



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PECES DEL GÉNERO
***Trichomycterus* DE RECURSOS LÉNTICOS DEL TITICACA**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. KEWIN HEDILBERTO VARGAYA ÑAUPA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2019



DEDICATORIA

A mis queridos padres

Hedilberto Eduardo Vargaya Paiva y
Neri Natividad Ñaupá Apaza por haberme
apoyado durante mi vida cotidiana como
también en mi vida profesional, qué gracias a
los esfuerzos que realizaron pude llegar a
donde estoy; por haber confiado siempre en
mi motivándome en todo momento a
superarme, con mucho cariño para ustedes
que siempre estuvieron en mis éxitos como
en mis desaciertos. Eternamente agradecido

A mis queridos hermanos

Erick y Harold, los cuales a pesar de
su juventud siempre me motivaron a que sea
una mejor persona y buen hermano, por
todos los momentos compartidos a lo largo
de nuestras vidas tanto gratos como no tan
gratos. Gracias por estar ahí



AGRADECIMIENTOS

Agradecido primeramente con mis padres, gracias al esfuerzo realizado por ellos pude terminar satisfactoriamente mi vida universitaria.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todos los que formaron parte durante el desarrollo de este trabajo:

A la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, y en especial a mis docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por todo el conocimiento impartido a lo largo de mi experiencia universitaria.

Al profesor Blgo. Herminio René Alfaro Tapia por el apoyo brindado en la asesoría del presente trabajo, y también por la amistad tan jovial que permitía conversaciones amenas.

Al Dr. Herbert Hernán Soto Gonzales por el apoyo y la amistad ofrecida de forma incondicional, así como sus recomendaciones tan acertadas para que este trabajo se pueda realizar de la mejor manera.

Al Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca (PEBLT) el cual me brindó sus instalaciones para poder dar comienzo a la presente tesis, de forma especial al ingeniero Jesus Flores Cahuana, quien me brindó su amistad, además de motivarme a concluir con este trabajo.

Muy agradecido con el doctor Claudio Oliveira, Jefe del Laboratorio de Biología y Genética de peces, de la Universidad Estadual Paulista Julio de Mésquita Filho, por el apoyo y la amistad incondicional ofrecida, además de las acertadas recomendaciones y enseñanzas, sobre todo por permitirme ser parte de dicho laboratorio.

A la doctora Luz Eneida Ochoa Orrego por haberme encaminado en este campo de la ciencia que es la genética. por el apoyo brindado en el presente trabajo de investigación, muy agradecido, por todos los consejos, la paciencia, orientación y experiencia.

A la licenciada Beatriz Boza, pasante del Laboratorio de genética de peces, por su gran ayuda y aporte con respecto a las técnicas de utilización para aplicar el PCR, y evaluar de la mejor manera el presente trabajo.



A mis amigos Dennys Jesus Jove, Dennys Alfredo Arpasi, Michael Ruelas, Luis Ordoñez, Diego Loaiza, Maritza Blanco, Mario Soria, Guido Chullo, Angel Vargas, Carlos Ticona, Fridian Ponce, Leydi Gabriela, Mirian, por su apoyo y motivación para poder concluir con este trabajo de investigación y también por el tiempo compartido a lo largo de nuestra vida universitaria. A todos los que estuvieron ahí tanto en los momentos gratos como también en los momentos no tan gratos, si olvido mencionarlos les ruego las disculpas respectivas, pero mi gratitud siempre estará con ustedes.



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN12

ABSTRACT.....13

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL.....15

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....16

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES.....17

2.1.1. Distancia genética17

2.1.2. Variabilidad genética18

2.2. MARCO TEÓRICO.....20

2.2.1. Orden Siluriformes y Superfamilia Loricarioidea.....20

2.2.2. Familia Trichomycteridae21

2.2.3. Género *Trichomycterus*22

2.2.4. Taxonomía.....24

2.2.5. Distribución y hábitat25

2.2.6. Alimentación25



2.2.7. Marcadores Moleculares	26
2.2.8. El genoma mitocondrial	27
2.2.9. Dna Barcode.....	29

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN	32
3.2. ÁREA DE TRABAJO	32
3.3. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	32
3.4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS EQUIPOS.....	35
3.5. OBTENCIÓN Y VERIFICACIÓN DEL DNA TOTAL.....	35
3.6. OBTENCIÓN DE LA REGIÓN CONTROL DEL DNAm.....	38
3.7. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	46
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
3.9. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA <i>Trichomycterus sp.</i>	48

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AMPLIFICACIÓN DEL PCR	50
4.2. IDENTIFICAR SI <i>Trichomycterus rivulatus</i> y <i>Trichomycterus dispar</i> DIVERGEN EN DOS ESPECIES DIFERENTES	51
4.3. DETERMINAR LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO <i>Trichomycterus.</i>	60
V. CONCLUSIONES.....	67
VI. RECOMENDACIONES	69
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70



ANEXOS.....77

AREA: Ciencias Biomédicas

LINEA: Acuicultura

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 13 de junio de 2019



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. DNA mitocondrial de peces {Brown, 2008}. (Tomado de Mori, 2010)	29
Figura 2. Laboratorio de Genética de Peces, Departamento de Morfología, Universidad Estatal Paulista Julio de Mésquita Filho, Campus de Botucatu - Brasil	32
Figura 3 Localización de los puntos de recolección de muestras en el Anillo Circunlacustre del lago Titicaca y en lagunas Altoandinas.....	33
Figura 4. Muestra de tejido de Trichomycterus	36
Figura 5. Obtención de fragmento de tejido	36
Figura 6. Colocación del fragmento en la solución de tampón lisis y proteinasa K.....	37
Figura 7. Centrifugado del tejido y la solución	37
Figura 8. Se agregó Mix de ligación a la solución	37
Figura 9. Después de la primera secuencia de centrifugado se agregó, tampón de lavado de proteína	37
Figura 10. Último ciclo de centrifugado, para la obtención de DNA.....	38
Figura 11. En la placa filtro se agregó agua, en las filas marcadas de color azul	38
Figura 12. Obtención de la región control de DNA mitocondrial mediante la aplicación de PCR a) muestras de DNA almacenadas a -20°C b) transferencia de 1ul de DNA a nuevos strips c) utilizando el termociclador para realizar el PCR d) preparación del gel de agarosa e) condensación del gel de agarosa f) preparación del colorante “Read leader” g) colocando la solución del PCR junto al c”read leader” h) colocando la solución al gel de agarosa i) se colocò el gel en una cuba elèctrica j) visualización del gel en un transluminador uv k) PCR de secuenciamiento l) secado de las muestras después del PCR de secuenciamiento m) rotulado de las	



muestras obtenidas por el PCR de secuenciamiento n) procesando las muestras en el Analizador genético	45
Figura 13. Obtención de la región control de Dna mitocondrial mediante la aplicación de PCR	46
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas amplificadas de la región COI del DNAm de: <i>Trichomycterus</i> sp	50
Figura 15. Filograma de máxima verosimilitud con 1000 de bootstrap, de 51 individuos de la especie <i>Trichomycterus</i> sp. (Suche y Mauri). Como grupo externo <i>Trichomycterus cachiraensis</i> , <i>Trichomycterus laucaensis</i> , <i>Trichomycterus inheringi</i> , <i>Trichomycterus punctulatus</i> , <i>Trichomycterus aff. sketi</i> (0504-I ST31), <i>Trichomycterus aff spilosoma</i> , <i>Trichomycterus banneai</i> , <i>Trichomycterus brasiliensis</i> , <i>Trichomycterus areolatus</i>	57
Figura 16. Red de haplotipos donde el tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos por cada haplotipo	64
Figura 17. Individuo de <i>Trichomycterus</i> sp. recolectado de la laguna Saracocha.	82
Figura 18. Pesca realizada de los especímenes de <i>Trichomycterus</i> sp. entre los meses de Agosto a Diciembre del 2017.	82
Figura 19. Procesamiento de muestras realizado en el Laboratorio de Genética de peces de la Universidad Estatal Paulista – Julio9 de Mésquita Filho – Campus de Botucatú, Brasil, durante los meses de Enero a Marzo, 2018... ..	82
Figura 20. Programa utilizado en el termociclador para realizar la reacción del PCR; Laboratorio de Genética de peces de la Universidad Estatal Paulista – Julio de Mésquita Filho – Campus de Botucatú, Brasil, durante los meses de Enero a Marzo, 2018.	82



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Puntos de Recolección de las muestras.....	33
Tabla 2.	Frecuencia de muestreo de <i>Trichomycterus</i> sp.....	34
Tabla 3.	Secuencias COI de DNA barcode.....	39
Tabla 4.	Porcentaje de la composición nucleotídica para la región control del DNA mitocondrial de especies del género <i>Trichomycterus</i>	52
Tabla 5.	Datos acerca de la recolección realizada de <i>Trichomycterus</i> dispar y <i>Trichomycterus rivulatus</i>	77
Tabla 6.	Secuencias de DNA de especies de <i>Trichomycterus</i> obtenidas del Gen Bank	81



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

COI	:Citocromo Oxidasa Subunidad I
dNTP	:desoxirribonucleótidos trifosfato
DNA	: Desoxirribonucleico Acid
EDTA	:Ácido etilendiaminotetraacético
Mm	:milímetros
Mg Cl	:Cloruro de magnesio
Msnm	:Metros sobre el nivel del mar
PCR	: Polimerasa Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
FRC	:Fuerza relativa de la centrífuga



RESUMEN

La disminución de la biomasa íctica viene siendo un problema que afecta a varias especies, específicamente a los *Trichomycterus* del lago Titicaca, y ecosistemas lenticos altoandinos, por la excesiva actividad extractiva pesquera. Es por ello que es de necesidad delimitar bien las especies de *Trichomycterus* que se tiene en los recursos lenticos de la cuenca del Titicaca. El objetivo fue: Caracterizar genéticamente el género *Trichomycterus* de los recursos lenticos del Titicaca, 2018. La metodología se consideró al nivel de investigación quasi experimental, observacional, prospectivo, transversal y analítico, para el estudio se empleó 51 muestras de peces de *Trichomycterus*, de distintos recursos lenticos tal como el lago Titicaca, laguna Pacharia, laguna Saracocha, laguna Orurillo. Todos los individuos colectados fueron considerados como *Trichomycterus sp.* Se seccionó una muestra de la aleta en tubos eppendorf y transportados al laboratorio para su análisis respectivo. Para la obtención del DNA se utilizó el protocolo descrito por Aljanabi e Martinez (1997). Luego se realizó el PCR utilizando la metodología descrita por Ale Ivanova *et al.*, (2005). Los resultados demuestran que todas las muestras de los peces estudiados pertenecen a una sola especie *Trichomycterus rivulatus* pues las distancias genéticas halladas oscilan entre 0,01% y 0,8% de individuos a individuo, a nivel grupal entre 0,01% y 0,4%, mientras tanto se registra una baja variabilidad genética intra poblacional pues se presenta tan solo 7 haplotipos diferentes, los cuales se agrupan en 2 clados distintos, pero muy cercanos. Por tanto se concluye que en el lago Titicaca y lagunas altoandinas solo existe la presencia de *Trichomycterus rivulatus*, y también que la variabilidad genética en esta especie viene disminuyendo esto a causa de la sobreexplotación y otros factores.

Palabras Clave : Citocromo oxidasa sub unidad I, Acido desoxirribonucleico, Reacción en cadena de la polimerasa, *Trichomycterus*, variabilidad genética



ABSTRACT

The decrease in fish biomass has been a problem that affects several species, specifically the *Trichomycterus* of Lake Titicaca, and high Andean lentic ecosystems, due to excessive extractive fishing activity. That is why it is necessary to clearly define the species of *Trichomycterus* that are found in the lentic resources of the Titicaca basin, in this way to propose better conservation strategies. The objective was: Genetically characterize the genus *Trichomycterus* of the lentic resources of Titicaca, 2018. The methodology was considered at the level of quasi-experimental, observational, prospective, cross-sectional and analytical research, for the study 51 samples of *Trichomycterus* fish were used, from different lentic resources such as Lake Titicaca, Pacharia Lagoon, Saracocha Lagoon, Orurillo Lagoon. All the individuals collected were considered as *Trichomycterus* sp. A sample of the fin was sectioned into eppendorf tubes and transported to the laboratory for analysis. To obtain the DNA, the protocol described by Aljanabi and Martinez (1997) was used. The PCR was then performed using the methodology described by Ale Ivanova et al., (2005). The results show that all the samples of the fish studied belong to a single *Trichomycterus rivulatus* species, since the genetic distances found range between 0.01% and 0.8% from individuals to individual, at the group level between 0.01% and 0.4%, meanwhile low intra-population genetic variability is recorded as only 7 different haplotypes are present, which are grouped into 2 different but very close clades. Therefore, it is concluded that in Lake Titicaca and high Andean lagoons there is only the presence of *Trichomycterus rivulatus*, and also that the genetic variability in this species has been decreasing due to overexploitation and other factors.

Key Words: Citocromo oxidasa sub unidad I, desoxirribonucleico acid, polimerasa chain reaction, *Trichomycterus*, genetic variability



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la diversidad biológica es el punto de partida para todos los estudios básicos o aplicados en el reconocimiento de especies, es fundamental para los estudios de ecología, comportamiento y evolución. Los peces siempre han generado interés ya sea con fines estético, deportivo, y/o alimentario para el ser humano; es por eso que vienen siendo estudiados.

La ictiofauna del altiplano andino endémico esta principalmente representada por los géneros, *Astroblepus*, *Orestias*, y *Trichomycterus*. Para el lago Titicaca y las lagunas altoandinas se reportan dos especies del género *Trichomycterus*: *Trichomycterus rivulatus* Valenciennes, 1846 y *Trichomycterus dispar* Tschudi, 1846, conocidos en el Perú como “suche” y “mauri” respectivamente. Estas especies son de gran importancia económica y alimentaria en la región de Puno representando cerca del 3,6% de la pesca anual, no obstante como consecuencia de la activa explotación de los recursos Ícticos así como la introducción de especies piscívoras, se ha observado una reducción significativa de sus poblaciones y actualmente *T. rivulatus* es considerado en estado Casi Amenazado (CA) y poca información es conocida sobre *T. dispar*.

Individuos de ambas especies son principalmente diferenciados por su longitud estándar (LS). *T. dispar* alcanza longitudes máximas de 20 cm en comparación con *T. rivulatus* cuyos individuos alcanzan longitudes de 39 cm, *T. rivulatus* y *T. dispar* pueden ser diferenciados por los siguientes caracteres morfológicos: posición de la aleta dorsal, forma de la aleta caudal y número de radios de la aleta dorsal y anal. *T. dispar* es caracterizado por presentar la aleta dorsal



completamente adelante de la aleta anal; aleta caudal emarginada, 12 radios en la aleta dorsal y 9 radios en la aleta anal. En comparación, *T. rivulatus* posee la aleta anal debajo de la aleta dorsal, aleta caudal redondeada, 13 radios en la aleta dorsal y 11 radios en la aleta anal. No obstante, se ha observado que estos caracteres presentan una alta variación a nivel intra e interespecifico, dificultando la asignación de especímenes en cada una de estas especies.

En este contexto, considerando la importancia de estas especies del altiplano andino así como su estado de vulnerabilidad, es necesario realizar una correcta identificación de las especies del genero *Trichomycterus* y verificar si existen dos o mas especies, como paso fundamental para el desarrollo posterior de medidas de conservación y manejo que contribuyan en la recuperación de este recurso en la región.

Dado que gran parte de la variación fenotípica intraespecífica a menudo se superpone entre estas especies conduciendo a equivocadas identificaciones, una alternativa es usar métodos de identificación molecular. La técnica del DNA “barcoding” fue desarrollada para la identificación de especies a partir de la amplificación de un segmento del gen Citocromo Oxidasa subunidad I, esta secuencia posee una baja variabilidad intraespecifica y alta variabilidad interespecífica facilitando la diferenciación entre especies. Adicionalmente esta metodología puede ser implementada independientemente de las etapas de desarrollo y contribuye en la identificación de la variación criptica.

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar genéticamente el género *Trichomycterus* de recursos lenticos de la cuenca del Titicaca



1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar si *Trichomycterus rivulatus* y *Trichomycterus dispar* divergen en dos especies diferentes
- Determinar la variabilidad genética del género *Trichomycterus sp.*



CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Distancia genética

Para medir las distancias genéticas entre especies ícticas se ha usado análisis moleculares en buena medida, las distancias genéticas para las especies *Sardinops sagax caeruleus* y *Sardinops sagax melanócticus*, mediante los oligonucleótidos subunidades ribosomales (12S y 16S) presentan una homología casi del 100% (Leyva, 2003); asimismo para *Brycon henni* la menor distancia genética entre individuos fue 0,7% (y la mayor fue 4%). Sin embargo comparando con otras especies (*Colossoma macropomum*), se encontró mayor distancia genética la cual fue de 66% (Pineda *et al.*, 2007).

Por otro lado en estudios realizados en el orden de los Siluriformes, específicamente de la superfamilia Loricarioidea, la distancia media entre las secuencias fue de $d= 19\%$, según el modelo de Tamura-Nei. Los análisis de la distancia media entre los pares de secuencia muestran los valores de $d= 0,100$ para el gen 16S rRNA, $d= 19\%$ para el gen COI, $d= 22\%$ para el gen cyt b, $d= 9\%$ para el gen rag1, $d= 10\%$ para el gen rag2 e $d= 14$ (Alves, 2008); por ello la hipótesis de la monofilia de la superfamilia Loricarioidea, lo que apunta a que la familia Nematogenyidae como grupo hermano de todos los demás familias de Loricarioidea; y también Loricariidae, Astroblepidae e Trichomycteridae forman un grupo monofilético (de Pinna, 1998; Britto, 2002).

Así mismo la divergencia genética entre las especies *Brachyplatystoma rousseauxii* y *Brachyplatystoma filamentosum* que varió entre 7%, ($\pm 1\%$), hasta



21%, ($\pm 1\%$), entre *Brachyplatystoma tigrinum* y *Pseudoplatystoma punctifer* (Mori, 2010).

Sobre el estudio de especies del género *Trichomycterus* sp., la divergencia interespecífica de *Trichomycterus* fue de 8,0 a 10,2% en tanto a la divergencia intra-específica varió de 0,15% a 3,38% para *Trichomycterus* sp. n1; 0,79% a 3,22% para *Trichomycterus* sp. n2 e 1,27% a 5,90% para *Trichomycterus* sp. n3, y divergieron entre 12,16% a 21,18% de *Trichomycterus brasiliensis* (Mehanna, 2010); de igual forma en el análisis realizado a *Trichomycterus iheringi* se encontró diferencias del 0,53% en un rango del 0 al 1% lo cual es bajo con respecto a 5,73% de la divergencia genética encontrada en la especie *Trichomycterus auroguttatus* (da Silva, et al., 2010).

La divergencia genética entre la nueva especie *Trichomycterus pascuali* y las especies congéneres, lo cual fue mayor al 3%, presentando una divergencia genética respecto a especies del mismo género 9,3 a 11,7%, con *T. candidus* y *T. brasiliensis* respectivamente, la divergencia genética entre *E. mutisii* y *T. pascuali* fue 10,8% similar con otras especies de *Trichomycterus* (Ochoa, et al., 2017), Del mismo modo usando genes mitocondriales mediante el marcador molecular (cyt b) al reconstruirse la filogenética de *Trichomycterus rivulatus* del lago Titicaca, se observó tres linajes de alto soporte, el primer linaje que se separa con una divergencia de (7 %) (de Sostoa et al., 2010).

2.1.2. Variabilidad genética

A nivel internacional en poblaciones españolas de *Tinca tinca* la variabilidad genética es baja cuyos datos obtenidos van desde 0,1% a 2,58%, con una media de 0,1% (Elorrieta, 1993), en tanto peces marinos de Chile *Macrourus*



holotrachys, *Caeloinchus fasciatus* y *Antimora rostrata* poseen una baja variabilidad genética, en el mismo orden anterior: 0,03; 0,026 y 0,05 (Oyarzún *et al.*, 1997) por otro en poblaciones cubanas de peces del género *Rivulus* existe una alta variabilidad genética (Fernández, *et al.*, 2003).

Las poblaciones de lenguado *Solea senegalensis* en México poseen una alta variabilidad genética intra poblacional mostrando una estadística en condición de equilibrio de Hardy – Weinberg (24%) y 7 después de aplicar las correcciones de Bonferroni (9%) (Diaz *et al.*, 2012), asimismo la variabilidad genética de poblaciones reproductoras de *Rachycentron canadum* donde la homología con las poblaciones parentales cercanas fue de 68%, con los abuelos existe un 29% de homología y con los bisabuelos tan solo 7%, por lo que se deduce que hubo una pérdida de variabilidad en los stocks de estos peces (Sakthivel *et al.*, 2019).

De la misma forma diferentes poblaciones de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* presentan una fuerte estructuración genética entre sus poblaciones geográficas 29% y 20% respectivamente (Aliaga, 2004), mientras tanto para *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* existe una clara diferencia interespecífica entre estas dos especies y que la red de haplotipos presentada por estas especies es baja lo cual indicaría que la variabilidad genética de esta especie se ha visto disminuido por el exceso de pesca y otros factores (Rivera, 2003).

En el norte peruano las poblaciones del *Brachyplatystoma tigrinum* de la amazonia peruana presenta valores menores en los parámetros genéticos ($H = 8$, $E_{ta} = 10$, $K = 1.632$, $S = 10$, $H_d = 0,527$, $\pi = 0,002$) con respecto a las otras especies de bagres (Mori *et al.*, 2012), del mismo modo el pez *Osteoglossum*



bicirrhosum presenta una fuerte estructuración genética en sus poblaciones, registrándose distancias geográficas de un 83 % , y también se obtuvo 50 % de distancia entre las poblaciones pluviales (ríos). (Chota *et al.*, 2016).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Orden Siluriformes y Superfamilia Loricarioidea

En el superorden Ostariophysi incluyen agrupaciones de peces que habitan en casi todos los continentes (Lagler *et al.*, 1984), dentro de este superorden se encuentra al orden de los Siluriformes, es el tercer orden mayor riqueza específica pues alberga a 3700 especies válidas .

Los Siluriformes conocidos comúnmente como los peces gato (catfish) son el segundo grupo más importante de peces en cuanto al número de especies en el neotrópico con 37 familias reconocidas (Betancur *et al.*, 2007) que se encuentran mayoritariamente en América del Sur y África (Arratia, 1981) , gran parte de los estudios realizados a los Siluriformes fueron direccionados a la familia Dyplostomidae, reconocida como el más basal de los Siluriformes (Mehanna, 2010)

En este orden se encuentra a la superfamilia Loricarioidea, el cual es considerado un grupo monofilético. Dentro de la superfamilia Loricarioidea conforman las siguientes familias: Loricariidae, Astroblepidae, Scoloplacidae, Callichthyidae, Trichomycteridae y Nematogenyidae. Las familias Loricariidas, Callichthyidae y Trichomycteridae son las que presentan más especies y a su vez divididas en varias subfamilias; mientras tanto las familias Astroblepidae, Scoloplacidae y Nematogenyidae están conformada por un pequeño grupo de especies de peces (Arratia, 1987; 1990^a, 1998; De Pinna, 1998; Nelson, 2006)



2.2.2. Familia Trichomycteridae

Trichomycteridae fue reconocida como familia por Gill (1872), pero más tarde Eigenmann y Eigenmann (1888, 1890), Eigenmann (1918, 1922), Myers (1944) y Miranda Ribeiro (1951) entre otras publicaciones usan el nombre Pygidiidae (Bakin, 1973; De Pinna, 1998). Mientras tanto, Tchernavin (1944) en una detallada revisión propone justificadamente mantener el nombre Trichomycteridae antes que Pygidiidae. (Fernández, 2015).

La familia Trichomycteridae es bastante representativa dentro del grupo taxonómico de los Loricarioidea. con aproximadamente 297 especies conocidas (Ferraris, 2003), esta familia se encuentra distribuida ampliamente desde Costa Rica hasta la Patagonia (Datovo & Bockmann, 2010).

El monofiletismo de esta familia exhibe siete sinapomorfias (Marques de Oliveira, 2011) que también es sustentada por los caracteres conspicuos que involucran su aparato operculo-interopercular altamente especializado. Este sistema permite que un tricomictérico generalizado trepe un sustrato rocoso empinado con aguas que fluyen rápido (Baskin, 1973; De Pinna, 1992, 1998).

Los tricomictéricos exhiben una excepcional diversidad de hábitats y modos de vida en una sola familia de peces. Pues son principalmente consumidores de invertebrados y habitan en fondos rocosos, donde tienen habilidades notables para resistir y ascender contra corrientes fuertes. Por otro lado poseen un alto potencial para colonizar los ambientes más extremos, tales como los arroyos y ríos de alta montaña en los Andes pues logran vivir a altitudes superiores a los 4000 msnm (Datovo & Bockmann, 2010; Fernández, 2015).



Esta familia está subdividida en 411 géneros y en ocho subfamilias Copionodontinae, Glanapteryginae, Sarcoglanidinae, Stegophilinae (incluyendo Pareiodontinae), Trichogeninae, Trichomycterinae, Tridentinae e Vandelliina (Adriaens, 2011; Ochoa *et al.*, 2017).

Dentro de la familia *Trichomycteridae*, se encuentra la subfamilia *Trichomycterinae*, la cual es la subfamilia más diversa dentro de la familia *Trichomycteridae* con aproximadamente 200 especies repartidas en 8 géneros, *Bullockia* (1 especie), *Eremophilus* (1), *Hatcheria* (1), *Ituglanis* (26), *Rhizosomichthys* (1), *Scleronema* (3), *Silvinichthys* (7), y *Trichomycterus* (160+) (L. E. Ochoa *et al.*, 2017) esta subfamilia es considerada un grupo polifilético (Mehanna, 2010), debido a las sinapomorfias que existentes, sobre por la presencia del género *Trichomycterus* que es el más complejo, con mayor cantidad de especies y distribuido en distintos lugares (da Silva *et al.*, 2010).

2.2.3. Género *Trichomycterus*

El género *Trichomycterus* fue mencionado por primera vez por Valenciennes en 1832, esto debido a que describió a *Trichomycterus nigricans*, un único ejemplar colectado por Saint Hilaire de la región costa de Santa Catarina, Brasil; asumiendo que se debería de crear un nuevo género, pues tenía una relación muy próxima al género *Eremophilus mutisii* descrito por Humboldt en 1805 (Mehanna, 2010).

Trichomycterus se origina a partir de una variación de *Thrichomycterus* planteado al principio por Humboldt en 1805, establecido como una opción para la descripción de especies nuevas diferentes al género *Eremophilus*, sin embargo una pequeña alteración de escritura hecha por Valenciennes, trajo consigo en que



Eremophilus, por ser designado primeramente como el nombre de un taxón fuese sinónimo de *Trichomycterus* (Mehanna, 2010)

Posteriormente Meyen (1834), Weigmann (1935) y Eigenmann (1890) describen varias especies como pertenecientes al género *Pygidium*, argumentando que *Trichomycterus* es muy similar a *Trichomycterus* y que difícilmente se le consideraría distinto (Sarmiento, 1987).

Tchernavin (1944) hace un análisis de las muestras de Trichomycterinos del British Museum of Natural History, reviso el problema nomenclatural y sinomimizó Pygiididae como Trichomycteridae (Mehanna, 2010).

El género *Trichomycterus* posee una diversidad con aproximadamente más de 100 especies que se extienden a lo largo de América Central y del Sur a ambos lados de los Andes (De Pinna y Wosiacki, 2003) Las especies generalmente tienen una distribución geográfica restringida y muestran un pronunciado nivel de endemismo (Costa, 1992; de Pinna, 1992b)

En el Perú existen 13 especies de *Trichomycterus* (Ortega *et al.*, 2011) entre ellos se encuentran *Trichomycterus rivulatus* y *Trichomycterus dispar* descritos por Valenciennes y Tschudi respectivamente en el año 1846. Sin embargo actualmente se encuentra en confusión la denominación de estas dos especies, esto debido a que ocupan el mismo hábitat y son confundidos comercialmente (Crespo, 2005).

Tchernavin (1944) comprueba que *T. rivulatus* corresponde a las mayores tallas, en contraposición a las demás especies que oscilan alrededor de los 80 mm.

En lo que concierne al “mauri”, para el Perú tal especie parece que corresponde a *Trichomycterus dispar* Tschudii, ya que las especies *T. rivulatus*



Valenciennes (suche) de la laguna Langui-Layo y el lago Titicaca, y el *T. vittatus* Regan, son de los ríos de la zona de Mercapata. Por tal situación la denominación del “mauri” quedaría por lo menos como *Trichomycterus* sp. (Canales, 1982)

2.2.4. Taxonomía

Según las últimas investigaciones realizadas en la cuenca del lago Titicaca, para las poblaciones de “mauri” y “suche”, la posición taxonómica presentaría el siguiente orden:

Reino	: Animalia
Filo	: Chordata
Clase	: Actinopterygii
Infra Clase	: Teleostei
Super Orden	: Ostariophysii
Orden	: Siluriformes
Familia	: Trichomycteridae Bleeker 1858
Subfamilia	: Trichomycterinae Bleeker 1858
Genero	: <i>Trichomycterus</i> Valenciennes 1832
Especie	: <i>Trichomycterus rivulatus</i> Valenciennes, 1846
NV	:suche

Reino	: Animalia
Filo	: Chordata
Clase	: Actinopterygii
Infra Clase	: Teleostei
Super Orden	: Ostariophysii



Orden	: Siluriformes
Familia	: Trichomycteridae Bleeker 1858
Subfamilia	: Trichomycterinae Bleeker 1858
Genero	: <i>Trichomycterus</i> Valenciennes 1832
Especie	: <i>Trichomycterus dispar</i> (Tschudi, 1846)
NV	:Mauri

Fuente: CalAcademy, 2018

2.2.5. Distribución y hábitat

Trichomycterus rivulatus está distribuido por los lagos, lagunas, ríos y esteros del altiplano de Perú, Bolivia y Chile (Arratia, 1982) se podría mencionar que tiene una distribución estenocora.

El hábitat de *T. rivulatus* es diverso, en zonas con bastante profundidad (lagos) puede alcanzar tallas superiores a 300 mm, sin embargo en hábitat como ríos o arroyos las tallas son menores. Principalmente en el Altiplano habitan por encima de los 3000 msnm. Generalmente en estadios juveniles tienden a vivir en zonas cercanas a la ribera por la tranquilidad de las aguas; cuando alcanzan tallas mayores se trasladan a zonas con mayor profundidad (lugares bentónicos y torrentícolas) *T. rivulatus* tiende a vivir en fondos irregulares y/o pedregosos, de limo fino y coloración oscura siendo capaz de realizar mimetismo en los lugares donde habita conforme a las coloraciones de los substratos (Arratia, 1982).

2.2.6. Alimentación

La alimentación de los *Trichomycterus* es bastante variable, para *Trichomycterus rivulatus* se reporta que en el estadio adulto tiene un hábito



alimenticio preferentemente de *Hyallolella* sp. ovas, larvas y alevinos de otros peces; larvas de insectos, cladóceros copépodos (Paca *et al.*, 2003) mientras tanto también se menciona que tiene una alta preferencia por *Orestias ispi* (Castillo, 2002).

Por otro lado para *Trichomycterus dispar* se ha reportado que el 96.03% de *Hyallolella* sp, 2.84% larvas de chironómidos, 1.13% Ovas de peces(Paca *et al.*, 2003), inclusive con el aumento de la talla el alimento favorito para estos peces es el camaroncillo de agua dulce *Hyallolella* sp.

2.2.7. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se relacionan con un rasgo genético, pero que posee variaciones o polimorfismos suficientes para agrupar a ciertos organismos (Mori, 2010)

Los diferentes tipos de marcadores moleculares deben denominarse marcadores bioquímicos / de proteínas. Tienen la misma actividad o función catalítica, pero tienen diferentes pesos moleculares y movilidad electroforética. Debido a que la diferencia en la movilidad electroforética es causada por una mutación puntual como un resultado de la sustitución de aminoácidos.

Un marcador de ADN es un pequeño segmento o sección de la secuencia de ADN que refleja el polimorfismo o la variación (movimiento de base, inserción y sustitución) entre diferentes individuos. En mejores términos, los marcadores de ADN se definen como un fragmento de ADN genómico que revela variaciones / mutaciones en secuencia, que está asociada o unida a una ubicación / locus definida dentro del genoma y puede detectarse por medio de una tecnología molecular particular, y si vinculados genéticamente a un gen de interés, se pueden

usar para detectar el polimorfismo entre diferentes alelos o genotipos del gen para una secuencia particular de ADN (Jiang, 2017)

Se ha demostrado que los marcadores moleculares son bastante efectivos en el diagnóstico de especies de diversos grupos (Mussi, 2009), pues aportan métodos eficientes para taxonomizar de forma no ambigua muestras de individuos, que son confundidas debido al amplio fenotipo que presentan (Godoy, 2009).

2.2.8. El genoma mitocondrial

2.2.8.1. Función de la mitocondria

La mitocondria es un organelo presente tanto en células animales o vegetales, cuya principal función es la de generar energía para proveer a la célula (De Robertis, 2004; Klug *et al.*, 2006; Schnek, 2006)

Otra característica importante de la mitocondria es que es un orgánulo semiautónomo que posee DNA, aunque si bien es cierto que es reducido en comparación al DNA nuclear, codifica algunas características importantes (Pierce, 2006)

2.2.8.2. Estructura y propiedades de genoma mitocondrial

El DNA mitocondrial (DNA_{mt}) es una molécula lineal en varias plantas y hongos; sin embargo en metazoarios es una molécula circular, haploide, que además presenta herencia materna (no existe recombinación) por ello está presente en todas las generaciones (Elorrieta, 1993; Mehanna, 2010) se utiliza bastante en el estudio a animales donde se presenta compacto y con pocos genes (Moreno, 2005).



El tamaño del genoma mitocondrial es muy variable, pues se ha registrado la presencia con valores de 16 kilobases (kb) aproximadamente en vertebrados y hasta 570 kb en algunas especies de plantas. Mientras tanto en otros estudios realizados al genoma mitocondrial de peces se ha demostrado que dicho genoma está constituido por alrededor de 17000 pares de base (Alves, 2008).

Existen cantidades variables (cientos) de mitocondrias en cada célula, y cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de DNAm_t (Pierce, 2006). El DNAm_t posee características importantes: carece de intrones y puede mutar de 10 - 20 veces más que el DNA nuclear (Mori, 2010). Supongamos que la mitad de las mitocondrias de una célula contiene una copia normal silvestre de DNAm_t y que la otra mitad contiene una copia mutada. En la división celular las mitocondrias se segregan al azar a las células hijas. Por azar una célula puede recibir mayoritaria- mente DNAm_t mutado y otra célula puede recibir mayoritariamente DNAm_t silvestre. De esta manera diferentes progenies de una misma madre, e incluso distintas células dentro de una misma progenie, pueden tener DNAm_t diferentes (Pierce, 2006). Es gracias a estas características que el DNAm_t es un instrumento muy utilizado como marcador para diversos estudios evolutivos, poblacionales y filogenéticos.

2.2.8.3. Organización del genoma mitocondrial

El DNA mitocondrial contiene 13 genes codificantes para proteínas, 2 genes que codifican para ARN ribosomal (la subunidad pequeña 12S y la subunidad mayor 16S rARN) (Elorrieta, 1993; Mori, 2010), el gen que codifica la subunidad 12S está constituido de 819 a 975 pb, mientras que el de la subunidad 16S cuenta con alrededor de 1571–1640 pb. El ADN

mitocondrial presenta además 22 genes que codifican los RNAs de transferencia (ARNt) y una región mayor no codificante o región de control. Las proteínas que son codificadas por los genes del ADN mitocondrial son: siete subunidades de NADH deshidrogenasa (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), citocromo b (Cytb), tres subunidades de citocromo c oxidasa (CO I, II, III) y dos subunidades de ATP sintetasa (Alves, 2008)

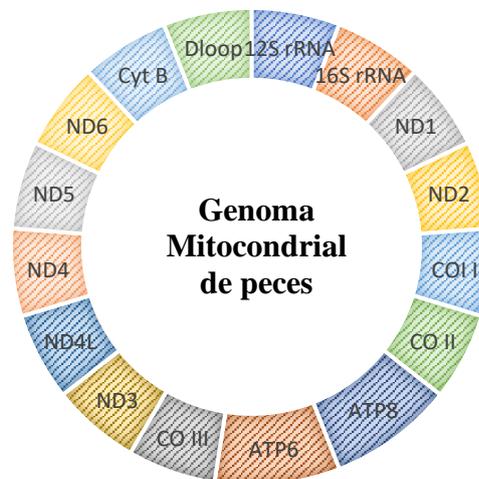


Figura 1. DNA mitocondrial de peces {Brown, 2008}. (Tomado de Mori, 2010)

2.2.9. Dna Barcode

En la tentativa de tener un padrón de marcador utilizando la identificación molecular de especies animales en 2003 investigadores de Universidad de Guelph (Ontario, Canadá) se propuso la creación de un sistema de diagnóstico universal basado en un fragmento de aproximadamente 650 pares de base a partir de la base 58 de la extremidad 5' del gen citocromo oxidasa subunidad I. Ese marcador fue



denominado DNA Barcode, pues secuencias de ese gen funcionaron como un código de barras (Ramos, 2015; Mussi, 2009).

Un marcador “DNA barcode” es una pequeña secuencia de ADN estandarizada, obtenida por PCR, variabilidad génica, redes de haplotipos, DNA-BAR y BLOG, que permiten evaluar secuencias a través de un análisis unificado, para determinar su utilidad como “DNA barcodes” Para identificar un espécimen, se realiza la amplificación de una región de ADN a partir de una muestra de tejido del organismo no identificado. El amplicón es secuenciado y la secuencia producida es comparada con una librería de referencia de “DNA barcodes” de especies previamente identificadas (Vera, 2012)

El uso DNA barcode presenta una alta de tasa de éxito en la identificación rápida de especies de diversos grupos de aves, peces, y anfibios (Ward *et al.*, 2005) la tasa de evolución molecular del gen *coi* permite distinguir especies próximas y también grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Mussi, 2009). La técnica llamada “DNA Barcoding”, también permite la asignación de individuos desconocidos a especies para las cuales se ha establecido un “DNA barcode” (Vera, 2012)

Otros beneficios esperados con la utilización del Dna Barcode son la identificación de especies crípticas, o el descubrimiento de nuevas especies, la identificación de una misma especie de formas juveniles y adultas de una misma especie, también la identificación de especies a partir de fragmentos del material biológico (Mussi, 2009)

Al inicio el DNA Barcode fue creado con la intención de secuenciar todas las especies existentes preferentemente utilizando las muestras depositadas en



museos u otras instituciones y previamente identificadas por taxonomistas. De esa forma nació el banco de datos denominado *BOLD (The Dna Barcode of Life Data System)* que permite asociar otros tipos de datos de las muestras así como 1) fotos del espécimen 2) informaciones de campo como punto de colecta, colector, y datos de colecta 3) número del espécimen e institución donde se encuentra depositado 4) datos taxonómicos 5) informaciones moleculares como electroferogramas de secuencias de primers que fueron utilizados en la amplificación y el secuenciamiento. En el *BOLD* la identificación de especies se da gracias a que se compara una secuencia de interés con una secuencia depositada previamente en este banco de datos (Mussi, 2009).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

Nivel de investigación:

- Quasi experimental

3.2. ÁREA DE TRABAJO

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biología y Genética de Peixes - LBP, Instituto de Biociencias Botucatu, Universidad Estatal Paulista Julio de Mésquita Filho, Distrito de Rubião Júnior, S/N Campus de Botucatu – Brasil.



Figura 2. Laboratorio de Genética de Peces, Departamento de Morfología, Universidad Estatal Paulista Julio de Mésquita Filho, Campus de Botucatu - Brasil

Fuente: Elaboración Propia

3.3. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Para la recolección de material biológico se realizó en distintos lugares de la región Puno, teniendo como principales puntos de muestreo lugares en el anillo circunlacustre del lago Titicaca de la región Puno, también se consideraron a

diferentes lagunas altoandinas (laguna Saracocha, laguna Orurillo, laguna Pacharia) donde se obtuvo reporte de estas poblaciones de peces (**Tabla 1, Figura 3**).

Tabla 1. Puntos de Recolección de las muestras

Lugar	Coordenadas
Moho (Jachaparo)	15°25'54.94"S 69°30'28.50"O
Chucuito (Sector Barco)	15°52'45.97"S 69°53'29.57"N
Huancané (Jacantaya)	15°19'56.36"S 69°39'32.74"O
Sandia (laguna Pacharía)	14°31'37.31"S 69°37'17.46"O
Cabanilla (laguna Saracocha)	15°45'51.58"S 70°38'34.03"O
Orurillo (laguna Orurillo)	14°43'33.17"S 70°30'9.33"O

Fuente: Elaboración Propia

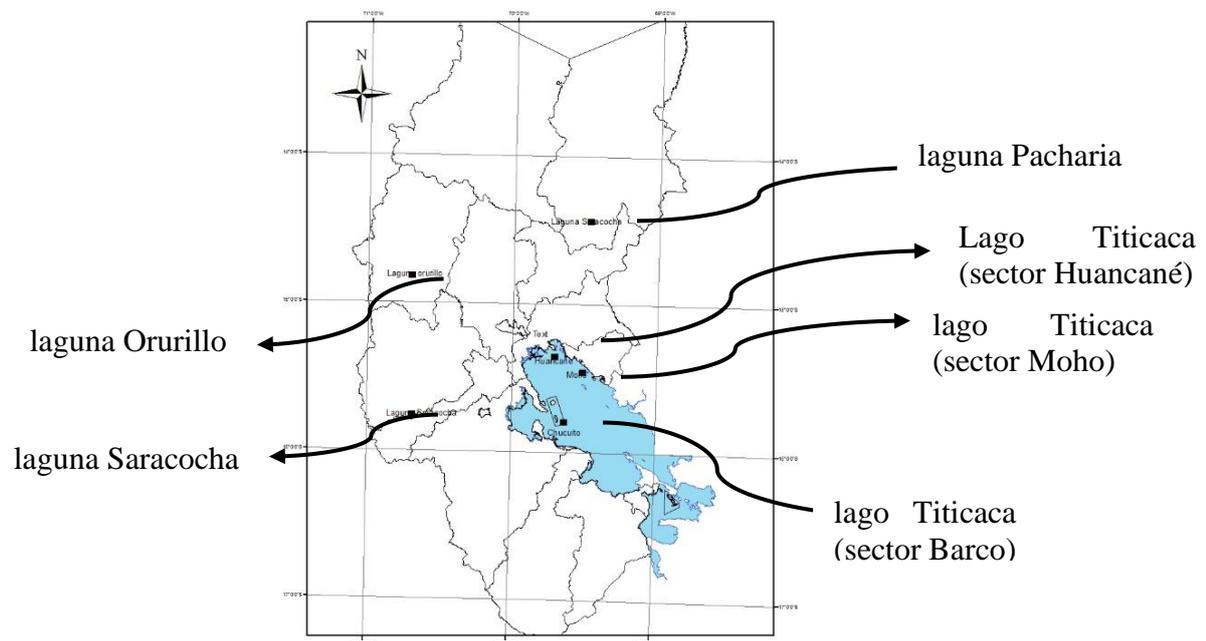


Figura 3 Localización de los puntos de recolección de muestras en el Anillo Circunlacustre del lago Titicaca y en lagunas Altoandinas

Fuente: Mesozonificación de la Región Puno 2015



Se colectaron 51 muestras en total en, la mayoría de ellos se obtuvo de las localidades de Chucuito y Moho, 15% de la muestras se recolectaron en el mes de mayo, 11% de las muestras de *Trichomycterus* se recolectaron en Agosto, 9 % de las muestras de *Trichomycterus* se recolectaron en septiembre y 62% de las muestras de *Trichomycterus* se recolectaron en noviembre del año 2018 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Frecuencia de muestreo de *Trichomycterus* sp.

Nro de muestras / Mes	Mayo	Agosto	Septiembre	Noviembre
<i>Trichomycterus</i> sp.	08	06	05	32
			Total	51

Fuente: Elaboración Propia

Una parte del material estudiado fue colectado a través de la pesca se utilizó el arte de pesca tipo chinchorro de línea tamaño de luz, que se componen de nylon monofilamento, dichas redes poseían medidas de 1 ¼ pulgadas para los individuos de menor tamaño y 2 1/8 pulgadas para los individuos de mayor tamaño, estas medidas de red fue aplicado por la experiencia ya obtenida a través de las personas que realizan la pesca extractiva. La otra parte del material fue recolectado en los mercados Union y Dignidad (Puno) y Feria Dominical (Huancane) donde se venden estos peces para consumo humano.

Se extrajo una muestra de tejido de la aleta dorsal, luego fueron conservadas en tubos eppendorf (2 ml) conteniendo etanol al 99%, cada tubo fue rotulado con un código que fue brindado por el Laboratorio de biología y genética de Peces de la UNESP y se dejó almacenado hasta el momento de la extracción del DNA.



3.4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS EQUIPOS

Para la extracción de dna se utilizó la incubadora Boekel Scientific; BOEKEL® que se mantuvo a una temperatura de 56°C durante 6 horas. Luego se procedió a diferenciar entre el sobrenadante y el dna con la ayuda de una ultracentrífuga Rotanta 450 ® Hettich. Posteriormente se utilizó el termociclador Veriti Thermal Cycler de Applied Biosystems ® para realizar el PCR y el PCR de secuenciamiento. Y por último se usó el secuenciador genético Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyze el cual es necesario para la secuenciación de Sanger y el análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

Objetivo 1: Identificar si *Trichomycterus rivulatus* y *Trichomycterus dispar* divergen en dos especies diferentes

3.5. OBTENCIÓN Y VERIFICACIÓN DEL DNA TOTAL

3.5.1. Extracción del DNA usando el método CTAB

La extracción del DNA genómico se realizó a partir del tejido almacenado previamente en etanol al 99%, se utilizó el método de extracción CTAB {Doyle & Doyle, 1987) que se describe a continuación:

Protocolo de CTAB de Doyle & Doyle (1987)

1. Retirar un pequeño fragmento del tejido (2 a 3 [mm]) preservado en etanol al 100%, secar bien y colocar cada muestra en un strip;
2. Realizar una mezcla de 5 ml (5000 µl) de tampón de lisis y 0,5 ml (500µl) de proteinasa K en un eppendorf estéril, agregar 50 µl de esta mezcla en cada muestra
3. Luego incubar a 56 ° C durante un mínimo de 6 horas para permitir la digestión.

4. Centrifugar a 1500rpm durante 15 segundos para quitar cualquier muestra condensada en la tapa;
5. Agregar 100 μ l de mix de ligación en las muestras.
6. Centrifugar a 1000 rpm durante 20 segundos.
7. Transferir la sustancia (150 μ l de muestra + proteinasas K, 100 μ l de mix de ligación) a la placa filtro.
8. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos.
9. Agregar 180 μ l de tampón de lavado de proteína a cada tubo.
10. Poner con una nueva cinta adhesiva y centrifugar a 5000 rpm durante 2 min.
11. Agregar 750 μ l de tampón de Lavado a cada tubo.
12. Centrifugar el 5000 rpm por 5 min; 13. Incubar la placa a 56 ° C durante 30 minutos.
13. Agregar 30 - 60 μ l de agua a 56 ° C en cada tubo eppendorf de la placa a incubar a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos; 15. Transferir el ADN a bandas separadas hasta hacer PCR.

El DNA puede conservarse temporalmente a 4 ° C, y para guardar a largo plazo -20

C



Figura 4. Obtención de fragmento de tejido



Figura 5. Muestra de tejido de *Trichomycterus*



Figura 6. Después de la primera secuencia de centrifugado se agregó, tampón de lavado de proteína



Figura 7. Centrifugado del tejido y la solución



Figura 8. Colocación del fragmento en la solución de tampón lisis y proteinasa K



Figura 9. Se agregó Mix de ligación a la solución



Figura 11. En la placa filtro se agregó agua, en las filas marcadas de color azul



Figura 10. Último ciclo de centrifugado, para la obtención de DNA

3.6. OBTENCIÓN DE LA REGIÓN CONTROL DEL DNAm_t

3.6.1. Amplificación de la región control vía PCR

Se realizó la amplificación de la región COI del DNAm_t utilizando la técnica Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la caracterización de las muestras se utilizaron secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo oxidasa Subunidad I (COI) DNA barcode que se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 3. Secuencias COI de DNA barcode

Nombre	Secuencia
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCA
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA

Fuente: Ward et al. (2005)

Se realizó el PCR obteniendo un “mix” de agua ultrapura 8.05 µl; tampón estándar 1.25 µl; cloruro de magnesio (Mg Cl₂) 0,50 µl primer Forward (F) 0,25 µl; primer Inverse ® 0,25 µl; dNTP (dinucleótidos) 0,50 µl; Taq polimerasa 0,20 µl y 1 µl de DNA. Genómico.

Luego se colocó en el termociclador el cual posee los siguientes ciclos: 1° ciclo - 94 °C por 4 minutos; 2° ciclo - 94 °C por 1 minuto; 3° ciclo - 52 °C por 45 segundos el cual tiene que repetirse por 30 veces; 4° ciclo - 68 °C por 1 minutos, 5° ciclo - 68 °C por 10 minutos; y por último 12 °C por tiempo indeterminado.

3.6.2. Electroforesis de los productos de la amplificación

Después se prosiguió a ver los segmentos de DNA amplificados mediante el PCR, utilizando gel de agarosa, el cual consistió en: 1° Preparar una mezcla de 100 ml TAE por 1 g de agarosa. 2° Agregar tampón READ carga positiva. 3° Colocar esa mezcla en una placa y en el gel (2 µl de tampón + 2 µl de la muestra) 4° Colocar el gel en una cuba (contiene el gel TAE), y dejar reposar a 130 °C por 15 minutos 5° Sacar el mismo de la cuba y ver en la electroforesis si las muestras se han amplificado.



3.6.3. Purificación del Producto de PCR

Se purificó de los productos del PCR – mediante Exo-Sap (Exonucleasas – Shrim Alcalino Phosphatase). Siguiendo los procedimientos del protocolo del proveedor; para ello se realizó un “mix” de agua ultrapura 1.9µl; Exol 0,05 µl; SAP 0,05 µl. Posterior a ello se procede a mezclar 2µl de esta solución con 5 µl del producto de PCR. Se incubó las muestras en el termociclador por 60 minutos a 37 °C seguidos de 15 min a 80 ° C. Posteriormente se dejó almacenado a – 20 °C para luego realizar el PCR de secuenciamiento.

3.6.4. PCR de Secuenciamiento

Para la reacción de secuenciamiento se utilizó agua ultrapura 3,9 µl; Tampón Big Deje 1,05 µl; Big Deje 0,7 µl; primer F 0,35 µl; primer R 0,35 µl; producto del PCR 1.0 µl; toda esta mezcla es colocada en el termociclador con la siguiente secuencia 1° ciclo 96 °C por 2 minutos; 2° ciclo 96°C por 30 segundos; 3° ciclo 54 °C por 15 segundos 4° ciclo 60 °C por 4 minutos y por último 12 °C por tiempo indeterminado.

3.6.5. Purificación del PCR de Secuenciamiento

Una vez concluido el proceso de reacción de secuenciamiento, se realizó la limpieza para eliminar el exceso de reactivos; elaborando un “Mix”de : EDTA 0,7 µl; acetato de sodio 0,7 µl y etanol al 100% 17 , 5 µl; agregar esta mezcla a las muestras obtenidas e incubarlas por 15 minutos a temperatura ambiente y alejado de la luz. Centrifugar por 30 min a 3000 RCF, a 20 ° C.

Descartar el etanol dando un giro invertido por 1 min a 180 RCF. Agregar 24,5 µl de etanol al 70% y centrifugar por 15 min a 1650 RCF a 25 °C. Descartar el etanol y dar un spin invertido por 2 min a 180 RCF. Secar en el termociclador



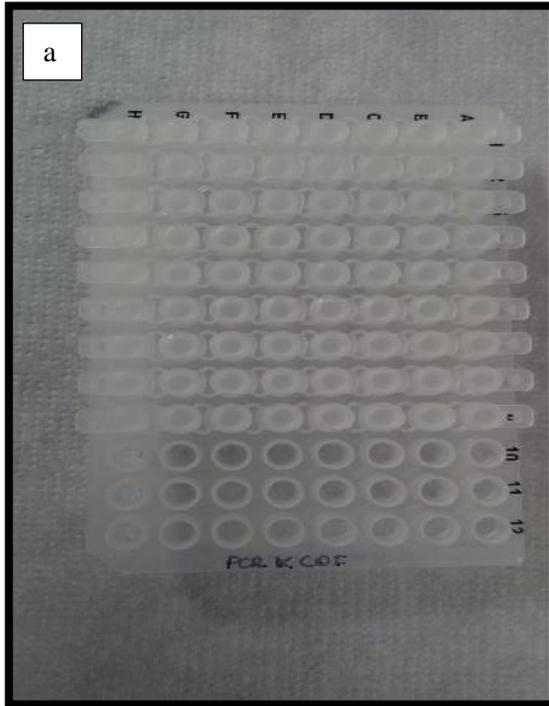
por 8 min a 96 ° C con las tapas de los tubos placa y del termociclador abiertas (evaporación del etanol).

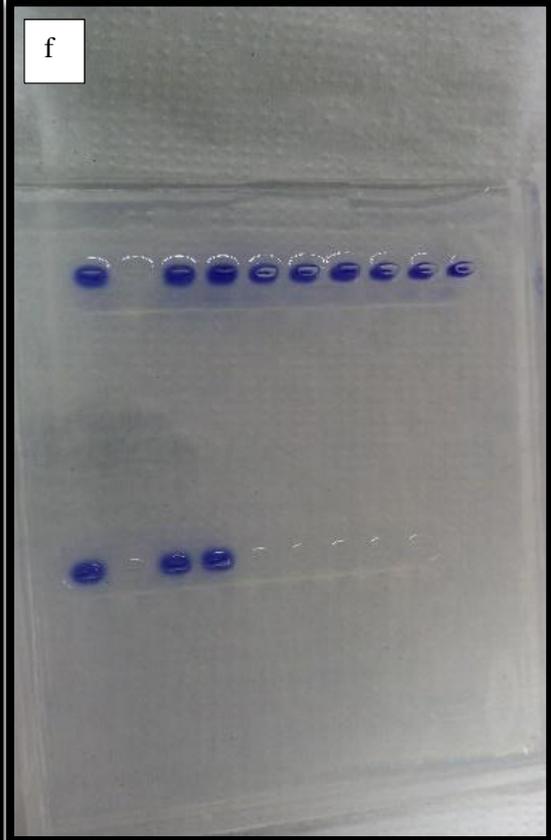
3.6.6. Corrida de las muestras en el analizador genético

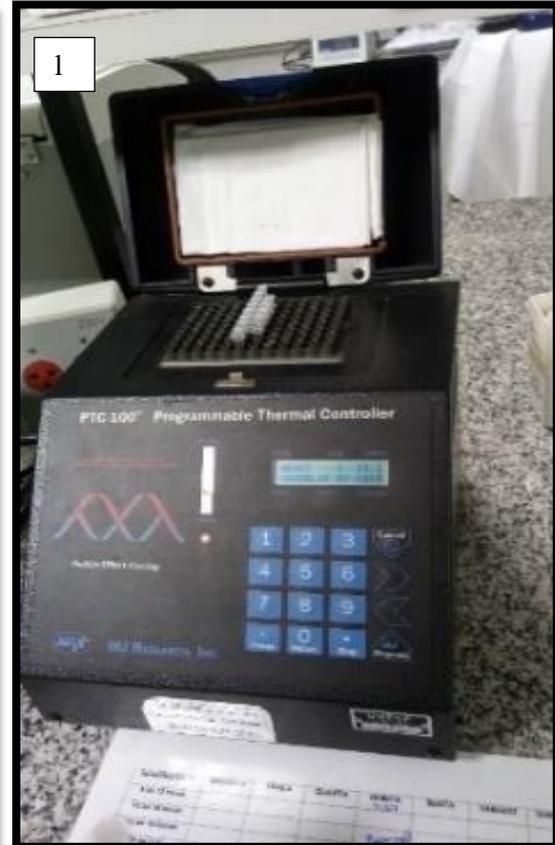
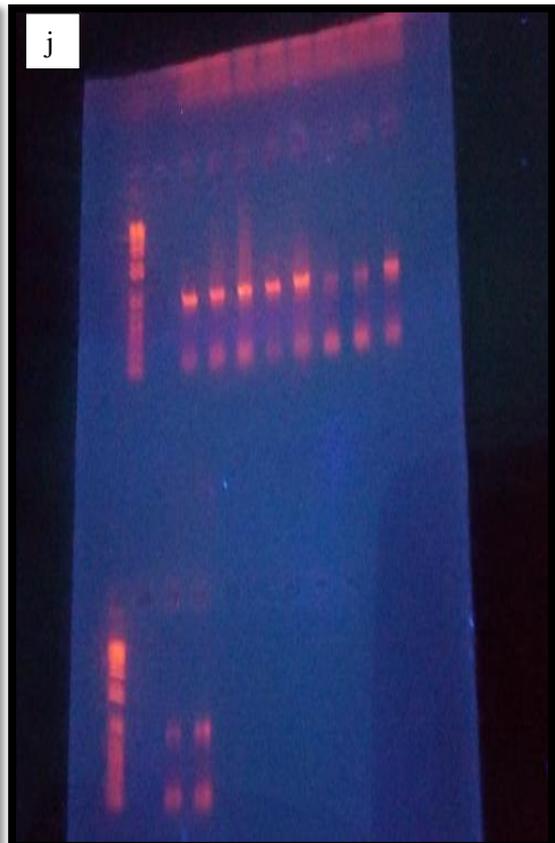
Posterior a la purificación, de los productos de la reacción de secuenciamiento se colocó en el analizador genético sequencer 3130-Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los datos que emitió este equipo fue procesado mediante el software Sequencing Analysis vs. 3.1.

3.6.7. Edición y alineamiento para la formación de secuencias consenso

Se obtuvieron las secuencias de Dna en bruto (Forward y Reverse) después de la reacción de secuenciamiento, sin embargo para tener la secuencias de consenso se realizó la edición y el alineamiento en el programa s Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zeland) donde se realizó la comparación en archivo *Fasta* y *Chromatogram* para entender la confiabilidad de las bases nucleotídicas.







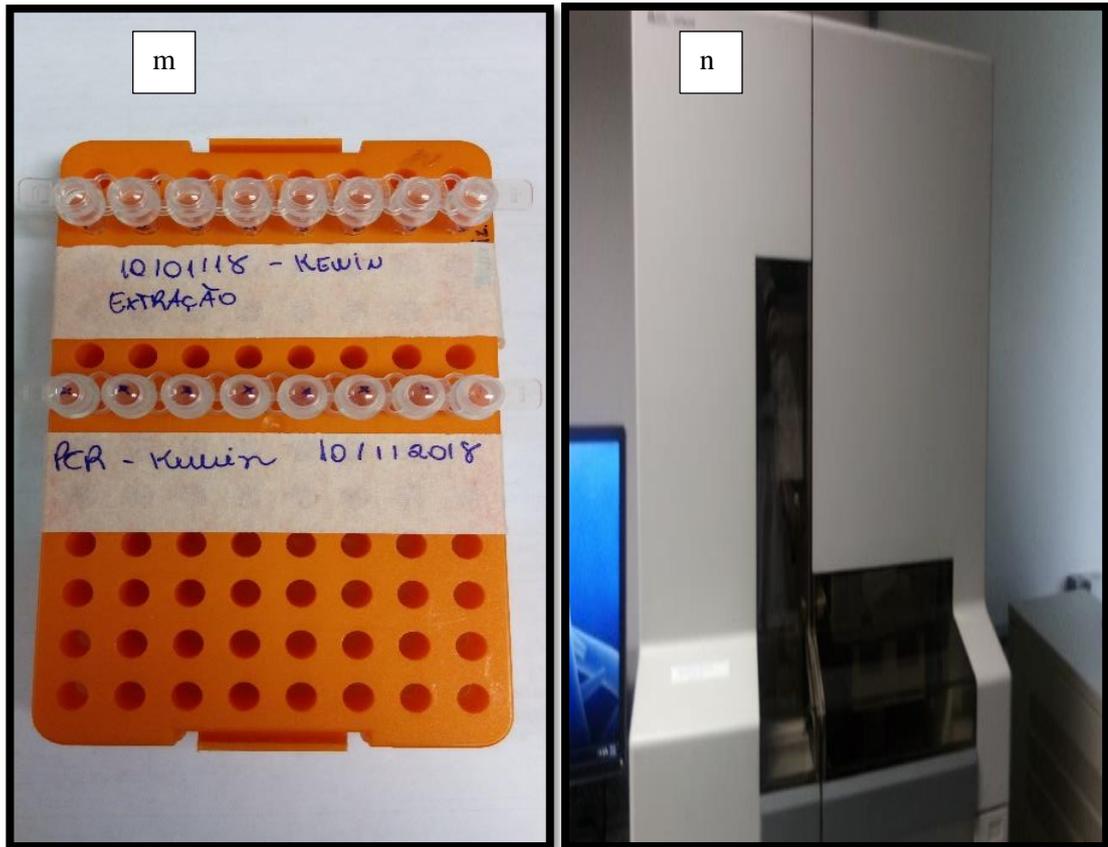


Figura 12. Obtención de la región control de DNA mitocondrial mediante la aplicación de PCR a) muestras de DNA almacenadas a -20°C b) transferencia de 1ul de DNA a nuevos strips c) utilizando el termociclador para realizar el PCR d) preparación del gel de agarosa e) condensación del gel de agarosa f) preparación del colorante “Read leader” g) colocando la solución del PCR junto al c”read leader” h) colocando la solución al gel de agarosa i) se colocó el gel en una cuba eléctrica j) visualización del gel en un transluminador uv k) PCR de secuenciamiento l) secado de las muestras después del PCR de secuenciamiento m) rotulado de las muestras obtenidas por el PCR de secuenciamiento n) procesando las muestras en el Analizador genético

3.6.8. Obtención de la matriz general con las secuencias consenso

Para la especie *Trichomycterus sp* se consideró 43 secuencias. Se obtuvo un total de 43 secuencias consenso en la matriz general. Se alinearon las secuencias consenso con el programa MEGA (Kumar, 2018). La matriz general o base fue optimizada mediante la Inserción de espacios o “gaps”, con la finalidad de mantener la homología entre algunas de las bases nucleotídica de los individuos estudiados. Para *Trichomycterus sp* se obtuvo en promedio 600 pb.

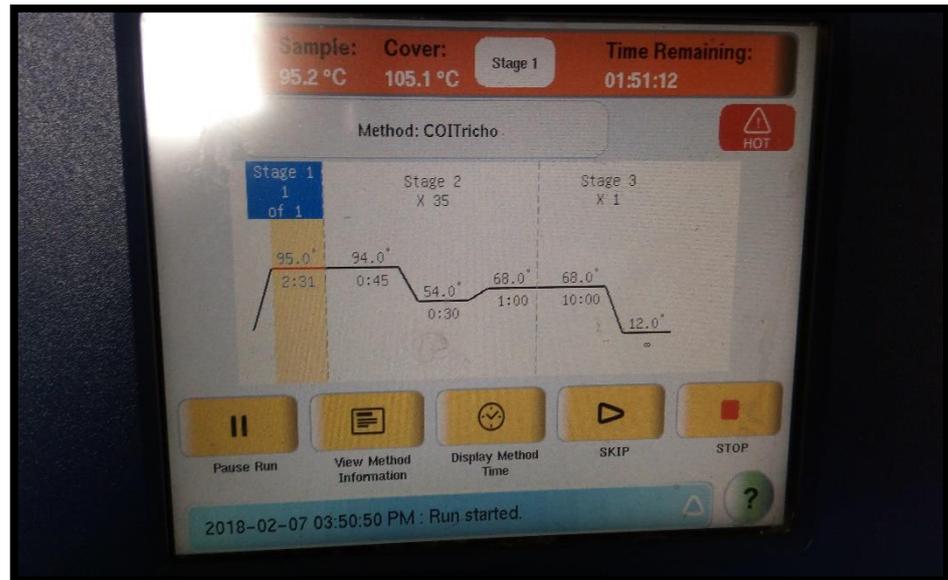


Figura 13. Obtención de la región control de Dna mitocondrial mediante la aplicación de PCR

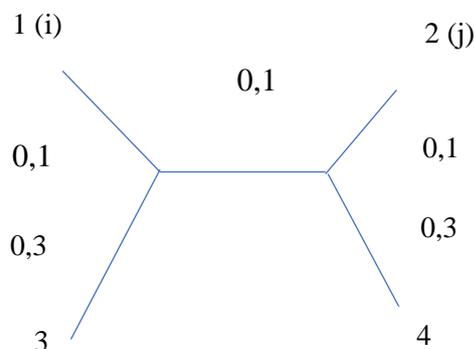
3.7. ANALISIS FILOGENÉTICO

Para la relación filogenética entre los individuos de *Trichomycterus sp.* y como grupo control genes de otros individuos del mismo género que fueron obtenidos de la plataforma digital Gen Bank (2019); *Trichomycterus areolatus*, *Trichomycterus punctulatus*, *Trichomycterus aff._sketi_(0504-I_ST31)*, *Trichomycterus aff._spilosoma*, *Trichomycterus cachiraensis*, *Trichomycterus laucaensis*, *Trichomycterus brasiliensis*, *Trichomycterus banneau*, *Trichomycterus inheringi*, las secuencias de su genes. Se construyó un árbol filogenético (filograma). Primero se obtuvo el mejor modelo de evolución, que fue $fi\backslash 193 + r$ (Tamura & Nei, 1993). Luego se construyó el árbol filogenético utilizando el programa MEGA X. Este análisis fue realizado bajo el criterio de Máxima Verosimilitud - MV (Felsenstein, 1981), cuyo principio es evaluar la probabilidad de un determinado modelo de cambio evolutivo para secuencias nucleotídicas y explicar el origen de los datos observados, y así permitir seleccionar a partir de una matriz, la topología que sea más verosímil. El nivel de confianza fue medido mediante el método no paramétrico bootstrap con 1000 réplicas; este análisis permite el re muestreo de caracteres de la matriz con reposición

de datos, generando así nuevas matrices. Para mayor resolución en los nodos, se adicionó como grupo externo a las especies antes mencionadas.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El método Neighbor Joining (Unión de Vecinos "Próximos") fue propuesto en 1987 por Saitou y Masatoshi Nei, que produce la unión de los OTU's (árbol filogenético) más cercanos (vecinos) tratando de minimizar la longitud total del árbol. Basado en una matriz de distancia en relación al taxón r , se calcula Q como sigue a continuación:



Los nodos 1 y 2 son los mas cercanos, pero 1 y 3 son los vecinos. Se calcula la divergencia de la red para cada OTU (Unidad Taxonómica Operacional), denominada con la letra r :

$$r(i) = di1 + di2 + di3 + \dots + dij$$

Se calcula la nueva matriz de distancias con la siguiente formula:

$$Mij = dij \frac{(r(i) + r(j))}{N - 2}$$

- Mij = Nueva distancia entre los OTU's i y j .
- dij = Distancia actual entre los OTU's i y j
- $r(i)$ = divergencia del OTU i
- $r(j)$ = Divergencia del OTU j
- N = Número de OTU's.

3.9. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA *Trichomycterus sp.*

3.9.1. Análisis de polimorfismo de DNA

Se realizó a partir de una matriz general conteniendo las secuencias consenso de todas las especies y con ayuda del programa DNÁSP v. 6.12.01 (Rozas *et al.*, 2018). Se obtuvieron parámetros genéticos para la región COI del DNA mitocondrial de cada especie: El número de Haplotipos (H), número de haplotipos únicos (Hu), la diversidad haplotípica (Hd), la diversidad nucleotídica (TT), número total de mutaciones (ETÁ), media de las diferencias nucleotídicas entre pares de individuos (K), número total de sitios, número de ciclos polimórficos (S), número de transiciones (ts), número de transversiones (Tv), el número de indels y la composición nucleotídica. Análisis de red de haplotipos Se realizó con ayuda del programa Network (Fluxus Technology, 2019) para crear una red entre los haplotipos de la especie *Trichomycterus sp.* Así, poder observar la proporción del número de individuos por haplotipos.

3.9.2. Estadístico de D Tajima

La D de Tajima es una estadística de pruebas genéticas de población creada por el investigador japonés Fumio Tajima y que lleva su nombre. La D de Tajima se calcula como la diferencia entre dos medidas de la diversidad genética: el número medio de diferencias por pares y el número de sitios de segregación, cada uno escalado de modo que se espera que sean iguales en una población de tamaño constante que evoluciona neutralmente.

$$E(pi) = \left[\frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}} \right] = 2N\mu$$



Donde:

S = número de sitios de segregación

n : es el número de muestras

N : tamaño efectivo de la población

μ : tasa de mutación en el locus genómico examinado

i ; índice de suma

π : diversidad nucleotídica

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AMPLIFICACIÓN DEL PCR

Bandas obtenidas de la región COI mediante la amplificación via PCR de los especímenes analizados de *Trichomycterus sp*, aproximadamente existe una amplificación de 640 pares de bases, en la parte izquierda está representado el control el cual posee 740 pares de bases, se deduce que se amplificó exitosamente cuando la coloración naranja es mayor en la parte superior (Figura 14),

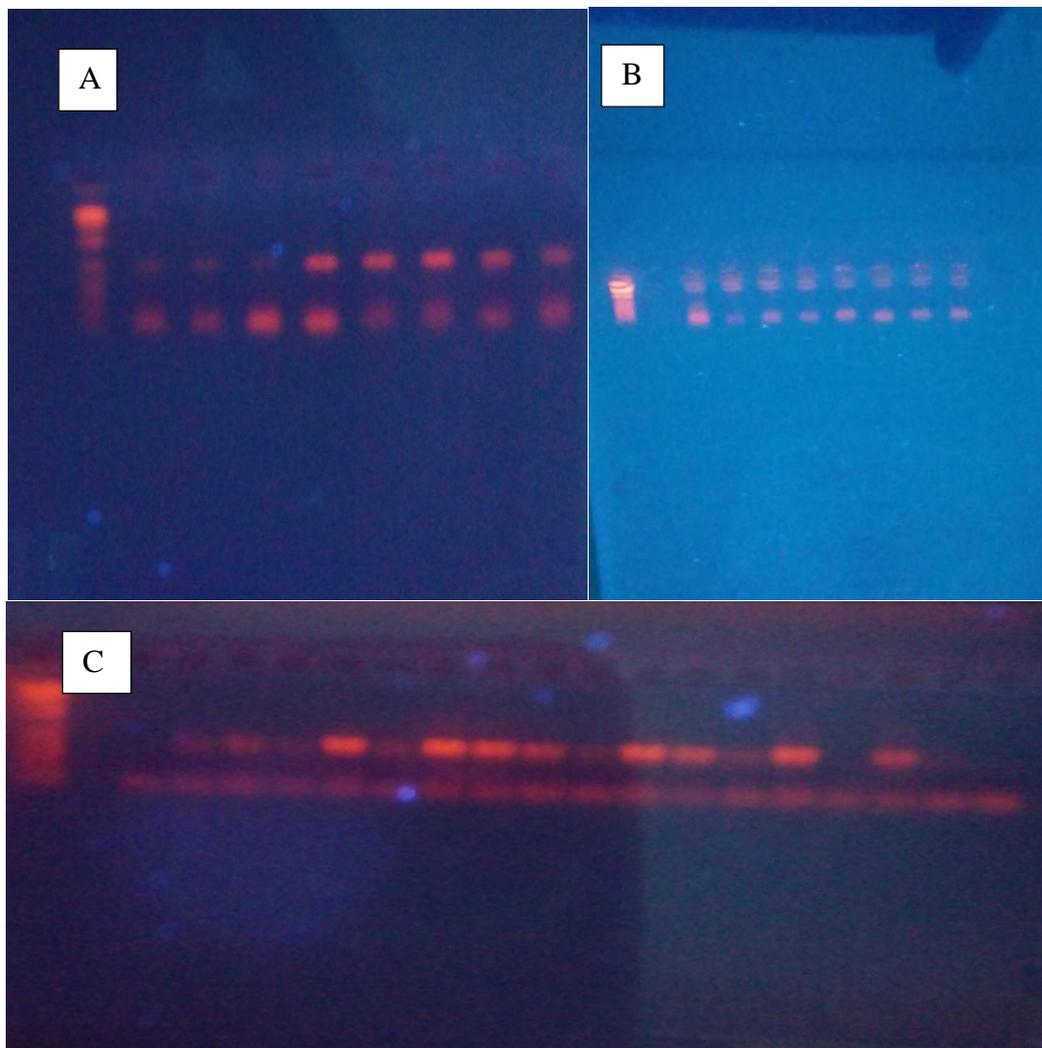


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas amplificadas de la región COI del DNAm de: *Trichomycterus sp*

Para extraer el DNA es necesario obtener una muestra de tejido, sin embargo, para poseer una mayor cantidad de DNA y de buena calidad se recomienda extraer una parte del músculo (Soares, 2008; Ochoa *et al.*, 2017), el PCR de los tejidos extraídos de *Trichomycterus sp.* no son de muy buena calidad pues fueron colectados de la aleta dorsal, asimismo el tejido de las aletas contiene muy poco DNA genómico o mitocondrial, pues está contenido mayormente por proteínas (Elorrieta, 1993).

4.2. IDENTIFICAR SI *Trichomycterus rivulatus* y *Trichomycterus dispar* DIVERGEN EN DOS ESPECIES DIFERENTES

4.2.1. Análisis de la matriz de la secuencia consenso y composición nucleotídica

El análisis de las secuencias consenso se efectuó utilizando el programa Geneious 4.8.5 (Biomatters Ltd. 2009). Todas las secuencias fueron alineadas usando algoritmo MUSCLE bajo los parámetros por defecto, el alineamiento fue revisado para evitar los errores en las secuencias, contaminación, entre otros. Posteriormente se analizó la composición nucleotídica con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) (**Tabla 4**), primero se sacó un promedio de los datos de todos los individuos de *Trichomycterus sp.*, donde se aprecia la concentración de Timina (T) y Citosina (C) es semejante con valores de 27,8% a 31,1%; 26,4% - 28,7%, mientras tanto la concentración de Adenina (A) es menor (24,4% - 26,2%) y la concentración de Guanina (G) (16,6% - 19,9%) disminuye aún más. Sin embargo, la proporción de las concentraciones es parecida comparando con las secuencias control.

Tabla 4. Porcentaje de la composición nucleotídica para la región control del DNA mitocondrial de especies del género *Trichomycterus*

Especies	T(U)	C	A	G
<i>Trichomycterus rivulatus</i>	28,8%	28,2%	26,0%	17,0%
<i>Trichomycterus cachiraensis</i>	31,1%	27,6%	24,4%	16,9%
<i>Trichomycterus laucaensis</i>	29,2%	28,5%	25,7%	16,6%
<i>Trichomycterus inheringi</i>	28,5%	26,4%	25,1%	19,9%
<i>Trichomycterus punctulatus</i>	27,8%	28,7%	25,3%	18,1%
<i>Trichomycterus aff. sketi (0504-I ST31)</i>	28,4%	28,2%	26,2%	17,2%
<i>Trichomycterus aff spilosoma</i>	28,7%	27,6%	25,9%	17,8%
<i>Trichomycterus banneaui</i>	28,9%	28,2%	25,3%	17,6%
<i>Trichomycterus brasiliensis</i>	28,7%	28,0%	24,4%	18,9%
<i>Trichomycterus areolatus</i>	30,2%	27,1%	23,5%	19,2%

Fuente: Elaboración Propia

En la composición nucleotídica de *T. rivulatus* claramente se aprecia que hay una mayor cantidad de timinas (T) y/o uracilo (U), lo que concuerda con Ochoa *et al.*, (2017) reportando para la nueva especie *T. pascualii*, el cual presenta 29,8% de timina (T), también Da Silva, (2010) encontró para *Trichomycterus inheringi* una mayor concentración de la misma base nitrogenado. Sin embargo no concuerda con lo que manifiesta Soares, (2008) quién en el análisis realizado a toda la superfamilia Loricarioidea encontró que existe una mayor presencia de Adenina (A) y que este nucleótido esta presente en la misma cantidad en la mayoría de especies de esta superfamilia a la cual pertenecen los *Trichomycteridos*.

4.2.2. Relación Filogenética

El árbol filogenético (Figura 15) se construyó bajo el criterio de máxima verosimilitud (MV), a partir del modelo de evolución nucleotídica fN93 + r (Tamura & Nei, 1993), En la topología del árbol filogenético muestra la formación de dos grupos dentro de las especies del género (bootstrap de 1000). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. Se eliminaron todas las posiciones



que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 364 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X.

Todos los individuos de *Trichomycterus* analizados pertenecen a *Trichomycterus rivulatus*, esto probablemente debido a que en el Altiplano se registre solo la presencia de una especie, sin embargo esta especie tiene una gran plasticidad fenotípica, pues se ha registrado individuos de variados fenotipos.

En el análisis de divergencia genética entre los individuos de *Trichomycterus sp.* se detectó que la menor distancia obtenida fue de 0,000 lo que significa que estos organismos presentan una misma composición genética, esta cifra se presenta en la mayoría de los organismos estudiados, tal como se aprecia (**Figura 15**) en la rama “A” agrupa a individuos registrados como mauris, de las zonas de Moho y Chucuito que son parte del Lago Titicaca, sin embargo también incluyen a un individuo de la laguna Saracocha, el cual fue identificado como *Trichomycterus rivulatus* (suche), según De Sostoa, 2010 manifiesta que hace muchos años, la laguna de Saracocha y el lago Titicaca tenían conexión a través de un río, y que las poblaciones de peces se trasladaban entre el lago y la laguna, por tanto la separación geográfica es reciente y por ello se explicaría que no hay especiación significativa entre las poblaciones de *Trichomycterus sp.* del lago Titicaca y la laguna Saracocha, así también se encuentra que existe bastante similitud con individuos de la laguna de Orurillo, esto probablemente por las campañas de repoblamiento de especies ícticas nativas que se han realizado por parte de las instituciones del estado, “sembrando” individuos de la especie *Trichomycterus sp.* en laguna altoandinas.



Para el grupo de la rama “B” los individuos que conforman este grupo son del sector de Chucuito del Lago Titicaca y la distancia genética no es muy significativa, pues además de agrupar a individuos de la rama “A” y tan solo los separa un 0,14% de distancia genética, por otro lado en la rama “C” con una distancia de 0,11% con respecto a la rama B; y los individuos que componen este grupo son de la del Lago Titicaca sector Chucuito y de la laguna Orurillo .

Mientras que para el grupo de la rama “D” la mayoría de individuos que componen este grupo son de la laguna Saracocha, como también del Lago Titicaca del sector Huancané, como también se puede notar que todos los individuos fueron descritos como suches, en el análisis se demostró que existe una distancia genética de 0,33% respecto al grupo “A”, con la rama “B” de 0,32% y con la rama C no hay distancia significativa, por tanto se encuentra relativamente mas aislada de los otros grupos, pero mas cercano al grupo C.

Para el grupo “E”, los individuos de esta rama pertenecen a la laguna Saracocha, se observa que existe una distancia de 0,21% respecto a la distancia con el grupo A, mientras que con el grupo B se encuentra mucho mas cercano, pues la distancia tan solo es de un 0,1%, así mismo con los grupos C y D la distancia tan solo oscila entre el 0,01% y 0,1% respectivamente.

De la misma manera, el grupo de la rama “F”, contiene a individuos de las laguna Orurillo, Lago Titicaca sectores de: Juli, Moho, Chucuito. La rama F con el grupo A manifiesta una distancia de 0,1%, sin embargo con el grupo B, manifiesta distancia significativa pues el valor es de tan solo 0,01%; mientras tanto la diferencia con el grupo C se amplía a una distancia de 0,2%, con el grupo D manifiesta una distancia de 0,4% con el que se encontraría relativamente más



distanciado; así mismo con el grupo E, tiene una distancia de tan 0,1% con el que se encuentra mas cercano.

Por último para el grupo de la rama “G” los individuos que se encuentran aquí son de la laguna Pacharí, Lago Titicaca de los sectores: Juli y Moho; aquí también se encuentra *Trichomycterus laucaensis*. Esta rama denota una distancia del 0,29% con el grupo de la rama A, con el grupo de la rama B existe una diferencia de 0,25%, para con el grupo C, la distancia se amplía a un 0,26%; mientras que para el grupo D la distancia disminuye a un 0,1% y para el grupo E se aleja a un 0,26% y para con el grupo F, la distancia encontrada tan solo es de 0,1%. Según esta comparativa, las diferencias no son tan significativas y los grupos en mención se encuentran cercanos, registrándose como mayor valor a nivel grupal un 0,4% de distanciamiento, y un 0,01%; lo cual los refiere como una sola especie.

Los mayores valores registrados fue de 0,0078476551 entre los individuos recolectados en Juli y la laguna Orurillo respectivamente, que geográficamente se encuentran distantes, pero esta cifra no es significativa pues correspondería solo a un 0,8% de distancia y para considerarse una especie diferente es necesario tener una divergencia mayor al 3%. Aunque se puede deducir que las poblaciones de *Trichomycterus sp.* están en un proceso de especiación.

En cuanto a las comparaciones con otras especies del mismo género que habitan en lugares cercanos donde habita *T. rivulatus* se pudo observar que la especie *Trichomycterus laucaensis* la cual es una especie que habita a 4300 msnm en los ríos del Valle Lauca en Chile, posee la misma composición genética que *T. rivulatus*, pues según las comparaciones de los pares de base con nuestra



especie en estudio tan solo existe una distancia entre 0,01% y la mayor de un 0,3%, por lo que se deduce que *Trichomycterus laucaensis* se encuentra en un proceso reciente de especiación; esto probablemente por que hace miles de años el lago Titicaca estuviera conectado mediante los ríos con varias lagunas altoandinas y que por diversos factores geográficos se hayan aislado de esta gran masa de agua. La hipótesis que se maneja es que el lago Titicaca se haya separado hace miles de años del río Lauca esto debido a lo se conoce como el evento de Parinacota (formación del volcán de Parinacota), este hecho fue el que originó la separación del lago con el Río Lauca, sin embargo aunque pasó hace tiempo, se puede observar que las distancias genéticas son casi nulas, y que prácticamente son la misma especie.

Ahora bien las distancias genéticas analizadas, entre individuos del *Trichomycterus sp.* estudiado no hay distancias genéticas significativas, pues la mayoría registra una distancia de entre 0,001 + 0,008 lo cual en porcentaje representa un 0,1% y 0,8%. Por otro lado comparando a *T. rivulatus* con las especies control se observa las distancias para con *Trichomycterus cachiraensis* 5,5%, *Trichomycterus inheringi* 9,3%, *Trichomycterus punctulatus* 6%, *Trichomycterus aff. sketi (0504-I ST31)* 6,1%, *Trichomycterus aff. spilosoma* 6,1%, *Trichomycterus banneaui* 8%, *Trichomycterus brasiliensis* 6%, *Trichomycterus areolatus* 8%.

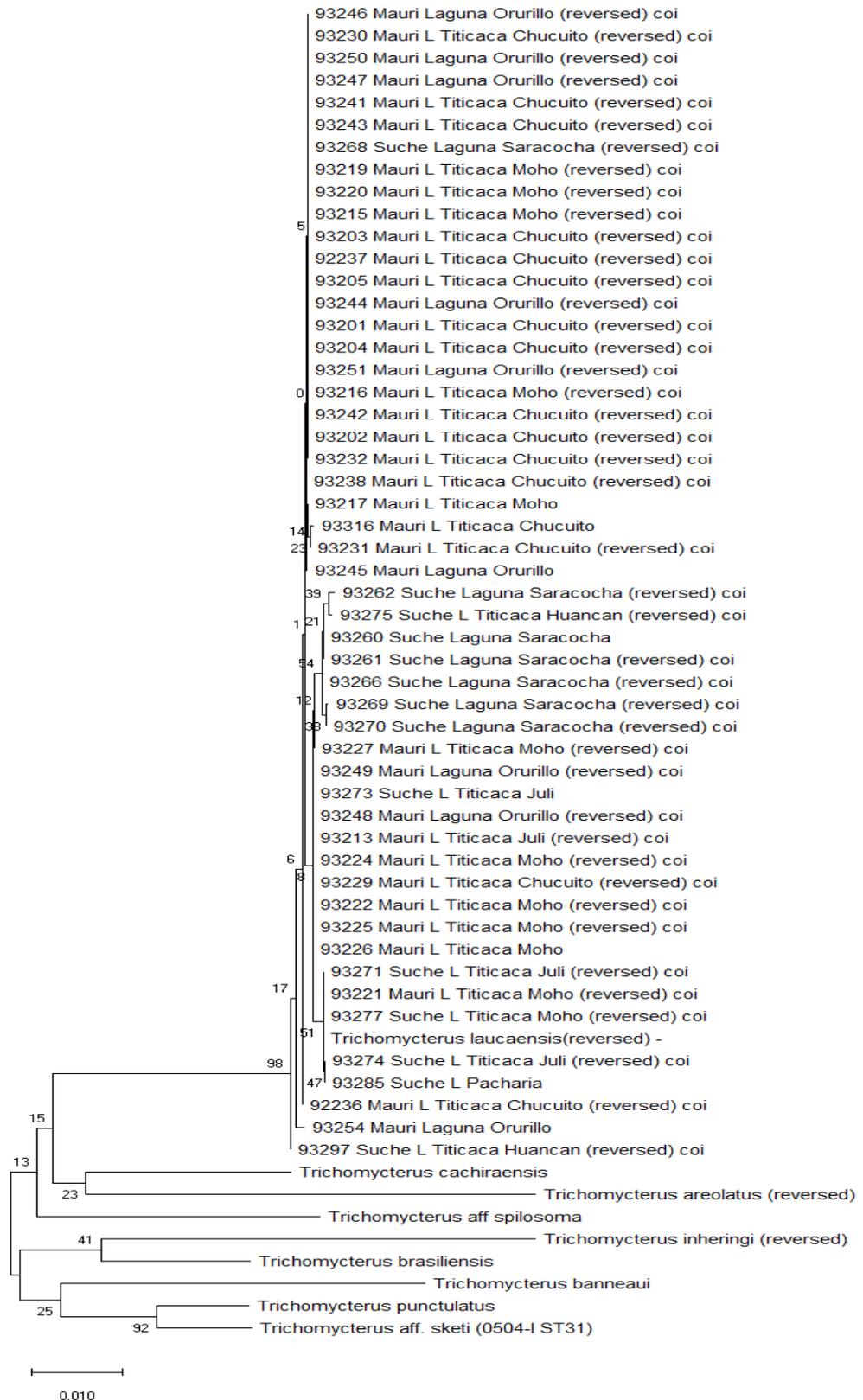


Figura 15. Filograma de máxima verosimilitud con 1000 de bootstrap, de 51 individuos de la especie *Trichomycterus sp.* (Suche y Mauri). Como grupo externo *Trichomycterus cachiraensis*, *Trichomycterus laucaensis*, *Trichomycterus inheringi*, *Trichomycterus punctulatus*, *Trichomycterus aff. sketi* (0504-I ST31), *Trichomycterus aff spilosoma*, *Trichomycterus banneai*, *Trichomycterus brasiliensis*, *Trichomycterus areolatus*



Tal como sucede con las especies mencionadas por Leyva, (2003) *Sardinops sagax caeruleus* y *Sardinops sagax melanosticus* donde la homología de su DNA es de un 100%, de la misma manera en que ocurre con los individuos de *Trichomycterus sp.*, donde la similitud del DNA de esta especie es del 99,6%. Mientras que según lo reportado por Pineda *et. al.*, (2007) la especie *Brycon henni*, registró similitudes en el DNA de entre 99,3% hasta 96%, aún así se les continúa considerando que los individuos pertenecen a la misma especie. Los datos registrados de *Trichomycterus sp.* no son similares con los de la especie *Colossoma macropomum* evidenciado por Pineda *et. al.*, (2007), pues ocurre que esta especie tiene una distancia genética del 34%, donde se considera que los individuos evaluados son especies diferentes.

En tanto para las especies mas cercanas del Orden Siluriformes, en los estudios realizados por Mori, (2010) entre las especies *Brachyplatystoma. rousseauxii* y *Brachyplatystoma filamentosum* evidencian una distancia genética de hasta 7%, por lo cual se concluye que las especies son diferentes, sin embargo en los *Trichomycterus sp.* del altiplano, esto no sucede, pues la distancia genética entre los individuos es menor al 0,7%. De igual modo sucede con las especies *Brachyplatystoma tigrinum* y *Pseudoplatystoma punctifer* también estudiadas por Mori, (2010) donde evidentemente se observó una distancia genética del 21% y así se concluye la clara diferencia interespecífica.

Para las especies del género *Trichomycterus*, tal como lo reporta Mehana, (2010) en el estudio realizado a poblaciones de *Trichomycterus de la cuenca Paraguaya, Brasilera* existe una diferencia intraespecífica entre los individuos; donde la población de *Trichomycterus sp. n1*, *Trichomycterus sp. n2*, *Trichomycterus sp. n3*, de 0,15%; 0,79%; 1,27%, respectivamente, y se observa la evidente distancia genética comparado a los resultados del presente estudio pues las distancias genéticas



intraespecíficas, van del 0,0% (no existe distancia genética) hasta valores máximos de 0,7% lo cual indica que no hay distancia genética significativa entre los individuos de *Trichomycterus sp.* de la cuenca altiplánica.

Por otro lado Mehana, (2010) en cuanto al análisis interespecífico comparando sus especies en estudio y *Trichomycterus brasiliensis*, encontró que distancia fue de entre 12,16% a 21, 18%, sin embargo las especies del presente estudio *Trichomycterus sp.* de la cuenca altiplánica, donde las distancias genéticas interespecíficas con *Trichomycterus brasiliensis* están entre 5,6% y 8,3%; por lo que se deduce que estas especies son mas cercanas, pues la distancia genética es menor, comparado a los otros especímenes, que geográficamente se encuentran más cerca. Mientras que en a comparación de *Trichomycterus iheringi*, con los *Trichomycterus sp.* de la cuenca Paraguaya – Brasilera, reportan diferencias de solo 0,53%, sin embargo las diferencias con *Trichomycterus rivulatus* de la cuenca altiplánica las distancias interespecíficas son mayores, con valores de 8,8% hasta 9,3%, claramente por la distancia geográfica.

En estudios recientes Ochoa *et.al.* (2017) manifiesta que la especie en estudio *Trichomycterus pascuali* y *Trichomycterus brasiliensis* presentan una distancia genética de 11,7%, este valor indica que son especies diferentes como tal, pero según las comparaciones genéticas entre *Trichomycterus rivulatus* y *Trichomycterus brasiliensis*, denotarían mas cercanía entre estas especies, pues registran valores de hasta 8,3%, lo cual es menor al valor registrado con su congénere *T. pascuali*.

Según De Sostoa *et. al.*, (2010) para en los análisis genéticos efectuados con el gen CytB manifiesta que, la mayoría de los individuos de *Trichomycterus*, pertenecen a *T. rivulatus*, donde se puede observas que las distancias genéticas tienen valores de 1% y 2% entre los diferentes puntos de muestreo dentro del lago, como



también con las lagunas altoandinas, lo cual coincide relativamente con el presente trabajo, pues también casi en su totalidad los individuos pertenecen a una sola especie la cual es *Trichomycterus rivulatus*, pues las distancias genéticas entre individuos 0,0% que indica que son muy similares, hasta un 0,8%; la cual no es muy significativas. Sin embargo, De Sostoa *et. al.*, (2010) encontró valores mayores, esto probablemente por la metodología utilizada, pues se trabaja con mayor número de pares de bases (1000pb), y en el presente trabajo se utilizó aproximadamente 750 pb. Aún así se puede diferir que los individuos de *Trichomycterus* de la cuenca del Titicaca pertenecen a una sola especie.

4.3. DETERMINAR LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO

Trichomycterus.

Durante años se ha tenido la premisa de que en el lago Titicaca y sus alrededores ha existido la presencia de 2 especies de *Trichomycterus* (Dejoux & Iltis, 1991; Arratia, 1982)), *Trichomycterus rivulatus* y *Trichomycterus dispar* (Cuvier & Valenciennes, 1846; Tschudi, 1846) presentando diferencias morfológicas, tal como tamaño de la cabeza, longitud total, número de radios en las aletas (Eigenmann, 1918; Jara, 2001; Paca et al., 2003; Crespo, 2005), todas ellas utilizaron la morfología como determinación en la identificación de especies, lo que contradice a este estudio que utilizó análisis molecular.

Sin embargo en el análisis realizado con Citocromo b a 134 especímenes de *Trichomycterus* sp. del anillo circunlacustre del lago Titicaca se concluyó que todos los individuos pertenecen a una sola especie, considerándose como *Trichomycterus rivulatus*(de Sostoa et al., 2010),en este estudio con el COI como en el estudio realizado por (De Sostoa et al., 2010) lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio utilizando el citocromo oxidasa subunidad I, pues las distancias genéticas



de los individuos del lago Titicaca, laguna Pacharia, laguna Saracocha, laguna Orurillo, van desde $0,005 \pm 0,001$ lo que indica que son la misma especie presentando polimorfismos, y que para considerarse una nueva especie la distancia genética debe ser mayor al 3% (Ochoa et al., 2017) lo que no sucede con nuestras muestras pues los valores encontrados son menores al 1%.

Por otro lado también se consideran como especie cercana a *Trichomycterus laucaensis*, las que habitan cuerpos de agua chilenos, que demográficamente se encuentran cerca de la cuenca del Titicaca (Arratia et al., 1981; Arratia, 1982; Arratia, 1989); sin embargo al comparar las secuencias de DNA obtenidas del Gen Bank se pudo detectar que *Trichomycterus laucaensis* genéticamente es una especie que posee un 99% de semejanza con *T. rivulatus*, lo que supone que en el pasado la cuenca del Titicaca haya estado en contacto con el río Lauca de Chile y que por eventos geológicos se hayan separado debido a barreras demográficas, por lo que es de necesidad realizar más comparaciones entre estas especies.

Entre las especies del género *Trichomycterus sp.* (Suche, Mauri) *Trichomycterus cachiraensis*, *Trichomycterus laucaensis*, *Trichomycterus inheringi*, *Trichomycterus punctulatus*, *Trichomycterus aff. sketi* (0504-I ST 31), *Trichomycterus aff. spilosoma*, *Trichomycterus banneui*, *Trichomycterus brasiliensis*, *Trichomycterus areolatus* son totalmente concordantes en cuanto a la monofilia encontradas a partir de datos morfológicos (Tschudi, 1846; Cuvier & Valenciennes 1846; Arratia et al., 1981; Arratia, 1982; Arratia, 1983; Datovo & Bockmann, 2010;), similares a los resultados obtenidos por DNA.

4.3.1. Polimorfismo DNA

Los resultados obtenidos en el análisis de polimorfismo de la región control del DNA mt para las cinco especies en estudio muestran que *Trichomycterus* presentó los siguientes parámetros genéticos ($H = 7$, $Hd = 0,663$, $Pi = 0,11566$, $Eta = 0,08563$, $S = 161$, $k: 42,09979$) donde H es el número de haplotipos, Hd diversidad haplotípica, Pi es la diversidad nucleotídica, Eta es el número total de mutaciones, S es el número de sitios polimórficos, k es el número promedio de diferencias de nucleótidos.

Se nota la gran cantidad de polimorfismos (161) en 51 individuos, lo que podría deducirse que esta especie posee una amplia plasticidad fenotípica. Aplicando la estadística del Test D de Tajima 1,16852, $P > 0,10$ no es significativo, lo que indica un exceso de heterocigosidad para el número de sitios segregantes. La mayoría de las mutaciones son comunes y no hay suficientes mutaciones raras. Esto podría deberse a que la selección promueve el mantenimiento de múltiples alelos en un sitio durante mucho tiempo, o debido a la mezcla de dos poblaciones diferentes en proporciones iguales.

4.3.2. Proporción de haplotipos

De la especie *Trichomycterus rivulatus* en estudio, se presentó solo siete haplotipos en los 51 especímenes analizados, de los cuales el haplotipo 6 fue el que presentó el mayor número de individuos (24), el haplotipo 5 con el mayor número de haplotipos únicos. Los demás haplotipos se registraron en una menor cantidad de individuos: haplotipo 2 en 4 individuos, haplotipo 3 en 3 individuos, haplotipo 1 en 1 individuo, haplotipo 4 en 1 individuo y haplotipo 7 en 1 individuo.

Los haplotipos 5 y 6 fueron los más comunes (Hap5 y Hap6) siendo el haplotipo 6 el más dominante 47,5% seguido del haplotipo 5 con 33,3%, el



haplotipo 5 fue el que se compartió más entre los lugares (laguna Saracocha, laguna Orurillo, lago Titicaca: sector Chucuito, sector Juli y sector Moho), el haplotipo 6 es compartido entre las poblaciones de laguna Orurillo, lago Titicaca: sector Chucuito y sector Moho, semejante al que ocurre en el haplotipo 2; por otro lado en el haplotipo 3 se registra la presencia de individuos de la laguna Saracocha, lago Titicaca: sector Moho y sector Juli; mientras que en haplotipo 1 se registra al individuo de la laguna Pacharia, y en los haplotipos 4 y 7 denota la presencia de 1 individuo del sector Huancané respectivamente

La red de haplotipos muestra con mayor claridad el número de haplotipos y sus proporciones en las diferentes especies.

Por cuanto a la diversidad haplotípica, que denota la presencia el número de haplotipos presentes; cabe resaltar que en el Clado I se registra a individuos de las lagunas altoandinas (lagunas: Saracocha, Pacharia, Orurillo) y a algunos individuos del lago Titicaca de las zonas Chucuito y Moho. Mientras que en el Clado II se reportan la mayoría de individuos del lago Titicaca de las zonas Moho, Chucuito y Huancané, También la presencia de individuos de la laguna Saracocha y laguna Orurillo, esto probablemente porque estas lagunas en algún momento estuvieron conectadas con el lago Titicaca y las poblaciones registran una diferenciación genética reciente (**Figura 16**).

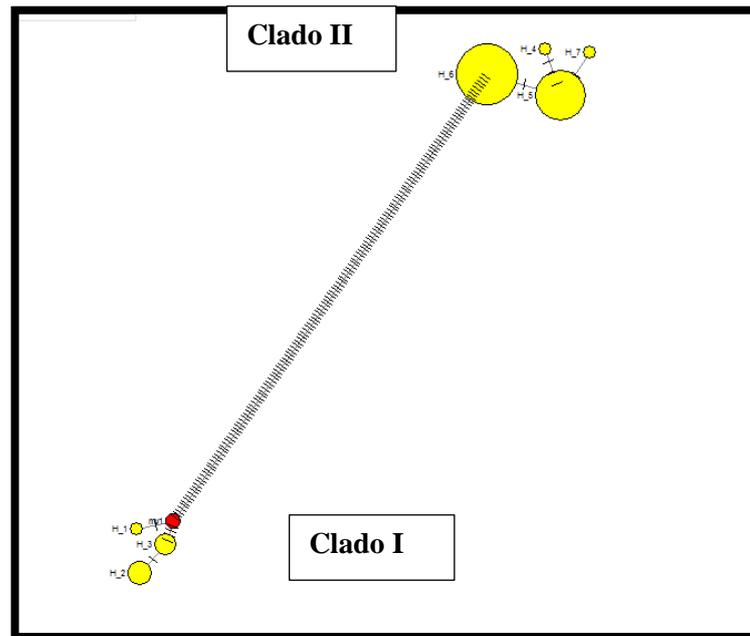


Figura 16. Red de haplotipos donde el tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos por cada haplotipo

Los resultados obtenidos en el polimorfismo de DNA muestran que *Trichomycterus rivulatus* presenta menor variabilidad genética número de haplotipos ($H=7$), número de sitios polimórficos ($S: 161$), número de mutaciones ($ETA= 162$), comparación entre los *Trichomycterus* de la región Puno. Conociéndose que la variabilidad genética está en función a la tasa de mutación y su probabilidad de fijación (McMillan & Palumbi, 1997), y que esta última esté directamente relacionada con la reproducción, que permite el repaso de un carácter genético de una generación a la siguiente (Alberts *et al.*, 1996). Era de esperarse que *Trichomycterus rivulatus* presentase una reducida variabilidad genética debido a que es una especie que desde años atrás viene siendo capturada.

La variabilidad genética de una especie, también puede ser evaluada a partir de sus haplotipos, considerándose una baja variabilidad genética cuando la relación entre el número de haplotipos y el número de especímenes analizados se aproxima a cero (Mori *et al.*, 2012), para la especie *Trichomycterus rivulatus* la relación entre el



número de haplotipos y el número de especímenes obtenido es de 0,1372 lo que indica que existe 1 haplotipo por cada 10 individuos aproximadamente. Sin embargo en el estudio realizado por De Sostoa *et al.*, (2010) sostiene que se ha encontrado tan solo 4 haplotipos en una población de estudio mucho mayor (134 individuos) lo cual considera que es muy baja, mientras que en el estudio presente se ha reportado una mayor cantidad de haplotipos (7), aun así se sigue considerando una baja variabilidad. Se tuvo mayor cantidad de individuos en los haplotipos 5 y 6 respectivamente y la mayoría son de las localidades de Moho y Chucuito, lo que concuerda con lo que refiere De Sostoa *et al.*, (2010) donde el haplotipo 1 es el más abundante el cual es de las localidades Ojherani y Moho. la diferencia de los parámetros genéticos de diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (rr) de la región control del COI para otras especies del género *Trichomycterus* dan soporte a lo mostrado anteriormente, acerca de la variabilidad genética de esta especie no se tiene muchos estudios, sin embargo se puede inferir de la reducción de las poblaciones de esta especie por la poca presencia que registra.

En la definición de Wright (1978) se pueden clasificar las poblaciones en cuatro niveles de variabilidad genética (F_{ST}): baja (0,00 a 0,05), moderada (0,05 a 0,15), alta (0,15 a 0,25) y elevada ($> 0,25$) a variabilidad genética obtenida fue de 0,00098 lo cual es muy baja comparado con los estudios de poblaciones de otros peces, tal como las poblaciones españolas de *Tinca tinca* con un promedio de 0,0129 de variabilidad genética (Elorrieta, 1993) o peces marinos de Chile *Macrourus holotrachys*, *Caeloinchus fasciatus* y *Antimora rostrata* reportan una baja variabilidad genética, en el mismo orden anterior: 0,03; 0,026 y 0,05 (Oyarzún *et al.*, 1997),

Para *Brachyplatystoma flavicans*, *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* también se presenta una baja variabilidad con $0,012 \pm$



0,021 (Coronel *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2012).y de la misma manera en *Brycon orbyniagnus* se observa $0,0125 \pm 0,0104$ (Lopera, *et al.*, 2008)

Por otro lado poblaciones como *Solea senegalensis* (lenguado) presenta una alta variabilidad genética de 0,24 (Diaz *et al.*, 2012); así también *Leporinus elongatus* $0,444 \pm 0,425$, *Prochilodus lineatus* $0,498 \pm 0,448$ de variabilidad genética (Lopera, *et al.*, 2008), en las misma circunstancia *Osteoglossum bicirrhosum* denota $0,83 \pm 0,50$ (Chota *et al.*, 2016)



V. CONCLUSIONES

Mediante la utilización de DNA barcode se determinó para el lago Titicaca y lagunas altoandinas registran las distancias genéticas, se van 0,01% a 0,8%, donde se registró que la mayoría de individuos manifiestan una distancia genética menor al 0,1% por lo cual se concluye que son la misma especie, aunque se puede denotar que existe un leve proceso de especiación.

Donde se puede apreciar mejor la distancia genética es en las agrupaciones obtenidas, debido a que los individuos del sector Chucuito (lago Titicaca) presentan mayor presencia encuentra en las ramas **A,B,C,F**, la distancia existente entre estas ramas va desde 0,01% hasta los 0,3%. Otro grupo de individuos interesantes son los del sector Moho (lago Titicaca), que se encuentran en los grupos **A,F,G**; donde los valores hallados oscilan entre 0,1% al 0,3%. Lo particular es la posición de los individuos de la Laguna Saracocha pues se encuentran exclusivamente en solo ramas **D y E**, aquí se observa un proceso de especiación pues se diferencia del resto de grupos, con valores no mayores al 0,4%. Así también la rama **G** tiene un agrupación particular, aquí tenemos a especímenes de la laguna Pacharúa, sectores Moho y Juli (Lago Titicaca) pero también a *Trichomycterus laucaensis* (especie chilena), las distancias encontradas de 0,23% al 0,29% respecto a los otros grupos. Algo conforme a los factores biogeográficos entre individuos de *Trichomycterus sp.* del lago Titicaca, laguna Saracocha, laguna Pacharúa, lagunas Orurillo, por lo que se concluye que pertenecen a una sola especie, *Trichomycterus rivulatus*, y se infiere que esta especie presenta una amplia plasticidad fenotípica, descartando la hipótesis de la presencia de 2 especies *Trichomycterus rivulatus* y *Trichomycterus dispar*. De la misma manera también se puede notar que las especies



de *Trichomycterus* son un grupo monofilético, lo que confirma la inclusión de *Trichomycterus rivulatus* al género.

La variabilidad genética dentro de *Trichomycterus rivulatus*. del lago Titicaca y lagunas altoandinas es baja, se registraron 7 haplotipos diferentes, donde dos de ellos son los que tienen mayor presencia (5,6) con presencia media los haplotipos (2,3) y menor presencia los haplotipos (1,4,7). Por lo que los haplotipos con mayor presencia se comparten entre los individuos del lago Titicaca, laguna Orurillo y laguna Saracocha. Teniendo en cuenta que se considera una variabilidad baja con valores menores a 0,00 – 0,05, en este estudio se obtuvo 0,0009, por lo que se concluye que tiene una variabilidad baja. Probablemente debido a que es un sistema endorreico cerrado y la posibilidad de recombinación genética es menor, además que las poblaciones distribuidas son de menor proporción, aunando a ello los factores tal como la sobrepesca de la especie, así como a la disminución sus poblaciones por la presencia de especies piscívoras. Con los factores arriba mencionados hacen que la variabilidad genética de la especie se vea seriamente afectada, lo que conllevaría a un proceso de extinción, además que la especie *Trichomycterus rivulatus* es una especie endémica de la cuenca del Titicaca.



VI. RECOMENDACIONES

Para continuar con el estudio es de necesidad realizar un muestreo que incluya más zonas y de esta manera las comparaciones se efectúen de manera más efectiva, y también con una mayor cantidad de muestras para determinar la variabilidad genética.

También es de necesidad utilizar otros tipos de marcadores genéticos y realizar las comparaciones respectivas, para que de esta manera la comparación sea mucho más efectiva.

Es de necesidad usar monitoreos genéticos en las poblaciones de *Trichomycterus* de la cuenca del Titicaca, para observar la pérdida de variabilidad genética en estas especies que constituyen una fuente económica importante para los habitantes del anillo circunlacustre del lago Titicaca.

Proponer mejores estrategias de conservación (vedas), y estas poblaciones se recuperen de la presión genética.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriaens, D., Baskin, J., & Coppens, H. (2011). Evolutionary morphology of trichomycterid catfishes : about hanging on and digging in, 1–39.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J. D. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega. S. A 1385pp.
- Aliaga, C. (2004). Variabilidad genética de *Colossoma macropomum* y *piaractus brachypomus* en la region del alto maderá (amazonía boliviana) para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias. Universidad Mayor de San Andrés.
- Arratia, G., Rojas, G., & Chang, A. (1981). Géneros de peces de aguas continentales de Chile. Santiago, Chile: Universidad de Chile.
- Arratia, G. (1982). El Hombre y los Ecosistemas de Montaña - El ambiente natural y las poblaciones humanas del norte grande de Chile, (February). 455
- Arratia, G. (1983). Preferencias de habitat de peces siluriformes de aguas continentales de Chile (Fam . Diplomystidae y Trichomycteridae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 217–237. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/0165052830936063>
- Arratia, G. (1987). Description of the primitive family Diplomystidae (Siluriformes, Teleostei, Pisces): morphology, taxonomy and phylogenetic implications. *Bonner Zoologische Monographien*, 24: 1-120.
- Arratia, G. (1990^a). Development and diversity of the suspensorium of trichomycterids and comparison with loricarioids (Teleostei : Siluriformes). *Journal of Morphology*, 205: 193-218.
- Arratia, G. (1998). *Silvinichthys*, a new genus of trichomycterid catfishes from the Argentinian Andes, with redescription of *Trichomycterus nigricans*. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 9:347–370.
- Betancur, R., Acero, A., Bermingham, E., & Cooke, R. (2007). Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes : Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear , and morphological evidence. *ELSEVIER*, 45, 339–357. <https://doi.org/10.1016/j.ympcv.2007.02.022>
- Baskin, J., (1973). Structure and relationships of the Trichomycteridae. Tese de Doutorado (não publicada), City University of New York, New York, 389 pp
- Biomatters, Ltda (2005) Geneious Pro 4.8.5 Auckland Nueva Zelanda



- Britto, M., (2002). Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysii). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 512 pp.
- Canales, J. (1982). Contribución al esclarecimiento sobre nomenclatura, distribución y conservación del “suche” (*Trichomycterus rivulatus*, Cuzco, Per. Dirección regional de pesquería Cuzco IX. p. 1-3
- Chota, W., Garcia, C., Ruiz, A., Castro, D., Duponchelle, F., Chu, F., Francoi, F. (2016). Primer estudio de la variabilidad genética de la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829) en la región Loreto (amazonía peruana). Folia Amazonica. IIAP.
- Crespo, A. (2005). Características morfométricas, en la taxonomía de dos especies del género *Trichomycterus* (mauri y suche) presentes en la fauna ictiológica del lago Titicaca. Universidad Mayor de San Andrés - Bolivia.
- Coronel, J., Maes, G., Claus, S., Van Damme, P., & Volckaert, S. (2004). Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers, 859–868. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00498>.
- Costa, M., (1992). Description de huit nouvelles espèces du genre *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae), du Brésil oriental. Revue Française de Aquariologie, 18: 101-110.
- Da Silva, F., Fernandes da Matta, L., Hilsdorf, S., Langeani, F., Marceniuk, P. (2010). Color pattern variation in *Trichomycterus iheringi* (Eigenmann, 1917) (Siluriformes: Trichomycteridae) from rio Itatinga and rio Claro Sao Paulo, Brasil. Neotropical Ichthyology, 8(1), 49–56.
- Datovo, A., & Bockmann, F. (2010). Dorsolateral head muscles of the catfish families Nematogenyidae and Trichomycteridae (Siluriformes: Loricarioidei): comparative anatomy and phylogenetic analysis. Neotropical Ichthyology, 8(2), 193–246.
- De Pinna, M., (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei; Ostariophysii) historical overview and synthesis of hypotheses, PUCRS, Porto Alegre, Brazil



- De Sostoa, A., Doadrio, I., Ornelas, C., Nuno, C., Pedraza, C., Flores, O., Monroy, M. (2010). Estudio genético de las especies ícticas nativas del lago Titicaca. caracterización y estructura poblacional. Puno- Perú. Retrieved from <http://www.proacuicultura.com.pe/publicaciones/OTRAS> PUBLICACIONES/01_Estudio_genetico_de_las_especies_icticas_del_lago_Titicaca.p
- Dejoux, C. & Iltis, A. (1991). El Lago Titicaca “Síntesis del Conocimiento Limnológico Actual.” (ORSTOM, Ed.). La Paz - Bolivia. 485
- De Pinna, C. & Wosiacki B. (2003). Family Trichomycteridae. Pp. 270-290. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). Check list of the freshwater fishes of the South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p
- De Pinna, M. C. C. 1992b. *Trichomycterus castroi*, a new species of trichomycterid catfish from the rio Iguaçú of South Brazil (Teleostei: Siluriformes). Ichthyological Exploration of Freshwaters, 3(1): 89-95
- De Robertis, E.D.P. Hib, J. 2004. Fundamentos de Biología Celular y Molecular. 4ta Ed. . Editorial. El Ateneo. Buenos Aires. Argentina.
- Díaz, E., Cross, I., Barrios, M., Pino, A., Castro, J., Bouza, C., Rebordinos, L. (2012). Genetic characterization, based on microsatellite loci, of *Solea senegalensis* (Soleidae, Pleuronectiformes) in Atlantic coast populations of the SW Iberian Peninsula, 38, 129–142.
- Doyle, J. J.; Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small _ quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bu/l., 19:11-15
- Eigenmann C., (1918) The Pygiidae, a family of South American Catfishes Vol. VII. Memoirs of the Carnegie Museum
- Elorrieta A., (1993) Caracterización y análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de tenca. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral
- Eschmeyer, W.N. Fricke, R., van der Laan, R., (2017). Catalog of fishes: genera, species, references
- Fernández, L., Nadalin, D., Serio, J., & López, H. (2015). Colección ictiológica del museo de la plata: Colección ictiológica del Museo de La Plata: la Familia Trichomycteridae. Probiota.
- Fernandez A., Hernandez N., Fraga J., Amplificación al azar del DNA de 5 poblaciones cubanas de peces larvívoros del género Rivulus. Instituto de Medicina Tropical .Cuba



- Godoy, J., (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. Departamento Ecología Integrativa. Estación Biológica Doñana, CSIC. C/ Américo Vespucio, s/n. E-41092 Sevilla, España.
- Guardia, A., Segura, M., & Cervantes, L. (2013). Encuesta de la pesca artesanal en el lago titicaca (Junio - Diciembre 2006). Puno- Perú.
- Jiang, G.,(2017) Molecular Markers. Virginia State University, Petersburg, VA, USA
- Lagler K., Bardach J., Miller R., May D., (1990). Ictiología (1st edition in spanish). aGteditor, México .DF
- Lauzanne L., (1991). VI.S a Especies nativas Los Orestias In Dejoux, C;Iltis, A. El lago Titicaca (Síntesis del conocimiento limnológico actual). ORSTOM. La Paz, BO. Talleres gráficos HISBOL. p. 499 - 503
- Leyva I., (2003). Marcadores moleculares para la identificación de la sardina del Pacífico (*Sardinops sagax caeruleus*). Tesis de Maestría. La Paz, Baja California Sur
- Lopera, N., Pereira, R., Povh, J., Gomes, P., VArgas, L., & Nogueira, S. (2008). Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura, 26(4), 515–522. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692008000400011
- Lopera, N., Ribeiro, R., Sirol, R., Povh, J., Gomes, P., Steit, D., & Vargas, L. (2008). Caracterización Genética de Lotes de Brycon orbignyanus Utilizados en Programas de Repoblamiento. *MVZ Córdoba*, 13, 1110–1119.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C., (2006). Conceptos de Genética. Editorial Pearson. Madrid, España
- Kumar S., Stecher G. y Tamura K. (2018). MEGAX: Análisis de genética evolutiva molecular versión 7.0 para conjuntos de datos más grandes. *Biología molecular y evolución* 33: 1870-1874.
- McMillan, W. & Paúmbel, R. (1997). Rapid rate of control-region evolution in Pacific Butterflyfishes (Chaetodontidae). *J. Mol. Evo.* 45: 473-484
- Marques de Oliveira, M. L. (2011). Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em peixes do gênero *Trichomycterus* (Teleostei, Trichomycteridae). Universidad Estadual Paulista; Botucatu; Brasil.



- Mehanna, M. N. (2010). Análise molecular e morfológica de exemplares de *trichomycterus valenciennes*, 1832 da chapada dos guimarães (bacia do paraguai) e ensaio sobre o complexo de espécies *Trichomycterus brasiliensis* LÜTKEN, 1874. Universidad Estadual Paulista.
- Mori, J., (2010). Estudio comparativo de la variabilidad genética y filogenética del *Zungaro tigrinus Brachyplatystoma tigrinum* (Britski, 1981) y especies relacionadas de la familia Pimelodidae en la Amazonía Peruana. Tesis de Pregrado. Iquitos – Perú
- Mori, J., Renno, J., Carvajal, F., Alcántara, F., Duponchelle, F., & García, C. (2012). Estudio comparativo de la variabilidad genética del zúngaro tigrinus- *Brachyplatystoma tigrinum* (Britski, 1981) y dos especies relacionadas de la familia pimelodidae. *Folia Amazónica*, 21, 87–95.
- Moreno, M. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. Real Sociedad de España de Historia Natural, 100, 45–65.
- Mussi, P., (2009). O potencial do DNA Barcode na identificação de especies de aves neotropicais. São Paulo – Brasil
- Nelson, J., 2006. Fishes Of The World. 4th ed. New York, John Wiley & Sons, 601 p.
- Ochoa, E., Roxo, F., Donascimento, C., Sabaj, H., Datovo, A., Alfaro, M., & Oliveira, C. (2017). Molecular Phylogenetics and Evolution Multilocus analysis of 518 the catfish family Trichomycteridae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes) supporting a monophyletic Trichomycterinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 115, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.007>
- Orlove, B., (1991). VII. c Aspectos sociales y económicos de la pesca In Dejoux, C; Iltis, A. El lago Titicaca (Síntesis del conocimiento limnológico actual). ORSTOM. La Paz, BO. Talleres gráficos HISBOL. p. 499 – 503
- Ortega, H., Hidalgo, M., Correa, E., Espino, J., Chocano, L., G, T., Quispe, R. (2011). Lista anotada de los peces de aguas continentales del Peru: Estado actual del conocimiento, distribución, usos y aspectos de conservación. (Edición Ge). Lima - Perú.
- Oyarzún C., Galeguillos R., Monsalves J., (1997). Variabilidad genética en peces demersales: Distribución en profundidad versus restricciones filogenéticas. Universidad de Concepción, Chile
- Paca, F., Atencio, S., Paca, R., Alfaro, R., Roncal, M., Paca, B., Vásquez, G. (2003). Compendio de Publicaciones “Especies Ícticas Nativas,” 172. Retrieved from



http://www.alt-perubolivia.org/Web_Bio/PROYECTO/Docum_peru/21.24_V1.pdf

- Pierce B., (2006) *Genética: un enfoque conceptual* 2ª ed. Editorial Medica Panamericana. Montevideo, Uruguay
- Pineda H., Arboleda L., Echeverry A., Urcuqui S., Pareja D., Olivera M., Builes J., (2007). Caracterización de la diversidad genética en el pez *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD Medellin, Colombia
- Reis, R., Kullander, S., & Ferraris, C. (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. (EDIPUCRS, Ed.). Porto Alegre. 534
- Rivera, R. (2003). Variabilidad Genética de *Pseudoplatystoma tigrinum* y *Pseudoplatystoma fasciatum* en la Cuenca Amazónica Boliviana. Universidad Mayor de San Andrés
- Rozas, J., Ferrer, A., Sanchez, J., Librado, P., Guirao, S., Ramos, S., Sanchez, A., (2018) DNA sequence polymorphism. Versión 6.12 – Barcelona España
- Sakthivel, M., Tamlimani, G., Abdul Nazar, A., Jayakumar, R., Sankar, M., Rameshkumar, P., Anikuttan, K., Samai, A., Ambarasu M., Gopakumar G. (2018) Genetic variability of a small captive population of the cobia (*Rachycentron canadum*) through pedigree analyses, India
- Sarmiento, J.; Azabache, L.; Mariño, L.; Hinojosa, A. (1987). Sinopsis biológica de las principales especies icticas del lago Titicaca. Bolivia-Perú. OLDEPESCA. 168 p.
- Schnek, A., Flores, G., (2006). *Invitación a la Biología*. Sexta Edición en Español. Editorial Médica Panamericana. Montevideo, Uruguay
- Soares, A., (2008). Estudos filogenéticos na superfamília Loricarioidea (Teleostei : Siluriformes) com base em seqüências do DNA nuclear e mitocondrial Estudos filogenéticos na superfamília Loricarioidea (Teleostei : Siluriformes) com base em seqüências do DNA nuclear e mitocondrial . These de Doutorado, Botucatu, Brasil
- Tamura, K. y Nei, M. (1993). Estimación del número de sustituciones de nucleótidos en la región de control del DNA mitocondrial en humanos y chimpancés. *Biología Molecular y Evolución* 10: 512-526.
- UICN (2018) World Conservation Monitoring Centre 1996. *Trichomycterus rivulatus* The IUCN Red List of Threatened Species 1996: e.T22124A9361319.



<https://www.iucnredlist.org/species/22124/9361319>

código

doi

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T22124A9361319.en>.

- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D., (2005). DNA barcoding
5Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360 (1462),
1847–
1857.[http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcat
main.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp) catmain.asp
- Wright, S. 1978. *Evolution and Genetics of Populations*. University of Chicago Press,
Chicago, USA. 511 pp.

ANEXOS

Tabla 5. Datos acerca de la recolección realizada de *Trichomycterus dispar* y *Trichomycterus rivulatus*

Código	Nombre	Lugar	Coordenadas	Fecha de Recolección	Modo de Obtencción	LOCALIDAD	Distrito	PROVINCIA
93236	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93237	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93201	MAURI	lago Titicaca	15°52'45.68"S- 68°53'21.90"	22/09/2017	Pesca	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93205	MAURI	lago Titicaca	15°52'45.68"S- 68°53'21.90"	19/09/2017	Pesca	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93204	MAURI	lago Titicaca	15°52'45.68"S- 68°53'21.90"	19/09/2017	Pesca	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93203	MAURI	lago Titicaca	15°52'45.68"S- 68°53'21.90"	22/09/2017	Pesca	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93202	MAURI	lago Titicaca	15°52'45.68"S- 68°53'21.90"	22/09/2017	Pesca	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93213	MAURI	lago Titicaca	16°12'54.02"S- 69°27'41.24"O	01/11/2017	Compra (Mercado Juli)	SIHUAYRO	JULI	CHUCUITO

Código	Nombre Común	Lugar	Coordenadas	Fecha de Recolección	Modo de Obtención	LOCALIDAD	Distrito	PROVINCIA
93216	MAURI	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	05/11/2017	Compra (Mercado Huancané)	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93219	MAURI	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	05/11/2017	Compra (Mercado Huancané)	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93220	MAURI	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	05/11/2017	Compra (Mercado Huancané)	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93221	MAURI	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	05/11/2017	Compra (Mercado Huancané)	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93222	MAURI	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	12/11/2017	Compra (Mercado Huancané)	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93224	MAURI	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	12/11/2017	Compra (Mercado Huancané)	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93225	MAURI	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	12/11/2017	Compra (Mercado Huancané)	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93227	MAURI	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	12/11/2017	Compra (Mercado Huancané)	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93229	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93230	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93231	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO

Código	Nombre Común	Lugar	Coordenadas	Fecha de Recolección	Modo de Obtención	LOCALIDAD	Distrito	PROVINCIA
93231	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93232	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93238	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93241	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93242	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93243	MAURI	lago Titicaca	15°50'23.95"S- 70°01'11.88"O	08/11/2017	Compra (Mercado Unión y Dignidad Puno)	BARCO	CHUCUITO	PUNO
93244	MAURI	laguna Orurillo	14°42'37.21"S- 70°28'43.69"O	08/11/2017	Compra (Mercado Orurillo)	ORURILLO	ORURILLO	MELGAR
93246	MAURI	laguna Orurillo	14°42'37.21"S- 70°28'43.69"O	08/11/2017	Compra (Mercado Orurillo)	ORURILLO	ORURILLO	MELGAR
93247	MAURI	laguna Orurillo	14°42'37.21"S- 70°28'43.69"O	08/11/2017	Compra (Mercado Orurillo)	ORURILLO	ORURILLO	MELGAR
93248	MAURI	laguna Orurillo	14°42'37.21"S- 70°28'43.69"O	08/11/2017	Compra (Mercado Orurillo)	ORURILLO	ORURILLO	MELGAR
93249	MAURI	laguna Orurillo	14°42'37.21"S- 70°28'43.69"O	08/11/2017	Compra (Mercado Orurillo)	ORURILLO	ORURILLO	MELGAR

Código	Nombre	Lugar	Coordenadas	Fecha de Recolección	Modo de Obtención	LOCALIDAD	Distrito	PROVINCIA
93250	MAURI	laguna Orurillo	14°42'37.21"S- 70°28'43.69"O	08/11/2017	Compra (Mercado Orurillo)	ORURILLO	ORURILLO	MELGAR
93251	MAURI	laguna Orurillo	14°42'37.21"S- 70°28'43.69"O	08/11/2017	Compra (Mercado Orurillo)	ORURILLO	ORURILLO	MELGAR
93261	SUCHE	laguna Saracocha	15°41'51.58"S- 70°38'34.03"O	03/05/2017	Pesca	QUIMSACHATA	CABANILLA	SAN ROMAN
93262	SUCHE	laguna Saracocha	15°41'51.58"S- 70°38'34.03"O	03/05/2017	Pesca	QUIMSACHATA	CABANILLA	SAN ROMAN
93266	SUCHE	laguna Saracocha	15°41'51.58"S- 70°38'34.03"O	03/05/2017	Pesca	QUIMSACHATA	CABANILLA	SAN ROMAN
93268	SUCHE	laguna Saracocha	15°41'51.58"S- 70°38'34.03"O	24/08/2017	Pesca	QUIMSACHATA	CABANILLA	SAN ROMAN
93269	SUCHE	laguna Saracocha	15°41'51.58"S- 70°38'34.03"O	25/08/2017	Pesca	QUIMSACHATA	CABANILLA	SAN ROMAN
93270	SUCHE	laguna Saracocha	15°41'51.58"S- 70°38'34.03"O	26/08/2017	Pesca	QUIMSACHATA	CABANILLA	SAN ROMAN
93271	SUCHE	lago Titicaca	16°12'54.02"S- 69°27'41.24"O	01/11/2017	Compra (Mercado Juli)	SIGUAYRO	JULI	CHUCUITO
93274	SUCHE	lago Titicaca	16°12'54.02"S- 69°27'41.24"O	05/11/2017	Pesca	SIGUAYRO	JULI	CHUCUITO
93275	SUCHE	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	05/11/2017	Pesca	VILQUECHICO	VILQUECHICO	HUANCANE
93277	SUCHE	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	05/11/2017	Pesca	JACHAPARO	MOHO	MOHO
93297	SUCHE	lago Titicaca	15°11'57.77"S- 69°45'35.20"O	26/11/2017	Pesca	JACANTAYA	MOHO	MOHO

Fuente: Elaboración Propia



Tabla 6. Secuencias de *DNA* de especies de *Trichomycterus* obtenidas del Gen Bank

ESPECIE	SECUENCIA
<i>Trichomycterus laucaensis</i> <i>s(reversed)</i>	<p>GAGCCTTGCTAGGGCGACGACCAAATTTATAATGTTATCGTTAC CGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATGCCAATTA TGATTGGAGGTTTCGGAAATTGATTAGTTCCTACTTATGATTGG AGCGCCAGACATGGCATTTCCTCCGAATAAACAACATAAGCTTT TGACTTCTTCCCCCTTCCTTCTACTCCTACTAGCCTCTTCCGG AGTAGAAGCGGGGGCGGGAACAGGGTGAACAGTTTACCCCCC TCTTGCTGGCAACCTCGCCATGCTGGAGCCTCTGTTGACCTA ACTATCTTCTCCCTCCACCTAGCCGGTGTCTCTTCCATCCTTGG AGCCATCAATTTTATTACAACAATTATTAACATAAAACCACCA GCCATTTACAATACCAAACCCCTGTTTGTGTTGAGCAGTCTT AATTACAGCAGTACTACTGCTGCTATCCCTCCCTGTCTTAGCTG CAGGAATTACAATACTTCTAACAGACCGCAACCTAAACACAA CATTCTTTGAC-----</p>
<i>Trichomycterus inheringi</i>	<p>GAGCCTTGCTGGGGCGACGACCAAATTTATAATGTCATTGTTAC CGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTA TGATTGGAGGTTTCGGAACTGACTAGTCCCCCTCATGATTGG GGCACCAGACATAGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGCTTC TGGCTTTTACCTCCGTCCTTCTCCTCCTGACTAGCCTCTTCTGG GGTAGAGGGCGGGGGCGGGGACAGGATGAACAGTATATCCTCC TCTTGCTGGAAATTTAGCCACGCAGGAGCCTCTGTTGATCTA ACTATCTTCTCACTACACCTGGCCGGTGTCTCTTTCGATTCTTGG GGCCATTAATTTTATTACAACAATTATCAACATGAAACCGCCA GCTATTTACAATACCAGACACCTCTATTTGTCTGAGCAGTATT AATTACAGCTGTTTCTACTACTACTGGCTCTCCCTGTGTTAGCCG CAGGGATTACAATGCTTCTAACAGACCGAAACCTGAACACAA CATTCTTTGACCCGGCGGGCGGAGGAGACCCAATTCTA</p>
<i>Trichomycterus punctulatus</i>	<p>GAGCCTTGCTAGGGCGACGACCAAATTTATAATGTTATTGTTAC CGCACACGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTA TGATTGGAGGTTTCGGAACTGATTAGTACCTCTTATGATTGG GGCACCAGACATGGCATTCCCCCGAATAAACAACATAAGCTTT TGACTTCTTCCCCCTCCTTCTTCTTCTGCTAGCCTCTTCTGGC GTAGAAGCGGGGGCAGGAACAGGATGAACAGTATACCCCCCT CTTGCTGGCAACCTCGCCACGCAGGAGCCTCTGTTGATTTAA CTATCTTCTCCCTACACTTAGCCGGGGTCTCTTCAATCCTGGGG GCCATCAATTTTATTACAACAATTATCAATATGAAACCCCCAG CCATTTACAGTACCAAACACCCTTGTGTTGTCTGAGCAGTCTT AATTACAGCCGTCTACTACTGCTGTCCCTCCAGTTCTAGCTG CAGGAATTACGATACTCCTAACAGACCGTAACCTAAACACCAC ATTCTTTGACCCGGCAGGCGGAGGAGACCCAATCCTA</p>



Trichomycterus aff. sketi
(0504-I_ST31)

GAGCCTTGCTAGGCGACGACCAAATTTATAATGTTATTGTTAC
CGCACACGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTA
TGATTGGAGGTTTCGGAAACTGATTAGTGCCTCTTATGATTGG
GGCACCAGACATAGCATTCCCCGAATAAACAACATAAGCTTT
TGACTTCTTCCCCCTTCTTTCTTCTCCTGCTAGCCTCTTCTGGC
GTAGAAGCAGGGGCAGGGACAGGATGAACAGTATACCCCCCT
CTTGCTGGCAACCTCGCCCACGCAGGAGCCTCTGTTGATTTAA
CTATCTTCTCCCTACACTTAGCCGGGGTCTCTTCAATCCTAGGA
GCAATTAATTTTATTACAACAATTATCAATATGAAACCCCCAG
CCATTTACAGTACCAAACACCCCTATTTGTTGAGCAGTTCTA
ATTACAGCCGTCTACTTCTACTGTCCCTCCCAGTTCTAGCTGC
AGGAATTACAATACTTCTAACAGACCGCAACCTAAACACCAC
ATTCTTTGACCCGGCAGGCGGAGGAGACCCAATCCTA

Trichomycterus aff. pilosoma

GAGCCTTGCTAGGCGACGACCAAATTTATAATGTTATTGTTAC
CGCACACGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTA
TGATTGGAGGCTTCGGAAACTGATTAGTGCCTCTTATAATCGG
AGCACCAGACATGGCATTCCCCGAATAAACAACATAAGCTTT
TGACTTCTTCCCTCCCTCTTTCTTCTCCTGTTGGCCTCTTCTGGC
GTAGAAGCAGGGGCGGGAACAGGATGAACGGTATACCCCCCT
CTTGCTGGTAACCTCGCCCACGCTGGAGCCTCTGTTGATTTAA
CTATCTTCTCCCTACACTTGGCCGGGGTCTCTTCAATCCTGGGA
GCCATCAATTTTATTACAACAATTATCAACATAAAACCACCAG
CCATTTACAATATCAGACACCCCTATTTCGTTGAGCAGTCCTA
ATTACAGCCGTACTACTACTGCTATCCCTCCCTGTGTTAGCCGC
AGGAATTACAATACTATTAACAGACCGCAATCTAAACACTACA
TTTTTTGACCCGGCAGGCGGAGGAGACCCTATCCTA

Trichomycterus banneai

GAGCCTTACTAGGCGACGACCAAATTTATAATGTTATTGTTAC
TGCACACGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTA
TAATCGGAGGTTTCGGAAACTGATTAGTTCCTCATGATTGG
GGCGCCAGACATGGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGCTTT
TGACTCCTTCCCCCTTCTTCTCCTCCTGCTCGCCTCTTCTGGG
GTAGAGGCTGGAGCTGGGACAGGATGAACAGTATACCCCCCT
CTTGCAAGCAACCTTGCCCACGCAGGAGCCTCTGTTGATTTAA
CTATCTTCTCCCTCCACCTGGCCGGTGTGTCTTCAATCCTGGGA
GCCATTAATTTTATTACAACCATTATTAATATGAAACCCCCAG
CCATCTACAATACCAAACACCACTATTTGTCTGAGCAGTTCT
GATTACAGCCGTCTCCTGCTACTAGCCCTCCCTGTTCTAGCTG
CAGGAATTACAATACTTTTAAACAGATCGTAATCTAAACACCAC
ATTCTTTGACCCAGCAGGTGGAGGAGACCCAATCCTA



Trichomycterus brasiliensis
s

GAGCCTTGCTGGGCGACGACCAAATTTATAATGTTATTGTTAC
CGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTA
TGATTGGAGGCTTCGGAACTGATTAGTCCCTCTTATGATTGG
GGCACCAGACATGGCCTTCCCCGAATGAACAACATAAGCTTT
TGACTCCTTCCCCCTTCTTCTCCTCCTGCTAGCCTCTTCCGGT
GTAGAAGCGGGAGCAGGGACAGGATGAACAGTATATCCCCCT
CTTGCCGGCAATCTTGCCCACGCGGGAGCCTCTGTTGATCTAA
CTATCTTTTCCCTCCACCTAGCCGGTGTTCCTCAATCCTTGGG
GCGATCAATTTTATTACAACAATTATTAACATAAAAACCGCCAG
CCATTTTACAATACCAAACACCCCTATTTGTTTGGGCAGTACT
AATTACAGCTGTCTACTACTGCTATCTCTCCCTGTGTTGGCCG
CAGGAATTACAATGCTTCTAACAGACCGTAACCTAAACACAAC
GTTCTTTGACCCGGCGGGCGGAGGAGACCCAATTCTA

Trichomycterus areolatus
_(reversed)

GAGCCTTACTAGGCGACGACCAAATTTATAATGTTATTGTTAC
CGCACATGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTAATGCCCTTA
TAATTGGGGGCTTTGGAACTGACTAGTCCCTCTCATGATTGG
GGCGCCAGACATGGCATTTCACGAATAAATAACATAAGCTTC
TGACTTCTTCTCCATCATTCTTCTCCTACTTGCCTCTTCGGGG
GTCGAAGCAGGGGCCGGGACAGGGTGGACAGTTTATCCCCCT
CTTGCTGGCAATCTTGCCCATGCGGGAGCCTCTGTTGATCTAA
CCATCTTTTCCCTCCACCTGGCCGGTGTCTCTTCAATTCTGGGG
GCCATTAATTTTATTACAACAATTATTAACATGAAGCCACCAG
CTATTTTACAATACCAAACACCTTTATTTGTTTGGAGCAGTCTA
GTTACAGCCGTCTACTGCTGCTGTCCCTCCCTGTCTTAGCTGC
AGGAATACAATACTTTTAAACAGACCGTAACCTAAATACTACA
TTCTTTGACCCGGCAGGCGGGGGAGACCCAATTTA

Trichomycterus cachiraensis
sis

GAGCCTTGCTAGGCGACGACCAAATTTATAATGTTATTGTTAC
CGCACACGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTA
TAATTGGAGGCTTTGGAACTGATTAGTTCCTCTTATGATTGG
AGCCCCAGACATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTT
TGACTTCTTCCCCCTTCTTTCTTCTCCTACTAGCCTCTTCTGGG
GTAGAAGCAGGGGCGGGAACAGGATGAACAGTATACCCCCCT
CTTGCTGGTAATCTTGCTCATGCGGGAGCCTCTGTTGATTAAAC
TATCTTCTCCCTCCATCTAGCCGGTGTCTCCTCAATCCTGGGAG
CCATCAATTTTATTACAACAATTATTAATATGAAACCGCCAAC
CATTTTACAATACCAAACACCCCTATTCGTTTGGAGCAGTCTA
ATCACAGCCGTCTCTACTGCTGTCCCTCCCTGTCTTAGCTGC
A

Fuente: Elaboración Propia



Figura 18. Individuo de *Trichomycterus* sp. recolectado de la laguna Saracocha.



Figura 17. Pesca realizada de los especímenes de *Trichomycterus* sp. entre los meses de Agosto a Diciembre del 2017.



Figura 19. Procesamiento de muestras realizado en el Laboratorio de Genética de peces de la Universidad Estatal Paulista – Julio9 de Mésquita Filho – Campus de Botucatu, Brasil, durante los meses de Enero a Marzo, 2018.

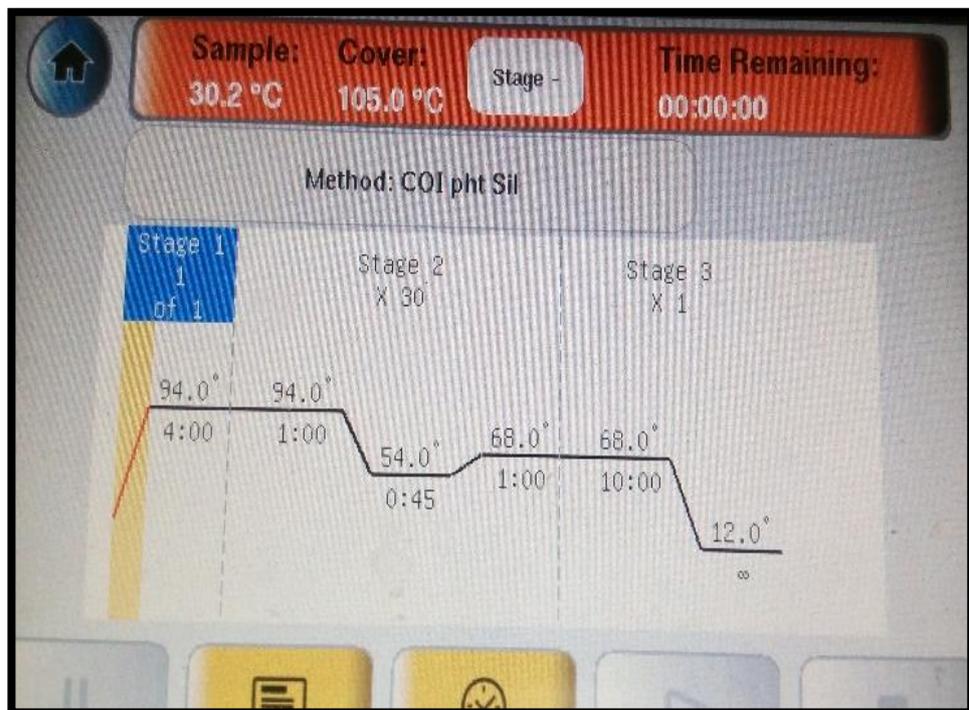


Figura 20. Programa utilizado en el termociclador para realizar la reacción del PCR; Laboratorio de Genética de peces de la Universidad Estatal Paulista – Julio de Mésquita Filho – Campus de Botucatu, Brasil, durante los meses de Enero a Marzo, 2018.



DECLARACIÓN

Declaro, a quien pueda interesar, que el Sr. Kewin Vargaya Ñaupá estuvo en mi laboratorio en el periodo del 17 de diciembre de 2017 al 02 de abril de 2018. Durante su estancia se hicieron extracciones de ADN y secuenciación de ADN de las especies de peces género *Trichomycterus*. Se dio también inicio a la elaboración de un artículo científico que estamos desarrollando en conjunto sobre ese grupo de peces.

Botucatu, 02 de abril de 2018


Dr. Claudio de Oliveira

Professor Titular

Depto. Morfologia

Dr. Cláudio de Oliveira
Professor Titular
CRBio 82618/Q1-D