INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA NATURALEZA

PROGRAMA DE POS-GRADO EN BIOCIENCIAS

DESARROLLO DE UN PAQUETE TECNOLÓGICO DE MONITOREO AMBIENTAL DE PECES BASADO EN *eDNA METABARCODING*

DIEGO FERNANDO CADENA MANTILLA

Foz do Iguazú, Estado de Paraná
2024

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA NATURALEZA

PROGRAMA DE POS-GRADO EN BIOCIENCIAS

DESARROLLO DE UN PAQUETE TECNOLÓGICO DE MONITOREO AMBIENTAL DE PECES BASADO EN *eDNA METABARCODING*

DIEGO FERNANDO CADENA MANTILLA

Disertación de maestría presentada al Programa de Pos-Grado en Biociencias, del Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial para obtener el título de Magister en Ciencias.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Schneider
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira

Foz do Iguazú, Estado de Paraná
2024

DIEGO FERNANDO CADENA MANTILLA

DESARROLLO DE UN PAQUETE TECNOLÓGICO DE MONITOREO AMBIENTAL DE PECES BASADO EN *eDNA METABARCODING*

Disertación de maestría presentada al Programa de Pos-Grado en Biociencias, del Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial para obtener el título de Magister en Ciencias

BANCA EXAMINADORA

_____

Dr. Carlos Henrique Schneider
Orientador
UDC

_____

Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira
Coorientador
UNILA

_____

Dr. Emanuel Marcelo Grassi
Examinador
IMiBio

_____

Dr(a). Rafaela Costa Bonugli dos Santos
Examinadora
UNILA

Foz do Iguazú, Estado de Paraná, 30 de agosto de 2024.

Catalogação elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação
Catalogação de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

C122
Cadena Mantilla, Diego Fernando.
Desarrollo de un paquete tecnológico de monitoreo ambiental de peces basado en eDNA metabarcoding / Diego Fernando Cadena Mantilla. - Foz do Iguaçu, 2024.
119 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino- Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu, PR, 2024.
Orientador: Carlos Henrique Schneider.
Coorientador: Luiz Henrique Garcia Pereira.

1. Biologia molecular - Bancos moleculares. 2. DNA - Código de Barras de DNA. 3. Biodiversidade - Monitoramento. 4. Rios - Brasil. I. Schneider, Carlos Henrique. II. Pereira, Luiz Henrique Garcia. III. Título.

CDU 577

AGRADECIMENTOS

Este trabajo cuenta con el apoyo de la Fundación Coordinadora para el Perfeccionamiento del Personal de Educación Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamiento 001, beca DS (Programa de Demanda Social) y fue financiado por Itaipu Binacional, Itaipu Parquetec y la Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) a través del convenio tripartito 4500058863.

En primer lugar, quiero agradecerle al profesor Carlos, por aceptarme como su orientando para entrar en el programa y al profesor Luiz, por creer en mis capacidades, motivarme a seguir en el camino académico y hacer todo lo que estvo a su alcance para entrar en el programa de Biociencias. Gracias por su apoyo constante, sobre todo en esta última etapa de mi formación académica.

Agradezco a la profesora Rafaela y a Emmanuel por haber aceptado ser parte de la banca examinadora a último minuto.

A mis compañeros del Laboratorio de Biodiversidad y Ecología Molecular (LaBEM), Same, Bruno y Vilmara, gracias por todas esas vivencias, historias de risa y *fofocas* en nuestro laboratorio trabajando que quedaran para siempre en mi memoria. Quiero agradecer especialmente a Carol “alegría”, con la que compartimos la mayor parte del trabajo en el laboratorio sufriendo y celebrando con cada PCR y pruebas que teníamos que hacer, esa amistad que se creó espero que dure por siempre.

El mayor de los agradecimientos es para esas personas que mas que amigos, se convirtieron en mi familia a lo largo de estos 7 años en Brasil, Olga “la tía”, Vane, Lucho, mis dos lobitos hermosas Kahel y Klee, Leñas, Majo, Cristian “cachetes”, Camila “la flaca”, Andrés “el negro”, Diana “la paisa”, Juliana, Julio “papi Prents”, Melissa y Jessi. Por todos los momentos de desmadres, viajes interminables para celebrar los cumpleaños y los intercambios de infinidad de temas, gracias por eso.

Por último, quiero agradecer a mis amigas y compis del IMiBio, Ceci, Emi y Akemi, por el aguante y el apoyo que me brindaron en los últimos para terminar de escribir esta disertación.

“Dicen que la gente puede cambiar, pero... ¿Eso será cierto? Si deciden que quieren volar, ¿les salen alas? No lo creo. No tienes que cambiar tú, sino como haces las cosas. Tienes que crear una manera de volar mientras sigues siendo igual.”

Sora – *No game, no Life*.

MANTILLA, Diego Fernando Cadena. 2024. **Desarrollo de un paquete tecnológico de monitoreo ambiental de peces basado en *eDNA metabarcoding***. Asesores: SCHNEIDER, Carlos Henrique (asesor); PEREIRA, Luiz Henrique (co-asesor). 119 h. Disertación (Maestría) - PPG-BC (Programa de Postgrado en Biociencias), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz do Iguaçu.

RESUMEN

Secuenciar y analizar el ADN ha revolucionado la conservación y el monitoreo de la biodiversidad. Técnicas como el *DNA barcoding* y la metagenómica permiten la identificación de especies a partir de muestras ambientales sin requerir observación directa o cultivo en laboratorio. Estas técnicas son cruciales para detectar especies raras, invasoras o en peligro, y para evaluar la efectividad de las acciones de conservación mediante el seguimiento pre y post-intervención. El *eDNA metabarcoding* se destaca como una herramienta eficaz para la identificación de especies de peces utilizando el marcador molecular 12S. A pesar de sus ventajas, enfrenta desafíos como la ausencia de parámetros estandarizados y la falta de bases de datos completas. Este estudio desarrolló un protocolo optimizado de *eDNA metabarcoding* para monitorear peces en arroyos, superando problemas relacionados con el volumen de agua y el almacenamiento de muestras. Establecimos que filtrar 1.2 litros de agua, en dos etapas, a través de membranas de 0.70 y 0.45 µm es óptimo para recuperar comunidades de peces. El marcador NeoFish demostró una mejor resolución taxonómica, identificando un mayor número de especies con una alta coincidencia respecto a los estudios tradicionales. Sin embargo, la carencia de secuencias referencia para muchas especies neotropicales limita la precisión del método. Asi, se creó un banco de datos con secuencias de 46 nuevas especies para actualizar los registros globales, a partir del diseño de dos nuevos cebadores *Forward* y un cebador *Reverse* para el secuenciamiento de las secuencias 12S referencia enfocado en la ictiofauna regional. El *eDNA metabarcoding* reveló un mayor número de especies en comparación con los métodos tradicionales, aunque no todas las especies fueron identificadas, con mayor resolución con el banco de datos creado. Ambos métodos coincidieron en la identificación de especies abundantes, pero el *eDNA* detectó especies adicionales que no fueron capturadas o resultaron difíciles de capturar con métodos tradicionales. Este estudio subraya que, aunque el *eDNA metabarcoding* es una herramienta poderosa para la evaluación de la biodiversidad y su eficacia está condicionada por la calidad y exhaustividad de las bases de datos de referencia.

Palabras clave: bancos moleculares; DNA *barcoding*; biomonitoreo; arroyos.

MANTILLA, Diego Fernando Cadena. 2024. ***Desenvolvimento de um pacote tecnológico de monitoramento ambiental baseado em eDNA metabarcoding****. Orientadores: SCHNEIDER, Carlos Henrique (orientador); PEREIRA, Luiz Henrique (coorientador). 119 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.*

RESUMO

Sequenciar e analisar o DNA revolucionou a conservação e o monitoramento da biodiversidade. Técnicas como o DNA barcoding e a metagenômica permitem a identificação de espécies a partir de amostras ambientais, sem necessidade de observação direta ou cultivo em laboratório. Essas técnicas são cruciais para detectar espécies raras, invasoras ou em perigo, e para avaliar a eficácia das ações de conservação por meio do monitoramento pré e pós-intervenção. O eDNA metabarcoding se destaca como uma ferramenta eficaz para a identificação de espécies de peixes utilizando o marcador molecular 12S. Apesar de suas vantagens, enfrenta desafios como a ausência de parâmetros padronizados e a falta de bases de dados completas. Este estudo desenvolveu um protocolo otimizado de eDNA metabarcoding para monitorar peixes em riachos, superando problemas relacionados com o volume de água e o armazenamento de amostras. Determinamos que filtrar 1,2 litros de água, em duas etapas, através de membranas de 0,70 e 0,45 µm é ideal para recuperar comunidades de peixes. O marcador NeoFish demonstrou uma melhor resolução taxonômica, identificando um maior número de espécies com alta coincidência em relação aos estudos tradicionais. No entanto, a falta de sequências de referência para muitas espécies neotropicais limita a precisão do método. Assim, foi criado um banco de dados com sequências de 46 novas espécies para atualizar os registros globais, a partir do disenho de dois novos primers Forward e um primer Reverse para o sequenciamento das sequências 12S de referência, focado na ictiofauna regional. O eDNA metabarcoding revelou um maior número de espécies em comparação com os métodos tradicionais, embora nem todas as espécies tenham sido identificadas, com maior resolução com o banco de dados criado. Ambos os métodos coincidiram na identificação de espécies abundantes, mas o eDNA detectou espécies adicionais que não foram capturadas ou que foram difíceis de capturar com métodos tradicionais. Este estudo destaca que, embora o eDNA metabarcoding seja uma ferramenta poderosa para a avaliação da biodiversidade, sua eficácia está condicionada pela qualidade e abrangência das bases de dados de referência.

Palavras-chave*: bancos moleculares; DNA barcoding; eDNA; biomonitoramento, riachos.*

MANTILLA, Diego Fernando Cadena. 2024. ***Development of an environmental monitoring technology package based on eDNA metabarcoding***. *Advisors*: *SCHNEIDER, Carlos Henrique* (*advisor*); *PEREIRA, Luiz Henrique* (*co-advisor*). *119 s.. Master's thesis (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration)*, Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

Sequencing and analyzing DNA has revolutionized the conservation and monitoring of biodiversity. Techniques such as DNA barcoding and metagenomics allow for species identification from environmental samples without requiring direct observation or laboratory cultivation. These techniques are crucial for detecting rare, invasive, or endangered species, and for assessing the effectiveness of conservation actions through pre- and post-intervention monitoring. eDNA metabarcoding stands out as an effective tool for identifying fish species using the molecular marker 12S. Despite its advantages, it faces challenges such as the lack of standardized parameters and complete databases. This study developed an optimized eDNA metabarcoding protocol for monitoring fish in streams, overcoming issues related to water volume and sample storage. It was determined that filtering 1.2 liters of water, in two stages through 0.70 and 0.45 µm membranes, is optimal for recovering fish communities. The NeoFish marker demonstrated better taxonomic resolution, identifying a higher number of species with high agreement compared to traditional studies. However, the lack of reference sequences for many Neotropical species limits the method's accuracy. Thus, a database with sequences from 46 new species was created to update global records, based on the design of two new Forward primers and one Reverse primer for sequencing the 12S reference sequences, focused on regional ichthyofauna. eDNA metabarcoding revealed a greater number of species compared to traditional methods, although not all species were identified, with higher resolution with the created database. Both methods agreed on identifying abundant species, but eDNA detected additional species that were not captured or were difficult to capture with traditional methods. This study highlights that while eDNA metabarcoding is a powerful tool for biodiversity assessment, its effectiveness is dependent on the quality and completeness of reference databases.

Keywords*: moleculars banks; DNA barcoding; eDNA; biomonitoring, streams.*

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Proceso del DNA *barcoding* 19

Figura 2. Procedimiento de campo y laboratorio para la creación de um banco de datos de código de barras 19

Figura 3. Mapa genético del ADN mitocondrial de peces 23

CAPÍTULO I

Figura 4. Río Jupirá 42

Figura 5. Paso a paso para la toma de muestras del eDNA 44

CAPÍTULO II

Figura 6. Localización de la BP3 y los sitios de colecta para la creación del banco de datos 60

Figura 7. Localización de la BP3 y los 12 sitios de colecta 63

Figura 8. Comparación de los cebadores Neofish y Teleo con algunos representantes de las especies de la región 68

Figura 9. Amplificación exitosa de algunas de las especies usando los cebadores modificados 69

Figura 10. Nivel de identifcación taxonómico alcanzada usando el *GenBank* y el banco de datos local 74

ÍNDICE DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I

Gráfico 1. Promedio de reads recuperadas por cada protocolo de filtración, usando los cebadores Mifish y NeoFish.....47
Gráfico 2. OTUs totales recuperadas por cada protocolo de filtración, usando los cebadores Mifish y NeoFish.....48
Gráfico 3. OTUs objetivo recuperadas por cada cebador.....48
Gráfico 4. Porcentaje de abundancia relativa de las principales especies recuperadas por el marcador Neofish usando el protocolo de filtración D.....49

CAPÍTULO II

Gráfico 5. Comparación entre el número de especies colectada e identificada por el método tradicional y las especies identificadas por el método de eDNA *metabarcoding* ..73

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1. Cebadores seleccionados para el metabarcoding 44
Tabla 2. Resultados obtenidos por el protocolo D 47

CAPÍTULO II

Tabla 3. Cebadores elegidos para la creación del banco de datos 67
Tabla 4. Resultados del blast hecho entre las secuencias obtenidos y el *GenBank* 71
Tabla 5. Número de reads y OTUs totales por cada punto de colecta 73
Tabla 6. Lista de especies identificada en los 12 puntos de colecta 75
Tabla 7. Especies de mayor y menor abundancia en cada punto de colecta usando las dos metodologías de muestreo 76

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

BOLD System	*Barcode of Life Data System*
BP3	Cuenca del Paraná 3
COI	Citocoromo Oxidasa I
eDNA	ADN ambiental
LaBEM	Laboratorio de Biodiversidad en Ecologia Molecular
OTU	Unidad Taxonómica Operacional
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rARN	ARN ribosomal
rDNA	ADN ribosomal

SUMÁRIO

RESUMEN ..... **vi**
RESUMO ..... **vii**
ABSTRACT ..... **viii**
ÍNDICE DE FIGURAS ..... **ix**
ÍNDICE DE GRÁFICOS ..... **x**
ÍNDICE DE TABLAS ..... **xi**
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS ..... **xii**
1. INTRODUCCIÓN **16**
1.1 Referencial teórico **16**
1.1.1 Aportes de la biología molecular en la identificación de especies 16
1.1.2 Técnicas moleculares de identificación, biomonitoreo y bioprospección de organismos 17
1.1.2.1 *Código de barras de ADN (DNA barcoding)* *18*
1.1.2.2 Meta-código de barras por ADN ambiental (eDNA metabarcoding) *20*
1.1.3 Marcador molecular 12S 22
1.1.4 Bancos de datos moleculares y su importancia para el uso del DNA barcoding y el eDNA 24
1.1.5 Ictiofauna neotropical 26
1.1.6 Ictiofauna de arroyos y Cuenca del Paraná 3 26
1.2 Justificativa **28**
1.3 Objetivos **29**
1.3.1 General 29
1.3.2 Específicos 29
1.4 Referencias bibliográficas **30**
2 CAPÍTULO I: DESARROLLO DE UN PROTOCOLO BASADO EN eDNA PARA EL MONITOREO DE LA ICTIOFAUNA DE LOS ARROYOS NEOTROPICALES **39**
2.1 Introducción **39**
2.2 Objetivos **41**
2.2.1 Objetivo General 41
2.2.2 Objetivos Específicos 41
2.3 Metodología **41**
2.3.1 Área de estudio 41
2.3.2 Colecta de las muestras de eDNA 42

2.3.3 Extracción del eDNA, Selección del cebador, Secuenciamiento y Procesamiento inicial de los datos....44
2.3.4 Análisis de datos....46
2.4 Resultados....46
2.5 Discusión....49
2.6 Conclusiones....50
2.7 Referencias bibliográficas....50
3. CAPÍTULO II: CREACIÓN DE UN BANCO DE DATOS DE SECUENCIAS DE ADN 12S PARA VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MONITOREO AMBIENTAL DE PECES BASADO EN *eDNA METABARCODING*....56
3.1 Introducción....56
3.2 Objetivos....59
3.2.1 General....59
3.2.2 Específicos....59
3.3 Metodología....59
*3.3.*1 Creación del banco de datos....59
3.3.1.1 Área de estudio....59
3.3.1.2 Elección del cebador....60
3.3.1.3 Construcción del banco de dados 12S local: extracción de ADN y amplificación de las regiones 12S....61
3.3.2 Validación del protocolo de eDNA....62
3.3.2.1 Área de estudio y colecta de especimenes....62
3.3.2.2 Colecta del eDNA....63
3.3.2.3 Extracción del eDNA, Secuenciamiento y Procesamiento de los datos....64
3.3.2.4 Comparación de similaridad del eDNA con los bancos de datos GenBank y local....66
3.4 Resultados....67
3.4.1 Creación del banco de datos....67
3.4.1.1 Elección del cebador 12S....67
3.4.1.2 Secuencias referencias obtenidas y comparación con GenBank....69
3.4.2 Validación del protocolo de eDNA....72
3.4.2.1 Comparación de identificación alcanzada entre los bancos de datos 72
3.4.2.2 Comparación de riqueza y abundancia recuperada entre el método tradicional vs eDNA....75

3.5 Discusión 77
3.5.1 Análisis de Similaridad 77
3.5.2 Validación del protocolo de eDNA 80
3.5.2.1 Comparación de similaridad eDNA y los bancos de datos 80
3.5.2.2 Comparación de identificación de especies entre el método tradicional y el eDNA metabarcoding 81
3.5.2.3 Comparación de abundancia de especies entre el método tradicional y el eDNA metabarcoding 84
***3.6* Conclusiones 86**
3.7 Referencias bibliográficas 87
4 CONSIDERACIONES FINALES 92
APÉNDICES 93
Apéndice 1 – Lista de espécies y sus secuencias usadas como referencias para la elección de los cebadores usados en la creación del banco de datos local 93
Apéndice 2 – Lista de especies disponibles de la colección Ictiológica del LaBEM 94
Apéndice 3 – Comparación de similaridad de las OTUs generadas entre el banco de datos local y el *GenBank* 96
Apéndice 4 – Lista de riqueza y abundancia relativa de espécies em cada punto de colecta 113
Apéndice 5 – Fotos de la caracterización del paisaje de los arroyos muestreados 118

1. INTRODUÇÃO

La foto 51 de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins, permitió descifrar la estructura del ADN presentada por Watson y Crick en 1953 (Martins, 2022), marcando un hito fundamental en la biología moderna. Esta estructura de doble hélice no solo reveló el mecanismo por el cual se almacena y transmite la información genética, sino que también abrió un vasto campo de posibilidades para la investigación biológica, la biotecnología, la medicina y la ecología.

El progreso de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la detección de marcadores moleculares, la secuenciación de ADN, ARN y proteínas, así como las herramientas bioinformáticas, han permitido avances y perfeccionamiento de técnicas como, el diagnóstico de enfermedades y zoonosis, organizar y relacionar información biológica, el mejoramiento genético, el estudio de diversidad genética, detección de especies invasoras, el biomonitoreo ambiental, establecer árboles filogenéticos, entre otras (Aranguren *et al.*, 2013).

La posibilidad de secuenciar y analizar el ADN ha significado un avance importante en la conservación, restauración y monitoreo de la biodiversidad, posibilitando identificar y cuantificar especies en diferentes hábitats. Métodos como el *DNA barcoding* (código de barras de ADN) y la metagenómica (análisis de los genomas contenidos en una muestra ambiental), permiten la identificación de organismos a partir de muestras ambientales, como agua, suelo y aire, sin necesidad de observación directa o cultivo en laboratorio (Martinez-Munoz, 2022). Esta capacidad es crucial para detectar especies raras, invasoras o en peligro de extinción, y para monitorear cambios en la biodiversidad de manera precisa y rápida. El monitoreo ambiental basado en el ADN también facilita la evaluación de la eficacia de las intervenciones de conservación y restauración. Al comparar las comunidades biológicas antes y después de una intervención, los científicos pueden determinar si las medidas adoptadas están logrando los objetivos deseados, como la recuperación de la biodiversidad o la reducción de la contaminación.

1.1 Referencial teórico

1.1.1 Aportes de la biología molecular en la identificación de especies

Hasta el siglo XIX, la clasificación de la biodiversidad fue basada en similitudes morfológicas reconocidas a simple vista, que representaba un desafío a problemas

intrínsecos en ciertos grupos con plasticidad fenotípica, diferencias ontogénicas y dimorfismo sexual, entre otros (Hebert *et al.*, 2003; Packer *et al.*, 2009). Además, en situaciones como, estadios larvales, fragmentos de tejido como restos de hojas, semillas, sangre, plumas, carne o pieles, esta metodología no podía ser aplicada por que no existen suficientes caracteres diagnósticos para una acertada identificación morfológica (Eaton *et al.*, 2010).

En los años 1960, el surgimiento de la biología molecular permitió entender que, todo tipo de información biológica sobre un organismo puede ser obtenida a partir de sus genes. Así se construye la noción de que toda la historia de la vida en este planeta puede ser conocida a partir de la información preservada en los genes de los organismos presentes hoy en día.

Las técnicas moleculares han permitido conocer la constitución y organización del genoma de numerosas especies, su variación, la relación fenotipo-genotipo, la expresión genética y el metabolismo; gracias al empleo de herramientas comparativas basadas en las secuencias de ácidos nucleicos y en el análisis de las relaciones de descendencia (Perez *et al.*, 2012; Aranguren *et al.*, 2013). Dentro de la industria alimentaria, fundamentalmente, han sido de gran importancia en la identificación de cepas bacterianas probióticas pues basarse en sus características fenotípicas no siempre proporciona resultados confiables, debido a las variaciones fenotípicas que las células pueden exhibir dependiendo de las condiciones y los medios de cultivo utilizados (Mitsuoka y Kaneuchi 1977; López *et al.*, 2003).

Recientemente, los estudios moleculares pasaron a ser usados como herramienta primaria en los estudios con plantas o animales para darles un mejor uso y manejo sostenible, no solo desde el punto de vista de beneficio económico, sino también a nivel de conservación de las especies, y aunque muchos de los métodos tradicionales no podrán ser reemplazados, es necesaria la inclusión de nuevas técnicas moleculares, ya que su uso es cada vez más necesario en términos técnicos y económicos. (Aranguren *et al.*, 2013).

1.1.2 Técnicas moleculares de identificación, biomonitoreo y bioprospección de organismos

Los avances en la instrumentación e implementación de los descubrimientos de la bioquímica y la biología molecular permiten utilizar la información genética de los organismos como herramientas de identificación y cuantificación de aquéllos de interés para

el hombre; dentro de las metodologías que en biología molecular se usan para estos fines, el *DNA barcoding* y más recientemente, el *eDNA metabarcoding*, son los métodos más usados (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004).

1.1.2.1 *Código de barras de ADN (DNA barcoding)*

Durante los últimos quince años, los taxónomos, genetistas y evolucionistas se han beneficiado de estos avances para el estudio de los caracteres moleculares, y han contribuido de forma significativa al desarrollo de las bases de datos moleculares.

Los antecedentes anteriores, llevaron a que Hebert y sus colaboradores en el 2003, propusieran la creación de un sistema estandarizado para la identificación de especies, denominado *DNA barcoding*, análogo al código de barras empleado para identificar los productos comerciales. Este sistema se basa en el uso de secuencias cortas (~650 pares de bases (pb) de ADN como fuente de datos (Luo *et al.*, 2011). De esta forma cada especie puede ser identificada por una secuencia particular o por un conjunto de secuencias muy similares y exclusivas, originadas por el acúmulo de mutaciones únicas a lo largo de su historia evolutiva.

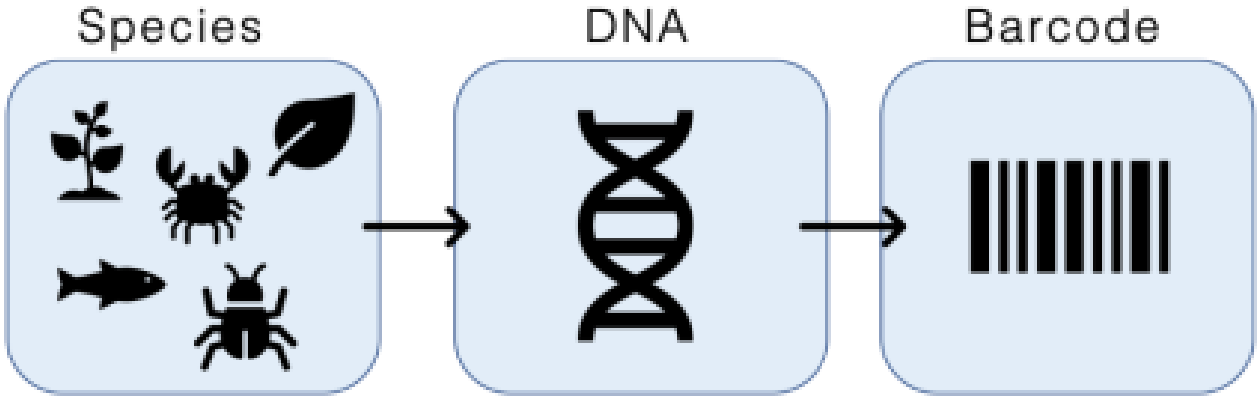
Esta técnica, constituye una herramienta diseñada para identificar de forma rápida y precisa las especies a partir de una corta y estándar secuencia de ADN (Figura 1; Floyd *et al.*, 2002; Hebert *et al.*, 2003). Una región del genoma puede ser utilizada como código de barras si permite distinguir entre variación inter-específica (entre especies relacionadas) y variación intra-específica (dentro de la misma especie). De lo anterior, se genera el concepto de *barcoding gap*, siendo la diferencia existente entre la variación inter-específica e intra-específica. Cuanto mayor sea la diferencia entre estas la discriminación específica será más acertada (Meyer y Paulay, 2005).

Los códigos de barras de ADN son más rápidos que los métodos morfológicos tradicionales desde el entrenamiento hasta la asignación taxonómica (Figura 2). Se necesita menos tiempo para adquirir experiencia en métodos de ADN que para convertirse en un experto en taxonomía. Además, el flujo de trabajo de códigos de barras de ADN (es decir, desde la muestra hasta el resultado) es generalmente más rápido que el flujo de trabajo morfológico tradicional y permite el procesamiento de más muestras.

Se prefieren usar como marcadores moleculares los genes mitocondriales debido a su falta de intrones, su modo de herencia haploide y su recombinación limitada (Paulay y Meyer, 2012). Además, cada célula tiene varias mitocondrias (hasta varios miles) y cada

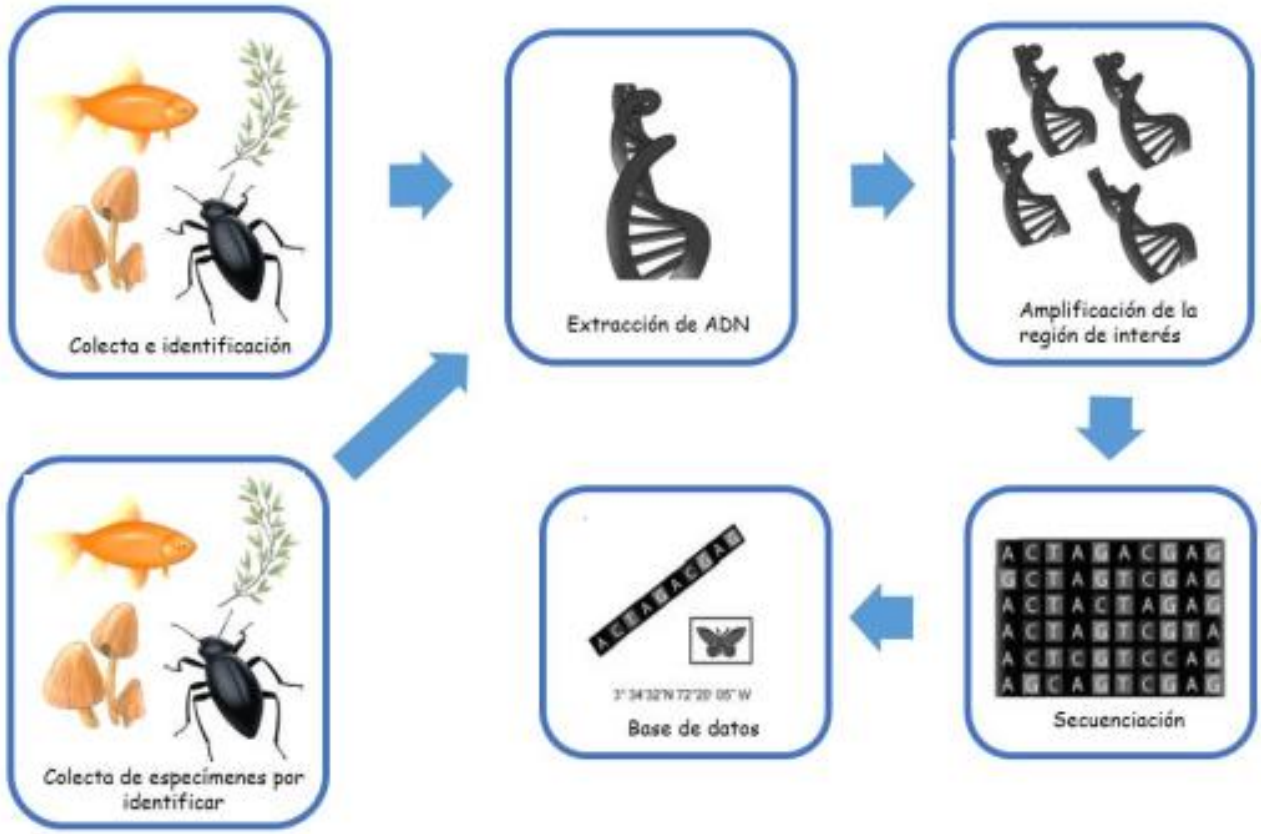
una de ellas contiene varias moléculas de ADN. Por lo tanto, las mitocondrias pueden ofrecer una fuente abundante de ADN incluso cuando la muestra de tejido es limitada.

Figura 1. Proceso del DNA *barcoding*



Fuente: FRUEHA, Larissa - *Own Work*, CC BY-SA 4.0.

Figura 2. Procedimiento de campo y laboratorio para la creación de un banco de datos de códigos de barras



Aviso: para hacer uso del código de barras, el primer paso es construir la base de datos con las secuencias de ADN y todos los datos asociados a estas (datos de colecta, imágenes, cromatogramas, cebadores utilizados); después de tener una base de datos construida se pueden identificar especímenes o fragmentos desconocidos usando esta como referencia.

Fuente: de los autores, 2024.

Inicialmente se propuso que para identificar animales se usara un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), de aproximadamente 648 pb. La región COI presenta una alta tasa de sustitución, lo que se manifiesta en alta variación de la secuencia entre especies del mismo género (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2011). En los últimos años, varios estudios demuestran que, en diferentes grupos de aves, peces, mamíferos e insectos, el fragmento COI presenta una variación inter-específica suficientemente amplia, permitiendo buena correlación entre la identificación molecular y la morfológica (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005).

Los marcadores de códigos de barras de ADN se pueden utilizar para abordar cuestiones fundamentales en sistemática, ecología, biología evolutiva y conservación. Esto incluye la asamblea comunitaria, redes de interacción de especies, descubrimiento taxonómico, identificación y evaluación de especies crípticas y evaluación de áreas prioritarias para la protección ambiental (Soininem *et al.*, 2009; Schnell *et al.*, 2012) También permiten la identificación de especies cuando los caracteres morfológicos no están bien conservados o varían según el estado larval, juvenil o adulto del individuo. Además, son útiles para evaluar la seguridad alimentaria, detectar especies exóticas, realizar biomonitoreo, vincular los estadios de huevos y larvas con especies adultas, asegurar los derechos de propiedad intelectual sobre recursos biológicos (Subrata 2016) y en la ciencia forense. (Dalton *et al.*, 2020).

Un aspecto que favorece el uso de esta técnica, es el obtener el ADN genómico a partir de muestras como la piel, alas, piernas, etc, de los individuos, sin embargo, a pesar de la gran eficiencia que ella ofrece, aún se necesita tener una muestra por cada especímen la cual debe ser procesada individualmente, desde la extracción hasta el secuenciamiento, lo que requiere mucho tiempo y trabajo.

1.1.2.2 Meta-código de barras por ADN ambiental (eDNA metabarcoding)

Basado en el código de barras de ADN, el *metabarcoding* de ADN ambiental es una estrategia de secuenciamiento de alto rendimiento que ofrece la oportunidad de secuenciar comunidades enteras de organismos a partir del ADN total de una única muestra ambiental (Soon *et al.*, 2013). El termino *metabarcording* de ADN se refiere a la identificación a larga escala de la comunidad presente en una muestra ambiental a través de la extracción del ADN total de los organismos allí presentes (Taberlet *et al.* 2012). El ADN ambiental (*eDNA*)

se define como los materiales genéticos suspendidos en muestras ambientales, como, por ejemplo, en el agua, el aire, la tierra o sedimentos. El *eDNA* es eliminado de macroorganismos por medio de heces, moco corporal, sangre, tejido descamado, etc., y surgió como una fuente de datos alternativa para el monitoreo de la biodiversidad (Cristescu, 2014). El ADN genómico es extraído de muestras ambientales y es utilizado para la amplificar genes conservados (código de barras de ADN) utilizando cebadores universales y los fragmentos son secuenciados a través de secuenciamientos de alto rendimiento (Schallenberg *et al.*, 2020). La proporción de taxones recuperados por medio del *metabarcoding* de *eDNA* dependen del método de obtención del *eDNA*, y crucialmente de la elección del conjunto de cebadores escogidos (Collins *et al.*, 2019; Miya *et al.*, 2020).

Uno de los atributos clave del biomonitoreo del *eDNA* es que apenas cambiando el tipo de cebador utilizado se pueden identificar diferentes grupos taxonómicos a partir de una única muestra (desde bacterias y hongos hasta algas, peces, plantas, aves y mamíferos, entro otros), lo que se traduce en la reducción del esfuerzo y costo del monitoreo en comparación con los muestreos tradicionales que son enfocados en un solo grupo o en algunos de ellos. Otras particularidades son trabajar fuera de las ventanas de tiempo reglamentarias; no hay captura ni manejo de especies, lo que reduce el riesgo de perturbar el hábitat o dañar los organismos, esto es especialmente valioso con la detección de especies raras y crípticas, que se facilita considerando que el *eDNA* permite la detección temprana de etapas de vida y aumenta la ventana de probabilidad para confirmar la presencia; además, permite la detección temprana de especies invasoras. Y además de ello, no es necesaria la presencia de especialistas para colectar las muestras, pues cualquier persona con un entrenamiento adecuado es apta para realizar el trabajo. El *eDNA* tiene tiempos de entrega de muestras significativamente más rápidos; y permite un alto grado de eficacia con resultados tanto cualitativos como cuantitativos.

Para la colecta del *eDNA* acuático, principalmente se ha efectuado la filtración en laboratorio, las muestras de agua son colectadas y congeladas para su transporte al laboratorio, donde posteriormente son filtradas. Últimamente, se ha usado una mezcla de buffers específicos para preservar las muestras sin necesidad de mantener temperaturas bajas, facilitando el transporte. Aún así esta metodología de colecta conlleva la gran dificultad de transportar grandes volúmenes de agua, por eso, recientemente se ha implementado filtrar el agua en el punto de muestreo, utilizando bombas de vacío y filtros para retener el ADN, los filtros posteriormente son congelados a -4°C hasta su análisis. Ambos métodos han mostrado ser eficientes y tienen sus ventajas según el área donde se

realiza el muestreo, el uso de buffers es más práctico en estudios prolongados, permitiendo la conservación del ADN hasta por 56 días sin cadena de frío, por su lado, la congelación de filtros es más eficiente en términos de transporte de las muestras y preservación del ADN (Williams *et al.*, 2016; Djurhuus *et al.*, 2017).

Sin embargo, para ser implementado el *DNA barcoding* precisa de una base de datos robusta que recopile toda la información existente acerca de las especies y a pesar de que existen algunos bancos de datos, con secuencias nucleotídicas de miles de especies como *GenBank* y EmBL, no todas contienen descripciones acerca de la morfología y ecología de las especies.

Gracias a la combinación de técnicas morfológicas tradicionales y el uso del marcador COI, se ha mejorado las bases de datos de referencia y la evaluación de la ictiofauna neotropical, con la creación de un gran conjunto de datos. No obstante, para el análisis de metabarcodificación de ADN, hacer uso del COI ha demostrado dificultades, amplificando bacterias y pequeños eucariotas que no son el objetivo, lo cual es inherente al uso de COI en muestras de *eDNA* (Milan *et al.*, 2020).

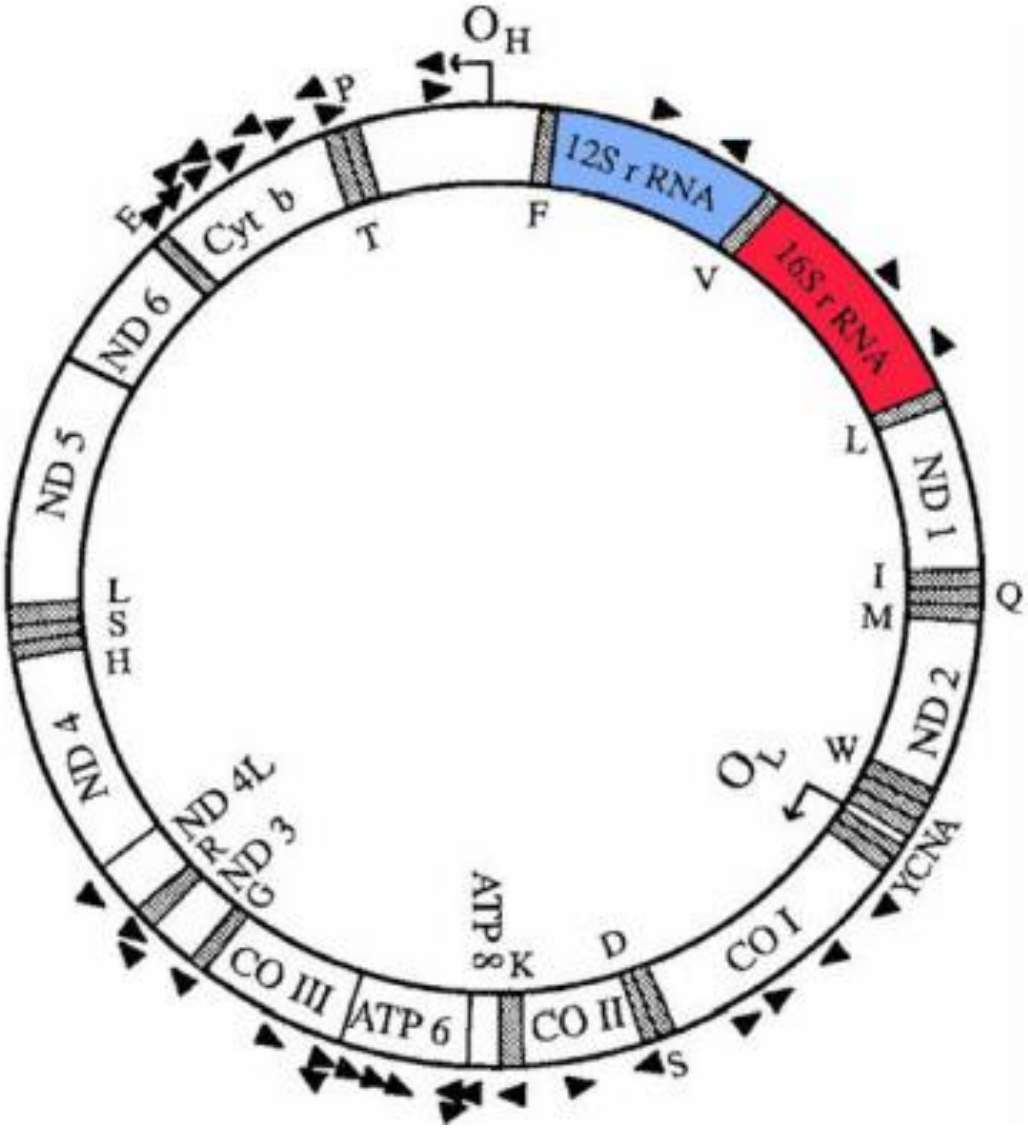
Los genes de ARN ribosomal (ARNr) 12S y 16S se han utilizado ampliamente como marcadores alternativos y han proporcionado resultados mas eficientes para la detección molecular de varias especies a través de *metabarcoding* de *eDNA*, como mostrado por Wang *et al.*, 2023. Su estudio centrado en identificar especies de peces en las aguas costeras de Zhoushan, China, comparó la eficiencia de identificación usando los marcadores genéticos: 12S y COI. Analizando 287 muestras de peces con métodos morfológicos y de código de barras, obtuvieron 264 secuencias de 12S ARNr y 188 de COI; mostrando que, aunque el 12S y el COI son efectivos para la identificación de peces, el ARNr 12S es prometedor para la metacodificación de ADN ambiental (eDNA) en estudios marinos.

1.1.3 Marcador molecular 12S

El marcador 12S corresponde a una porción conservada del genoma mitocondrial presente en la mayoría de los organismos eucariotas (Figura 3). Esta región generalmente abarca aproximadamente 950 pares de bases y se encuentra dentro del gen que codifica para la subunidad ribosomal 12S del ARN ribosómico. Aunque el 12S es relativamente conservado, también presenta suficientes variaciones para permitir la diferenciación entre

especies y, en algunos casos, incluso entre poblaciones dentro de una misma especie. (Yang *et al.*, 2014).

Figura 3. Mapa genético del ADN mitocondrial de peces



Aviso: en azúl se destaca el gen 12S.

Fuente: Meyer, 1994.

De hecho, varios estudios usando el gen 12S (Yamamoto *et al.*, 2017; Andruszkiewicz *et al.*, 2017; Bylemans *et al.*, 2019; Ushio *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2021) han demostrado que es un marcador molecular efectivo para la detección de especies de peces a partir de muestras de *eDNA* y se ha utilizado ampliamente en el estudio de la biodiversidad íctica mediante *metabarcoding* de *eDNA* (Sato *et al.*, 2018).

Algunas variantes de este marcador, se han usado para identificar una amplia variedad de organismos de vida acuática (Chakraborty *et al.*, 2017) y ha sido destacado

como excelente para identificar las especies debido a su tasa de mutación y longitud adecuada, convirtiéndolo en una herramienta valiosa para evaluar el fraude en productos marinos (Von Der Heyden *et al.*, 2010).

Aunque comparado con el marcador COI, el uso del marcador 12S es más reciente, la disponibilidad de información de secuencias en bases de datos es amplia, sin embargo, la mayor parte de la información está concentrada en la vida marina. Por ejemplo, en el *GenBank* existen 339686 registros referentes al marcador 12S (acceso 21/07/2024) de los cuales, 53753 registros pertenecen a peces, 2663 registros a peces de agua dulce y 12 registros para peces de arroyos; para Brasil hay registradas 2069 secuencias, de las cuales cuatro son para peces de agua dulce.

1.1.4 Bancos de datos moleculares y su importancia para el uso del DNA barcoding y el eDNA

El almacenamiento de datos se torna necesario mediante el aumento del volumen de información generado en los últimos años y tienen una gran utilidad para la comunidad científica. La localización de un gen, perspectivas de evolución de organismos, características fenotípicas, interacciones moleculares, son algunos ejemplos de una amplia lista de posibilidades y desafíos en el tratamiento de los datos moleculares (Libório y Resende, 2021). Hasta el día de hoy, se estima que aproximadamente existen cerca de 10 a 50 millones de especies vivientes, de las cuales alrededor de un 10% se encuentran en las bases de datos biológicas (Henao-Castro, 2021).

Las bases de datos más relevantes en biología que incluyen datos de secuencias de nucleótidos, proteínas, estructura de proteínas, genomas, expresión genética, bibliografía, taxonomía, metabolismo, factores de transcripción, etc., son el Banco ENA - EMBL (Europa), *GenBank* (EE.UU.) y DDBJ (Japón). Estos tres bancos conforman la colaboración internacional para la base de datos de secuencias de nucleótidos (INSDC, en sus siglas en inglés) conteniendo cerca de 55 millones de secuencias, el equivalente a 100 gigabases o, lo que es lo mismo, cien mil millones de componentes moleculares del ADN que codifican la información genética. Ya para los datos específicos sobre identificación de especies, fue creado el banco de datos *Barcode of Life data System* (BOLD System), basado principalmente en el marcador COI, donde se puede, de forma fácil y rápida, identificar los organismos presentes en un determinado local, región o país (Rubinoff, 2006). El BOLD system actualmente cuenta con 17.849.000 registros, correspondientes a 359.000 especies

(<https://www.boldsystems.org/> en 18 jul. 2024). En él se pueden asociar otros tipos de datos de las muestras como: fotos del espécimen, informaciones de campo, número de registro de la institución donde el material se encuentra, datos taxonómicos e informaciones moleculares (como los *cebadores* usados para la amplificación y en el secuenciamiento) (Ratnasingham e Hebert, 2007). No obstante, el BOLD System es un banco de datos basado mayoritariamente en la región COI y a eso se le suma que la mayor parte de toda esta información es sobre las especies que habitan América del Norte, Europa y Oceanía, en contraste con las regiones tropicales como América Latina y África, donde los estudios demuestran que concentran la mayor diversidad de especies, pero solo una pequeña fracción de la biodiversidad es conocida y ha sido estudiada (Chapin *et al.*, 1995; Ceballos *et al.*, 2015). Por ejemplo, en el caso de la ictiofauna de Brasil, uno de los grupos más estudiados, el BOLD cuenta con 145.293 registros, representando 8.977 especies de peces en todo el mundo, de las cuales, tan solo 1.170 especies están reportadas como ocurrentes en Brasil (donde son conocidas cerca de 6 mil especies de peces y estimadas más de 8 mil).

Centrándonos en los bancos de datos de secuencias del marcador 12S, utilizado en los trabajos de *eDNA-metabarcoding*, se percibe que la disponibilidad de secuencias referencias para la región Neotropical es aún más escasa. A pesar, del aparente gran número de registros en el *GenBank* (339686 – acesso en 21/07/2024), la mayor parte de la información está concentrada en la vida marina. De estos registros, 53753 pertenecen a peces, siendo 2663 registros a peces de agua dulce y 12 registros para peces de arroyos. Para Brasil hay registradas 2069 secuencias, de las cuales *cuatro* son para peces de agua dulce. Así, queda evidente que faltan muchas informaciones en los bancos de datos llevando en consideración el gran número de especies descritas, especialmente a lo que se refiere para Brasil, evidenciando la enorme laguna existente en los bancos de datos (Menezes *et al.*, 2015).

Por eso, es necesario y urgente complementar las informaciones de bancos de datos, con las obtenidas a partir de marcadores como el 12S o algún otro marcador utilizado en los estudios. Pues otro desafio que esto demuestra, es que, al usarse diversos marcadores moleculares para grupos específicos, no todos suelen ser eficientes para los estudios, porque a pesar de que, las especies se encuentren registradas en los bancos de datos, no necesariamente estan con el marcador que determinado estudio precisa.

1.1.5 Ictiofauna neotropical

En términos de biodiversidad, la región Neotropical constituye uno de los principales hotspots de biodiversidad del planeta (Albert y Reis, 2011). Considerando la diversidad acuática, los ecosistemas continentales de agua dulce se encuentran entre los más diversos de la región, incluyendo gran concentración de vertebrados e invertebrados acuáticos (Balian *et al.*, 2008; Lévêque *et al.*, 2008; Albert y Reis, 2011). Diversidad que ha venido estableciendo y organizándose a lo largo de 100 millones de años (Albert y Reis, 2011) y está relacionada a un largo proceso de irradiaciones de linajes como extinciones de grupos (Ribeiro *et al.*, 2011).

Un tercio de los vertebrados de agua dulce del mundo es encontrado en la región Neotropical, dentro del cual, 69% es compuesto por especies de peces (Balian *et al.*, 2008), haciendo que la icitiofauna de agua dulce sea la más diversas del planeta, estimada entre 8000 y 9000 especies (Lévêque *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2016). Esta rica biodiversidad involucró la interacción de múltiples factores, incluyendo cambios geomorfológicos y climáticos, elevaciones de montañas, formación de divisiones entre los sistemas de drenajes, mudanzas en los cursos de los ríos y conexiones históricas (Lundberg *et al.*, 1998), los cuales posibilitaron varios eventos de diversificación (LUNDBERG *et al.*, 1998; Hubert y Renno, 2006) y haciendo que la biodiversidad que habita en los ambientes de agua dulce, presenten una gran variedad de adaptaciones biológicas a diversos hábitats y asumiendo de forma eficaz el papel de bioindicadores de calidad ambiental, a pesar de que todavía faltan muchas informaciones en los bancos de datos biológicos (Purdon, 1993; Lenat, 1993; Menezes *et al.*, 2015).

1.1.6 Ictiofauna de arroyos y Cuenca del Paraná 3

El sistema Paraná-Paraguay, o cuenca del rio de la Plata, es la segunda mayor cuenca hidrográfica de América del Sur (Cox, 1989; Ribeiro, 2006), engoblando las cuencas de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay (Bonetto, 1998).

La sección alta del río Paraná, es llamada de cuenca del Alto río Paraná, actualmente corresponde a todos los drenajes del río Paraná y el inicio de la planta de energía Hidroeléctrica de Itaipu (Castro *et al.*, 2003). Muchos estudios han buscado comprender la diversidad de peces del Alto río Paraná. Langeani *et al.* (2007), por ejemplo, relataron la ocurrencia de 310 especies en esta cuenca, incluyendo 11 órdenes y 38 familias; sin

embargo, especies nuevas son registradas año a año y esa estimativa ya debe ser mayor. Ota *et al.* (2018), en un estudio más reciente, revisaron y actualizaron la lista de especies, publicada por Graça e Pavanelli (2007), de la inundación del río Paraná y sus áreas adyacentes, relatando 211 especies (distribuidas en 41 familias y 10 órdenes), dentro de las cuales, muchas eran nuevas para la ciencia.

Es sabido que, de las especies de peces conocidas, al menos el 40% habitan exclsuivamente los sistemas de agua dulce (Berra, 2001) y de este total, la mitad de las especies son peces pequeños que viven en ecosistemas de arroyos (Berra, 2001). La ictiofauna de arroyos y regiones de cabecera esta compuesta, principalmente, por especies de pequeño porte que en general no pasan los 200 mm de largo (Vazzoler, 1999), lo que según Shibatta y Cheida (2003), puede deverse a la inestabilidad de las condiciones ambientales. Los peces de arroyo también tienden a presentar distribuciones geográficas restrictas, presentan poco o ningún valor comercial y son muy dependientes de la vegetación riparia para su alimentación, abrigo y reproducción (Lowe-Mcconnell *et al.*, 1999).

Como una subcuenca del Alto Río Paraná, La cuenca hidrográfica conocida como Paraná 3 (BP3), en el oeste del estado de Paraná, Brasil, fue instituida por el Decreto Estadual n° 2.924, del 5 de mayo de 2004 (Instituto Das Águas Do Paraná, 2017) con el objetivo de priorizar el planeamiento minucioso y aproximar el debate y uso del agua con las organizaciones del estado, para asegurar la calidad de los recursos hídricos y calidad de vida de las generaciones futuras. Esta Cuenca engloba los drenajes de ríos y arroyos que desembocan directamente en el rio Paraná, localizados entre los ríos Piquiri e Iguazú y se caracteriza por suelos fértiles y una geología diversa que incluye rocas sedimentarias, ígneas y metamórficas (Fabris *et al.* 2011), además se destaca como un corredor de biodiversidad que ha venido sufriendo grandes cambios en su paisaje natural, ocasionadas principalmente por el avance de las actividades agrícola, el uso inadecuado e irracional de los recursos hídricos y el bajo índice de tratamiento de residuos sanitarios (Pereira y Scroccaro, 2015).

Los arroyos de la BP3 proporcionan diversidad de hábitats acuáticos, como rápidos, remansos y vegetación ribereña que ofrecen nichos específicos para diferentes especies, muchas de las cuales son endémicas (Castro *et al.*, 2003). Entre las familias más representativas se encuentran: las mojarras (Characidae), los bagres (Pimelodidae y Hepatapteridae), peces gato de armadura (Loricariidae) y varías especies de cíclidos (Agostinho *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2003). Por otra parte, a pesar de albergar una amplia

gama de especies, este tipo de ecosistemas son los menos estudiados, algunos datos disponibles son los de Araújo *et al.* (2011) que encontraron 20 especies al inventariar los peces de los arroyos de la cuenca del río Ivaí, Batista-Silva *et al.* (2018) mencionan 43 especies en arroyos de la cuenca inferior del río Iguatemi. Langeani *et al.* (2007) reportaron 317 especies y otras 50 especies no descritas en toda la cuenca del Alto Paraná; los datos mas recientes sobre la BP3 son los reportados por Pereira *et al.* (2021), donde usando la combinación de las técnicas tradicionales junto a las herramientas moleculares, identificaron 48 especies para la región, obteniendo un 11,7% del total de especies reportadas en un área que representa solo alrededor del 0,9% de la cuenca del Alto Paraná. Este valor muestra la riqueza e importancia de la BP3 para la biodiversidad, que representa uno de los ecosistemas de agua dulce más amenazados del mundo (Dudgeon *et al.* 2006; Meyer *et al.* 2007; Vörösmarty *et al.* 2010; Vilar *et al.* 2014; Zorzal-Almeida *et al.* 2017).

En lo que se refiere al estado de conservación de estas especies, tanto en la región Neotropical como en otras regiones del planeta, peces y organismos que habitan aguas continentales han presentado constantes pérdidas de diversidad (Agostinho *et al.*, 2005; Dudgeon *et al.*, 2006). Estos detrimentos son el resultado principalmente de los impactos causados por diferentes formas de interferencia antrópicas, donde se destaca la explotación excesiva, contaminación ambiental, degradación de hábitats, alteraciones en el flujo de los ríos (principalmente por represas) e introducción de especies exóticas (Allan y Flecker, 1993; Agostinho *et al.*, 2005; Dudgeon *et al.*, 2006; Carpenter *et al.*, 2011).

1.2 Justificativa

La biodiversidad en ambientes de agua dulce, especialmente en sistemas de arroyos, muestra una gran variedad de adaptaciones biológicas y actúa como bioindicadores de la calidad ambiental (Purdon, 1993; Lenat, 1993; Menezes *et al.*, 2015). Por ello, identificar correctamente estas especies locales es crucial para comprender la dinámica del ecosistema y su impacto en la salud humana, dada su proximidad y relevancia para la sustentabilidad (Moritza, 1994). Sin embargo, solo una pequeña fracción de esta biodiversidad es conocida y estudiada, lo que es preocupante en un periodo de intensa explotación y degradación de los recursos naturales, llevando a la pérdida de muchas especies antes de registrarlas (Chapin *et al.*, 1995; Ceballos *et al.*, 2015).

El monitoreo tradicional de peces presenta problemas como identificación morfológica errónea, bajas probabilidades de detección y desafíos logísticos (Yamamoto *et*

al., 2016; Evans y Lamberti, 2018; Murakami *et al.*, 2019). En este contexto, el *eDNA metabarcoding* se presenta como un método de muestreo confiable para identificar las especies de peces a través del uso del marcador molecular 12S que ha mostrado su ideneidad para esta tarea. Aunque se han descrito algunos problemas del *eDNA* como no contar con parámetros totalmente definidos sobre el volumen correcto de agua para muestrear y el almacenamiento de las muestras (Bessey *et al.*, 2020), su mayor desafío es contar con una base de datos de secuencias estandarizadas, ya que la mayoría de los trabajos realizados usando el marcador 12S se concentran en las regiones de América del Norte, Europa (España, Francia y Reino Unido) y Así (Japón y China) con numerosos estudios sobre especies marinas y de agua dulce. Por lo tanto, existe una cobertura incompleta sobre la información de las especies y a eso se le suma que algunas de las secuencias no son de alta calidad, conteniendo errores de secuenciación o anotaciones incorrectas y que estas bases de datos no son actualizadas regularmente, lo que puede llevar a falta de datos recientes y a la inclusión de especies nuevas descritas.

De esta manera, se hace necesario la creación de protocolos operacionales estándares que permitan realizar las gestiones de monitoreo ambiental de forma no invasiva y al mismo, se requiere un esfuerzo para mejorar la cobertura y calidad de las bases de datos de referencia, especialmente en las regiones de ecosistemas de arroyos.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

- Desarrollar un paquete tecnologíco de monitoreo ambiental basado en *eDNA*.

1.3.2 Específicos

- validación de un protocolo de *eDNA* para monitorear la ictiofauna a través de muestras de agua en ambientes de arroyos;
- crear y complementar un banco de datos de secuencias de ADN 12S de peces de la BP3 para el desarrollo y aplicación eficiente del paquete tecnologíco; e
- aplicar y validar el paquete desarrollado en arroyos de la BP3.

Con la finalidad de alcanzar los objetivos planteados este trabajo fue dividido en dos partes, detalladas en forma de dos capítulos, donde el capitulo uno enfoca el primero

objetivo específico y el capitulo dos los otros dos objetivos. En ellos se hace el detalle minucioso sobre las estrategias implementadas para su desarrollo.

1.4 Referencias bibliográficas

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; PETRY, A. C.; GOMES, L. C.; JÚLIO J. R. H. F.. *Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation*. ***Aquatic Ecosystem Health & Management***, v. 10, n. 02, p. 174-186, 2005. Disponible en: < https://doi.org/10.1080/14634980701341719 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E.. ***Historical biogeography of neotropical freshwater fishes***. *Berkeley, USA*: *University of California Press*, p. 388, 2011. Disponible en: < https://www.ucpress.edu/books/historical-biogeography-of-neotropical-freshwater-fishes/hardcover >. Acceso en: 06 dic. 2023.

ALLAN, J. D.; FLECKER, A. S.. *Biodiversity conservation in running waters: identifying the major factors that threaten destruction of riverine species and ecosystems*. ***BioScience***, v. 43, n. 01, p. 32-43, 1993. Disponible en: < https://doi.org/10.2307/1312104 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

ANDRUSZKIEWICZ, E. A.; STARKS, H. A.; CHAVEZ, F. P.; SASSOUBRE, L. M.; BLOCK, B. A.; BOEHM, A. B.. *Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using EDNA metabarcoding.* ***PLoS ONE***, v. 12, p. e0176343, 2017. Disponible en: < https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176343 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

ARAÚJO, M. I.; DELARIVA, R. L.; BONATO, K. O.; SILVA, J. C.. *Fishes in first order stream in Ivaí River drainage basin, Upper Paraná River Basin, Paraná state Brazil*. ***Check List***, v. 07, n. 06, p. 774-777, 2011. Disponible en: < https://doi.org/10.15560/11023 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

BALIAN, E. V.; LÉVÊQUE, C.; SEGERS, H.; MARTENS, K.. *The freshwater animal diversity assessment: an overview of the results*. ***Hydrobiologia***, v. 595, p. 627-637, 2008. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/s10750-007-9246-3 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

BATISTA-SILVA, V. F. *et al*.. *Ichthyofauna from three streams of the lower Iguatemi River in the Upper Paraná river basin, Brazil.* ***Check List****,* v. 14, n. 02, p. 363-378, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.15560/14.2.363 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

BOLD Systems. ***Identifying species through DNA barcodes***: *v4: retrieved 2019-04-02. Canada*: *University of Guelph*, 1998. Disponible en: < www.boldsystems.org >. Acceso en: 06 dic. 2023.

BONETTO A. A.. Investigaciones sobre migraciones de peces en los ríos de la cuenca del Plata. **Ciencia e Investigación**, v. 19, n. 01/02, p. 12-26, 1963.

BYLEMANS, J.; GLEESON, D. M.; DUNCAN, R. P.; HARDY, C. M.; FURLAN, E. M.. *A performance evaluation of targeted EDNA and EDNA metabarcoding analyses for freshwater fishes.* ***Environ. DNA***, v. 01, p. 402-414, 2019. Disponible en: < https://doi.org/10.1002/edn3.41 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CASTRO, R. *et al*.. *Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil*. ***Biota Neotropica***, v. 03, n. 01, p. 01-31, 2003. Disponible en: < https://doi.org/10.1590/S1676-06032003000100007 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CHAKRABORTY, M.; DHAR, B.; GHOSH, S. K.. *Design of character-based DNA barcode motif for species identification: a computational approach and its validation in fishes*. ***Mol. Ecol. Resour***., v. 17, p. 1359-1370, 2017. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/1755-0998.12671 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

COLLINS, R. A. *et al*.. *Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI*. ***Methods in Ecology and Evolution***, v. 10, n. 11, p. 1985-2001, 2019. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/2041-210X.13276 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

COX, B.. *The biogeographic regions reconsidered*. ***Journal of Biogeography***, v. 28, n. 04, p. 511-523, 2001. Disponible en: < https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00566.x >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CRISTESCU, M. E.. *From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity*. ***Trends in Ecology & Evolution***, v. 29, n. 10, p. 566-571, 2014. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

DALTON, D. L.; BRUYN, M. de; THOMPSON, T.; KOTZÉ, A.. *Assessing the utility of DNA barcoding in wildlife forensic cases involving South African antelope*. ***Forensic Science International***: *reports,* v. 02, p. 100071, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100071 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

DJURHUUS, A. *et al*.. *Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels*. ***Front. Mar. Sci.***, v. 04, 2017. Disponible en: < https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

FABRIS, D. R.; ALVES, R. L.; ROESLER, M. R. V. B.; RIPPEL, R.. *Meio socioeconômico*. *In*: **Plano da Bacia Hidrográfica do Paraná 3**: características gerais da bacia. Cascavel: Unioeste/Itaipu/Paraná3, 2011. Disponible en: < http://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos_restritos/files/documento/2020-05/produto_01_caracteristicas_gerais_da_bacia_bp3_2014_v07_final.pdf >. Acceso en: 06 dic. 2023.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A. BALL, S. L.; DEWAARD, J. R.. *Biological identifications through DNA barcodes.* ***Proceedings of the Royal Society of London: Series B: Biological Sciences***, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003. Disponible en: < https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.. *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator.* ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004. Disponible en: < https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M.. *Identification of Birds through DNA Barcodes.* ***PLOS Biology***, v. 02, n. 10, p. e312, 2004. Disponible en: < https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

HUBERT, N.; RENNO, J. F.. *Historical biogeography of South American freshwater fishes.* ***Journal of Biogeography***, v. 33, n. 08, p. 1414-1436, 2006. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01518.x >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LANGEANI, F. *et al*.. *Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras*. ***Biota Neotropica***, v. 07, n. 03, p. 181-197, 2007. Disponible en: < https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000300020 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LEE, H. T.; LIAO, C. H.; HSU, T. H.. *Environmental DNA (eDNA) metabarcoding in the fish market and nearby seafood restaurants in Taiwan reveals the underestimation of fish species diversity in seafood*. ***Biology***, v. 10, n. 1132, 2021. Disponible en: < https://doi.org/10.3390/biology10111132 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M. L. J.; TEDESCO, P. A.. *Global diversity of fish (Pisces) in freshwater*. ***Hydrobiologia***, v. 595, p. 545-567, 2008. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/s10750-007-9034-0 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LIBÓRIO, L., RESENDE, V. H.. *Introdução aos bancos de dados biológicos*. **BIOINFO: Revista Brasileira de Bioinformática**. v. 01, 2021. DOI: 10.51780/978-6-599-275326-16. Disponible en: < https://doi.org/10.51780/978-6-599-275326-16 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LIMA, F. C. T.; RIBEIRO, A. C.; MENEZES, N. A.; . *Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul*. *In*: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (ed.). ***Biogeografia da América do Sul****: padrões e processos*. São Paulo: Roca, p. 261-276, 2011.

LOWE-MCCONNELL, R. H.. ***Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais***. São Paulo: EdUSP, p. 534-534, 1999. Disponible en: < https://www.edusp.com.br/livros/estudos-ecologicos-de-comunidades-de-peixes-tropicais/ >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LUNDBERG, J. G. *et al*.. *The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers*. *In*: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.;

LUCENA, C. A. S.. ***Phylogeny and classification of neotropical fishes****: part 01: fossils and geological evidence.* Porto Alegre: PUCRS, p. 13-48, 1998.

MARTINS, A.. Foto 51: la fascinante historia detrás de la célebre imagen de Rosalind Franklin sobre la estructura del ADN. ***BBC News Mundo***, 06 mayo 2022. Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-61335659>. Acceso en 13 sept. 2024.

MARTINEZ-MUNOZ, D. S. *et al.* Metagenómica y metatranscriptómica para mitigar las emisiones de metano por animales rumiantes. **TIP (Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas)**, v. 25, p. e430, 2022. Disponible en: < https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.430 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MENDES, I.; HILÁRIO, H.; TEIXEIRA, D.; CARVALHO, D. C. de. *Challenges in assessing the Neotropical fishes using DNA metabarcoding*. ***ARPHA Conference Abstracts***, *Pensoft Publishers*, v. 04, p. e65093, 2021. Disponible en: < https://doi.org/10.3897/aca.4.e65093 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MENEZES, M. *et al.*. *Update of the Brazilian floristic list of Algae and Cyanobacteria*. **Rodriguésia**, v. 66, n. 04, p. 1047-1062, 2015. Disponible en: < https://doi.org/10.1590/2175-7860201566408 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MEYER, A.. *DNA technology and phylogeny of fish*. *In*: BEAUMONT, A. (ed.). ***Genetics and evolution of aquatic organisms***. *London/UK*: Chapman & Hall, p. 219-249, 1994.

MEYER, J. L. *et al.*. *The contribution of headwater streams to biodiversity in river networks*. ***J. Am. Water Resour. As.*** (***JAWRA***), v. 43, n. 01, p. 86-103, 2007. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2007.00008.x >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MILAN, D. T. *et al.*. *New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment*. ***Scientific Reports***, v. 10, n. 01, p. 01-12, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/s41598-020-74902-3 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MIYA, M.; GOTOH, R. O.; SADO, T.. *MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples*.

Fisheries Science, v. 86, p. 939-970, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/s12562-020-01461-x >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MIYA, M.. *MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species*. ***Royal Society Open Science***, v. 02, n. 07, p. 150088, 2015. Disponible en: < https://doi.org/10.1098/rsos.150088 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

OTA, R. R.; DEPRÁ, G. D. C.; GRAÇA, W. J. D.; PAVANELLI, C. S.. *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated.* ***Neotropical Ichthyology***, v. 16, n. 02, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170094 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

PAULAY, G.; MEYER, C. P.. *DNA barcoding: error rates based on compre-hensive sampling*. ***PLOS Biology***, v. 03, n. 12, p. e422, 2005. Disponible en: < https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

PEREIRA, L. H. G.; CASTRO, J. R. C.; VARGAS, P. M. H.; GOMEZ, J. A. M.; OLIVEIRA, C.. *The use of an integrative approach to improve accuracy of species identification and detection of new species in studies of stream fish diversity*. ***Genetica***, v. 149, p. 103-116, 2021. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/s10709-021-00118-6 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

RATNASINGHAM, S.. *Chapter 26: BOLD v4*: *a centralized bioinformatics platform for DNA-based biodiversity data*. *In*: DESALLE, R. (*Ed.*). ***DNA barcoding****: methods and protocols*. *New York, USA*: *Springer US*, p. 403-441, 2024. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3581-0 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

REIS, R. E. *et al*.. *Fish biodiversity and conservation in South America*. ***Journal of Fish Biology***, v. 89, n. 01, p. 12-47, 2016. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/jfb.13016 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

RUPPERT, K. M.; KLINE, R. J.; RAHMAN, M. S.. *Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring,*

and applications of global eDNA. ***Global Ecology and Conservation***, v. 17, p. e00547, 2019. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SATO, Y.; MIYA, M.; FUKUNAGA, T.; SADO, T.; IWASAKI, W.. *MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding*. ***Mol. Biol. Evol.***, v. 35, n. 06, p. 1553-1555, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1093/molbev/msy074 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SCHALLENBERG, L.; WOOD, S.; POCHON, X.; PEARMAN, J.. *What can DNA in the environment tell us about an ecosystem?*. ***Front. Young Minds***., v. 08, p. 150, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.3389/frym.2019.00150 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SCHNELL, I. B. *et al*.. *Screening mammal biodiversity us-ing DNA from leeches*. ***Current Biology***. v. 22, n. 08, p. R262-R263, 2012. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.058 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SHIBATTA, O. A.; CHEIDA, C. C.. *Composição em tamanho dos peixes (Actinopterygii, Teleostei) de ribeirões da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil*. ***Revista Brasileira de Zoologia***, v. 20, p. 469-473, 2023. Disponible en: < https://doi.org/10.1590/S0101-81752003000300016 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SOININEN, E. M. *et al*.. *Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures*. ***Frontiers in Zoology***, v. 06, n. 16, 2009. Disponible en: < https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-16 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SOON, W. W.; HARIHARAN, M.; SNYDER, M. P.. *High-throughput sequencing for biology and medicine*. ***Molecular Systems Biology***, v. 09, n. 01, p. 640, 2013. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/msb.2012.61 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SUBRATA, T.; ABID, A. A.; SANKAR, K.; GHOSH, H. R.. ***DNA barcoding in marine perspectives****: assessment and conservation of biodiversity. Cham, Switzerland*: *Springer*

International Publishing, 2016. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/978-3-319-41840-7 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

TABERLET, P.; BONIN, A.; COISSAC, E.; ZINGER, L.. ***Environmental DNA****: for biodiversity research and monitoring*. *New York/USA*: *Oxford University Press*, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

USHIO, M. *et al*.. *Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing*. ***Metabarcoding*** **Metagenomics**, v. 2, p. e23297, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.3897/mbmg.2.23297 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

VILAR, A. G. *et al*.. *Eutrophication decreases distance decay of similarity in diatom communities*. ***Freshwater Biol.***, v. 59, n. 07, p. 1522-1531, 2014. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/fwb.12363 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

VON DER HEYDEN, S.; BARENDSE, J.; SEEBREGTS, A. J.; MATTHEE, C. A.. *Misleading the masses: detection of mislabelled and substituted frozen fish products in South Africa*. ***J. Mar. Sci.***, v. 67, n. 01, p. 176-185, 2010. Disponible en: < https://doi.org/10.1093/icesjms/fsp222 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

VÖRÖSMARTY, C. J. *et al.. Global threats to human water security and river biodiversity*. ***Nature***, v. 467, p. 555-561, 2010. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/nature09440 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

WANG, Y.; SONG, N.; LIU, S. *et al.. DNA barcoding of fishes from Zhoushan coastal waters using mitochondrial COI and 12S rRNA genes*. ***J. Ocean. Limnol***., v. 41, p. 1997-2009, 2023. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/s00343-022-2214-y >. Acceso en: 06 dic. 2023.

WILLIAMS, K. E.; HUYVAERT, K. P.; PIAGGIO, A. J.. *No filters, no fridges: a method for preservation of water samples for eDNA analysis*. ***BMC Research***, v. 09, p. 298, 2016. Disponible en: < https://doi.org/10.1186/s13104-016-2104-5 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

YAMAMOTO, S. *et al*.. *Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea*. ***Sci. Rep.***, v. 07, p. 40368, 2017. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/srep40368 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

YANG, L. *et al.. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis*. ***Sci. Rep.***, v. 04, p. 4089, 2014. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/srep04089 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

ZORZAL-ALMEIDA, S.; BINI, L. M.; BICUDO, D. C.. *Beta diversity of diatoms is driven by environmental heterogeneity, spatial extent and productivity*. ***Hydrobiologia****,* v. 800, p. 07-16, 2017. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/s10750-017-3117-3 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

2 CAPÍTULO I: DESARROLLO DE UN PROTOCOLO BASADO EN eDNA PARA EL MONITOREO DE LA ICTIOFAUNA DE LOS ARROYOS NEOTROPICALES

2.1 Introducción

Desde que se aprobó la primera aplicación del método del *eDNA* para monitorear organismos (Minamoto *et al.*, 2021) esta metodología se ha convertido en una herramienta indispensable para dar seguimiento principalmente a los macrorganismos; recopilando información relacionada con la conservación, identificación del hábitat, identificación de especies raras y no nativas y el seguimiento de la situación actual (Minamoto *et al.*, 2021).

Algunas de las ventajas de analizar el *eDNA* es que no es invasivo para el ecosistema y se requiere menor esfuerzo para su muestreo (Macher *et al.*, 2018) pues no necesita de colecta activa, instalación de trampas ni exploración de un área extensa, pues apenas es necesaria una muestra de buena calidad de agua, suelo, heces, etc, en la cual existan millones de fragmentos de ADN de las especies ahí presentes, las cuales dejan ese material en el ambiente (Ficetola *et al.*, 2008; Barnes & Turner, 2016; Valdez-Moreno *et al.* 2019; Ruppert *et al.* 2019) y por lo tanto, es posible identificar un gran número de taxones simultáneamente dentro de la misma muestra, incluyendo especies raras, conociendo así la composición de toda la comunidad del área muestreada (Valdez-Moreno *et al.* 2019; Ruppert *et al.* 2019).

En la muestra *eDNA* de un arroyo, por ejemplo, están presentes fragmentos de ADN de peces, algas, macroinvertebrados, bacterias, hongos, anfibios y cualquier otro ser vivo que haya pasado por allí, incluso el ADN de las especies presentes en el área de desembocadura de la cuenca que son cargados. Además de eso, el número de secuencias asociadas a cada taxón permite además cuantificar su abundancia relativa en el ambiente (mayor número de individuos, mayor número de fragmentos de ADN), permitiendo trabajar con diferentes niveles de diversidad en comunidades naturales (Valdez-Moreno *et al.* 2019; Ruppert *et al.* 2019). De esta forma, con una única muestra de *eDNA*, obtenida de forma no invasiva y con menor esfuerzo muestral, es posible aplicar la técnica de *metabarcoding* (Cristescu, 2014; Taberlet *et al.*, 2018).

Generalmente, la densidad del *eDNA* es baja en muestras ambientales y, por lo tanto, para obtener una muestra de calidad se requiere un método de captura para concentrar el *eDNA* para análisis posteriores. Para los estudios a partir de muestras de agua, el tratamiento más común es colectar y almacenar el agua en frascos refrigerados y la

filtración se realiza en el laboratorio, pero esto conlleva a buscar estrategias para el correcto almacenamiento y transporte de la muestra para evitar posible degradación del ADN, pérdida de la muestra por mal cierre de los frascos, entre otros; de esta manera, realizar la filtración in situ sería más beneficiosa.

A pesar de que muchos estudios han mostrado la efectividad del uso del *eDNA* para caracterizar las comunidades bióticas en regiones con influencia de múltiples actividades humanas como actividades agrícolas (p.e. Pawlowski *et al.* 2014, Chen *et al.* 2018, Treonis *et al.* 2018), actividades de la industria de hidrocarburos (p.e. Lanzén *et al.* 2016, Daly *et al.* 2016, Laroche *et al.* 2018) o polución (p.e. Li *et al.* 2018, Valentini *et al.* 2019), no se ha realizado una evaluación integral y comparativa de su eficiencia en la región tropical, donde la degradación del *eDNA* puede ser más acelerada, debido a las temperaturas que se mantienen altas y constantes a lo largo del año, además de las intensas lluvias que promueven las escorrentía del material orgánico a los sistemas fluviales cercanos, tornándolos más ácidos (Padakis, 1980). Estas particularidades dificultan las decisiones informadas sobre la idoneidad del *eDNA* para estudiar diferentes sistemas acuáticos, como los arroyos (Hilario *et al.*, 2023).

Los ecosistemas de arroyos, son sistemas fluviales con cauce de hasta 30 metros, aproximadamente, donde los gradientes del flujo de agua son influenciados por diversos factores como: el grado de inclinación de donde se encuentran, el tipo de vegetación, el clima, entre otros; tales factores acaban llevándolo a una variación espacial y temporal de hábitats en varias escalas (Winemiller *et al.*, 2008), y por ser considerados sistemas abiertos, donde la energía y nutrientes “escapan” constantemente hacia la desembocadura, son ambientes predominantemente heterotróficos, o sea, comúnmente mucho más carbono está presente y siendo consumido por la comunidad allí presente, en comparación al carbono que es producido dentro del sistema (Davies *et al.*, 2008).

De esta manera, vemos como la metodología del *eDNA* puede significar un gran avance para el conocimiento de la biodiversidad en regiones donde aún falta mucho por conocer, como en la megadiversa región Neotropical, además de que la extinción de especies avanza a un paso acelerado, principalmente por efecto antrópico. Sin embargo, la técnica todavía plantea varios retos, en especial, en lo que respecta a la optimización de la estrategia de muestreos, así como en la fiabilidad y disponibilidad de marcadores adecuados (Thomsen *et al.* 2012; Deiner *et al.* 2015; Miya *et al.* 2015), por lo que su aplicación requiere de una minuciosa puesta a punto (Caro *et al.*, 2020).

En este contexto, se hace necesario desarrollar protocolo basados en *eDNA* para monitorear la ictiofauna de arroyos, ajustándolos a las necesidades de la zona neotropical, enfocando en una metodología optimizada y eficiente que resulte en menor costo económico y de tiempo, y que pueda ser replicada por cualquier equipo que trabaje con monitoreo ambiental. Para esto, fueron testados el método de filtración *in situ*, donde fueron probados diferentes filtros y volumen de filtración, la eficiencia de dos marcadores moleculares, y la cobertura de los bancos de datos de secuencias de ADN referencia que estan disponibles.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

- desarrollar un protocolo basado en *eDNA* para monitorear la ictiofauna de arroyos

2.2.2 Objetivos Específicos

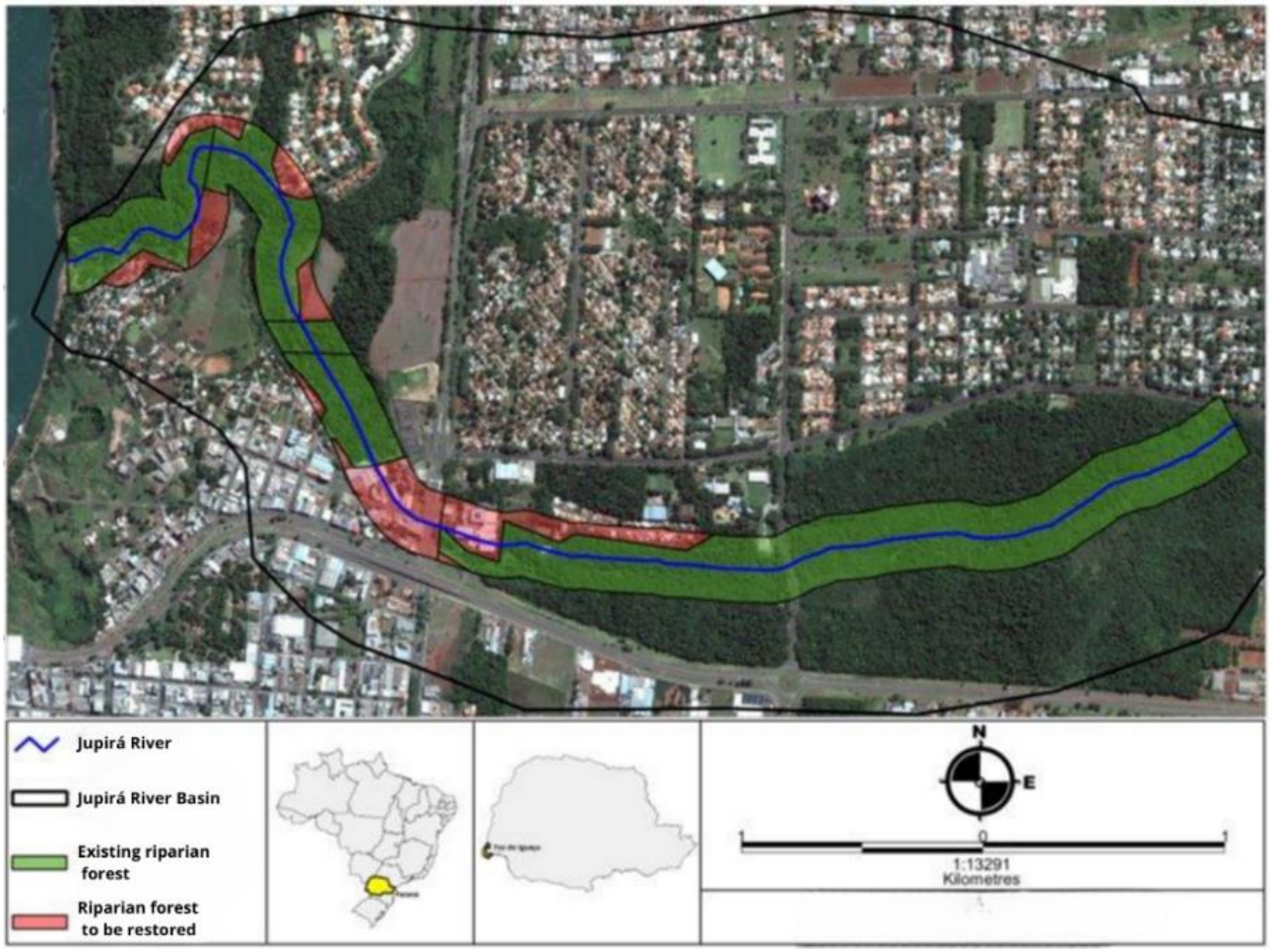
- testar el tiempo-costo-beneficio de la filtración *in situ;*
- establecer los volúmenes y filtros estándar de agua para realizar las filtraciones;
- determinar la eficiencia de los cebadores Mifish y Neofish del marcador molecular 12S rDNA en la recupercion de las secuencias y la identificación de las especies; e
- evaluar la cobertura de las bases de datos de secuencias de ADN disponibles.

2.3 Metodología

2.3.1 Área de estudio

El muestreo se llevó a cabo en el arroyo Jupirá (Figura 4), un arroyo de 2 orden perteneciente a la BP3. Este arroyo fue seleccionado por tener una vegetación riparia bastante amplia, ser de fácil acceso y, además, al estar ubicado dentro de la ciudad de Foz de Iguazú, posee influencias agrícolas y urbanas, por lo que representa de manera general las características de toda la zona.

Figura 4. Río Jupirá



Aviso: en rojo se muestra la zona del arroyo con influencia urbana y dónde se llevó a cabo el estudio.
Fuente: Alves *et al.*, 2009.

2.3.2 Colecta de las muestras de eDNA

Para cumplir con el objetivo de obtener un método de filtración con mejor costo–beneficio, tiempo y riesgo de contaminación/degradación por transporte y almacenamiento de agua, fue testada la optimización del método de filtración en campo. La filtración del agua ocurrió, usando bomba peristáltica portátil modelo Geopump II de la marca Geotech acoplada a un embudo de filtración con capacidad de 100 mL, con microfiltros de nitrocelulosa con 47 mm de diámetro de la marca Whatman. Para el funcionamiento del sistema, fueron utilizadas mangueras de silicona atóxicas de 5.0 x 10 mm. Se probaron cuatro diferentes protocolos (cuatro tratamientos) de filtración combinando volumen y porosidad del filtro: a) volumen de 600 mL pasándolo por un filtro de 0,45 µm; b) 600 mL divididos en dos volúmenes de 300 ml; 300 ml fueron filtrados a través de un filtro de 0.45

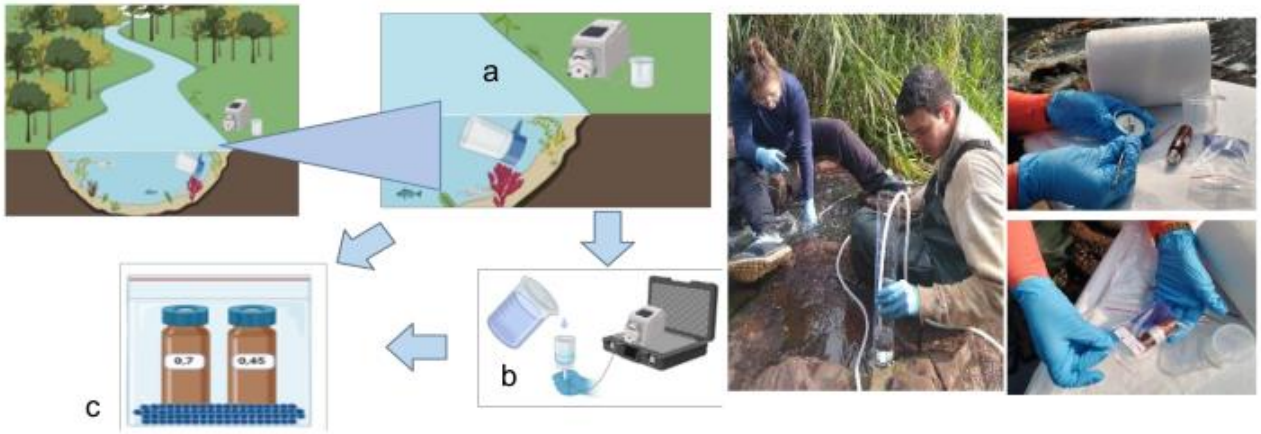
µm y los otros 300 ml usando otro filtro de 0.45 µm; los dos filtros constituyendo la muestra; c) 1200 mL filtrados a través de un filtro de 0,7 µm y seguido de una segunda filtración usando el filtro de 0,45 µm (la extracción del *eDNA* fue hecha solo a partir del filtro de 0,45 µm); y d) 1200 mL filtrados a través de un filtro de 0,7 µm y seguido de una segunda filtración usando el filtro de 0,45 µm (los dos filtros consitutyendo la muestra para la extracción del *eDNA*). Estos volúmenes de filtración fueron establecidos a partir de experimentos previos, donde se evidenció que el volumen máximo de filtración, antes del taponamiento del filtro, era de 600 mL con el filtro de 0,45 µm y de 1200 mL con el filtro de 0,7 µm. Cada protocolo fue hecho en duplicado. Fue aplicada la prueba de ANOVA de dos factores (volumen filtrado y tamaño de poro del filtro) para verificar si existe diferencia entre los protocolos.

Los embudos de filtración venían estériles y sellados en empaques individuales, ya con el filtro de 0,45 µm; los filtros de 0,7 µm fueron esterelizados por exposición de 20 minutos em luz U.V. utilizando flujo laminar, siendo imediatamente sellados, individualmente, en bolsas plásticas previamente esterilizados. Los embudos utilizados para los filtros de 0,7 µm, las mangueras y los frascos ámbares para almacenamiento de los filtros fueron autoclavados y sellados en embalajes herméticos, previamente identificados, para ida al campo.

Los embudos y filtros fueron abiertos solo en el momento de su uso, siendo acoplados en el sistema de filtración e inmediatamente sumergidos en el arroyo, a una profundidad de 10 – 20 cm de la superficie, sin tocar el fondo, contra la corriente, posicionados en regiones con mayor flujo de agua, evitando regiones de gran turbulencia, alejados, por lo menos, 1 metro de la orilla (Figura 5). La persona responsable por el muestreo se posicionó atrás del sistema de filtración, evitando revolver el área muestreada. Para medir el volumen filtrado fueron utilizadas probetas esterilizadas, graduadas para recibir el agua filtrada (Figura 5). En los protocolos c y d, el agua filtrada era almacenada en frascos graduados y esterilizados, siguiendo la segunda etapa de filtración inmediatamente después de terminar la primera, haciéndose esto aún en campo. Al final del proceso de filtración, usando pinzas autoclavadas, los filtros fueron retirados de los embudo de filtración teniendo cuidado de no tocar el centro del filtro para evitar contaminación. Los filtros fueron almacenados en frascos ámbares estériles y previamente identificados (Figura 5). Los frascos fueron acondicionados individualmente en bolsas tipo zip loc, conteniendo ~ 20g de sílica y refrigerados en caja térmica con hielo para transporte hasta el laboratorio, en el cual fueron transferidos para freezer -20 °C.

Entre las réplicas y protocolos, las mangueras fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio 5%. El procedimiento consistió en pasar el hipoclorito por 5 min por el sistema, seguido de otros 5 min de lavado con agua del propio punto de muestreo.

Figura 5. Paso a paso para la toma de muestras del *eDNA*



Aviso*:* a. Filtración de agua; b. Re-filtración del agua; c. Almacenamiento del filtro en bolsa zip loc. Los protocolos a y b, siguen la secuencia a y c. Los protocolos c y d, siguen la secuencia a, b y c.
Fuente: de los autores, 2024.

2.3.3 Extracción del eDNA, Selección del cebador, Secuenciamiento y Procesamiento inicial de los datos

La selección del cebador fue hecha a partir de una amplia revisión de la literatura llevando en cuenta la universalidad para el grupo, su aplicación en estudios de la región neotropical y el tamaño de la base de dados de secuencias referencias disponibles. De esta manera fueron elegidos los primers Mifish y Neofish (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores seleccionados para el *metabarcdoing*

Región	Cebador	Secuencia	Pb	Autor
12S rDNA	Mifish-U-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GTCGGTAAAACTCGTGCCAGC	171	Miya *et al.* 2015
	Mifish-U-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA GCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG		
	NeoFish-U-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG CGCCGTCGCAAGCTTACCCT	193	Milan *et al.* 2020
	NeoFish_3R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA GAGTGACGGGCGGTGTGTGC		

Fuente: de los autores, 2024.

Las etapas de extracción, amplificación, secuenciamiento y tratamiento inicial de los datos brutos fue realizada por la empresa BPI Biotecnología (Botucatu, SP, Brasil). Para

eso, los frascos ámbares conteniendo los filtros con las muestras de *eDNA* fueron enviados a la empresa bajo refrigeración (~10 °C). El ADN genómico fue extraído utilizando el kit *ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrepTM (Zymo Research cód. D6005*) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Fueron utilizadas partes iguales de cada filtro, formando una muestra compuesta, siguiendo el volumen máximo recomendado por el protocolo. El *eDNA* estraido fue cuantificado por fluorescencia utilizando el equipo *Qubit® 3.0 Fluorometer y el kit QubitTM dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific*). Para la etapa de amplificación, las PCR fueron hechas con un volumen final de 20 µL, conteniendo 10 µL de Gotaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 1,0 µL del cebador *Forward* a 10 µM, 1,0 µL del cebador *Reverse* a 10µM, 2 µL de ADN genómico y 6 µL de agua ultrapura para completar el volumen. Para el cebador Mifish, el programa de amplificación consistió en: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg., apareamiento a 50°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 30 seg.; la extensión final fue a 72°C por 5 min. Para el cebador NeoFish, el programa consistió en: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg., apareamiento a 60°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 1 min.; la extensión final fue a 72°C por 7 min. Los productos de la amplficacion fueron visualizados a través de electroforesis en gel de agarosa 2% coloreada con Gel Red 0,03% (v/v) y cuantificados por fluorescencia utilizando el equipo *Qubit® 3.0 Fluorometer y el kit QubitTM dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific*).

Después de esta etapa se inició la construcción de la biblioteca NGS/*metabarcoding*. Fue realizada la reacción de indexación en la cual fueron insertados los indexadores en los adaptadores comunes, siguiendo el protocolo del kit Nextera XT IIndex (Illumina). La biblioteca fue amplificada de acuerdo con el siguiente programa: incubación a 72°C por 3 minutos, desnaturalización inicial a 95°C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 5 minutos. Las reacciones de amplificación fueron conducidas en termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Las bibliotecas generadas fueron sometidas a etapas de purificación utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Seguidamente, se realizó la cuantificación por la metodología de PCR en Tempo Real utilizando el Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), todos de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se generó un Pool equimolar de DNA, a través de la normalización de todas las muestras a 4nM, para realizar el secuenciamiento, el cual fue conducido usando el sistema Illumina MiSeq de secuenciamiento de nueva generación

(Illumina® Sequencing) y 3 unidades del kit MiSeq v2 Reagent 500 ciclos (lectura de 2 x 250pb) con 20% de PhiX Sequencing Control V3 (Illumina).

Las secuencias fastq R1 y R2 fueron montadas en una única fila por el programa FLASH V.1.2.11 y transformadas en secuencias FASTA por el paquete seqkt V.2.2.0. Fueron mantenidas solamente las secuencias con el tamaño mínimo de 150 pb. Las secuencias con similaridad ≥ 99% fueron agrupadas en OTUs (unidad taxonómica operacional). Cada OTU pasó por una primera etapa de filtración, por comparación con el banco de datos *GenBank*, utilizando el programa blast V.2.13.0, siendo retenidas solamente las OTUs que presentaron 90% de similaridad mínima con el grupo objetivo.

2.3.4 Análisis de datos

Para la atribución de cada OTU a los diferentes niveles taxonómicos, se estableció el critério de similaridad de: ≥99%, especie; ≥97%, género; ≥96%, família; ≥94%, clase; ≥90%, orden. Finalmente, fueron analizadas las abundancias relativas de los taxones identificados a nível de Especie para revisar su correspondência com las abundancias obtenidas en trabajos realizados en la región y ambientes semejantes.

2.4 Resultados

Para todas las muestras obtenidas con los diferentes protocolos de filtración fue posible extraer ADN (min: 1.6 ng/uL; max: 9.27 ng/uL). Para la creación de la lista de OTUs, fueron obtenidas, en media, 24000 *reads* (min: 20704; max: 41112). Usando el criterio del número de *reads* recuperadas, se determino cuál método de filtración fue más eficiente. Los protocolos A y D, mostraron tener el mejor rendimiento, sin embargo, no encontramos diferencias estadísticas entre ellos ($p = 0.614456$) (Gráfico 1), por otro lado, al considerar el número de OTUs, se encontró que existen diferencias significativas entre los cebadores (Gráfico 2).

Para la selección del cebador ideal, solo se tuvieron en cuenta los resultados del protocolo D, definido en la etapa anterior como el protocolo más eficiente; de esta manera, teniendo como principal criterio el número de OTUs que correspondió al grupo objetivo, el cebador Neofish mostró mayor eficiencia (Gráfico 3 y Tabla 2) identificando un mayor número de taxones a nivel de especie, demostrando la resolución de este marcador en la identificación de especies en la región Neotropical.

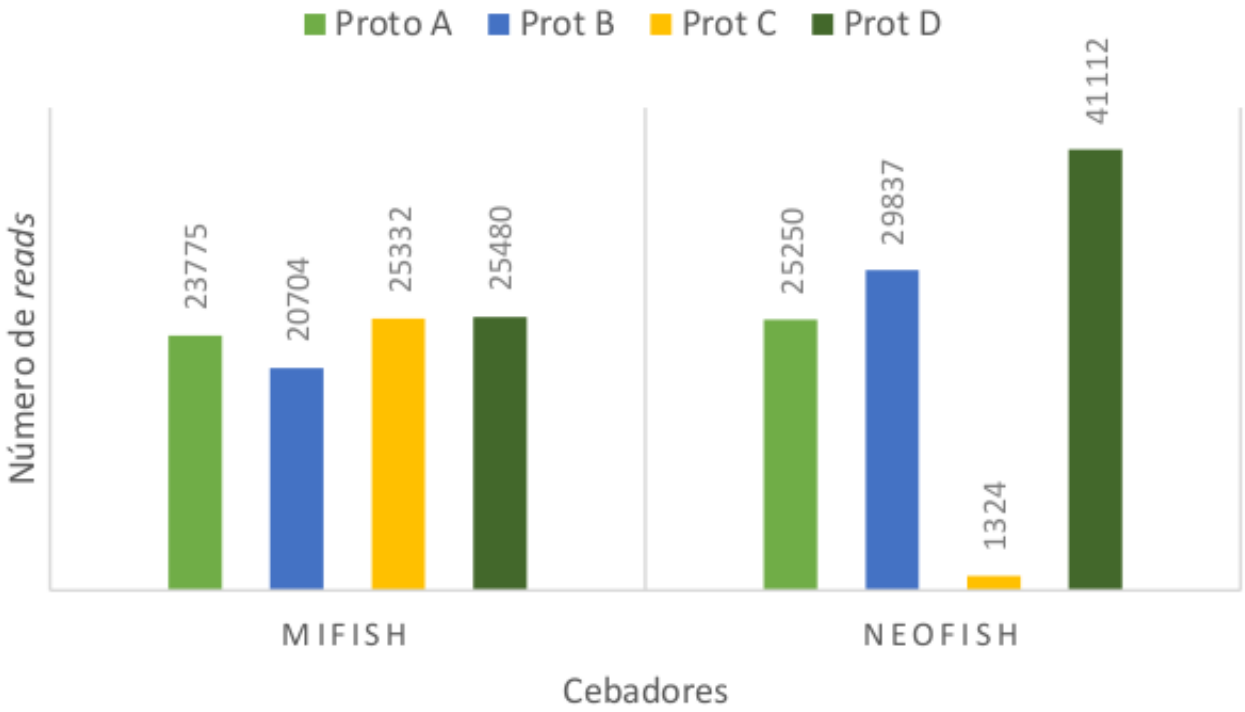
Centrando la atención en la recuperación del nivel taxonómico de especie, observamos que los *reads* también sirven como una forma de cuantificar el material genético extraído, permitiendo determinar la abundancia de las especies detectadas. En el gráfico 4, se muestran las 5 especies más abundantes detectadas con el cebador Neofish a partir del protocolo de filtración D.

Tabla 2. Resultados obtenidos por el protocolo D por cada cebador usado

Cebador	Media *reads*	OTUs 90% similaridad	OTUs objetivo	Taxones objetivo identificados	Nivel taxonómico alcanzado			
					Orden	Familia	Género	Especie
Mifish	25480	47	10	6			3	3
NeoFish	41112	24	21	12	1	1	2	8

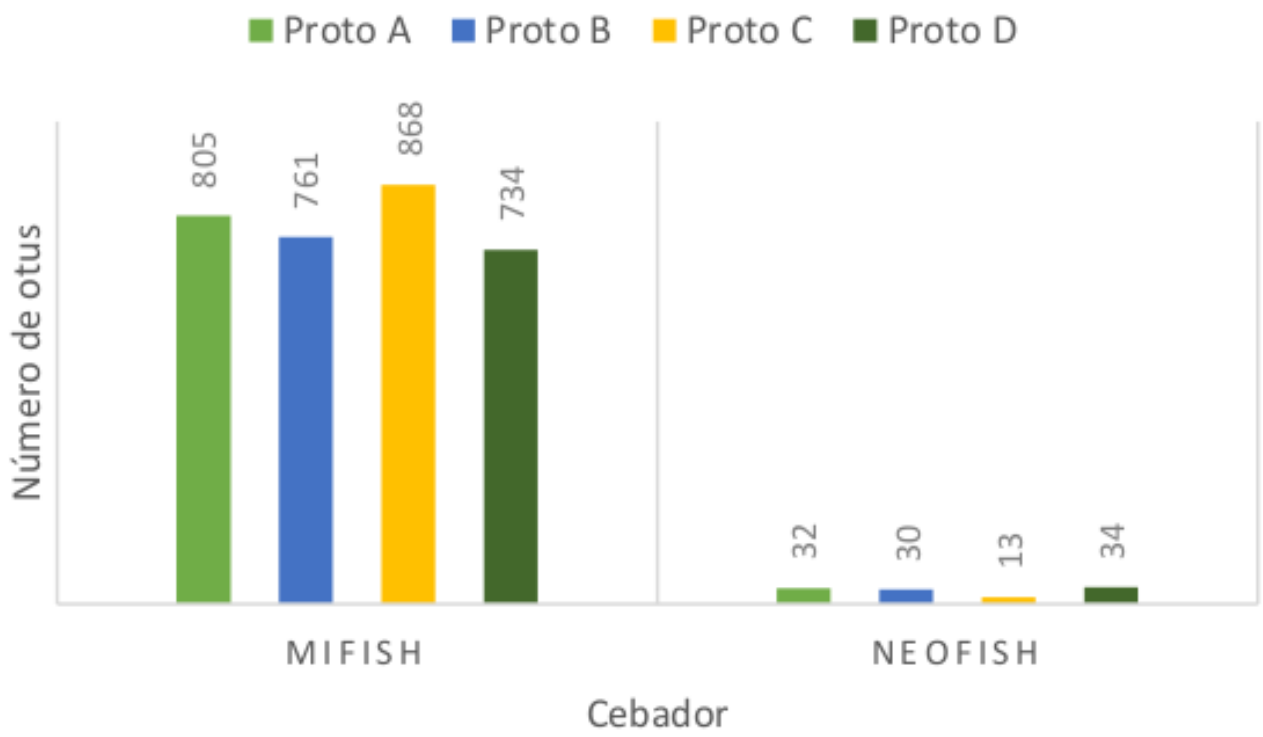
Aviso: se muestran el número de taxones identificados y el nivel taxonómico alcanzado.
Fuente: de los autores, 2024.

Gráfico 1. Promedio de *reads* recuperadas por cada protocolo de filtración, usando los cebadores Mifish y NeoFish



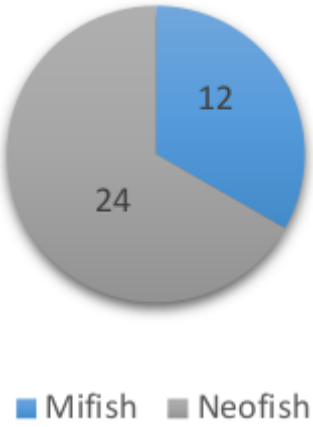
Fuente: de los autores, 2024.

Gráfico 2. OTUs totales recuperadas por cada protocolo de filtración, usando los cebadores Mifish y NeoFish



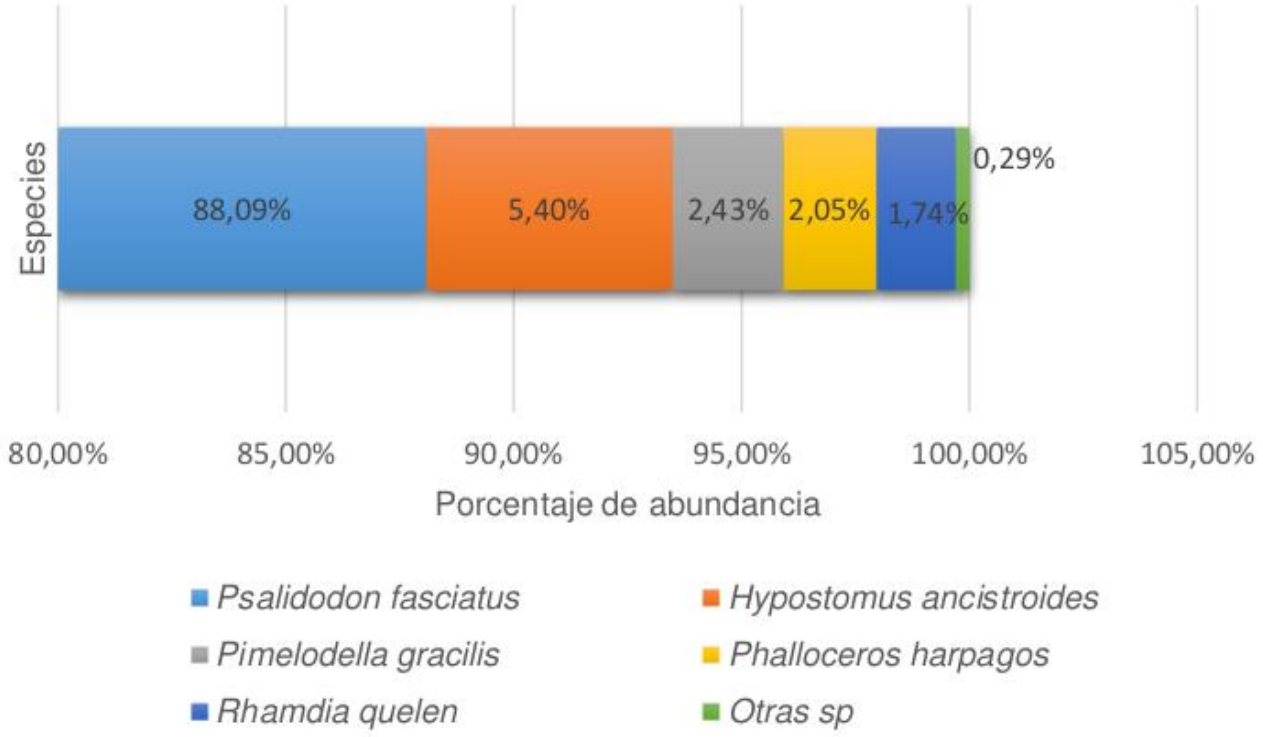
Fuente: de los autores, 2024.

Gráfico 3. OTUs objetivo recuperadas por cada cebador



Fuente: de los autores, 2024.

Gráfico 4. Porcentaje de abundancia relativa de las principales especies recuperadas por el marcador Neofish usando el protocolo de filtración D



Fuente: de los autores, 2024.

2.5 Discusión

Las pruebas y análisis realizados permitieron presentar un protocolo eficiente de *eDNA* para el análisis y monitoreo de comunidades de peces en ambientes de arroyos. Durante el desarrollo de nuestro trabajo, fueron abordados los problemas descritos por Day *et al.* (2019) y Bessey *et al.* (2020), respecto a la estandarización del volumen adecuado de agua para recolectar las muestras y el almacenamiento de las mismas. Demostramos que la filtración *in situ* del agua, disminuye los riesgos de contaminación de las muestras y elimina los problemas de traslado, promoviendo un protocolo más rápido y barato, el cual puede ser aplicado por cualquier persona mínimamente entrenada para coletar muestras de agua, eliminando la necesidad de especialistas y grandes logísticas de transporte. Además, establecimos que, 1,2 L de agua filtrada con membranas de 0.70 y 0.45 µM son las combinaciones ideales que permiten recuperar las comunidades de ictiofauna.

El marcador Mifish, fue quien consiguió recuperar el mayor número de OTUs, si embargo, la mayoría de ellas blastaron con otros grupos taxonómicos que no eran el foco del estudio, o no alcanzaron la resolución necesaria para diferenciar las especies de peces, mostrando similaridad con más de un taxón, aspecto en el cual el marcador NeoFish, tuvo

una mayor eficiencia, logrando identificar a nivel de especie 8 taxones, dentro de los cuales las especies *Psalidodon fasciatus* e *Hipostomus ancistroides* se muestran como las más abundantes, seguidas por los bagres *Pimelodella gracilis* y *Rhamdia quelen*, estos datos son correspondientes a los registros de los estudios previamente realizados mediante los métodos tradicionales (Agostinho *et al.*, 2005; Claro-García *et al.*, 2018; Jarduli *et al.*, 2020) y los métodos moleculares (Pereira *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2021), mostrando su alto poder de resolución.

Además, vale resaltar que parte de las OTUs obtenidas por NeoFish, blastaron apenas con niveles taxonómicos mas altos, como género, familia y mismo orden (Tabla 2), evidenciando la falta de secuencias de referencia en las bases de datos, uno de los mayores desafíos para la aplicación efectiva de la metodología de *eDNA-metabarcoding*. Con todo, a pesar de no conseguir identificartodos los indivíduos al nivel específico, la metodología permite identificar los linajes presentes en las muestras, que por su parte representan diferentes taxones.

2.6 Conclusiones

El protocolo propuesto ha demostrado ser una metodología eficiente, económica y estandarizada para la recolección de datos sobre la distribución de las especies mediante el análisis de ADN ambiental, permitindo el análisis de las asambleas de peces, a partir de una única muestra, lo que posibilita realizar no solo estudios de riqueza, si no también evaluar la abundancia y obtener los valores de diversidad alfa, beta y gama, mostrándose como una alternativa atractiva e idónea que ofrece un acercamiento para tener información detallada sobre el estado, distribución y requisitos de hábitat de las especies, contribuyendo así a una gestión más efectiva y precisa de los ecosistemas acuáticos.

2.7 Referencias bibliográficas

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; PETRY, A. C.; GOMES, L. C.; JÚLIO JR, H. F.. *Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation*. ***Aquatic Ecosystem Health & Management***, v. 10, n. 02, p. 174-186, 2005. Disponible en: < https://doi.org/10.1080/14634980701341719 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

ALVES, A. R.; VARGA, E. H.; GONZÁLEZ, T. H.; DIAZ, R. S.; GONZÁLEZ, R. H.. **Uso do programa gvSIG na análise ambiental da bacia do Rio Jupirá**. *Foz do Iguaçu*: *Centro Internacional de Hidroinformática*, 2019. <http://www.gvsig.com/es/prueba/-/asset_publisher/eqkU1yeCyOuF/content/uso-do-programa-gvsig-na-analise-ambiental-da-bacia-do-rio-jupira>.

BARNES, M. A.; TURNER, C. R.. *The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics.* ***Conservation Genetics***, v. 17, n. 01, p. 01-17, 2016. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

BESSEY, C. *et al.. Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding*. ***Environmental DNA***, p. 01-12, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1002/edn3.74 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CAMACHO, C.. ***BLAST® Command line applications user manual***. *Bethesda, MD, USA*: *National Center for Biotechnology Information,* 2008. Disponible en: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279674/ >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CARO, A.; MADEIRA, M.; SOMOZA, E.; GÓMEZ, B.. **Desarrollo y aplicación de una metodología basada en el studio del ADN ambiental, que permita caracterizar las comunidades de anfibios en el término municipal de Vitoria-Gasteiz en aras de su gestión y conservación**. Bilbao, Espanha: Universidad del País Vasco, 2020. Disponible en: < https://blogs.vitoria-gasteiz.org/ceagreenlab/files/2020/09/Informe-final-CEA-Green-Lab-EHU-*eDNA*-anfibios.pdf >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CHEN, Y. *et al.. Distribution of bacterial communities across plateau freshwater lake and upslope soils.* ***Journal of Environmental Sciences***, v. 43, p. 61-69, 2016. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.08.012 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CLARO-GARCÍA, A.; ASSEGA, F. M.; SHIBATTA, O. A.. *Diversity and distribution of ichthyofauna in streams of the middle and lower Tibagi river basin, Paraná, Brazil*. ***Check List***, v. 14, n. 01, p. 43-53, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.15560/14.1.43 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CRISTESCU, M. E.. *From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity*. ***Trends in Ecology & Evolution***, v. 29, n. 10, p. 566-571, 2014. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

DAVIES, B. *et al*.. *Comparative biodiversity of aquatic habitats in the European agricultural landscape.* ***Agriculture, Ecosystems & Environment***, v. 125, n. 01-04, p. 01-08, 2008. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.10.006 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

DAY, K. *et al*.. *Development and validation of an environmental DNA test for the endangered Gouldian finch*. ***Endang Species Res.***, v. 40, p. 171-182, 2019. Disponible en: < https://doi.org/10.3354/esr00987 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

DEINER, K.; WALSER, J. C.; MÄCHLER, E.; ALTERMATT, F.. *Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA*. ***Biol. Conserv.***, v. 183, p. 53-63, 2015. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

FICETOLA, G. F.; MIAUD, C.; POMPANON, F.; TABERLET, P.. *Species detection using environmental DNA from water samples*. ***Biology Letters***, v. 04, p. 423-425, 2008. Disponible en: < https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

HILÁRIO, H. O.; MENDES, I. S.; SALES, N. G.; CARVALHO, D. C.. *DNA metabarcoding of mock communities highlights potential biases when assessing Neotropical fish diversity*. ***Environmental DNA***, v. 00, p. 01-11, 2023. Disponible en: < https://doi.org/10.1002/edn3.456 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

JARDULI, L. R. *et al*.. *Fish fauna from the Paranapanema River basin, Brazil*. ***Biota Neotropica***, v. 20, n. 01, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2018-0707 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LANZÉN, A.; LEKANG, K.; JONASSEN, I.; THOMPSON, E. M.; TROEDSSON, C.. *High-throughput metabarcoding of eukaryotic diversity for environmental monitoring of offshore*

oil-drilling activities. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 17, p. 4392-4406, 2016. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/mec.13761 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LAROCHE, O. *et al*.. *Metabarcoding monitoring analysis: the pros and cons of using co-extracted environmental DNA and RNA data to assess offshore oil production impacts on benthic communities*. ***PeerJ***., v. 05, p. e3347, 2017. Disponible en: < https://doi.org/10.7717/peerj.3347 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LI, J.; HANDLEY, L. J. L.; READ, D. S.; HÄNFLING, B.. *The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding.* ***Mol. Ecol. Resour***., v. 18, p. 1102-1114, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/1755-0998.12899 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MACHER J. N. *et al*.. *Comparison of environmental DNA and bulk-sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome c oxidase I primers*. ***Mol Ecol Resour***., v. 18, p. 1456-1468, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/1755-0998.12940 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MILAN, D. T.. *New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment*. ***Scientific Reports***, v. 10, n. 01, p. 01-12, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/s41598-020-74902-3 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MINAMOTO T. *et al.. An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols*. ***Environmental DNA***. v. 03, p. 08-13, 2021. Disponible en: < https://doi.org/10.1002/edn3.121 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MIYA, M. *et al*.. *MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species*. ***Royal Society Open Science***, v. 02, n. 07, p. 150088, 2015. Disponible en: < https://doi.org/10.1098/rsos.150088 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

PAWLOWSKI, J.; ESLING, P.; LEJZEROWICZ, F.; CEDHAGEN, T.; WILDING, T. A.. *Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities*. ***Mol. Ecol.***

Resour., v. 14, p. 1129-1140, 2014. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/1755-0998.12261 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

PEREIRA, L. H. G.; CASTRO, J. R. C; VARGAS, P. M. H.; GOMEZ, J. A. M.; OLIVEIRA, C.. *The use of an integrative approach to improve accuracy of species identification and detection of new species in studies of stream fish diversity.* ***Genetica***, v. 149, p. 103-116, 2021. Disponible en: < https://doi.org/10.1007/s10709-021-00118-6 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

PEREIRA, L. H. G.; MAIA, G. M. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.. *DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil.* ***Mitochondrial DNA***, v. 22, p. 71-79, 2011. Disponible en: < https://doi.org/10.3109/19401736.2010.532213 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

RUPPERT, K. M.; KLINE, R. J.; RAHMAN, M. S.. *Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA*. ***Global Ecology and Conservation***, v. 17, p. e00547, 2019. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

TABERLET, P.; BONIN, A.; COISSAC, E.; ZINGER, L.. ***Environmental DNA****: for biodiversity research and monitoring*. *New York/USA*: *Oxford University Press*, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

THOMSEN, P. F. *et al*.. *Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples*. ***PLoS ONE****,* v. 07, n. 08, p. e41732, 2012. Disponible en: < https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

TREONIS, A. M.; UNANGST, S. K.; KEPLER, R. M. *et al.. Characterization of soil nematode communities in three cropping systems through morphological and DNA metabarcoding approaches*. ***Sci Rep.***, v. 08, p. 2004, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/s41598-018-20366-5 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

VALDEZ-MORENO M. *et al.. Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake*. **PLoS ONE**, v. 14, n. 04, p. e0215505, 2019. Disponible en: < https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215505 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

VALENTINI, A. *et al*.. *Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding*. ***Mol. Ecol***., v. 25, p. 929-942, 2016. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/mec.13428 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

WINEMILLER, K. O.; AGOSTINHO, A. A.; CARAMASCHI, E. P.. *Fish ecology in tropical streams*. *In*: DUDGEON, D.. ***Tropical stream ecology***: *aquatic ecology*. *Hong Kong/China*: *Academic Press*, p. 107-146, 2008. Disponible en: < https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50007-8 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

3. CAPÍTULO II: CREACIÓN DE UN BANCO DE DATOS DE SECUENCIAS DE ADN 12S PARA VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MONITOREO AMBIENTAL DE PECES BASADO EN eDNA METABARCODING

3.1 Introducción

Los bancos de datos moleculares han transformado profundamente la biología molecular al proporcionar plataformas centralizadas para el almacenamiento, acceso y intercambio de información genética. Estas bases de datos son fundamentales para la identificación taxonómica, el análisis filogenético y la conservación de la biodiversidad. En el contexto del monitoreo ambiental, los bancos de datos moleculares facilitan la aplicación de técnicas avanzadas como el *DNA barcoding* y *eDNA-metabarcoding*, que se han consolidado como herramientas indispensables para la identificación de especies y el estudio de la biodiversidad.

Los métodos tradicionales de bioevaluación están bien establecidos a nivel internacional y se utilizan ampliamente para el biomonitoreo, como lo demuestran las Directivas de la UE sobre la Directiva Marco del Agua (DMA) y la Estrategia Marina (MSFD) (DIRECTIVA 2008/56/CE). Sin embargo, el *DNA barcoding* puede mejorar estos métodos tradicionales por varias razones: (i) proporciona una resolución taxonómica más alta y facilita la identificación de taxones difíciles de clasificar o para los cuales no existen expertos disponibles; (ii) permite una evaluación más precisa de los factores ambientales específicos de ciertos taxones; (iii) mejora la comparabilidad de los datos entre diferentes regiones; (iv) permite la identificación de etapas tempranas de vida y especímenes fragmentados; (v) facilita la detección de especies crípticas y raras; (vi) posibilita el desarrollo de nuevos índices ecológicos, como los que incluyen especies raras o crípticas que pueden ser indicadoras de factores estresantes; (vii) incrementa la cantidad de muestras procesables y reduce el tiempo de procesamiento, lo que lleva a una mejor comprensión de la ecología de las especies; (viii) ofrece una metodología no invasiva cuando se emplean técnicas de *eDNA*.

Reciente se ha implementado la metodología de *metabarcoding*, la cual permite analizar, de una sola vez, la totalidade de secuencias presentes en una muestra ambiental (agua, tierra, aire, feces, etc), inlcuyendo diversos grupos taxonómicos. Conocida como *eDNA-metabarcoding*, esta técnica es particularmente atractiva porque no hay captura ni manejo de especies, por lo que no hay riesgo de perturbar los ecosistemas y, al poder

identificar los diversos grupos taxónomicos en una única muestra, solo es necesario mudar el tipo de cebador utilizado, promoviendo la reducción del esfuerzo y costo del procesamiento de muestras en comparación con los muestreos tradicionales que son enfocados en un solo grupo o en algunos de ellos.

Por utilizar muestras ambientales, el material genético recuperado se encuentra más degradado, por lo que las secuencias obtenidas son más cortas (~150-200 pb) así, el marcador mas decisivo que se ha descrito para el grupo de peces es el 12S, que presentó buena resolución en la identificación a nível de especie, a partir de secuencias más cortas, cuando comparado con el marcador COI utilizado en el *DNA barcoding* (Miya *et al.*, 2015; Hilário *et al.*, 2023).

El marcador 12S rDNA forma parte del gen ribosómico mitocondrial y presenta múltiples ventajas para la identificación de ictiofauna. El gen 12S rDNA es altamente conservado en diversas especies, pero muestra suficiente variabilidad para permitir una diferenciación precisa entre ellas, inlcuso a partir de secuencias más cortas como 150 pb (Ward *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016).

El monitoreo de la ictiofauna en arroyos mediante *eDNA metabarcoding* es crucial para detectar cambios en la estructura de las comunidades de peces, que pueden reflejar alteraciones ambientales tales como contaminación, cambios en el uso del suelo o efectos del cambio climático. Esta capacidad para identificar cambios sutiles y realizar un seguimiento detallado a lo largo del tiempo es fundamental para la gestión y conservación de los ecosistemas acuáticos (Taberlet *et al.*, 2012).

Hacer uso del marcador 12S en el *eDNA metabarcoding* para el monitoreo ambiental de arroyos es de particular relevancia debido a su capacidad para proporcionar una identificación precisa y eficiente de las especies de peces en estos hábitats acuáticos. Los arroyos son ecosistemas delicados y, a menudo, difíciles de muestrear con métodos tradicionales, lo que genera déficits de información sobre la rica diversidad ictiofaunística que albergan (Texeira *et al.*, 2023). La aplicación de la metodología de *eDNA-matabarcoding* utilizando el marcador 12S permite la detección de ictiofauna a partir de muestras ambientales como agua y sedimentos, ofreciendo una visión detallada de la biodiversidad y los cambios en las comunidades de peces (Leray *et al.*, 2015). Para maximizar el impacto de estos análisis, es esencial desarrollar y mantener bancos de datos moleculares regionales que se integren en plataformas internacionales, permitiendo el acceso y la compartición de la información genética dentro de la comunidad científica. La aplicación de estas herramientas moleculares no solo mejora la identificación y el

seguimiento de especies, sino que también contribuye significativamente a la gestión sostenible y a la conservación de los ecosistemas de arroyos.

Sin embargo, el gran desafio que estas técnicas enfrentan es contar con bancos de datos de referencia actualizados y completos. La colaboración internacional para la base de datos de secuencias de nucleótidos (INSDC, en sus siglas en inglés), integrados por los bancos Banco ENA - EMBL (Europa), *GenBank* (EE.UU.) y DDBJ (Japón), cuenta con los datos moleculares más relevantes en biología, conteniendo cerca de 55 millones de secuencias, o cien mil millones de componentes moleculares del ADN que codifican la información genética. Sin embargo, la mayor parte de toda esta información, referente a la identificación de espécies, independente del marcador utilizado, es sobre las especies que habitan América del Norte, Europa y Oceanía, en contraste con las regiones tropicales como América Latina y África, donde los estudios demuestran que concentran la mayor diversidad de especies, pero solo una pequeña fracción de la biodiversidad es conocida y ha sido estudiada (Chapin *et al.*, 1995; Ceballos *et al.*, 2015). Específicamente, al revisar las informaciones en los bancos de datos de secuencias del marcador 12S, utilizado en los trabajos de *eDNA metabarcoding*, se percibe que la disponibilidad de secuencias referencias para la región Neotropical es aún más escasa. A pesar, del aparente gran número de registros en el *GenBank* (339686 – acesso en 21/07/2024), la mayor parte de la información está concentrada en la vida marina. De estos registros, 53753 pertenecen a peces, siendo 2663 registros a peces de agua dulce y 12 registros para peces de arroyos. Para Brasil hay registradas 2069 secuencias, de las cuales cuatro son para peces de agua dulce. Asi, queda evidente que faltan muchas informaciones en los bancos de datos llevando en consideración el gran número de especies descritas, especialmente a lo que se refiere para Brasil, evidenciando la enormae laguna existente en los bancos de datos (Menezes *et al.*, 2015).

Por eso, es necesario y urgente inventariar y complementar las informaciones de bancos de datos de las especies Neotropicales, con las obtenidas a partir del marcador 12S para que puedan ser más eficientes en los estudios de *eDNA metabarcoding* y de otras metodologías moleculares basadas en este marcador, inclusive.

3.2 Objetivos

3.2.*1 General*

- desarrollar un banco de datos de secuencias de ADN como parte de un paquete tecnológico no invasivo para el biomonitoreo, basado en el *eDNA metabarcoding*, de las especies de peces de la BP3.

3.2.*2 Específicos*

- desarrollar los cebadores específicos para las secuencias usadas como código de barras;
- crear un banco de datos con las secuencias;
- depositar las secuencias en los bancos de referencias *online;*
- validar el protocolo de *eDNA metabarcoding*.

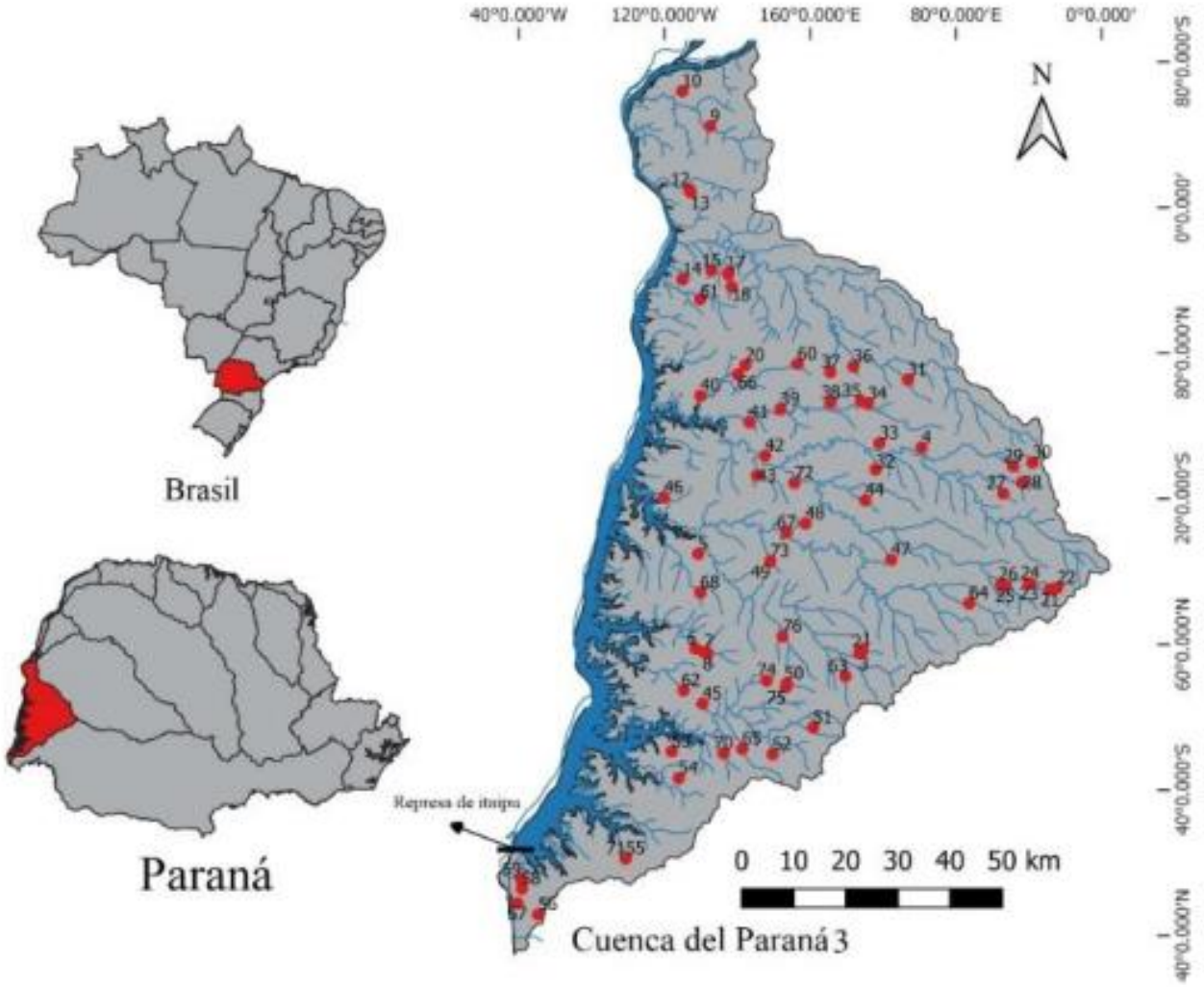
3.3 Metodología

3.3.1 Creación del banco de datos

3.3.1.1 Área de estudio

Se utilizaron tejidos de 75 especies de peces de la BP3 depositados en la colección de tejidos de la colección de Ictiología del Laboratorio de Biodiversidad en Ecología Molecular (LaBEM) de la Unila. Estos peces fueron obtenidos de 76 puntos de colecta (Figura 6) de diferentes arroyos de segunda a cuarta orden de la BP3 que fueron muestreados desde el 2013 al 2022. Para cada espécie fueron selecionados de 2 a 3 muestras de tejido/individuo, cuando posible, para extraer el material genético.

Figura 6. Localización de la BP3 y los sitios de colecta para la creación del banco de datos



Fuente: Pereira *et al.*, 2021.

3.3.1.2 Elección del cebador

Inicialmente, para la construcción de la biblioteca 12S, fueron seleccionados, a partir de la literatura, los cebadores diseñados para la región Neotropical, Neofish (Milan *et al.*, 2020): Neofish2/3F CGCCGTCGCAAGCTTACCCT y Neosifh 3R GCACACACCGCCCGTCACT; y el cebador Teleofish (Valentini *et al.*, 2016): Teleofish02F AAACTCGTGCCAGCCACC y TeleofishR CATGGTAAGTGTACCGGAAG. Los cebadores fueron testados, primero siguiendo las reacciones descitas en los trabajos, en la amplificación de muestras de 20 espécies de la BP3, la cual resulto en una baja amplificación (~40%), incluso después de ajustes en la PCR. Así, en una segunda etapa, se buscaron en el *GenBank*, secuencias de referencia del mayor número posible de especies que representaran los principales grupos taxonómicos presentes en BP3, ya sean

género, familia u orden, siendo obtenidas 25 secuencias de la de región 12S de 25 espécies. Asi, los cebadores iniciales fueron alineados, utilizando el algortimo Muscle implementado en el software MEGA® v7.0 software (Tamura *et al.*, 2011) a las secuencias referencias para verificar la existencia de sitios variantes y asi, permitir el diseño de nuevos cebadores, mas específicos para las espécies de la región.

3.3.1.3 Construcción del banco de dados 12S local: extracción de ADN y amplificación de las regiones 12S

El ADN fue extraído utilizando el Gen Elute^{TM} Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits marca Sigma®. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región 12S del ADN ribosomal (rDNA) fue realizado en el termociclador para PCR (Veriti-ThermoFisher) en un volumen final de 11.5 uL de solución compuesta de 8,05 uL de agua ultrapura; 1,25 uL de 10X buffer; 0,5 uL dNTP (10 mM); 0,5 uL de cada cebador (10 mM); 0,5 uL de MgCl2 (50 mM), 0,1 uL de Taq polimerasa (5U/uL) (Platinum Taq Brasil – ThermoFisher) y 1uL de ADN. Con la finalidad de amplificar el fragmento de 600 pb de la región 12S rDNA, usamos el cebador diseñado por LaBEM, 12S-Fish-LABEM 2F (5'- TTAYAC ATGCAAGTMTCCGC - 3') y el cebador modificado TeleoR (ref) (5' – CTTCYGGTACACTTACCWTG – 3'). El protocolo del termociclador consistió en las condiciones de: desnaturalización inicial a 94° C (4 minutos), con 35 ciclos de desnaturalización a 94° C (30 segundos), anillamiento de cebador a 50° C (30 segundos) y extensión a 72° C (2 minutos) y extensión Final a 72° C (10 minutos). Los amplicones fueron visualizados en electroforesis de agarosa a 1% y reveladas con UniSafe Dye (20.000x) (Uniscience). Para confirmar el tamaño del fragmento esperado se utilizó un marcador molecular 1KB *Ladder* (Kasvi) integrado por fragmentos de ADN digeridos, cuyos tamaños fueron conocidos.

Todas las muestras se secuenciaron bidireccionalmente. La reacción de secuenciación del ADN se realizó utilizando un kit comercial Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) en una reacción con un volumen final de 10,0 µl que consistió en: 1 µl de producto amplificado por PCR, 0,35 µl de iniciador (10 uM), 1 µl de solución Pre-Mix (Big Dye Terminator), 2 µl de buffer 5X y 5,65 µl de agua ultrapura. La reacción de secuenciamiento fue realizada en el termociclador Veriti (ThermoFisher) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96° C (2 minutos), con 35 ciclos de desnaturalización a 96° C (30 segundos), anillamiento de cebador a 50° C (15 segundos) y extensión a 60° C (4 minutos) y extensión Final a 60° C (2 minutos). Las muestras fueron

purificadas por precipitación en EDTA/acetato de sodio/etanol. Las placas de secuenciamiento fueron secadas at 96°C por 2 minutos. Las muestras precipitadas fueran resuspendids con 10ul de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems™) y desnaturalizados a 96°C por 2 minutos seguido de choque térmico y por fin, llevadas al secuenciador ABI 3500 disponible en UNILA.

Las secuencias consenso (contig) y alineamiento de la región 12S fueron obtenidas usando el algoritmo Muscle de MEGA® v7.0 software (Tamura *et al.*, 2011) Por fin, las secuencias fnales obtenidas para cada especie fueron pasadas por el Blast en el *GenBank* para verificar su correspondencia con el gen 12S. Las secuencias obtenidas se encuentran en fase de sumisión final y depóstio en el *GenBank*.

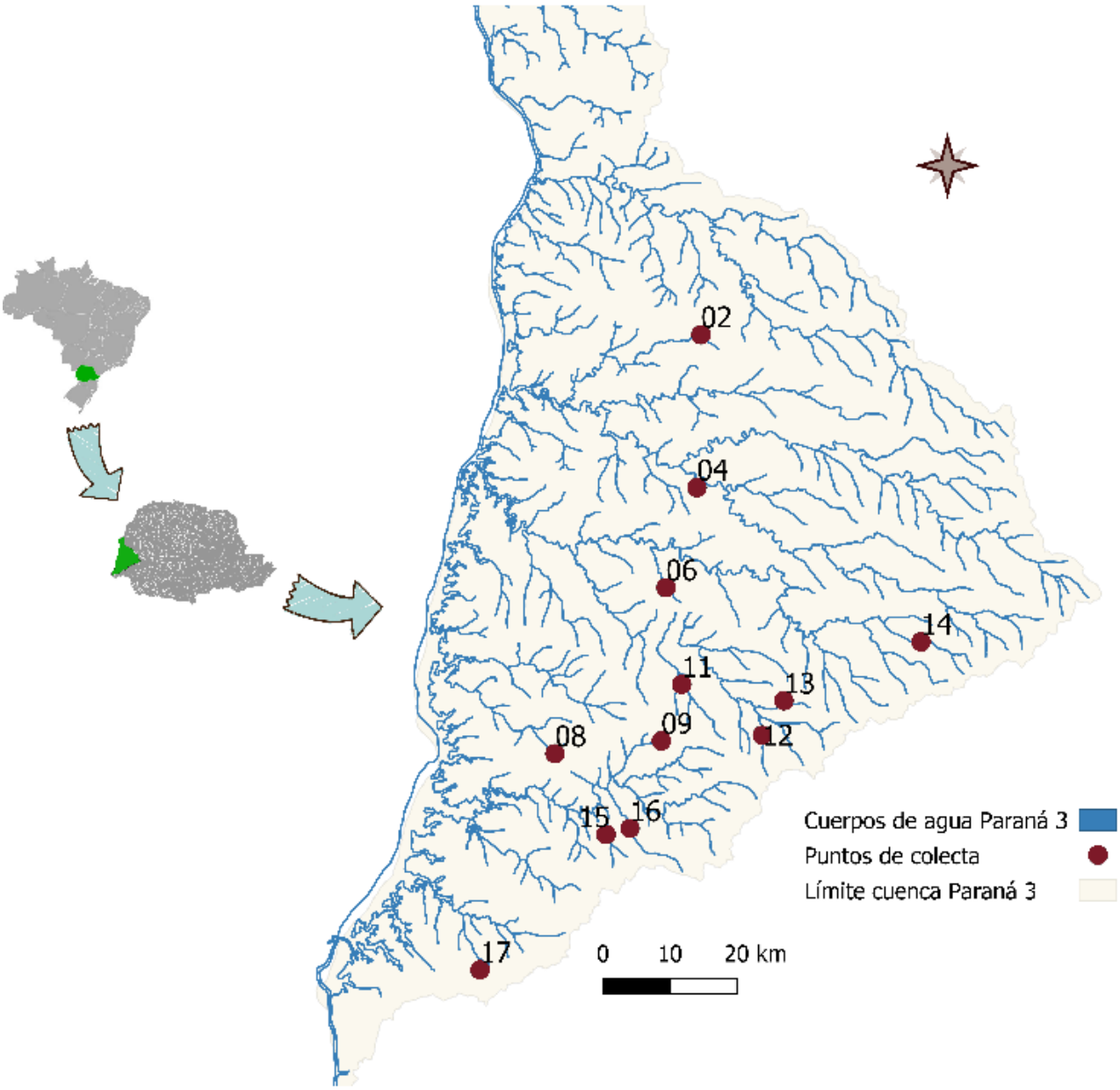
3.3.2 Validación del protocolo de eDNA

Para la validación del protocolo de *eDNA-metabarcoding* y banco de datos generado fue hecho un análisis de 12 puntos de coleta en la BP3.

3.3.2.1 Área de estudio y colecta de especimenes

Se seleccionaron 12 puntos de la BP3 (Figura 7) de diferentes arroyos de segunda a cuarta orden. Con la finalidad de validar si el protocolo de *eDNA* recuperaba la diversidad de especies, fue hecha la coleta de los peces de cada punto por la metodología tradicional. Para esto, en cada punto de colecta fue demarcado un tramo de 30 metros de extensión río arriba, a partir del punto inicial de barredura para captura de los peces. Los peces fueron capturados por medio de pesca eléctrica con el uso del equipamiento Electrofisher modelo: LR 24 BP, marca Smith Root y con auxilio de redes de pesca. La coleta de los peces ocurrió inmediatmente depués de la coleta de *eDNA*. Los peces capturados se conservaron en alcohol al 96% y fueron identificados utilizando las llaves de identificación del trabajo de Ota *et al.*, 2018. Estos peces fueron registrados y depositados en la colección ictiológica de la UNILA.

Figura 7. Localización de la BP3 y los 12 sitios de colecta



Fuente: de los autores, 2024.

3.3.2.2 Colecta del eDNA

La filtración del agua ocurrió, usando el protocolo establecido en el capítulo anterior a través de bomba peristáltica portátil modelo Geopump II da marca Geotech acoplada a un embudo de filtración con capacidad de 100 mL con microfiltros de nitrocelulose con 47 mm de diámetro da marca Whatman. Para el funcionamiento del sistema, fueron utilizadas mangueras de silicona atóxicas de 5.0 x 10 mm. Se filtraron 1200 mL de agua, realizando

una primera filtración del volumen total con un filtro de 0,7 µm y en seguida una segunda filtración con el filtro de 0,45 µm (los dos filtros correspondiendo a una única muestra).

Los embudos de filtración venían estériles y sellados en empaques individuales, ya con el filtro de 0,45 µm; los filtros de 0,7 µm fueron esterelizados por exposición de 20 minutos em luz U.V. utilizando flujo laminar, siendo imediatamente sellados, individualmente, en bolsas plásticas previamente esterilizados. Los embudos utilizados para los filtros de 0,7 µm, las mangueras y los frascos ámbares para almacenamiento de los filtros fueron autoclavados y sellados en embalajes herméticos, previamente identificados, para ida al campo.

Los embudos y filtros fueron abiertos solo en el momento de su uso, siendo acoplados en el sistema de filtración e inmediatamente sumergidos en el arroyo, a una profundidad de 10 – 20 cm de la superficie, sin tocar el fondo, contra la corriente, posicionados en regiones con mayor flujo de agua, evitando regiones de gran turbulencia, alejados, por lo menos, 1 metro de la orilla (Figura 7). La persona responsable por el muestreo se posicionó atrás del sistema de filtración, evitando revolver el área muestreada. Para medir el volumen filtrado fueron utilizadas probetas graduadas para recibir el agua filtrada (Figura 7). El agua filtrada era almacenada en frascos graduados y esterilizados, siguiendo la segunda etapa de filtración inmediatamente después de terminar la primera, haciéndose esto aún en campo. Los filtros fueron almacenados en frascos ámbares estériles y previamente identificados, inmediatamente al final del proceso de filtración, usando pinzas autoclavadas (Figura 7). Los frascos fueron acondicionados individualmente en bolsas tipo zip loc, conteniendo ~ 20g de sílica y refrigerados en caja térmica con hielo para transporte hasta el laboratorio, en el cual fueron transferidos para freezer -20 °C.

Entre los puntos de colecta, las mangueras fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio 5%. El procedimiento consistió en pasar el hipoclorito por 5 min por el sistema, seguido de otros 5 min de lavado con agua del propio punto de muestreo.

3.3.2.3 Extracción del eDNA, Secuenciamiento y Procesamiento de los datos

Las etapas de extracción, amplificación, secuenciamiento y tratamiento inicial de los datos brutos fue realizada por la empresa BPI Biotecnología (Botucatu, SP, Brasil). Para eso, los frascos ámbares conteniendo los filtros con las muestras de *eDNA* fueron enviados a la empresa bajo refrigeración (~10 °C). El ADN genómico fue extraído utilizando el kit *ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrepTM (Zymo Research cód. D6005*) de acuerdo con el

protocolo sugerido por el fabricante. Fueron utilizadas partes iguales de cada filtro (0,7uM y 0,45 uM), formando una muestra compuesta, siguiendo el volumen máximo recomendado por el protocolo. El *eDNA* estraido fue cuantificado por fluorescencia utilizando el equipo *Qubit® 3.0 Fluorometer y el kit QubitTM dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific*). Para la etapa de amplificación, las PCR fueron hechas con un volumen final de 20 µL, conteniendo 10 µL de Gotaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 1,0 µL del cebador NeoFish-U-F (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGCCGTCGCAAGCTTACCCT) a 10 µM, 1,0 µL del cebador NeoFisih_3R (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGTGACGGGCGGTGTGTGC) a 10µM, 2 µL de ADN genómico y 6 µL de agua ultrapura para completar el volumen. El programa de amplificación consistió en: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg., apareamiento a 60°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 1 min.; la extensión final fue a 72°C por 7 min. Los productos de la amplficacion fueron visualizados a través de electroforesis en gel de agarosa 2% coloreada con Gel Red 0,03% (v/v) y cuantificados por fluorescencia utilizando el equipo *Qubit® 3.0 Fluorometer y el kit QubitTM dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific*).

Después de esta etapa se inició la construcción de la biblioteca NGS/*metabarcoding*. Fue realizada la reacción de indexación en la cual fueron insertados los indexadores en los adaptadores comunes, siguiendo el protocolo del kit Nextera XT IIndex (Illumina). La biblioteca fue amplificada de acuerdo con el siguiente programa: incubación a 72°C por 3 minutos, desnaturalización inicial a 95°C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 5 minutos. Las reacciones de amplificación fueron conducidas en termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Las bibliotecas generadas fueron sometidas a etapas de purificación utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Seguidamente, se realizó la cuantificación por la metodología de PCR en Tiempo Real utilizando el Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), todos de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se generó un Pool equimolar de DNA, a través de la normalización de todas las muestras a 4nM, para realizar el secuenciamiento, el cual fue conducido usando el sistema Illumina MiSeq de secuenciamiento de nueva generación (Illumina® Sequencing) y 3 unidades del kit MiSeq v2 Reagent 500 ciclos (lectura de 2 x 250pb) con 20% de PhiX Sequencing Control V3 (Illumina).

Las secuencias fastq R1 y R2 fueron montadas en una única fila por el programa FLASH V.1.2.11 y transformadas en secuencias FASTA por el paquete seqkt V.2.2.0. Fueron mantenidas solamente las secuencias con el tamaño mínimo de 150 pb. Las secuencias con similaridad ≥ 99% fueron agrupadas en OTUs (unidad taxonómica operacional). Cada OTU pasó por una primera etapa de filtración, por comparación con el banco de datos *GenBank*, utilizando el programa blast V.2.13.0, siendo retenidas solamente las OTUs que presentaron 90% de similaridad mínima con el grupo objetivo.

3.3.2.4 Comparación de similaridad del eDNA con los bancos de datos GenBank y local

Para la atribución de cada OTU a los diferentes niveles taxonómicos, se estableció el seguinte critério de similaridade, basado en la literatura: ≥99%, especie; ≥97%, género; ≥96%, família; ≥94%, clase; ≥90%, orden. Cada OTU fue comparada con los bancos de datos *GenBank* y local para obtener la lista de especies/taxones. Para comparar con el *GenBank*, fue utilizado el algortimo Blast disponible en el sitio del NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Para comparar com el banco de datos local creado fue utilizado el software Geneious Prime (v. 2024.0.7). Para eso, fue creado en el Geneious un banco de datos local, con nuestras secuencias 12S y cada OTU fue comparada con este bancoutilizando la herramienta Magablast implementada en el software. Posteriormente se realizó la comparación de la lista de especies obtenida en cada punto de colecta para los dos bancos de datos con la la lista de especies coletadas para verificar la eficiencia del método.

Finalmente, fueron analizadas las abundancias relativas de los taxones identificados a nível de especie (solamente para los datos obtenidos a partir del banco de datos local) para revisar su correspondencia con las abundancias obtenidas en las coletas realizadas y con otros trabajos realizados en la región y ambientes semejantes.

3.4 Resultados

3.4.1 Creación del banco de datos

3.4.1.1 Elección del cebador 12S

Fueron realizadas algunas amplificaciones con los cebadores originales, utlizando DNA de 20 especies de la BP3, siguiendo los parámetros originales y modificaciones, pero

en ambos casos, muchas muestras fallaron en la amplificación, obtenendo un suceso de aproximadamente 40% (datos no mostrados). A partir de ello, se realizaron comparaciones alineando los cebadores con las secuencias referencias obtenidas en el NCBI de 25 espécies de peces representantes de géneros, familias u órdenes ocurrentes en la BP3 (Apéndice 1) en las culaes se encontraron algunos sitios variantes. Para el cebador NeoFish 2/3F se encontraron cinco sitios variantes, el cebador NeoFish_3R mostró tres sitios variantes, el cebador Teleofish F presentó dos sitios variantes y Teleofish R presento dos sitios variantes (Figura 8), lo que justifica que no hayamos tenido suceso en las amplificaciones iniciales con los cebadores originales.

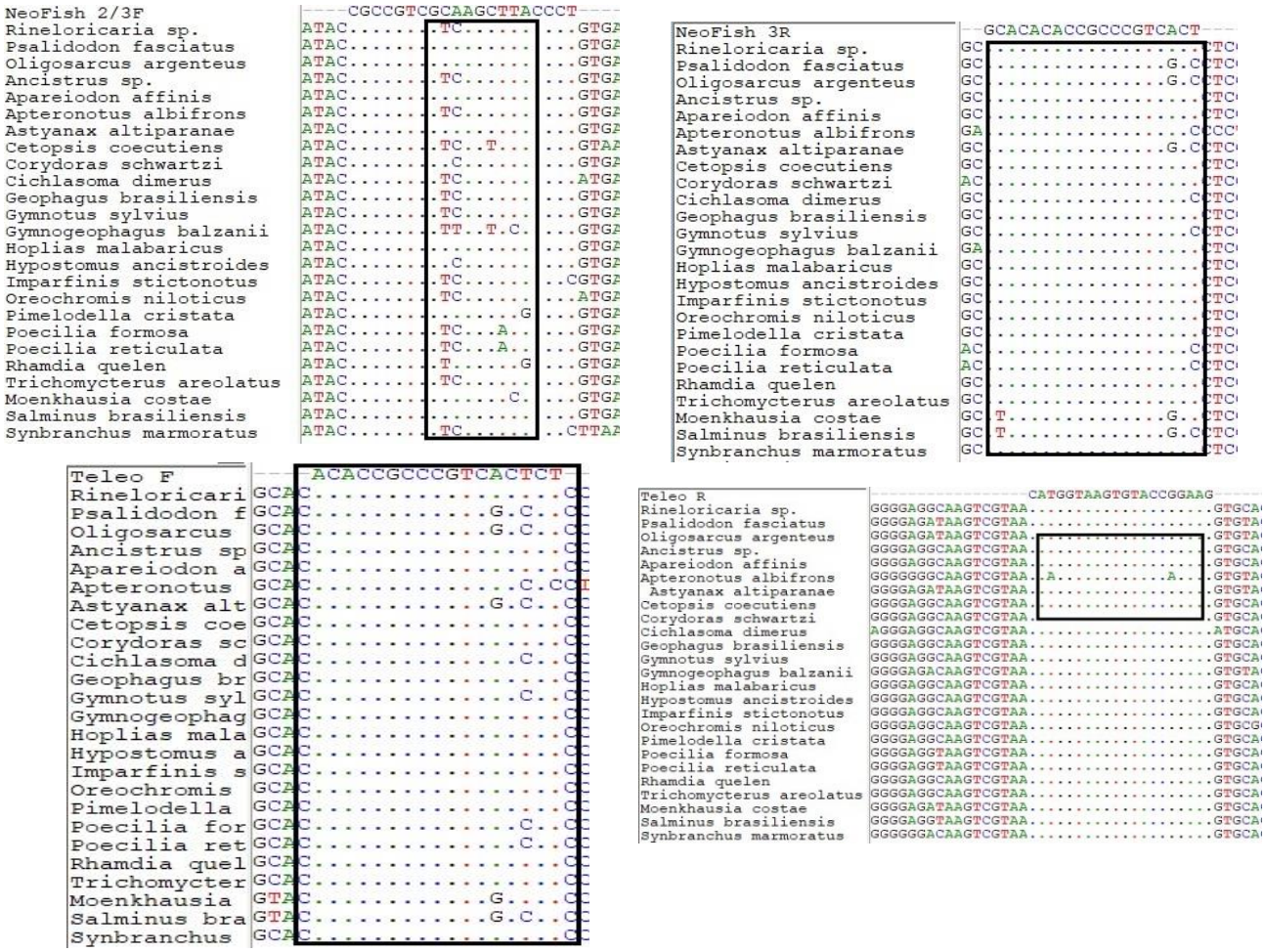
A partir de esas comparaciones, se buscó, en las secuencias referencias regiones más conservadas para el diseño de nuevos cebadores, llevando en cunta el mayor tamaño de fragmento posible y que englobara las secuencias de los cebadores Neofish del eDNA. Fueron diseñados dos cebadores Foward y se hizo apenas dos modificaciónes del cebador Teleo R como opción Reverse (Tabla 3) ya que presento bajo número de sitios variantes y solamente en una espécie (Figura 8). Asi, se obtuvo dos conjutos de cebadores, 12S-Fish-Labem-2F/TeleoR-Labem, que amplifica un fragmento de 950 pb y 12S-Fish-Labem-3F/TeleoR-Labem, que amplifica un fragmento de 890 pb. Los dos conjuntos presentaron suceso de ampfificación mayor que 95% (Figura 9).

Tabla 3. Cebadores elegidos para la creación del banco de datos de las secuencias de ADN

Cebador	Secuencia	Región
12S-Fish-Labem-2F	TTAYACATGCAAGTMTCCGC	12S ADNr
12S-Fish-Labem-3F	AGGARCNGGYATCAGGCRC	
TeleoR	CTTCYGGTACACTTACCWTG	

Fuente: de los autores, 2024.

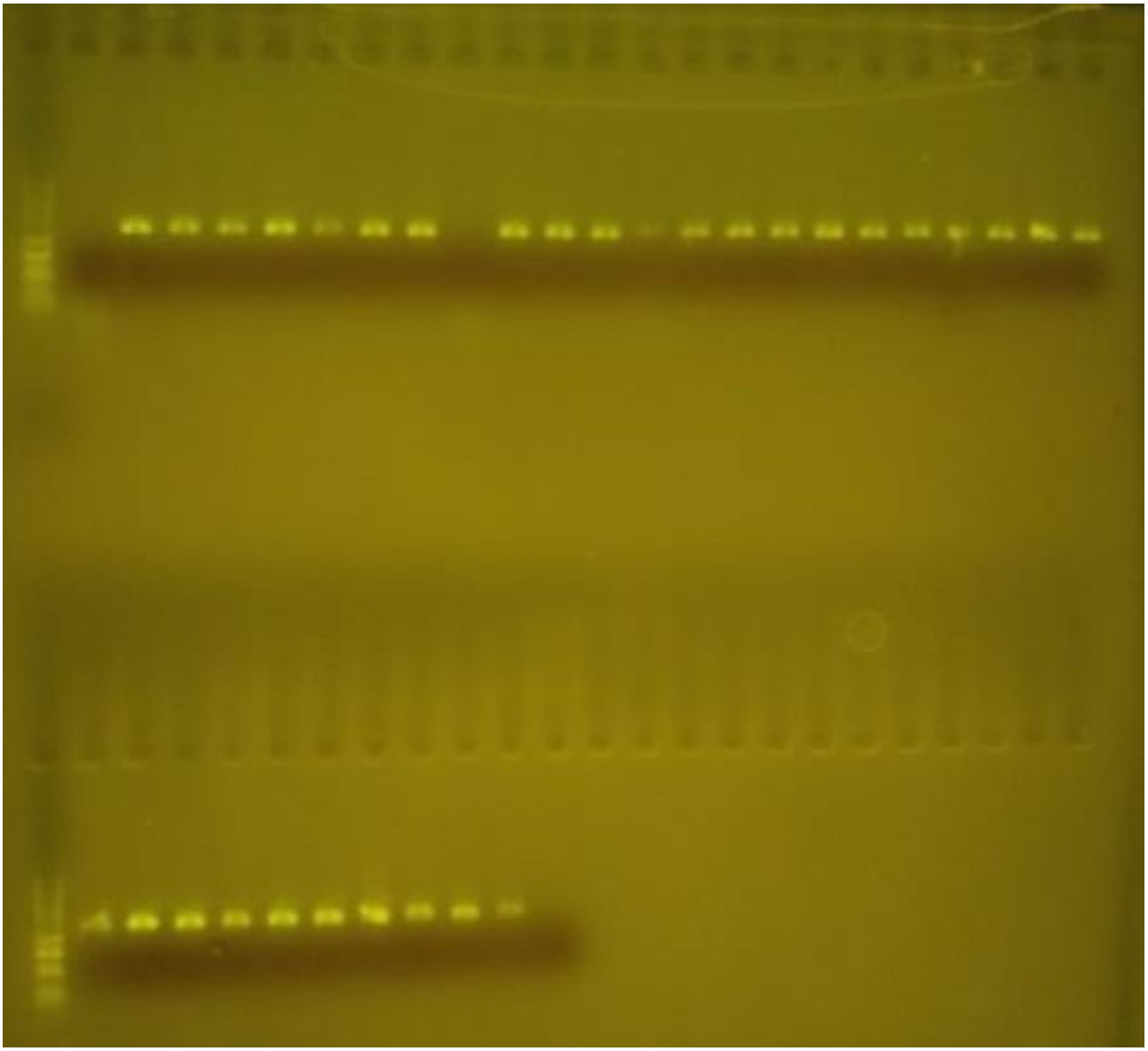
Figura 8. Comparación de los cebadores Neofish y Teleo con algunos representantes de las especies de la región



Aviso: las regiones conservadas se muestran como puntos. A. Neofish *Forward*. B. Neofish *Reverse*. C. Teleo *Reverse*.

Fuente: de los autores, 2024.

Figura 9. Amplificación exitosa de algunas de las especies usando los cebadores modificados



Fuente: de los autores, 2024.

3.4.1.2 Secuencias referencias obtenidas y comparación con GenBank

Para obtención de las secuencias 12S del banco de datos local fue utilizado el conjunto de cebadaroes 12S-Fish-Labem-2F/TeleoR-Labem. Un total de 89 secuencias fueron obtenidas, producto de 57, de las 75 especies de la colección de LaBEM (suceso de 76%) (Apéndice 2). En la tabla 4 se muestran los resultados de similaridad (una sola secuencia por especie) y porcentaje de cubrimiento de las secuencias al ser comparadas en el *GenBank*. Del total, once especies resultaron con una similaridad ≥99% entre la especie identificada por nosotros y la disponible en el *GenBank* recuperando la misma especie (color azul en la Tabla 4). Cuatro especies, aunque mostraron una baja similaridad,

representaban la misma especie (color verde en la Tabla 4). Once especies, mostraron similaridad ≥99% pero representando especies diferentes de las atribuidas (color ocre en la Tabla 4). Una especie, mostró una baja similaridad retornando especies diferentes (color rojo en la Tabla 4), a pesar de que sus especies ya cuentan con secuencias referencia en las bases de datos. Las secuencias restantes (color negro en la Tabla 4) mostraron similaridad a nivel taxonómico de género o familia, indicando la ausencia de estas especies en las bases de datos.

Asi, se encontró que 19,30% (11) de las especies ya estaban referenciadas en los bancos de datos y el 80,70% (46) restante significaron un incremento para los bancos de datos.

Tabla 4. Resultados del *blast* hecho entre las secuencias obtenidas y el *GenBank*

Especie	ID NCBI	Similaridad	Cobertura
Oreochromis niloticus	*Oreochromis niloticus*	100,00	100
Gymnotus silvius	*Gymnotus sylvius*	100,00	100
Astyanax lacustris	*Astyanax lacustris*	100,00	100
Psalidodon aff. Fasciatus	*Psalidodon fasciatus*	100,00	100
Neoplecostomus yapo	*Neoplecostomus yapo*	99,73	100
Characidium aff. zebra	*Characidium zebra*	99,67	80
Hypostomus ancistroides br	*Hypostomus sp* *Hypostomus ancistroides*	99.60 99.20	100
Geophagus brasiliensis	*Geophagus brasiliensis*	99,47	100
Cichalsoma cf. dimerus	*Cichlasoma dimerus*	99,47	100
Apteronotus aff. albifrons	*Apteronotus albifrons*	99,47	99
Callichthys callicthys	*Callichthys callicthys*	99,34	100
Hypostomus sp.	*Hypostomus sp*	98,94	100
Rhamdia quelen	*Rhamdia quelen*	98,29	100
Synbranchus marmoratus	*Synbranchus marmoratus*	96,26	100
Apareiodon affinis BR	*Apareiodon affinis*	93,88	100
Psalidodon sp. Br	*Psalidodon fasciatus // Hyphessobrycon anisi-tsi*	99,87	100
Oligosarcus paranaensis	*Oligosarcus jenynsil*	99,73	100
Psalidodon aff. paranae	*Psalidodon fasciatus // Hyphessobrycon anisi-tsi*	99,47	100
Hypostomus cf. strigoticeps	*Hypostomus francisci*	99,47	100
Hypostomus cf. Iheringui	*Hypostomus francisci*	99,47	100
Gymnogeophagus sp.	*Oligosarcus jenynsil*	99,34	100
Rineloricaria sp.	*Rinelocaria aff langei*	99,47	100
Phenacorhamdia tenebrosa	*Cetopsorhamadia iheringi*	99,17	80
Hoplias intermedius	*Hoplias malabaricus*	98,93	100
Hypostomus cf albopunctatus	*Hypostomus francisci*	98,27	100
Hypostomus sp.	*Hypostomus francisci*	97,88	100
Cetopsorhamdia iheringi	*Imparfinis cf cochabambae*	91.55	100
Gymnotus inaequilabiatus	*Gymnotus sylvius*	98,68	100
Pimelodella gracilis	*Rhamdia quelen*	98.29 95.94	100
Ancistrus sp.	*Ancistrus multispinis*	98,25	99

Gymnotus sp	*Gymnotus sylvius*	98,01	100
Gymnotus pantanal	*Gymnotus sylvius*	98,01	100
Piarbachus stramineus	*Knodus sp*	97,89	100
Moenkhausia aff. Intermedia	*Hemigrammus marginatus*	97,67	79
Pimelodella avanhandavae	*Rhamdia quelen* *Pimelodella cristata*	97.45 95.06	100
Knodus moenkhausii	*Knodus sp*	97,22	100
Serrapinnus notomelas	*Serrapinus kriegi*	97,21	100
Knodus moenkhausii	*Knodus sp*	97,09	100
Cambeva davisi	*Trichomycterus cf jacupiranga*	97,09	100
Bryconamericus exodon	*Boehlkea fredcochui / Knodus borki*	97,09	100
Hemmigramus sp	*Astyanax giton*	96,83	100
Hoplias misionera	*Hoplias malabaricus*	96,55	100
Cetopsis sp.	*Cetopsis coecutiens*	96,43	100
Corydoras cf. paleatus	*Corydoras paleatus*	96,27	100
Corydoras aeneus	*Loricariichthys sp "Jari"*	95,69	100
Crenicichla britskii	*Crenicichla lepidota*	95,57	97
Paradon nasus	*Apareiodon affinis*	94,81	99
Imparfinis schubarti	*Imparfinis stictonotus*	94,7	100
Ituglanis sp.	*Trichomycterus areolatus*	94,58	100
Heptapterus mustelinus	*Imparfinis cf cochabambae*	94,46	100
Imparfinis borodini	*Imparfinis cf cochabambae*	94,32	100
Imparfinis sp.	*Imparfinis sp*	93,93	100
Imparfinis mirini	*Imparfinis cf cochabambae*	93.80	100
Phalloceros harpagos	*Xiphophorus milleri*	92.52	99
Characidium aff. gomesi	*Characidium fasciatum*	92.36	100
Crenicichla iguassuensis	*Crenicichla lepidota*	90.80	97
Crenicichla sp.	*Crenicichla lepidota*	90.52	97
Psalidodon sp.	*Hyphessobrycon anisitsi*	88.81	99

Aviso: Azúl: especies con similaridad ≥ 99% y coinciden en la identificacíon de especie. Verde: especies que representan la misma identificación, pero con similaridad < 99%. Ocre: especies con similaridad ≥ 99% pero con identidad diferente. Rojo: especie con referencia en *GenBank* pero que retorna una identidad diferente. Negro: especies con similaridad a nivel taxonómica de género, familia u orden.

Fuente: de los autores, 2024.

3.4.2 Validación del protocolo de eDNA

3.4.2.1 Comparación de identificación alcanzada entre los bancos de datos

Para todos los puntos muestreados fue posible extraer ADN de las muestras ambientales. Para la creación de la lista de OTUs, fueron obtenidas, en media, 14046 *reads* (min: 2677; max: 18715) que representa de cinco a 29 OTUs por punto (Tabla 5).

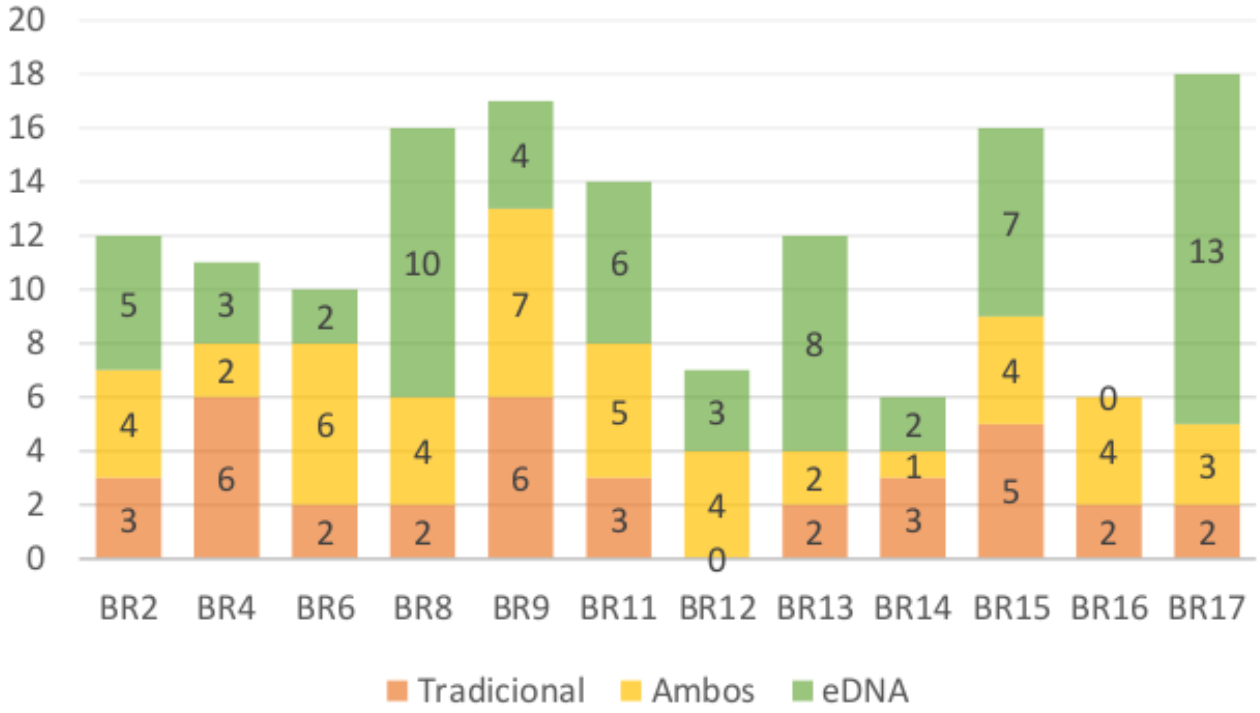
Las OTUs de cada punto de colecta fueron blastadas con el *GenBank* y el banco de datos regional creado (Apéndice 3 y Figura 10). Es evidente que, en todos los puntos de colecta, hubo una mayor resolución taxonómica cuando las OTUs fueron blastadas con el banco de datos local en comparación con el *GenBank*, con el cual la mayoría de las OTUs no tuvieron una identidad taxonómica resuelta y la mayoría quedaron en nivel muy generales como orden o familia (Gráfico 5), habiendo un incremento máximo del 250% en la identificación específica en el punto BR12, y un incremento mínimo de 66,67% como en el BR4.

Tabla 5. Número de *reads* y OTUs totales por cada punto de colecta

Punto de Colecta	*Reads*	OTUs	Punto de Colecta	*Reads*	OTUs
BR2	15998	15	**BR12**	11860	11
BR4	14553	15	**BR13**	11592	10
BR6	16240	16	**BR14**	1307	12
BR8	16467	27	**BR15**	15969	21
BR9	17416	22	**BR16**	2677	5
BR11	13759	23	**BR17**	18715	29

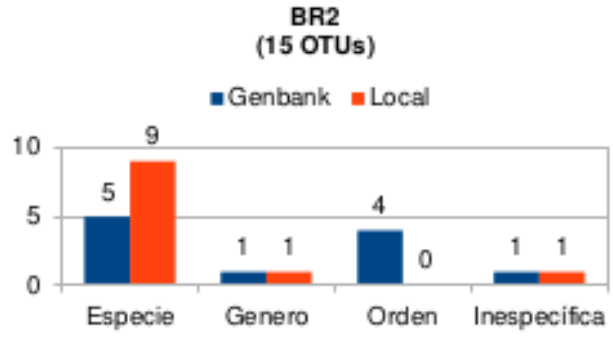
Fuente: de los autores, 2024.

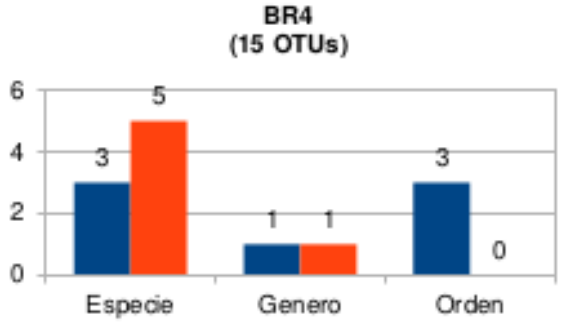
Gráfico 5. Comparación entre el número de especies colectada e identificada por el método tradicional y las especies identificadas por el método de *eDNA metabarcoding*

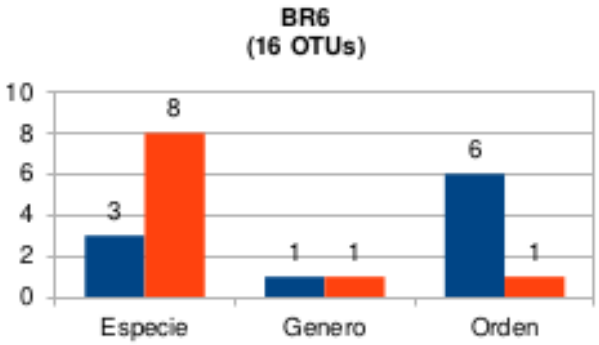


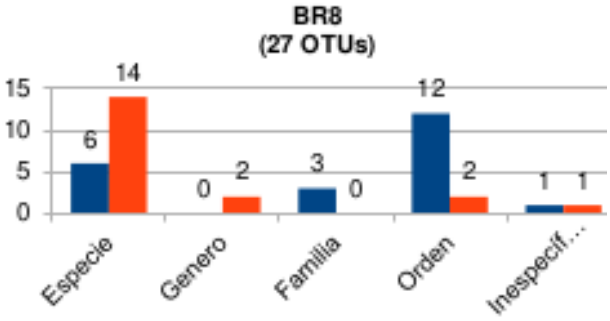
Fuente: de los autores, 2024.

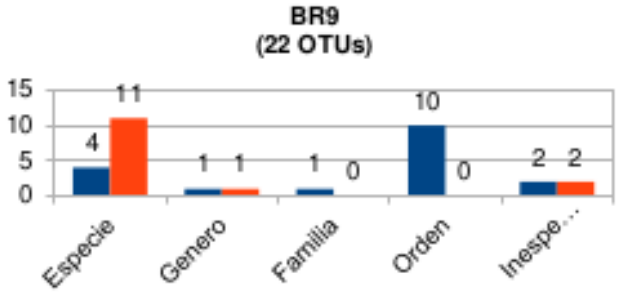
Figura 10. Nivel de identifcación taxonómico alcanzada usando el *GenBank* y el banco de datos local

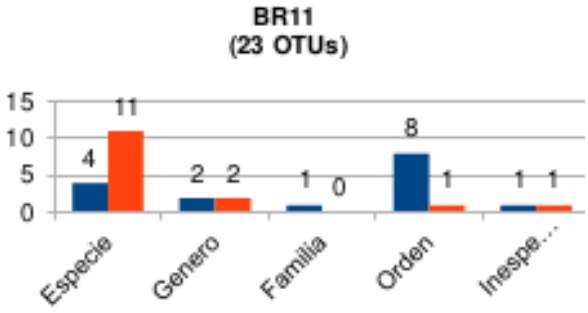

BR2
(15 OTUs)
Genbank
Local
10
5
0
5
9
1
1
4
0
1
1
Especie
Genero
Orden
Inespecifica


BR4
(15 OTUs)
6
4
2
0
3
5
1
1
3
0
Especie
Genero
Orden

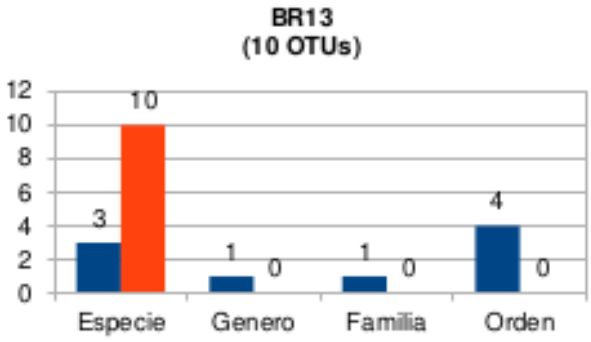

BR6
(16 OTUs)
10
8
6
4
2
0
3
8
1
1
6
1
Especie
Genero
Orden

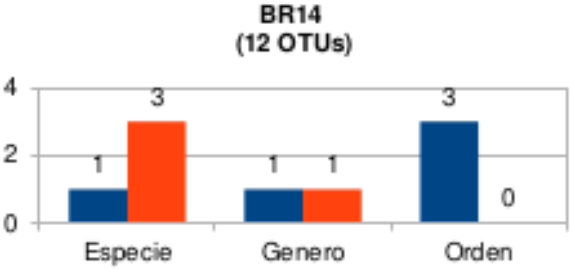

BR8
(27 OTUs)
15
10
5
0
6
14
0
2
3
0
12
2
1
1
Especie
Genero
Familia
Orden
Inespecif...

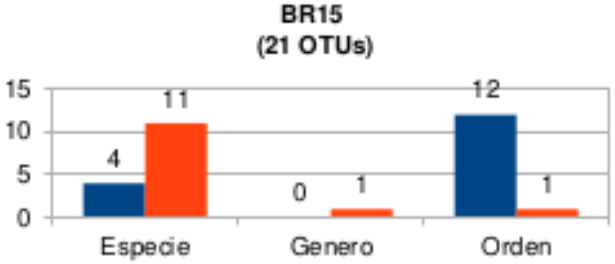

BR9
(22 OTUs)
15
10
5
0
4
11
1
1
1
0
10
0
2
2
Especie
Genero
Familia
Orden
Inespe...

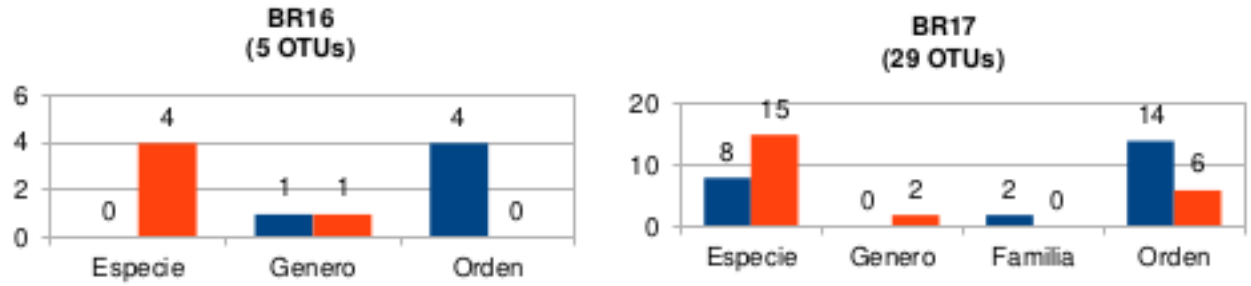

BR11
(23 OTUs)
15
10
5
0
4
11
2
2
1
0
8
1
1
1
Especie
Genero
Familia
Orden
Inespe...

BR12
(11 OTUs)
8
6
4
2
0
2
7
5
0
Especie
Orden


BR13
(10 OTUs)
12
10
8
6
4
2
0
3
10
1
0
1
0
4
0
Especie
Genero
Familia
Orden


BR14
(12 OTUs)
4
2
0
1
3
1
1
3
0
Especie
Genero
Orden


BR15
(21 OTUs)
15
10
5
0
4
11
0
1
12
1
Especie
Genero
Orden



Fuente: de los autores, 2024.

3.4.2.2 Comparación de riqueza y abundancia recuperada entre el método tradicional vs eDNA

Usando las llaves de identificación, fueron identificadas 23 especies (considerando los 12 puntos de muestreo) producto de la colecta tradicional, mientras que por el método del *eDNA* fueron identificadas 37 especies en total, habiendo un incremento de 14 especies (60,87%) (Tabla 6). Para todos los puntos de colecta, se evidenció un incremento en el número de especies identificadas, una vez implementada la técnica del *eDNA*, sin embargo, como vemos en la figura 10, para cada punto, hubo algunas especies que sólo lograron ser identificadas usando uno de los dos métodos. Considerando los 12 puntos, el 48,65% de las especies fueron identificadas por los dos métodos, 13,51% de ellas fueron identificadas exclusivamente por el método tradicional y 37,84% de las especies fueron identificadas exclusivamente por el *eDNA* (Tabla 6).

Tabla 6. Lista de especies identificada en los 12 puntos de colecta, agrupadas según la exclusividad de identificación en cada uno de los métodos

Especies Identificadas		
Método tradicional	**Ambos métodos**	***eDNA* metabarcoding**
Bryconamericus aff. iheringii	*Astyanax lacustris*	*Apterinotus aff. albifrons*
Bryconamercius exodon	*Characidum aff. zebra*	*Cichlasoma cf. dimerus*
Cetopsorhamdia iheringi	*Corydoras cf. paleatus*	*Gymnogeophagus sp.*
Hypostomus cf. Iheringuii	*Crenicichla jaguarensis*	*Gymnotus inaequilabiatus*
Phalloceros harpagos	*Heptapterus mustelinus*	*Gymnotus sylvius*
	Psalidodon aff. paranae	*Hoplias misionera*
	Psalidodon sp	*Hypostomus albopunctatus*
		Hypostomus strigaticeps
		Knodus moenkhausii
		Moenkhausia aff. intermedia
		Oreochromis niloticus
		Piarbacus stramineus
		Serrapinus notomelas

Fuente: de los autores, 2024.

Cuando consideramos algunos puntos de muestreo específicos, vemos que el alcanze de riqueza entre los métodos variou. En el punto BR4 (Gráfico 5), fueron colectadas 11 especies, de las cuales el 54,54% fueron identificadas únicamente con el método tradicional, 27,28% solo se consiguieron identificar por el *eDNA* y 18,18% fueron identificados por los dos métodos (Gráfico 5). En el BR13 (Gráfico 5), por su lado, de las 12 especies identificadas, 66,67% fueron únicamente por el *eDNA*, 16,67% solo por el método tradicional y 16,66% se identificaron con los dos métodos (Gráfico 5). Para el punto BR12 (Gráfico 5), ninguna identificación fue exclusiva del método tradicional, de las 7 especies, 42,86% se identificaron solo por medio del *eDNA* y el 57,14% restante fue identificado por los dos métodos (Gráfico 5). Caso contrario, ocurrió en el punto BR16 (Gráfico 5), donde ninguna especie tuvo indentificación exclusiva por *eDNA*, del total de 6 especies, 33,33% fueron identificados solo a partir del método tradicional y el 66,67% restante, a partir de los dos métodos (Gráfico 5).

Para la comparación de abundancia, solo se tuvieron en cuenta a quellas especies que fueron identificadas por los dos métodos (Tabla 7). En total, se realizaron 46 comparaciones entre todos los puntos, de los cuales en el 41,30% de los casos los dos métodos consiguieron detectar valores de abundancia próximos. El pez *Heptapterus mustelinus*, fue la única especie que registrou mayor abundancia por el método tradicional que por el *eDNA* en todos los puntos; mientras que las especies *Astyanax lacustris* y *Psalidodon* aff. *paranae* consiguieron mayores valores de abundancia por el *eDNA metabarcdoing* que por el método tradicional en la mayoría de los puntos (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de abundancia entre las especies colectadas por los dos métodos

Punto	Especie	Abundancia		Punto	Especie	Abundancia	
		Tradicional	*eDNA*			Tradicional	*eDNA*
BR2	*Heptapterus mustelinus*	31,94%	1,23%	**BR12**	*Ancistrus sp.*	5,75%	15,09%
	Characidium aff. Zebra	6,94%	3,49%		*Characidium aff. zebra*	6,90%	3,69%
	Psalydodon aff. paranae	50,00%	40,16%		*Cambeva davisi*	2,30%	2,45%
	Astyanax aff. lacustris	4,17%	32,48%		*Psalydodon aff. paranae*	85,06%	59,87%
BR4	*Heptapterus mustelinus*	25,93%	0,06%	**BR13**	*Psalidodon sp.*	50,00%	19,08%
	Psalydodon aff. paranae	1,06%	80,40%		*Rhamdia quelen*	16,67%	0,59%
BR6	*Heptapterus mustelinus*	50,44%	0,10%				
	Ancistrus sp.	9,73%	28,21%				
	Geophagus brasiliensis	10,62%	54,19%				
	Hypostomus ancistroides	1,77%	0,05%	**BR14**	*Psalydodon aff. paranae*	7,41%	92,01%
		0,88%	1,01%				
	Rhamdia quelen	0,88%.	14,15%				

BR8	*Psalydodon sp.*	37,86%	0,48%	**BR15**	*Ancistrus sp.*	19,39%	21,83%
	Heptapterus mustelinus	14,56%	9,09%		*Crenicichla jaguarensis*	4,08%	35,53%
	Ancistrus sp.	1,94%	36,91%		*Cambeva davisi*	36,73%	1,36%
	Astyanax aff. lacustris	0,97%	0,38%		*Rhamdia quelen*	1,02%	0,53%
	Rhamdia quelen	0,26%	0,12%				
	Heptapterus mustelinus	5,77%	1,15%	**BR16**	*Ancistrus sp.*	6,82%	15,52%
	Corydoras cf. paleatus	1,57%	13,27%		*Rhamdia quelen*	2,27%	0,15%
BR9	*Geophagus brasiliensis*	1,05%	0,27%		*Cambeva davisi*	59,09%	24,38%
	Rhamdia quelen	0,52%	23,74%		*Hypostomus ancistroi-des*	4,55%	59,96%
	Crenicichla britskii	0,26%	0,95%				
	Astyanax aff. lacustris	44,36%	31,71%				
	Psalydodon aff. paranae	12,60%	0,67%				
	Heptapterus mustelinus	2,36%	10,70%	**BR17**	*Heptapterus mustelinus*	54,29%	0,06%
BR11	*Ancistrus sp.*	3,15%	5,76%		*Ancistrus sp.*	25,71%	6,96%
	Crenicichla jaguarensis	12,60%	58,00%		*Rhamdia quelen*	2,86%	0,12%
	Geophagus brasiliensis	8,66%	9,41%				
	Psalydodon aff. paranae						

Aviso: Rojo: > abundancia em el método tradicional. Azúl: > abundancia em el método *eDNA*. Negro: abundancias equivalentes.

Fuente: de los autores, 2024.

3.5 Discusión

3.5.1 Análisis de Similaridad

El uso de la herramienta molecular *eDNA metabarcoding* se ha convertido en una herramienta esencial para monitorear e inventariar especies, pero el acceso a base de datos completas es una variable que impacta directamente en la detección de ellas y su asignación taxonómica adecuada (Lamb *et al.* 2019). Este aspecto afecta el marcador 12S usado en este estudio. En primera instancia, al comparar las secuencias referencias generadas con el banco de referencia (*GenBank*), encontramos que solo un 19,30% de las secuencias obtenidas (n=11) retornaron el nivel taxonómico de especie (color azúl, en la tabla 4), indicando que las mismas ya estan referenciadas en el banco de datos. Estas especies incluyen algunas de las más estudiadas en anbientes de ríos y arroyos como *Psalydodon fasciatus*, que muestra variadas características morfológicas, alta variabilidad genética y complejidad taxonómica (Gavazzoni *et al.*, 2023); *Characidium* aff. *zebra*, que han demostrado ser útiles como bioindicador (Manoel *et al.*, 2008) y *O. niloticus,* que a pesar de que no se tiene evidencia del establecimiento en los arroyos de la cuenca (Pereira, 2021) es cultivado en larga escala en la región en psiculturas cuya agua drena para los arroyos de la BP3 (Lowe-McConnell, 2000; Figueredo y Giani, 2005).

Un segundo grupo de nuestras secuencias (n=4, 7,02% - color verde en la Tabla 4) recuperaron la misma especie en el *GenBank*, pero con nivel de similaridad abajo del valor del corte establecido (>99%). La especie *Synbranchus marmoratus aparece con silimitud de 96,26%*, *Apareiodon affinis con 93,88%*, *Rhamdia quelen 98,29%* e *Hypostomus sp*.

98,94%. Casualmente, estos datos corresponden a especies que han sido reportadas como representantes de complejos de especies (varias especies crípticas asignadas al mismo taxón) y por lo tanto, su clasificación taxonómica es compleja y de mucha discusión debido a sus niveles de diversificación rápidos y recientes (Jorge *et al.*, 2000; Traldi *et al.*, 2020). Esto nos lleva a tener tres posibles hipótesis; para los casos de *Hypostomus sp.* y *Rhamdia quelen*, cuyas similaridades fueron de 98%, puede que la variación sea debida meramenta a variación genética poblacional o un caso de especición críptica. Estos dos grupos de especies, incluyen peces que estan ampliamente distribuidos por la región neotropical y con una gran discusión taxonómica de las cuales su historia evolutiva y sistemática siguen sin estar completamente claras (Favorito *et al.*, 2005; Benitez *et al.*, 2019; Anjos *et al.*, 2021). Para *R. quelen*, se han reportado 48 sinonimias nominales de especies (Benitez *et al.*, 2019), mientras que el género Hypostomus, muestra una gran riqueza de especies y endemismo en ecorregiones como el Bosque Atlántico, donde se han revelado linajes con historias evolutivas independientes dentro de la misma región junto con grupos genéticamente relacionades entre sí y que estan subrepresentadas en los estudios filogenéticos (Anjos *et al.*, 2021). Estos datos refuerzan el confuso escenario de estos grupos de peces y que son útiles para delinear estudios filogeográficos adicionales en ellos. En los casos de *Synbranchus marmoratus* y *Apareiodon affinis* que muestran una similitud más baja, puede sugir caso de especies crípticas o, problemente, ser representantes de especies del mismo género o familia, pero con errores de identificación morfológicos. *Synbranchus* es un género endémico de América del Sur y Central, comprende tres especies reconocidas, *S. marmoratus* (Bloch 1795), *S. madeirae* (Rosen and Rumney 1972), and *S. lampreia* (Favorito, Zanata y Assumpção 2005); sin embargo, los exámenes detallados a una serie de estos organismos, revelaron que el género no tiene sinapormorfias y análisis citogenéticos, indican la existencia de variabilidad cariotípica interespecífica en *Synbranchus* (Carvalho *et al.*, 2012) y sugieren que es necesaria una revisión taxonómica para este género, además, de que la taxonomía a nivel de especie es muy pobre y no se ha definido el número de especies que realmente se reconocen (Favorito *et al.*, 2005); para *A. affinis*, la situación es muy similar, estos peces encontrados dentro de la familia Parodontidae, se distinguen solo por unas pocas características morfológicas sutiles, lo que genera incertidumbre sobre las interrelaciones y la monofilia de los géneros. Jorge y Moreira-Filho, 2000, detectaron 10 citotipos para *A. affinis* a lo largo de la cuenca del Bajo Paraná, indicando la ocurrencia de distintas especies en la región y nombradas de la misma manera; datos que son reafirmados por Nascimiento *et al.*, 2018, estudiando la

organización cariótipica de seis deme en varias subcuencas hidrográficas de la cuenca del Paraná (Alto Paraná, río Paraguay, Cuiabá y Uruguay) revelando diferencias cromosómicas entre los demes estudiados y aislamiento genético entre las poblaciones del alto y bajo río Paraná, apoyando la hipótesis de una especie emergente más joven y/o especiación cromosómica en progreso.

Las secuencias de la especie *Cetopsorhamdia iheringui*, fueron las únicas que, a pesar de ya tener registro en la base de datos, no obtuvieron ningún tipo de similaridad con ellas, lo que puede ser debido a una identificación errónea de los estudios previos o errores en el momento de su registro.

Por su lado, 11 especies (19,30%) (color ocre en la tabla 4) mostraron una similaridad alta (97,8 a 99,8%) pero con correspondencia a otras especies, que son parte del mismo género pero de las cuales no se tienen registros de su presencia y establecimiento, en la cuenca de nuestro estudio, como lo fue en el caso de algunas especies del género *Hypostomus* y la especie *Oligosarcus paranaensis*, cuya similaridades blastaron, respectivamente, con *Hypostomus fransisci*, propio de la cuenca del río São Fransico y *Oligosarcus jenynsii*, reportado para los arroyos de Argetina, Uruguay y Rio grande del Sur (Lima *et al.* 2003). Estos datos refuerzan la falta de secuencias referencias de las especies de nuestra área de estudio. Con todo, debido a la alta similitud genética, principalmente de aquellas com similitud mayor que 99%, tales datos encienden una alerta en el uso e interpretación de los resultados, pues pueden indicar complejos de especies, como mencionado anteriormente para el género *Hypostomus*, para las cuales las secuencias 12S no son resolutivas, siendo necesario asociar otros datos como la localidad del especimen que dio origen a las secuencias y mismo otros marcadores moleculares. Por otro lado, no se puede descartar la hipótesis que parte de ellas, puden representar errores de identificación.

Finalmente, 31 (54,38%) especies de las 57 reunidas en este estudio, no cuenta con secuencias del marcador 12S en los bancos de referencia disponibles (color negro en la tabla 4), presentando baja similitud con las secuencias disponibles en el *GenBank* haciendo evidente la falta de información en secuencias de referencia necesarias para una asignación taxonómica precisa de las especies identificadas en la BP3. Considerando todas las secuencias que no retornaron el nivel de especie, verificamos que 46 especies, que representan 80,70% son referencias nuevas para el *GenBank* e incrementan en un 100% al banco de datos molecular creado por Santos (2024) para la ictiofauna del Alto Paraná. Destacamos la necesidad de enriquecer las bases de datos, especialmente con aquellas

especies que han demostrado su función como bioindicadores y su papel crucial en el mantenimiento de la estructura comunitaria del ecosistema, tales como *C. paleatus* (Scarcia y De la Torre, 2018; Cadena, 2020) y *K. moenkhausii* (Mise *et al.*, 2018; Cadena, 2020).

3.5.2 Validación del protocolo de eDNA

3.5.2.1 Comparación de similaridad eDNA y los bancos de datos

En las comparaciones de similitud entre los dos bancos de datos, se observa un aumento significativo en la identificación a nivel de especie entre los bancos de referencia disponibles y el banco local. Este incremento varió desde un 66.67% (Punto BR4) hasta un 250% (Punto BR12) (Gráfico 1). Un ejemplo de esta variación se observa en el punto BR17, donde el *eDNA* recuperó 29 OTUs. Al comparar estos datos con el *GenBank*, solo 11 OTUs (representando oito especies) mostraron una identificación a nivel de especie, mientras que las restantes se identificaron a niveles taxonómicos más generales. En contraste, el banco de datos local identificó 21 OTUs (correspondientes a 15 especies) a nivel específico en ese mismo punto, incrementando en un 90.91% el número de identificaciones a nivel de especie y mejorando la resolución taxonómica en términos de biodiversidad para ese arroyo. Esta tendencia también se observa en el punto BR16, donde de las cinco OTUs recuperadas, ninguna obtuvo una identidad específica de especie al compararse con el *GenBank*, resultando en identificaciones a nivel de orden. Sin embargo, al utilizar el banco local, se logró una identificación específica de especie en cuatro OTUs, con solo una OTU sin un nivel taxonómico específico, aunque se pudo identificar al género más cercano. Esto demuestra un aumento del poder resolutivo que se puede obtener mediante *eDNA* cuando se dispone de referencias regionales actualizadas, subrayando que, aunque esta técnica es altamente efectiva, su potencial puede ser limitado sin un banco de datos adecuado.

Esto mismo es mencionado por Martinelli *et al.*, 2024, en su trabajo con vertebrados, onde identificaron un total de 709 OTUs en las Cuencas del Amazonas y del Orinoco, en Colombia. En su estudio, de todos los tetrápodos detectados, solo al 57% lograron asignarle el nivel de especie y en el caso de los peces, solo al 29% se les asignó el nivel de especie, además de que encotraron una segunda OTU para el género Electrophorus, de la cual solo se reconoce una especie para la cuenca (*E. electricus*). Por su parte, de Santana *et al.*, 2021, usando cebadores MiFish con bibliotecas de referencia públicas existentes estudiando los peces del rio Amazonas, obtuvieron 222 OTUs, encontrando que solo el 28% de secuencias coincideron con una identidad >98,5%. Los trabajos anteriores muestran las

graves lagunas en la biblioteca para los peces amazónicos y corroboran el análisis global hecho por Marques, *et al.* (2020) de brechas de bases de datos de referencia, que reveló que el 13% de las más de 33.000 especies conocidas de peces teleósteos están secuenciadas para 12S, lo que representa el 38% de los géneros, el 80% de las familias y el 98,5% de los órdenes, reportando que, los peces de agua dulce de América del Sur y África son lo que tienen la cobertura mas baja. Esto dificulta la identificación precisa de las especies, un problema que ha sido subrayado por estudios previos de *eDNA* neotropical (Cilleros *et al.*, 2019; Sales *et al.*, 2020).

Por otro lado, es importante destacar que, a pesar de la falta de un banco de datos completo, el método *eDNA metabarcoding* demuestra ser altamente eficiente. Este método facilita la identificación de la biodiversidad a nivel de linajes genéticos distintos (OTUs), los cuales, aunque no se pueden identificar hasta el nivel de especie, representan taxones diferentes. Esto incrementa la detección y el registro de especies en una región.

3.5.2.2 Comparación de identificación de especies entre el método tradicional y el eDNA metabarcoding

Desde el primer informe de Minamoto y su equipo en 2012 sobre las aplicaciones del *eDNA metabarcoding*, este método ha sido utilizado para realizar inventarios de biodiversidad, especialmente para la detección de múltiples especies de peces y la estimación de su composición. Thomsen *et al.* (2012) presentaron el primer registro marino utilizando *eDNA*, identificando 15 especies diferentes, algunas de las cuales eran raramente colectadas o nunca registradas en monitoreos convencionales. Todos sus hallazgos ya estaban registrados en bases de datos nacionales. Sales *et al.* (2020), empleando *eDNA* en el Bosque Amazónico y Atlántico, identificaron especies de mamíferos en peligro crítico o en peligro de extinción y encontraron superposiciones entre especies. Garret (2023) identificó 11 taxones de murciélagos mediante *eDNA* del aire en 12 refugios conocidos o sospechosos en el distrito de Orange Walk, Belice. Además, Rodriguez (2022) reportó que, en los Pantanos de Perú, se identificaron 19 de las 21 especies conocidas en el área de estudio utilizando *eDNA*, a pesar de que el esfuerzo muestral para *eDNA* fue menor (cinco puntos) en comparación con el esfuerzo muestral de la metodología tradicional (21 puntos). A pesar de esta diferencia, se logró una identificación de riqueza de especies equivalente.

Lo datos anteriores, hacen enfatizar aún más en la necesidad de tener referencias actualizadas y preferencialmente del área de estudio. Al hacer las comparaciones de la

riqueza de ictiofauna identificada a través de los dos métodos de muestreo, observamos que, si bien no todas las especies colectadas por el método tradicional fueron detectadas mediante el *eDNA*, hubo un aumento en la riqueza de especies al realizar las extraciones de ADN a partir de las filtraciones de agua, demostrando la efectividad de este método y la importancia de contar un banco de datos local que corrobore la ocurrencia del material genético detectado.

Nuestros resultados mostaron que con el método tradicional el total de especies colectadas fue de 22, ya con el *eDNA* el total de ellas fue de 37 especies, aumentando en 60,87% la lista de biodiversidad. Este incremento en la identificación de biodiversidad, ya ha sido mencionado en trabajamos como el de Yamamoto *et al.* (2017) que detectaron 128 especies de peces marinos en Japón, de los cuales 23 nunca fueron capturados en los últimos 14 años usando métodos tradicionales. Boussarie *et al.* (2018) detectaron un 44% más de especies de tiburones que los censos visuales tradicionales bajo el agua y los videos con carnadas. Estos datos sugieren que éste método será útil en la conservación de la vida acuática.

Algunos puntos destacables de nuestros resultados, son las diferencias encontradas en el número de especies identificadas en los dos métodos. Especies como *Oreochromis niloticus* y las especies de la orden Gimnotiformes (*Gymnotus inaequilabiatus, Gymnotus sylvius, Gymnotus pantanal* y *Apteronotus* aff. *albifrons*) fueron detectadas únicamente mediante el análisis del *eDNA* (Apéndice 4 y Tabla 6). Esta situación puede deberse a las características ecológicas de estas especies. Los Gymnotiformes, al ser peces eléctricos con hábitos nocturnos (William *et al.*, 2005; Uieda *et al.*, 2018), son particularmente difíciles de capturar con métodos tradicionales. En el caso de *O. niloticus*, que no está reportada como establecida en la región (Pereira *et al.*, 2021), es frecuente encontrar su material genético debido a su relevancia económica y a la existencia de grandes criaderos en la región, cuya agua de los criaderos drenan para los arroyos de la BP3 cargando su material genético (Pereira el al, 2021).

Por otro lado, a pesar de que el *eDNA* potencializó la identificación de las especies, algunas de ellas solo lograron se identificadas por los métodos tradicionales (Tabla 6). Específicamente, las especies del género *Bryconamericus*, como *B*. aff. *iheringii* y *B. exodon* y la especie *Phalloceros harpagos*, que acostumbran ser abundantes, solo pudieron ser recolectadas mediante métodos tradicionales. Lo más probable para este evento es que el cebador Neofish, usado para el *metabarcoding* no haya conseguido amplificar esas especies, siguiendo la hipótesis de que estas especies podrían tener alguna variación en

su secuencia de ADN que torna el cebador inespecífico y se hace necesario para futuros trabajos, pensar en hacer un proceso semejante al hecho en este trabajo, alinear el cebador con secuencias de los banco de datos y proponer nuevos cebadores para el *metabarcoding*, basados en los grupos de peces presentes en la región. Dentro de estas especies, se destaca que para *B.* aff. *Iheringii*, no fue obtenida la secuencia 12S referencia, incluso con el nuevo conjunto de cebadores diseñados (Apéndice 2), reforzando la hipótesis que, para algunos grupos, aún es necesaria una revisión de los cebadores para garantizar el éxito en su amplificación.

No obstante, es importante resaltar que, en las variaciones encontradas entre los métodos, según Taberlet *et al.* (2018), se debe tener en consideración también las características de las comunidades biológicas a ser evaluadas, ya que su detectabilidad depende de sus hábitos ecológicos, como la posición en la columna de agua y sus adapataciones morfológicas y, su producción de *eDNA*, relacionada al porte del tamaño de los individuos.

Las características del paisaje, también juegan un papel importante, en los puntos 4, 9 y 16, si bien hubo identificación de las especies por *eDNA*, éstas estuvieron en menor proporción en comparación al método tradicional o, como el caso del punto 16, no hubo un aporte en el incremento de la riqueza. Estos tres puntos particularmente, son arroyos con pocos volúmenes de agua y más estancados (Apéndice 5), lo que dificultó la filtración del agua y consecuentemente, pudo repercutir en obtener menores concentraciones de *eDNA*, algo que ya es intrínseco de este tipo de muestras. Pensar en la propuesta ella por Sakata *et al.* 2020, de combinar diferentes tipos de muestras de *eDNA*, basado en las características del ambiente, puede ser una propuesta interesante para mejorar aún más la identificación por *metabarcoding de eDNA*. Este grupo de investigadores, comparó las propiedades del *eDNA* acuático con el sedimentario, mostrando que, si bien la composición de especies recuperada por los dos tipos de *eDNA* no tuvo diferencias significativas, la concentración de *eDNA* sedimentar fue mayor que la del *eDNA* acuático y así mismo, tuvo menor tasa de descomposición, por lo que sugieren que al combinar los dos tipos de muestras se puede obtener información más completa de la distribución de las especies y puede ampliar lo estudios ecológicos y de biomonitoreo al proporcionar una diferencia en la escala de tiempo.

Finalmente, nuestros resultados soportan la idea de que el *eDNA metabarcoding* se puede utilizar para la evaluación rápida y a gran escala de la biodiversidad (Cilleros *et al.*,

2019; Shaw *et al.*, 2021) reduciendo el esfuerzo y costo del monitoreo en comparación con los muestreos tradicionales.

3.5.2.3 Comparación de abundancia de especies entre el método tradicional y el eDNA metabarcoding

El uso de *eDNA* para la detección de especies está bien documentado, y su aplicación en el monitoreo de biodiversidad continúa expandiéndose. Investigaciones preliminares en laboratorio han demostrado una correlación positiva entre la concentración de *eDNA* específica de una especie y la densidad o biomasa de esa especie en un entorno determinado (Yaster, Fraser y Derry, 2019). Sin embargo, son pocos los trabajos que se han realizado para evaluar si estos hallazgos pueden ser extrapolados a entornos naturales. Algunos conocidos son los de Riffo (2019), sobre la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), donde encontró que existe una relación positiva entre cantidad de *eDNA* cuantificado y biomasa de individuos, usando experimentos en estanques de cultivo. Por su parte, Encarnación (2020), evaluó y comparó como la concentración del *eDNA* cambia con relación al tiempo y la densidad de los individuos en muestras recolectadas tanto de agua como de sedimentos, usando la especie invasora *Poecilia reticulata*, introducida en el lago Yahuarcocha. El comportamiento de la concentración del *eDNA* se relacionó en función al número de peces presente en los tratamientos, a mayor número de peces, mayor concentración de *eDNA*.

En nuestro estudio, también abordamos esta cuestión para validar la eficacia del *eDNA* y el protocolo implementado en términos cuantitativos. Los resultados obtenidos muestran que el *eDNA* también puede cuantificar la abundancia de las especies. A modo general, los datos obtenidos por los dos métodos de muestreo fueron equivalentes, para aproximamendemente, 41,30% de los casos (Tabla 7), y aunque se observaron diferencias en los valores obtenidos para algunas de las espéices en la mayoría de los puntos, estas variaciones puden justificarse tanto por las características ecologicas de las especies, por las características del paisaje de los arroyos, como el lecho rocoso, el porcentaje de vegetación riparia y el tipo de suelo (arcilloso o arenoso), y por las características de los cebadores utilizados, que influyen en el recupercion de las secuencias de *eDNA metabarcoding*. En lo caso de las especies *Heptapterus mustelinus* que fue la especie más representada por el muestreo tradicional, pero la menos detectada con *eDNA metabarcoding* y *Cambeva davisi*, que mostró mayor abundancia en el método tradicional

en dos de los cinco puntos en los que ocurrió (Tabla 7), es probable que el cebador 12S utilizado en la amplificación del *eDNA* pueda no haber sido tan eficiente en la amplificación de esas especies por presentar alguna variación en el sitio de apareamiento, haciendo que el mismo tuviera menor éxito en la amplificación, o incluso haber generado competición por sitio de apareamiento con otras especies que presentaron mayor similaridad. Por otro lado, algunas carácterísticas biológicas de estas especies también pueden justificar la diferencia observada, como el número de copias de lectura obtenidas para cada individuo o especie, como el número de mitocondrias por célula, individuos de diferente tamaño en la misma muestra y el sesgo de amplificación (Fonseca, 2018; Carvalho, 2022). Para el caso de las especies de Characideos (*A. lacustris* y *P.* aff. *paranae)* y Cíclidos (*G. brasiliensis; C. britskii* y *C. jaguarensis*), que en la mayoiria de los casos presento mayor abundancia en el *eDNA metabarcoding* en comparación al método tradicional, sus características ecológicas pueden explicar las diferencias observadas. Los peces de estas familias cuentan con adaptaciones morfológicas, como la capacidad de nadar rápido (Apolinário-Silva *et al.*, 2018), que dificultan su captura con métodos tradicionales. Además de eso, estas especies no responden bien al método de colecta empleado (pesca eléctrica), con la cual apenas se asusta y huyen, dificultando su captura. Asi, en estes casos, el *eDNA* acaba siendo más representativo para ellas. En el caso de *Ancistrus sp.,* que presento mayor abundancia por *eDNA metabarcdoing* en cuatro de los cinco puntos en que ocurrió (Tabla 7), las diferencias pueden ser justificada por un conjunto de factores que asocian el comportamiento del pez, que habita preferencialmente regiones de correderas al fondo del arroyo y debajo de las piedras; las características del arroyo, como la velocidad del agua y profundidad; y la respuesta a los métodos de coleta tradicional. El método tradicional de pesca eléctrica deja esos peces paralizados, los cuales, en la mayoría de los casos, continúan en los sitios que ocurren, o sea, presos debajo de las piedras. Así, su captura acaba siendo manual. Donde una vez paralizado, se hace la búsqueda de esos individuos en medio de las piedras capturándolos con las manos o revolviendo las piedras para que se suelten, lo que muchas veces provoca que terminen ocultos debajo de las mismas. Asociado a eso, esta el hecho de que, al parar la corriente eléctrica, estos peces se recuperan rapidamente, huyendo y escondiéndose, lo que dificulta aún más la captura de todos los indivíduos que estan em um determinado lugar. Sumado a esto, las características del paisaje de los arroyos (Apéndice 5) pueden posibilitar o dificultar la captura de estos individuos. Arroyos con flujo de agua más intenso, mayor volumen y/o formado predominantemente por lajas (puntos 4, 11, 12 y 16 – Apéndice 5), dificultan la captura de los indivíduos por dificultar su visualización

o proveer escondederos que impiden revolver las piedras como el caso de los arroyos con lajas. A su vez, puntos con agua más mansas, poco profundas y con fondo pedregoso (puntos 8 y 15 – Apéndice 5), facilitan la visualización de los peces y su captura.

Los datos obtenidos en nuestro estudio, demuestran que el método de *eDNA metabarcoding*, puede ser una herramienta útil en estudios de abundancia, principalmente, de aquellas especies raras o de difícil captura por los métodos tradicionales de coleta, reflejando mejor la real abundancia de las especies presentes en un determinado ambiente. Con todo, para algunas especies, aunque em menor número, se debe tener cautela, pues el *eDNA metabarcoding* puede no recuperar fidedignamente su abundancia, por los motivos citados arriba, lo que refuerza la necesidad de conocer la icitofauna local, para la correcta interpretación de los datos.

3.6 Conclusiones

Contar con bancos de datos moleculares actualizados para la región 12S del rDNA es una herramiental fundamental para el monitoreo ambiental basado en *eDNA metabarcoding* de la ictiofauna de arroyos. Su aplicación no solo mejora la capacidad de los investigadores para identificar y rastrear especies de peces con alta precisión, sino que también proporciona información crítica para la conservación y gestión sostenible de los ecosistemas acuáticos. Por medio del *eDNA metabarcoding* se consigue tener una representación mas cercana a la realidad comparada con los métodos tradicionales para la evaluación de la biodiversidad, gracias a que la técnica puede identificar la cantidad de taxones diferentes presentes, a partir de divergencia en similitud genética entre ellos, identifiando inlcusive las esppecies raras ou de difícil captura pelos métodos tradiconales. Sin embargo, la identidad taxonómica solo se puede determinar con precisión al comparar los datos obtenidos con los bancos de datos de referencia locales y completos.

Finalmente, este trabajo genéro un banco de datos que aporta secuencias de 46 nuevas especies para actualizar los bancos de datos mundiales; asi mismo, también se deseñaron y estandarizaron dos nuevos cebadores *Forward* y un cebador *Reverse* para ser usados en el secuenciamiento de las secuencias referencias 12S para el uso del *eDNA metabarcoding* en peces. Finalmente, se validó la eficiencia del protocolo de *eDNA metabarcoding* creado asociado al banco de dados local obtenido evaluando 12 puntos de muestreo en la BP3. Esto datos significan un avance importantísimo para la aplicación de la metodología del *eDNA matabarcoding* para el biomonitoreo eficiente de peces en la

región Neotropical. Además, los cebadores desarollados pueden servir de referencia para futuras actualizaciones o establecimiento de bancos de datos de referencia para las especies de la region Neotropical.

3.7 Referencias bibliográficas

ANJOS, M. D. S. *et al*.. *A taxonomically complex catfish group from an underrepresented geographic area: systematics and species limits in* Hypostomus Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), *from Eastern South America*. ***Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research***, v. 59, p. 1994-2009, 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jzs.12572>. Acceso en: 06 dic. 2022.

BENITEZ, M F.. **Revisión multidisciplinaria de Rhamdia quelen (teleostei, siluriformes, heptapteridae) de las cuencas de los ríos Alto Paraná y Uruguay en Argentina**: taxonomía clásica, citogenética y genética molecular. Asesores: AZPELICUETA, M. de las M. (asesor); BALDO, J. D. (co-asesor). Tesis (doctorado) - PPG-ZOO (Programa de Postgrado en Zoología), UNLP (Universidad Nacional de la Plata), Buenos Aires, Argentina, 2019. Disponible en: < https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/80290 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

BOUSSARIE, G. *et al*.. *Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks*. ***Sci. Adv***., v. 04, n. 05, p. eaap9661, 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aap9661>. Acceso en: 06 dic. 2023.

CASTRO, M. A. DE. *et al.. Swimming performance of the small characin Bryconamericus stramineus* (*Characiformes*: *Characidae*). **Zoologia** (Curitiba), v. 27, n. 06, p. 939-944, 2010. Disponible en: < https://doi.org/10.1590/S1984-46702010000600015 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CARVALHO, D. C.. *Ichthyoplankton DNA metabarcoding*: *challenges and perspectives*. ***Molecular Ecology***, v. 31, n. 06, p. 1612-1614, 2022. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/mec.16387 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

CONTRERAS, C. A. R.. **Uso de ADN ambiental (*eDNA*) para determinar la relación entre cantidad de ADN y abundancia de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante experimentos en estanques de cultivo**. Asesores: no informado. no informado f.. UDEC (Universidad de Concepción), Lima, Peru, 2022. Disponible en: < https://repositorio.udec.cljspui/handle/11594/66 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

DÍAZ, A. J. E.. **Determinación de la concentración de *eDNA* de *Poecilia reticulata* en sedimentos acuáticos y aguas superficiales**. Asesores: CRUZ, V. (asesor). Trabajo de Finalización de Carrera (Graduación) – CG-Biología (Licenciatura en Biología), UTN

(Universidad Técnica del Norte), Ibarra, Equador, 2020. Disponible en: < https://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/10340 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

DUBREUIL, T. *et al*.. *The development of early monitoring tools to detect aquatic invasive species: eDNA assay development and the case of the armored catfish Hypostomus robinii*. ***Environmental DNA***, v. 04, p. 349-362, 2022. Disponible en: < https://doi.org/10.1002/edn3.260 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A.. *Ecological interactions between Nile tilapia (Oreochromis niloticus, L.) and the phytoplanktonic community of the Furnas Reservoir (Brazil).* ***Freshwater Biology***, v. 50, n. 08, p. 1391-1403, 2005. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01407.x>. Acceso en: 06 dic. 2023.

FONSECA, V. G.. *Pitfalls in relative abundance estimation using eDNA metabarcoding*. ***Molecular Ecology Resources***. v. 18, n. 05, p. 923-926, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/1755-0998.12902 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

GARRET, N.. ***Measuring neotropical bat diversity using airborne eDNA***. *Advisors*: CLARE, Elizabeth (*advisor*); SOBRENOME, Nome (co-asesor). 118 f.. *Master's thesis* (*Master's degree*) - *Graduate Program in Biology*, *YORKU* (*York University*), *Toronto*/Canada, 2023. Disponible en: < https://hdl.handle.net/10315/41627 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

GRACA, W. J.; PAVANELLI, C. S.. **Peixes da planÌcie de inundacao do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes**. Neotrop. Ichthyol. v. 16, n. 02, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170094 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

HILÁRIO, H. O.; MENDES, I. S.; SALES, N. G.; CARVALHO, D. C.. *DNA metabarcoding of mock communities highlights potential biases when assessing Neotropical fish diversity*. ***Environmental DNA***, v. 05, n. 06, p. 1351-1361, 2023. Disponible en: < https://doi.org/10.1002/edn3.456 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LAMB, P. D. *et. al*.. *How quantitative is metabarcoding: a meta-analytical approach*. ***Molecular Ecology***, v. 28, n. 02, p. 420-430, 2019. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/mec.14920 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LERAY, M.; MEYER, C. P.; MILLS, S. C.; RIGINOS, C.. *Metabarcoding of water samples detects community change along an environmental gradient*. ***Molecular Ecology***, v. 24, n. 07, p. 1560-1571, 2015. Disponible en: < https://onlinelibrary.wiley.com/journal/1365294x >. Acceso en: 06 dic. 2023.

LIMA, F.C.T. *et al.. Genera incertae sedis in Characidae*. *In*: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C. J.. (eds.). ***The freshwater fishes of south and Central America***.

Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 106-168, 2003. Disponible en: < https://repository.si.edu/handle/10088/11234 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MANOEL, L. O.; VILELA, M. J. A.; BARBOSA, N. S.; RODRIGUES, R. S.. **Ocorrência e distribuição de C*haracidium aff. zebra* (*pisces: Crenuchidae*) no Alto Rio Sucuriú, MS**. *In*: IIENCIVI (Encontro de Ciências da Vida), 2008, Ilha Solteira, SP. Anais. Anais do [...]. Ilha Solteira, SP: UNESP, p. 01-04, 2008. Disponible en: <https://www.feis.unesp.br/Home/Eventos/encivi/iiencivi-2008/leticia-oliveira-1.pdf>. Acceso en: 06 dic. 2023.

MANTILLA, Diego Fernando Cadena. **Descripción de la diversidad funcional de los peces de la Cuenca del Paraná 3**. Asesores: PEREIRA, Luiz Henrique (asesor). 56 f.. Trabajo de Finalización de Carrera (Graduación) – CG-Biología (Licenciatura en Ciencias Biológicas), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz do Iguaçú 2020. Disponible en: < https://dspace.unila.edu.br/handle/123456789/6125 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MARQUES, V. *et al.. Blind assessment of vertebrate taxonomic diversity across spatial scales by clustering environmental DNA metabarcoding sequences*. ***Ecography***, n. 43, p. 1779-1790, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/ecog.05049 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MARTINELLI, M. D.; LASSO, C. A.; CABALLERO, S. J.. *eDNA metabarcoding: an effective tool for vertebrate diversity studies in the Colombian Amazon and Orinoco basins*. ***Front. Ecol. Evol***. v. 12, p. 1409296, 2024. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fevo.2024.1409296>. Acceso en: 06 dic. 2023.

MENDES, I.; HILÁRIO, H.; TEIXEIRA, D.; CARVALHO, D. C. de. *Challenges in assessing the Neotropical fishes using DNA metabarcoding*. ***ARPHA Conference Abstracts***, v. 04, p. E65093, 2021. Disponible en: < https://doi.org/10.3897/aca.4.e65093 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MILAN, D. T. *et al.. New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment*. ***Scientific Reports***, v. 10, n. 01, p. 01-12, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/s41598-020-74902-3 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

MIYA, M. *et al.. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species*. ***Royal Society Open Science***, v. 02, n. 07, p. 150088, 2015. Disponible en: < https://doi.org/10.1098/rsos.150088 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

RODRIGUEZ, D. L. N.. **Aplicación de ADN ambiental en áreas protegidas: estimando la biodiversidad acuática en Pantanos de Villa**. Asesores: RAMIREZ, Zoila Raquel Siccha (asesora). 74 f.. Trabajo de Finalización de Carrera (Graduación) - CG-Biología

(Licenciatura en Ciencias Biológicas), UNMSM (Universidad Nacional Mayor de San Marcos), Lima, Peru, 2022. Disponible en: < https://hdl.handle.net/20.500.12672/18675 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SAKATA, M. K. *et al.*. *Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA*. **Environmental DNA**, v. 2, p. 505-518, 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/edn3.75>. Acceso en: 06 dic. 2023.

SALES, N. G. *et al.. Assessing the potential of environmental DNA metabarcoding for monitoring Neotropical mammals: a case study in the Amazon and Atlantic Forest, Brazil*. **Mam. Rev.**, v. 50, p. 221-225, 2020. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/mam.12183 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SANTANA, C. D.; PARENTI, L. R.; DILLMAN, C. B. *et al.. The critical role of natural history museums in advancing eDNA for biodiversity studies: a case study with Amazonian fishes*. ***Sci. Rep.***, v. 11, p. 18159, 2021. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/s41598-021-97128-3 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SANTOS, G.. **Banco referencial molecular para a ictiofauna da bacia hidrográfica do Alto Paraná**. Asesores: TAGLIACOLLO, Victor Alberto (asesor). 33 f.. Trabajo de Finalización de Carrera (Graduación) - CG-Biología (Licenciatura en Ciencias Biológicas), *UFU* (*Universidade Federal de Uberlândia*), *Uberlândia*, 2024. Disponible en: < https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/41888 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

SCARCIA, P. I.; TORRE, F. R de la. Efectos de un hidrocarburo aromático policíclico (ß-naftoflavona) sobre biomarcadores de efecto en Corydoras paleatus en condiciones de campo y laboratorio. **Rev. Biología Acuática**, v. 24, p. 131-136, 2008. Disponible en: < https://revistas.unlp.edu.ar/bacuatica/article/view/6565 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

TABERLET, P.; BONIN, A.; COISSAC, E.; ZINGER, L.. ***Environmental DNA****: for biodiversity research and monitoring*. *New York/USA*: *Oxford University Press*, 2018. Disponible en: < https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

TEIXEIRA, D.; HILÁRIO, H.; SANTOS, G.; CARVALHO, D.C. *Qualitative and quantitative DNA metabarcoding assessment of Neotropical ichthyoplankton communities is marker-dependent*. **ESS Open Archive**, 2023. Disponible en: < https://doi.org/10.22541/au.168726071.15140543/v1 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

THOMSEN, P. F. *et al.. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples*. ***Plos One***, v. 07, n. 08, p. e41732, 2012. Disponible en: < https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

UIEDA, V. S.; FUJIHARA, C. Y.. *Structure of the ichthyofauna of adventitious streams in the South Pantanal.* Iheringia. **Série Zoologia**, v. 108, p. e2018019, 2018.

UNIÓN EUROPEA. Parlamento Europeo. **Directiva n.º. 2008/56/CE**. Estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política para o meio marinho. EUR-Lex (*European Union law*): seção JO L, Estrasburgo, França, n. 164, p. 19-40, 17 jun. de 2008. Disponible en: < https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32008L0056 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

VALENTINI, A. *et al*.. *Next□generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding*. ***Molecular Ecology***, v. 25, n. 04, p. 929-942, 2016. Disponible en: < https://doi.org/10.1111/mec.13428 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

WILLIAM G. R.; CRAMPTON, D. H.; THORSEN, J. S.; ALBERT, J. W.. ARMBRUSTER; *Three New Species from a Diverse, Sympatric Assemblage of the Electric Fish Gym-notus (Gymnotiformes: Gymnotidae) in the Lowland Amazon Basin.* ***Notes on Ecology***. *Copeia,* v., p. 82-89, 2005. Disponible en: < https://doi.org/10.1643/CI-03-242R2 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

YAMAMOTO, S. *et al*.. *Environmental DNAmetabarcoding reveals local fish communities in a speciesrich coastal sea*. ***Sci. Rep***., v. 7, p. 40368, 2017. Disponible en: < https://doi.org/10.1038/srep40368 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

YATES, M. C.; FRASER, D. J.; DERRY, A. M.. *Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature*. ***Environmental DNA***, v. 01, p. 05-13, 2019. Disponible en: < https://doi.org/10.1002/edn3.7 >. Acceso en: 06 dic. 2023.

4 CONSIDERACIONES FINALES

Los inventarios biológicos a partir de métodos de colecta tradicionales, su posterior identificación taxonómica y construcción de la biblioteca de referencia son imprescindible para la aplicación exitosa de tecnologías de biología molecular. Los estudios realizados en este trabajo permitieron desarrollar un paquete tecnológico para el monitoreo ambiental que incluye un protocolo para la extracción de ADN ambiental mediante filtración de agua, enfocado específicamente en la detección de ictiofauna de arroyos y un banco de datos molecular de secuencias basado en la región 12S del genoma mitocondrial.

Señalamos que las ventajas de hacer las evaluaciones ambientales a partir del *eDNA metabarcoding* es la reducción del esfuerzo de muestreo en las localidades de díficil acceso; la disminución de costos de logística y la posibilidad de obtenerse inventarios mas fidedignos incluyendo especies raras o de difícil colecta. Estos avances prometen mejorar la capacidad de evaluación de la biodiversidad de ecosistemas de arroyos de manera más efectiva, rápida y económica en la región neotropical y estamos seguros de que es una gran contribución que ayudara en la compleja tarea de conservar la megadiversa ictiofauna Neotropical.

APÉNDICES

Apéndice 1 – Lista de espécies y sus secuencias usadas como referencias para la elección de los cebadores usados en la creación del banco de datos local

ESPECIE	CÓDIGO NCBI	PB
Rineloricaria sp.	KR478201.1	1170
Psalidodon fasciatus	NC_053758.1	1170
Oligosarcus argenteus	NC_044969.1	1170
Ancistrus sp.	KP960569.1	1170
Apareiodon affinis	AP011998.1	1170
Apteronotus albifrons	NC_004692.1	1170
Astyanax altiparanae	NC_053759.1	1170
Cetopsis coecutiens	JX899752.1	1170
Corydoras schwartzi	KT239007.1	1170
Cichlasoma dimerus	NC_033551.1	1170
Geophagus brasiliensis	KU531434.1	1170
Gymnotus sylvius	MN583179.1	1170
Gymnogeophagus balzanii	KR150864.1	1170
Hoplias malabaricus	MN583178.1	1170
Hypostomus ancistroides	NC_052710.1	1170
Imparfinis stictonotus	JX899733.1	1170
Oreochromis niloticus	MW149239.1	1170
Pimelodella cristata	MH286807.1	1170
Poecilia formosa	KT307617.1	1170
Poecilia reticulata	NC_024238.1	1170
Rhamdia quelen	EU179824.1	1170
Trichomycterus areolatus	AP012026.1	1170
Moenkhausia costae	MW366831.1	1170
Salminus brasiliensis	NC_024941.1	1170
Synbranchus marmoratus	AP004439.1	1170

Fuente: de los autores, 2024.

Apéndice 2 – Lista de especies disponibles de la colección Ictiológica del LaBEM

Especie		
Ancistrus sp.	*Gymnotus sp.*	*Pimelodella sp.*
Apareiodon affinis	*Hemmigramus sp.*	*Pecilia reticulata*
Apteronotus aff. albifrons	*Heptapterus mustelinus*	*Psalidodon aff. fasciatus*
Astyanax bockmanni	*Hoplias intermedius*	*Psalidodon aff. paranae*
Astyanax lacustris	*Hoplias misionera*	*Psalidodon sp.*
Astyanax shubarti	*Hoplosternum littorale*	*Psellogrammus kennedyi*
Bryconamericus aff. iheringii	*Hypostomus albopunctatus*	*Pterygoplichthys ambrosettii*
Bryconamericus exodon	*Hypostomus ancistroides*	*Rhamdia quelen*
Callichthys callichthys	*Hypostomus cf. iheringui*	*Rinelocaria sp.*
Cambeva davisi	*Hypostomus cf. strigaticeps*	*Serrapinus notomelas*
Cetopsis sp.	*Hypostomus sp.*	*Steindachnerina brevipinna*
Cetopsorhamdia iheringi	*Imparfinis borodini*	*Synbranchus marmoratus*
Characidium aff. gomesi	*Imparfinis mirini*	*Trichomycterus sp.*
Characidium aff. zebra	*Imparfinis schubarti*	
Characidium sp.	*Imparfinis sp.*	
Cichlasoma cf. dimerus	*Ituglanis sp.*	
Cichlasoma cf. paranaensis	*Knodus moenkhausii*	
Coptodon rendalli	*Loricariichthys rostratus*	
Corydoras aeneus	*Moenkhausia aff. intermedia*	
Corydoras cf. paleatus	*Neoplecostomus sp.*	
Crenicichla britskii	*Neoplecostumos yapo*	
Crenicichla iguasuensis	*Oligosarcus paranaensis*	
Crenicichla jaguarensis	*Oreochromis niloticus*	
Crenicichla sp.	*Otothyropsis cf. moropoama*	
Curculionichthys insperatus	*Otothyropsis sp.*	
Erythrinus erythrinus	*Parodon nasus*	

Geophagus brasiliensis	*Phalloceros harpagos*
Gymnogeophagus sp.	*Phenarcorhamdia tenebrosa*
Gymnotus inaequilabiatus	*Piarbacus stramineus*
Gymnotus pantanal	*Pimelodella avanhandavae*
Gymnotus sylvius	*Pimelodella gracilis*

Aviso: en azúl se muestran las especies que tuvieron secuenciamiento exitoso.

Fuente: de los autores, 2024.

Apéndice 3 – Comparación de similaridad de las OTUs generadas entre el banco de datos local y el *GenBank*

Punto BR2	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**
0dbc863c89be47cf74d5fa3b94d82215	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie
d55f24df2f12023bfef1aeaa3b22bd1f	*Astyanax lacustris*	99,476	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	99,7	*Astyanax lacustris*	Especie
ac353272f9305cd5263f6d2d160b9bdd	*Astyanax lacustris*	99,476	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	99,7	*Astyanax lacustris*	Especie
d2157e6f2afae7aad7e2de93dbf622d4	*Oreochromis niloticus*	100	*Oreochromis niloticus*	Especie	*Oreochromis niloticus*	98,4	*Oreochromis sp.*	Género
c57c4508929739e9707fb9f8d5fc4c3d	*Oreochromis sp.*	100	*Oreochromis sp.*	Especie	*Oreochromis niloticus*	100	*Oreochromis niloticus*	Especie
99c12086167a0d51973dcdf99931fe36	*Hypostomus francisci*	100	*Hypostomus francisci*	Especie	*Hypostomus strigaticeps*	100	*Hypostomus strigaticeps*	Especie
5cb6e56a7c1059f1d476f104f492669a	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie	*Gymnotus silvius*	100	*Gymnotus silvius*	Especie
3bb5cc8ca4131d530345729798bc74a0	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
00986e17a888a117edb403062dc6c235	*Psalidodon fasciatus*	99,476	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
069e85b55e5beed7d29fb3985e3bbd0e	*Psalidodon fasciatus*	98,958	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
0273bf64679f821358645cdf880c92da	*Hypoptopoma incognitum*	96,875	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp*	100	*Ancistrus sp*	Especie
96d288c2f60db208d1f3607b80a871a8	*Pseudoplatystoma reticulatum*	92,147	*Siluriformes*	Orden	*Rhamdia quelen*	99,7	*Rhamdia quelen*	Especie
af3ee695d51e06e5b7a8de77061bce32	*Pimelodus yuma*	91,005	*Siluriformes*	Orden	*Heptapterus mustelinus*	100	*Heptapterus mustelinus*	Especie
50eab7af7c0b2d6ca0a77a785aecd610	*Abramites hypselonotus*	89,175	*Characiformes*	Orden	*Characidium aff. Zebra*	100	*Characidium aff. Zebra*	Especie
5b1ab2fa3b6ea496711e1bb83d7ad4e5	*Solanum lycopersicum (tomate)*	84,255	*Solanales*	INESP.	*no blastó*		Tomate	INESP.

Punto BR4	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mais próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nível**	**Especie ref. mais próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**
c57c4508929739e9707fb9f8d5fc4c3d	*Oreochromis sp.*	100	*Oreochromis sp.*	Especie	*Oreochromis niloticus*	100	*Oreochromis niloticus*	Especie
45de53bffdbc4695c56bdb95d5e105a3	*Oreochromis sp.*	99,476	*Oreochromis sp.*	Especie	*Oreochromis niloticus*	99,7	*Oreochromis niloticus*	Especie
d2157e6f2afae7aad7e2de93dbf622d4	*Oreochromis niloticus*	100	*Oreochromis niloticus*	Especie	*Oreochromis niloticus*	98,4	*Oreochromis niloticus*	Especie
572fccc004715e4d8c1ab49a29ce867a	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
3bb5cc8ca4131d530345729798bc74a0	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
fefaf1dea62d2cce-ceb855358201ce8c	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
00986e17a888a117edb403062dc6c235	*Psalidodon fasciatus*	99,476	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
4ae26a0cff9f332e3a0c88058d0aa72d	*Hypostomus francisci*	99,482	*Hypostomus francisci*	Especie	*Hypostomus albopunctatus*	100	*Hypostomus albopunctatus*	Especie
08f1392c2b1c930e6d4f818f3f85475d	*Psalidodon fasciatus*	98,958	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
3141e4bc356c2895c2ef7276005bae77	*Psalidodon fasciatus*	98,953	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,2	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
e13e569adae62c34b76c64c03e4d837c	*Psalidodon fasciatus*	98,438	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,2	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
ce7cba14f015923097d877d79521643b	*Psalidodon fasciatus*	98,438	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,2	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,75	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,7	*Piabarchus sp.*	Género
af3ee695d51e06e5b7a8de77061bce32	*Pimelodus yuma*	91,005	*Siluriformes*	Orden	*Heptapterus mustelinus*	100	*Heptapterus mustelinus*	Especie
6d246ef0c951bace0727cc2880377f5a	*Parexocoetus brachypterus*	85,492	*Beloniformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	100	*Crenicichla britskii*	Especie

Punto BR6	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**
e223d74cbe4a1a1670bc37e59f2574a4	*Geophagus brasiliensis*	100	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasiliensis*	99,7	*Geophagus brasiliensis*	Especie
942c48c24a22c2cf89c5066119fe45b4	*Geophagus brasiliensis*	99,476	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasiliensis*	99,5	*Geophagus brasiliensis*	Especie
31654eb956dfe4a69f8ca858d392bcf0	*Geophagus brasiliensis*	99,476	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasiliensis*	99,5	*Geophagus brasiliensis*	Especie
04804f0502cb54117fdb07d4aa716866	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
572fccc004715e4d8c1ab49a29ce867a	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
e4ae2a41db365d02ff38bed1058f8d0e	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
fefaf1dea62d2cceceb855358201ce8c	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
0dbc863c89be47cf74d5fa3b94d82215	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie
cf3cd53530d42742ad5ea1e2b9f2ae7d	*Hypostomus ancistroides*	98,964	*Hypostomus*	Género	*Hypostomus ancistroides*	99,2	*Hypostomus ancistroides*	Especie
0273bf64679f821358645cdf880c92da	*Hypoptopoma incognitum*	96,875	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	100	*Ancistrus sp.*	Especie
18508302809aed0c1c3dde12b0138563	*Hypoptopoma incognitum*	96,354	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	99,7	*Ancistrus sp.*	Especie
965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,75	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,7	*Piabarchus*	Género
23278560c625db83784ae7fb09aefdc2	*Geophagus brasiliensis*	92,228	*Perciformes*	Orden	*Geophagus brasiliensis*	95,9	*Cichliformes*	Orden
86c4e20f4a6f8c7359c1f2a0f04032b4	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,623	*Siluriformes*	Orden	*Rhamdia quelen*	100	*Rhamdia quelen*	Especie
af3ee695d51e06e5b7a8de77061bce32	*Pimelodus yuma*	91,005	*Siluriformes*	Orden	*Heptapterus mustelinus*	100	*Heptapterus mustelinus*	Especie
e0595548099abf158201c1a7d500e794	*Labracinus cyclophthalmus*	87,027	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	99,7	*Crenicichla britskii*	Especie

Punto BR8	Blast com *GenBank*				Blast com banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Identidade**	**Taxonomia**	**Nivel**
0dbc863c89be47cf74d5fa3b94d82215	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustres*	100	*Astyanax lacustres*	Especie
ac353272f9305cd5263f6d2d160b9bdd	*Astyanax lacustris*	99,476	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustres*	99,7	*Astyanax lacustres*	Especie
d55f24df2f12023bfef1aeaa3b22bd1f	*Astyanax lacustris*	99,476	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustres*	99,7	*Astyanax lacustres*	Especie
5cb6e56a7c1059f1d476f104f492669a	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie
4ae26a0cff9f332e3a0c88058d0aa72d	*Hypostomus francisci*	99,482	*Hypostomus francisci*	Especie	*Hypostomus albopunctatus*	100	*Hypostomus albopunctatus*	Especie
d2157e6f2afae7aad7e2de93dbf622d4	*Oreochromis niloticus*	100	*Oreochromis niloticus*	Especie	*Oreochromis niloticus*	98,4	Oreochromis sp.	Género
fffd00894c4c369bd0ce7f8bfeb97370	*Oreochromis esculentus*	98,947	*Oreochromis niloticus*	Especie	*Oreochromis niloticus*	99,2	*Oreochromis niloticus*	Especie
0011c8cd0da8b87e8a9d70bc4ded37d4	*Oreochromis niloticus*	99,476	*Oreochromis niloticus*	Especie	*Oreochromis niloticus*	98,2	Oreochromis sp.	Género
c57c4508929739e9707fb9f8d5fc4c3d	*Oreochromis sp.*	100	*Oreochromis sp.*	Especie	*Oreochromis niloticus*	100	*Oreochromis niloticus*	Especie
bfc7d974020d9017d60380324a84f246	*Oreochromis sp.*	99,476	*Oreochromis sp.*	Especie	*Oreochromis niloticus*	99,7	*Oreochromis niloticus*	Especie
572fccc004715e4d8c1ab49a29ce867a	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff paranae/fasciatus*	Especie
0f6af7e196aeb9889ca71a051e3324cb	*Oligosarcus argenteus*	97,382	*Characidae*	Família	*Oligosarcus paranaensis*	99,7	*Oligosarcus paranaensis*	Especie
324a349b77863512b6955f8e1e6afba3	*Gymnotus sylvius*	97,938	*Gymnotidae*	Família	*Gymnotus ineaquilabiatus*	100	*Gymnotus ineaquilabiatus*	Especie
1dbe8a2d6f01c9a710e3970129a5ef1b	*Hypostomus ancistroides*	97,927	*Loricariidae*	Família	*Hypostomus ancistroides*	99,7	*Hypostomus ancistroides*	Especie

6d246ef0c951bace0727cc2880377f5a	*Parexo-coetus brachypte-rus*	85,492	*Beloniformes*	Orden	*Creniciclha brityski*	**100**	*Creniciclha brityski*	Especie
965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,75	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus Stramineus*	98,7	Piabarchus sp.	Género
a30526403bd124e9ade109fce74614b5	*Hoplias ma-labaricus*	96,373	*Characiformes*	Orden	*Hoplias misio-nera*	100	*Hoplias misionera*	Especie
74c6283c343e14810716e1691b3103d5	*Hoplias in-termedius*	87,755	*Characiformes*	Orden	*Hoplias misio-nera*	91,8	Characiformes	Orden
d8992e5ab4bf69f2148da3c49c2f04b7	*Curimata mivartii*	96,373	*Characiformes*	Orden	*Bryconame-ricus exodon*	95,1	Characiformes	Orden
6c3a31194d9145534541ff56f91fa911	*Brycon henni*	93,229	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus Str-mineus*	98,4	Piabarchus sp.	Género
fef5f2326617ad66b4932f9c3386b9ea	*Brycon henni*	93,229	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus Str-mineus*	98,4	Piabarchus sp.	Género
084058a758d6d1bab7e79e50fa1b450f	*Cyanophora biloba (alga)*	82,192	*Glaucocystales*	INESP.	*no blastó*		ALGA VERDE	INESP
28b734e8fbd4653d4bcb0023f74b9ab8	*Astronotus ocellatus*	87,179	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla ja-guariensis*	99,5	*Crenicichla jagua-riensis*	Especie
b353f5b575afab1a65586c018d55259b	*Astronotus ocellatus*	87,692	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla ja-guariensis*	99,7	*Crenicichla jagua-riensis*	Especie
0273bf64679f821358645cdf880c92da	*Hypopto-poma incog-nitum*	96,875	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	100	*Ancistrus sp.*	Especie
af3ee695d51e06e5b7a8de77061bce32	*Pimelodus yuma*	91,005	*Siluriformes*	Orden	*Heptapterus mustelinus*	100	*Heptapterus mustelinus*	Especie
86c4e20f4a6f8c7359c1f2a0f04032b4	*Pseudo-platystoma reticulatum*	91,623	*Siluriformes*	Orden	*Rhamdia quelen*	100	*Rhamdia quelen*	Especie

Punto BR9	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident**	**Taxonomia**	**Nivel**
572fccc004715e4d8c1ab49a29ce867a	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
5e9b7bf2ebc7dddd4ce9501db6ff8ad3	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
881053e09e45cd88f28100c271b12679	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
4535aaefbaa57aee02ccae9377bbf7bf	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
e223d74cbe4a1a1670bc37e59f2574a4	*Geophagus brasiliensis*	100	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasiliensis*	99,7	*Geophagus brasiliensis*	Especie
5cb6e56a7c1059f1d476f104f492669a	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie	*Gymnotus silvius*	100	*Gymnotus silvius*	Especie
0dbc863c89be47cf74d5fa3b94d82215	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie
82ff4662d242ec495417bed8beb4e322	*Psalidodon fasciatus*	98,958	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
b86c1da28ec3fb5001a0459e0be9f5fd	*Psalidodon fasciatus*	97,917	*Characidae*	Família	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,2	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
7194df3096cff7f506aca6ae9f618d53	*Hypoptopoma incognitum*	96,891	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	99,7	*Ancistrus sp.*	Especie
20f5e011589ad539bd62b49681fa509c	*Corydoras paleatus*	96,875	*Siluriformes*	Orden	*Corydoras cf paleatus*	100	*Corydoras cf paleatus*	Especie
57c99162abe91abf21399b7cf9d6cf67	*Oligosarcus argenteus*	96,842	*Characiformes*	Orden	*Gymnogeophagus sp.*	100	*Gymnogeophagus sp.*	Especie
154bb9170a0db44f2b76bbab2b86081e	*Corydoras paleatus*	95,833	*Siluriformes*	Orden	*Corydoras cf paleatus*	99,5	*Corydoras cf paleatus*	Especie

965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,75	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,7	*Piabarchus*	Género
640c70d0a2aa8910717226be20a0ca42	*Berkeleya fennica (alga marrom)*	93,548	*Naviculales*	INESP.	*no blastó*		*ALGA MARROM*	INESP.
fef5f2326617ad66b4932f9c3386b9ea	*Brycon henni*	93,229	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,4	*Piabarchus*	Género
6c3a31194d9145534541ff56f91fa911	*Brycon henni*	93,229	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,4	*Piabarchus*	Género
57e8f0324d6a50d0affe4b8f70e7eff8	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,099	*Siluriformes*	Orden	*Rhamdia quelen*	99,5	*Rhamdia quelen*	Especie
ad0e18dd95068611694187fc1a27cc6a	*Pimelodus yuma*	90,476	*Siluriformes*	Orden	*Heptapterus mustelinus*	99,7	*Heptapterus mustelinus*	Especie
92f4b482d6f46b16f23ffc744cb0dd36	*Clarias gariepinus*	89,947	*Siluriformes*	Orden	*Cambeva davisi*	100	*Cambeva davisi*	Especie
6d246ef0c951bace0727cc2880377f5a	*Parexocoetus brachypterus*	85,492	*Beloniformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	100	*Crenicichla britskii*	Especie
d53aa43da759db269299d27cd5660ffd	*Cycas taitungensis (Cyca – coqueiro)*	80,426	*Cycadales*	INESP.	*no blastó*		*CYCA – Gymnosperma*	INESP.

Punto BR11	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**
e223d74cbe4a1a1670bc37e59f2574a4	*Geophagus brasiliensis*	100	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasiliensis*	99,7	*Geophagus brasiliensis*	Especie
31654eb956dfe4a69f8ca858d392bcf0	*Geophagus brasiliensis*	99,476	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasiliensis*	99,5	*Geophagus brasiliensis*	Especie
572fccc004715e4d8c1ab49a29ce867a	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
fefaf1dea62d2cce-ceb855358201ce8c	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
5cb6e56a7c1059f1d476f104f492669a	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie	*Gymnotus silvius*	100	*Gymnotus silvius*	Especie
a6f48a43cf3d31c795872207f624aa7c	*Cichlasoma dimerus*	100	*Cichlasoma dimerus*	Especie	*Cichlasoma cf. dimerus*	99,7	*Cichlasoma cf. dimerus*	Especie
cf3cd53530d42742ad5ea1e2b9f2ae7d	*Hypostomus ancistroides*	98,964	*Hypostomus*	Género	*Hypostomus ancistroides*	99,2	*Hypostomus ancistroides*	Especie
3ec6ab920bf5f74bd570773e4840ae98	*Psalidodon fasciatus*	98,958	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
82ff4662d242ec495417bed8beb4e322	*Psalidodon fasciatus*	98,958	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
de8b19a679ab56423ecc92b75d6a3369	*Oligosarcus argenteus*	97,382	*Characidae*	Família	*Oligosarcus paranaensis*	99,2	*Oligosarcus paranaensis*	Especie
edfd83a3b0a4e833c8a20c5ae177be9b	*Oligosarcus argenteus*	97,382	*Characidae*	Família	*Oligosarcus paranaensis*	99,5	*Oligosarcus paranaensis*	Especie
0273bf64679f821358645cdf880c92da	*Hypoptopoma incognitum*	96,875	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	100	*Ancistrus sp.*	Especie
01a86721100fec244c523e3452be16ff	*Corydoras paleatus*	94,792	*Siluriformes*	Orden	*Corydoras cf. paleatus*	97,9	*Corydoras*	Género
965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,75	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,7	*Piabarchus*	Género
fef5f2326617ad66b4932f9c3386b9ea	*Brycon henni*	93,229	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,7	*Piabarchus*	Género
6c3a31194d9145534541ff56f91fa911	*Brycon henni*	93,229	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,4	*Piabarchus*	Género

29a41ab1b74cf7d3bef067b296cf3f56	*Aequidens metae*	92,228	*Perciformes*	Orden	*Geophagus brasiliensis*	95,9	*Cichliformes*	Orden
70634894c728ee-bac7344170a4c04aff	*Pseudoplatystoma reticulatum*	92,147	*Siluriformes*	Orden	*Pimelodella gracilis*	99,7	*Pimelodella gracilis*	Especie
af3ee695d51e06e5b7a8de77061bce32	*Pimelodus yuma*	91,005	*Siluriformes*	Orden	*Heptapterus mustelinus*	100	*Heptapterus mustelinus*	Especie
b353f5b575afab1a65586c018d55259b	*Astronotus ocellatus*	87,692	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla jaguarensis*	99,7	*Crenicichla jaguarensis*	Especie
c486d0d16faa5d284d6768462fde5acb	*Astronotus ocellatus*	87,692	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla jaguarensis*	100	*Crenicichla jaguarensis*	Especie
e0595548099abf158201c1a7d500e794	*Labracinus cyclophthalmus*	87,027	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	99,5	*Crenicichla britskii*	Especie
792f03d991d0d0cf769e3a01d0020091	*Chlorokybus atmophyticus (alga verde)*	81,124	*Klebsormidiales*	Orden	*no blastó*		*ALGA VERDE*	INESP

Punto BR12	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nível**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**
572fccc004715e4d8c1ab49a29ce867a	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
58d7970e9c874bc1a50a7e4ffd32f4f4	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
4535aaefbaa57aee02ccae9377bbf7bf	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
e223d74cbe4a1a1670bc37e59f2574a4	*Geophagus brasiliensis*	100	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasilienis*	99,7	*Geophagus brasilienis*	Especie
31654eb956dfe4a69f8ca858d392bcf0	*Geophagus brasiliensis*	99,476	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasilienis*	99,5	*Geophagus brasilienis*	Especie
0273bf64679f821358645cdf880c92da	*Hypoptopoma incognitum*	96,875	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	100	*Ancistrus sp.*	Especie
57e8f0324d6a50d0affe4b8f70e7eff8	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,099	*Siluriformes*	Orden	*Rhamndia quelem*	99,5	*Rhamndia quelem*	Especie
26a62617496beee20ae4e00e59a38532	*Diplomystes nahuelbutaensis*	89,175	*Siluriformes*	Orden	*Cambeva davisis*	99,7	*Cambeva davisis*	Especie
0fb583482cc37b5f96f23bc6119b0cf3	*Abramites hypselonotus*	88,66	*Characiformes*	Orden	*Characidium aff. Zebra*	99,7	*Characidium aff. Zebra*	Especie
ae662bb46043e3641675623f6ae8447a	*Abramites hypselonotus*	88,144	*Characiformes*	Orden	*Characidium aff. Zebra*	99,2	*Characidium aff. Zebra*	Especie
6d246ef0c951bace0727cc2880377f5a	*Parexocoetus brachypterus*	85,492	*Beloniformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	100	*Crenicichla britskii*	Especie

Punto BR13	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident**	**Taxonomia**	**Nível**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nível**
0dbc863c89be47cf74d5fa3b94d82215	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie
5cb6e56a7c1059f1d476f104f492669a	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie	*Gymnotus silvius*	100	*Gymnotus silvius*	Especie
4ae26a0cff9f332e3a0c88058d0aa72d	*Hypostomus francisci*	99,482	*Hypostomus francisci*	Especie	*Hypostomus albopunctatus*	100	*Hypostomus albopunctatus*	Especie
82ff4662d242ec495417bed8beb4e322	*Psalidodon fasciatus*	98,958	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
bb7ebd141f21e9d2ad6aa38830c5ef11	*Gymnotus sylvius*	97,938	*Gymnotidae*	Família	*Gymnotus pantanal*	100	*Gymnotus pantanal*	Especie
0273bf64679f821358645cdf880c92da	*Hypoptopoma incognitum*	96,875	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	100	*Ancistrus sp.*	Especie
70634894c728ee-bac7344170a4c04aff	*Pseudoplatystoma reticulatum*	92,147	*Siluriformes*	Orden	*Pimelodella gracilis*	99,7	*Pimelodella gracilis*	Especie
86c4e20f4a6f8c7359c1f2a0f04032b4	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,623	*Siluriformes*	Orden	*Rhamndioa quelem*	100	*Rhamdia quelem*	Especie
26a62617496beee20ae4e00e59a38532	*Diplomystes nahuelbutaensis*	89,175	*Siluriformes*	Orden	*Cambeva davisi*	99,7	*Cambeva davisi*	Especie
6d246ef0c951bace0727cc2880377f5a	*Parexocoetus brachypterus*	85,492	*Beloniformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	100	*Crenicichla britskii*	Especie

Punto BR14	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**
572fccc004715e4d8c1ab49a29ce867a	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
2758d4ae3c8897869105fba150974830	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
58d7970e9c874bc1a50a7e4ffd32f4f4	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
4535aaefbaa57aee02ccae9377bbf7bf	*Psalidodon fasciatus*	99,479	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,7	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
1d0f107e1196bab7957587377721688f	*Psalidodon fasciatus*	98,958	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
274bb07f097a68f2f8b222cb240abaa8	*Psalidodon fasciatus*	98,958	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,5	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
09196c7a3137abd-beb08b0c8889ca1c3	*Psalidodon fasciatus*	98,438	*Psalidodon*	Género	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	99,2	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
0273bf64679f821358645cdf880c92da	*Hypoptopoma incognitum*	96,875	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	100	*Ancistrus sp.*	Especie
965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,75	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,7	*Piabarchus*	Género
9900f87908e84ff5c47b62157318e25c	*Brycon henni*	92,708	*Characiformes*	Orden	*Piabarcus stramineus*	98,2	*Piabarchus*	Género
26e98b8884c9e6d1021cc0a1747ca731	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,623	*Siluriformes*	Orden	*Rhmandia quelen*	99,7	*Rhmandia quelen*	Especie
57e8f0324d6a50d0affe4b8f70e7eff8	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,099	*Siluriformes*	Orden	*Rhmandia quelen*	99,5	*Rhmandia quelen*	Especie

Punto BR15	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**
e223d74cbe4a1a1670bc37e59f2574a4	*Geophagus brasiliensis*	100	*Geophagus brasiliensis*	Especie	*Geophagus brasiliensis*	99,7	*Geophagus brasiliensis*	Especie
bbce1d71b2b3277243df19b37bc7c552	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	99,7	*Astyanax lacustris*	Especie
0dbc863c89be47cf74d5fa3b94d82215	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie
572fccc004715e4d8c1ab49a29ce867a	*Psalidodon fasciatus*	100	*Psalidodon fasciatus*	Especie	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	100	*Psalidodon aff. paranae/fasciatus*	Especie
5cb6e56a7c1059f1d476f104f492669a	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie
7194df3096cff7f506aca6ae9f618d53	*Hypoptopoma incognitum*	96,9	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	99,7	*Ancistrus sp.*	Especie
20f5e011589ad539bd62b49681fa509c	*Corydoras paleatus*	96,9	*Siluriformes*	Orden	*Corydoras cf. paleatus*	100	*Corydoras cf. paleatus*	Especie
d8992e5ab4bf69f2148da3c49c2f04b7	*Curimata mivartii*	96,4	*Characiformes*	Orden	*Knodus moenkausi*	94,8	*Characiformes*	Orden
931fa6dae8220475a36272b0cde71035	*Hypoptopoma incognitum*	96,4	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	99,5	*Ancistrus sp.*	Especie
d8d69e8586d80d9184ffa3daad7c8071	*Prochilodus lineatus*	94,8	*Characiformes*	Orden	*Piabrachus stramineus*	100	*Piabrachus stramineus*	Especie
899c55d060f4861c2ee2f8fe125b9fa3	*Lebiasina astrigata*	93,8	*Characiformes*	Orden	*Piabrachus stramineus*	98,4	*Piabarchus*	Género
965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,8	*Characiformes*	Orden	*Piabrachus stramineus*	98,7	*Piabarchus*	Género
6c3a31194d9145534541ff56f91fa911	*Brycon henni*	93,2	*Characiformes*	Orden	*Piabrachus stramineus*	98,4	*Piabarchus*	Género
fef5f2326617ad66b4932f9c3386b9ea	*Brycon henni*	93,2	*Characiformes*	Orden	*Piabrachus stramineus*	98,4	*Piabarchus*	Género
57e8f0324d6a50d0affe4b8f70e7eff8	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,1	*Siluriformes*	Orden	*Rhamdia quelem*	99,5	*Rhamdia quelem*	Especie
92f4b482d6f46b16f23ffc744cb0dd36	*Clarias gariepinus*	89,9	*Siluriformes*	Orden	*Cambeva davisi*	100	*Cambeva davisi*	Especie

c486d0d16faa5d284d6768462fde5acb	*Astronotus ocellatus*	87,7	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla jaguarensis*	100	*Crenicichla jaguarensis*	Especie
16d41f50d016c0963609c07299c3a449	*Astronotus ocellatus*	87,2	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla jaguarensis*	99,7	*Crenicichla jaguarensis*	Especie
ee0fb9261383d5631cacd78d240a042f	*Astronotus ocellatus*	87,2	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla jaguarensis*	99,7	*Crenicichla jaguarensis*	Especie
28f84bdcb969486a9b1306d4ccef4dde	*Labracinus cyclophthalmus*	86,4	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	99,2	*Crenicichla britskii*	Especie
6d246ef0c951bace0727cc2880377f5a	*Parexocoetus brachypterus*	85,5	*Beloniformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	100	*Crenicichla britskii*	Especie

Punto BR16	Blast con *GenBank*				Blast con banco de dados local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	***Taxonomia***	**Nivel**
2a453ff95b7fe0225c97dda52e117357	*Hypostomus ancistroides*	98,446	*Hypostomus ancistroides*	Género	*Hypostomus ancistroides*	100	*Hypostomus ancistroides*	Especie
965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,75	*Characiformes*	Orden	*Piabarchus stramineus*	98,7	*Piabarchus*	Género
92f4b482d6f46b16f23ffc744cb0dd36	*Clarias gariepinus*	89,947	*Siluriformes*	Orden	*Cambeva davisi*	100	*Cambeva davisi*	Especie
7194df3096cff7f506aca6ae9f618d53	*Hypoptopoma incognitum*	96,891	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	99,7	*Ancistrus sp.*	Especie
26e98b8884c9e6d1021cc0a1747ca731	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,623	*Siluriformes*	Orden	*Rhamndia quelen*	99,7	*Rhamndia quelen*	Especie

Punto BR17	Blast con *GenBank*				Blast con banco de datos local			
#OTU ID	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	**Taxonomia**	**Nivel**	**Especie ref. mas próxima**	**Ident.**	***Taxonomia***	**Nivel**
0dbc863c89be47cf74d5fa3b94d82215	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	100	*Astyanax lacustris*	Especie
d55f24df2f12023bfef1aeaa3b22bd1f	*Astyanax lacustris*	99,5	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	99,7	*Astyanax lacustris*	Especie
ac353272f9305cd5263f6d2d160b9bdd	*Astyanax lacustris*	99,5	*Astyanax lacustris*	Especie	*Astyanax lacustris*	99,7	*Astyanax lacustris*	Especie
bbce1d71b2b3277243df19b37bc7c552	*Astyanax altiparanae*	100	*Astyanax altiparanae*	Especie	*Astyanax lacustris*	99,7	*Astyanax lacustris*	Especie
5cb6e56a7c1059f1d476f104f492669a	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie	*Gymnotus sylvius*	100	*Gymnotus sylvius*	Especie
933606cb8393578cbf2feaa4944fd53f	*Hypophthalmichthys nobilis*	100	*Hypophthalmichthys nobilis*	Especie	*Gymnotus Sylvius*	92,6	*Gymnotiformes*	Orden
a6f48a43cf3d31c795872207f624aa7c	*Cichlasoma dimerus*	100	*Cichlasoma dimerus*	Especie	*Cichlasoma aff. dimerus*	99,7	*Cichlasoma aff. dimerus*	Especie
d2157e6f2afae7aad7e2de93dbf622d4	*Oreochromis niloticus*	100	*Oreochromis niloticus*	Especie	*Orechromis niloticus*	98,4	*Oreochromis*	Género
c57c4508929739e9707fb9f8d5fc4c3d	*Oreochromis sp.*	100	*Oreochromis sp.*	Especie	*Orechromis niloticus*	100	*Orechromis niloticus*	Especie
b352c5e3f6a7a52d30139cc98bc90dc6	*Apteronotus albifrons*	99,0	*Apteronotus albifrons*	Especie	*Apterinotus aff. Albifrons*	99,7	*Apterinotus aff. Albifrons*	Especie
fffd00894c4c369bd0ce7f8bfeb97370	*Oreochromis esculentus*	98,9	*Oreochromis niloticus*	Especie	*Orechromis niloticus*	99,2	*Orechromis niloticus*	Especie
324a349b77863512b6955f8e1e6afba3	*Gymnotus sylvius*	97,9	*Gymnotidae*	Família	*Gymnotus inaequilabiatus*	100	*Gymnotus inaequilabiatus*	Especie
bb7ebd141f21e9d2ad6aa38830c5ef11	*Gymnotus sylvius*	97,9	*Gymnotidae*	Família	*Gymnotus pantanal*	100	*Gymnotus pantanal*	Especie
67949564685155851c148444e477634c	*Salminus brasiliensis*	97,4	*Bryconidae*	Família	*Piabarchus strmineus*	94,5	*Characiformes*	Orden
e08f4187935fdbd39f314c663b093c86	*Hypoptopoma incognitum*	96,4	*Siluriformes*	Orden	*Ancistrus sp.*	99,5	*Ancistrus sp.*	Especie
d8992e5ab4bf69f2148da3c49c2f04b7	*Curimata mivartii*	96,4	*Characiformes*	Orden	*Knodus moenkhausii*	94,8	*Characiformes*	Orden

265791db6288caba1ec835f1a2073295	*Prochilodus lineatus*	95,3	*Characiformes*	Orden	*Piabarchus strmineus*	100	*Piabarchus strmineus*	Especie
965cfbb34760a160d23ac0d545dd09cf	*Brycon henni*	93,8	*Characiformes*	Orden	*Piabarchus strmineus*	98,7	*Piabarchus*	Género
1bd80bac2ea23c4a11620e48a266bbea	*Lebiasina astrigata*	93,3	*Characiformes*	Orden	*Knodus moenkhausii*	100	*Knodus moenkhausii*	Especie
b9d9c4057873294e2d8f248a9ea55d1f	*Ageneiosus pardalis*	93,3	*Perciformes*	Orden	*Gymnogeophagus sp*	94,3	*Cichliformes*	Orden
d9e383025a40cf4c9f6d3a3e539716dd	*Prochilodus vimboides*	93,2	*Characiformes*	Orden	*Apareiodon affinis*	93,5	*Characiformes*	Orden
86c4e20f4a6f8c7359c1f2a0f04032b4	*Pseudoplatystoma reticulatum*	91,6	*Siluriformes*	Orden	*Rhamdia quelen*	100	*Rhamdia quelen*	Especie
ef42ccd286b10009267bc7941c0c6b3c	*Brycon henni*	91,1	*Characiformes*	Orden	*Serrapinus notomelas*	99,7	*Serrapinus notomelas*	Especie
af3ee695d51e06e5b7a8de77061bce32	*Pimelodus yuma*	91,0	*Siluriformes*	Orden	*Heptapterus mustelinus*	100	*Heptapterus mustelinus*	Especie
c6d5ae9acf17a29efbf60c069c4cb2ec	*Oligosarcus argenteus*	89,5	*Characiformes*	Orden	*Moenkhausia aff. Intermedia*	100	*Moenkhausia aff. Intermedia*	Especie
8ab7d833dfe54bb4ce1e590653675039	*Schistura sikmaiensis*	88,9	*Cypriniformes*	Orden	*Gymnotus sylvius*	94,1	*Gymnotiformes*	Orden
b353f5b575afab1a65586c018d55259b	*Astronotus ocellatus*	87,7	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla jaguariensis*	99,7	*Crenicichla jaguariensis*	Especie
0a56ee-afda3cfa19e982616864646dad	*Astronotus ocellatus*	87,2	*Perciformes*	Orden	*Crenicichla jaguariensis*	99,5	*Crenicichla jaguariensis*	Especie
6d246ef0c951bace0727cc2880377f5a	*Parexocoetus brachypterus*	85,5	*Beloniformes*	Orden	*Crenicichla britskii*	100	*Crenicichla britskii*	Especie

Aviso: Verde = especie; amarillo = género; naranja = familia; rojo = orden; blanco = inespecífico.

Fuente: de los autores, 2024.

Apéndice 4 – Lista de riqueza y abundancia relativa de espécies em cada punto de colecta

Punto	Especie	Abundancia		Punto	Especie	Abundancia	
		Tradicional	*eDNA*			Tradicional	*eDNA*
BR2	*Bryconamericus aff. iheriguii*	2,78%		**BR12**	*Ancistrus sp.*	5,75%	15,09%
	Heptapterus mustelinus	31,94%	1,23%		*Characidium aff. zebra*	6,90%	3,69%
	Characidium aff. zebra	6,94%	3,49%		*Cambeva davisi*	2,30%	2,45%
	Phalloceros harpagos	2,78%			*Psalidodon aff. paranae*	85,06%	59,87%
	Geophagus brasiliensis	1,39%			*Geophagus brasiliensis*		15,22%
	Psalidodon aff. paranae	50,00%	40,16%		*Rhamdia quelen*		2,38%
	Astyanax aff. lacustris	4,17%	32,48%		*Crenicichla britskii*		1,30%
	Oreochromis niloticus		4,63%	**BR13**	*Psalidodon sp.*	50,00%	19,08%
	Hypostomus strigaticeps		0,98%		*Characidium aff. zebra*	16,67%	
	Gymnotus sylvius		0,78%		*Rhamdia quelen*	16,67%	0,59%
	Ancistrus sp.		16,17%		*Hypostomus sp.*	16,67%	
	Rhamdia quelen		0,07%		*Astyanax lacustris*		12,48%
BR4	*Bryconamericus aff. iheringui*	62,96%			*Gymnotus silvyus*		5,67%
	Heptapterus mustelinus	25,93%	0,06%		*Hypostomus albopunctatus*		10,20%
	Geophagus brasiliensis	1,06%			*Gymnotus pantanal*		4,64%
	Hypostomus ancistroides	2,12%			*Ancistrus sp.*		29,02%

	Characidium aff. zebra	0,53%			*Pimelodella gracilis*		4,15%
	Pasalidodon aff. paranae	1,06%	80,40%		*Canbeva davisis*		7,31%
	Bryconamericus exodon	5,82%			*Crenicichla bristkii*		6,87%
	Hypostomus cf. iheringuii	0,53%		**BR14**	*Cambeva davisi*	77,78&	
	Oreochromis niloticus		16,13%		*Characidium agg. Zebra*	11,11%	
	Hypostomus albpunctatus		3,35%		*Phalloceros harpagos*	3,70%	
	Crenicichla britskii		0,06%		*Psalidodon aff. Paranae*	7,41%	92,01%
BR6	*Bryconamericus aff. iheringii*	20,35%			*Ancistrus sp.*		3,40%
	Heptapterus mustelinus	50,44%	0,10%		*Rhamdia quelen*		4,59%
	Ancistrus sp.	9,73%	28,21%	**BR15**	*Bryconamericus aff. iheringii*	31,63%	
	Geophagus brasiliensis	10,62%	54,19%		*Heptapterus mustelinus*	3,06%	
	Characidium aff. zebra	5,31%			*Ancistrus sp.*	19,39%	21,83%
	Hypostomus ancistroides	1,77%	0,05%		*Crenicichla jaguarensis*	4,08%	35,53%
	Rhamfia quelen	0,88%	1,01%		*Cambeva davisi*	36,73%	1,36%
	Psalidodon sp.	0,88%	14,15%		*Bryconamericus exodon*	2,04%	
	Astyanax lacustres		0,13%		*Rhamdia quelen*	1,02%	0,53%
	Creniciclha britsii		2,17%		*Pimelodella gracilis*	1,02%	
BR8	*Bryconamericus aff. iheringii*	43,69%			*Cetopsorhamdia iheringi*	1,02%	
	Heptapterus	37,86%	0,48&		*Geophagus*	1,02%	13,59%

	mustelinus				*brasiliensis*		
	Ancistrus sp	14,56%	9,09%		*Astyanax lacustres*		15,89%
	Bryconamericus exodon	0,97%			*Psalidodon aff. paranae* *Psalidodon aff. fasciatus*		2,94%
	Astyanax lacustris	1,94%	36,91%		*Gymnotus sylvius*		1,03%
	Rhamdia quelen	0,97%	0,38%		*Corydoras cf paleatus*		1,96%
	Gymnotus silvyus		2,83%		*Piarbacus stramineus*		0,38%
	Hypostomus alpopunctatus		0,60%		*Crenicichla britskii*		4,96%
	Psalidodon aff. paranae *Psalidodon aff. fasciatus*		1,43%	**BR16**	*Bryconamericus aff. iheringii*	11,36%	
	Psalidodon aff. fasciatus				*Heptapterus mustelinus*	15,91%	
	Oligosarcus paranaenses		0,45%		*Ancistrus sp.*	6,82%	15,52%
	Gymnotus inaequilabiatus		0,40%		*Rhamdia quelen*	2,27%	0,15%
	Hypostomus ancistroides		0,52%		*Cambeva davisi*	59,09%	24,38%
	Crenicichla britskii		1,20%		*Hypostomus ancistroides*	4,55%	59,96%
	Hoplias missioneira		4,35%	**BR17**	*Bryconamericus aff. iheringii*	2,86%	
	Crenicichla jaguarensis		4,40%		*Heptapterus mustelinus*	54,29%	0,06%
BR9	*Bryconamericus aff. iheringii*	41,99%			*Ancistrus sp.*	25,71%	6,96%
	Heptapterus mustelinus	0,26%	0,12%		*Bryconamericus exodon*	14,29%	

	Characidium aff. zebra	1,31%		*Rhamdia quelen*	2,86%	0,12%
	Corydoras cf. paleatus	5,77%	1,15%	*Astyanax lacustris*		54,21%
	Geophagus brasiliensis	1,57%	13,27%	*Gymnotus sylvius*		1,96%
	Hypostomus ancistroides	0,52%		*Cichlasoma cf. dimerus*		1,27%
	Rhamdia quelen	1,05%	0,27%	*Oreochromis niloticus*		3,60%
	Crenicichla jaguarensis	1,31%		*Apterionotus aff. albifrons*		3,00%
	Crenicichla britskii	0,52%	23,74%	*Gymnotus inaequilabiatus*		2,00%
	Pimelodella gracilis	0,79%		*Gymnotus pantanal*		0,42%
	Oligosarcus paranaenses	0,26%		*Piarbacus stramineus*		3,62%
	Astyanax lacustris	0,26%	0,95	*Knodus moenkhausii*		0,74%
	Psalidodon aff. paranae	44,36%	31,71%	*Serrapinus notomelas*		1,07%
	Gymnostus silvyus		1,76%	*Moenkhuasia aff. Intermedia*		0,27%
	Ancistrus sp.		25,71%	*Crenicichla jaguarensis*		8,59%
	Gymnogeophagus sp.		0,11%	*Crenicichla bristkii*		12,12%
	Cambeva davisi		1,22%			
BR11	*Bryconamericus aff. iheringii*	35,43%				
	Heptapterus mustelinus	24,41%	0,67%			
	Ancistrus sp.	12,60%	10,70%			
	Characidium aff.	2,36%				

zebra		
Crenicichla jaguarensis	3,15%	5,76%
Geophagus brasiliensis	12,60%	58,00%
Psalidodon aff. paranae	8,66%	9,41%
Hypostomus sp.	0,79%	
Gymnotus sylvius		6,35%
Cichlasoma cf. dimmeurs		5,48%
Hypostomus ancistroides		1,46%
Oligosarcus paranaenses		1,54%
Pimelodella gracilis		0,23%
Crenicichla bristkii		0,41%

Aviso: Negro: especies que solo fueron identificadas por el método tradicional, azúl: especies que solo se identificaron por eDNA metabarcoding, verde: especies identificadas por los dos métodos.

Fuente: de los autores, 2024.

Apéndice 5 – Fotos de la caracterización del paisaje de los arroyos muestreados

BR2

BR4

BR6

BR8

BR9

BR11

BR12

BR13

BR14

BR15

BR16

BR17

Fuente: de los autores, 2024.