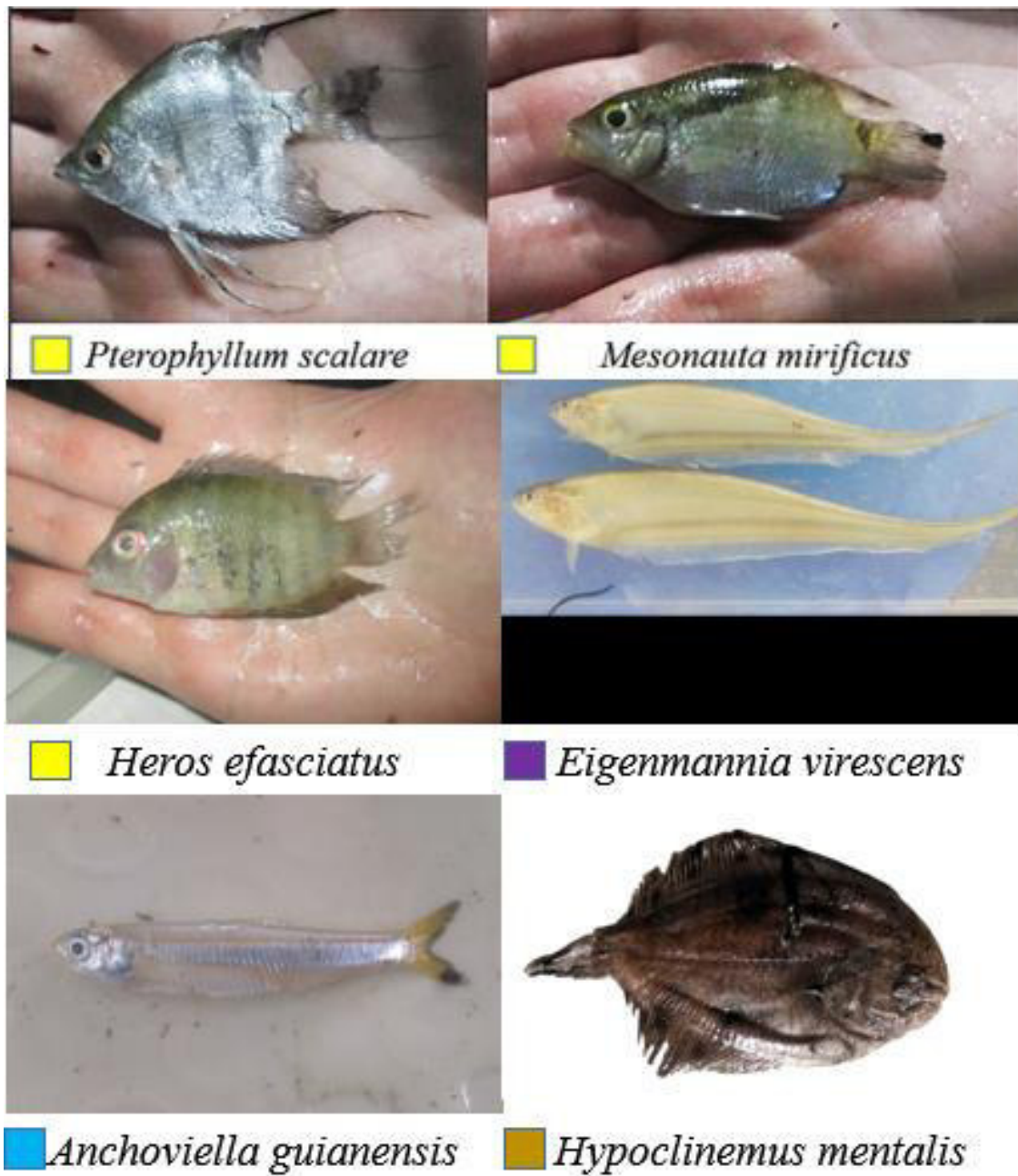
**ANEXO 11: FOTOGRAFÍAS DE ALGUNAS ESPECIES DE PECES REGISTRADAS EN ESTE ESTUDIO**



**Figura A1.** Representantes del orden Characiformes



**Figura A2.** Representantes del orden Siluriformes: Loricariidae (amarillo), Callichthyidae (rojo), Heptapteridae (naranja), Auchenipteridae (azul) y Pimelodidae (verde)



**Figura A3.** Representantes de los órdenes Cichliformes (amarillo), Gymnotiformes (morado), Clupeiformes (celeste) y Carangiformes (marrón)