

UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Diversidad filogenética de *Macrobrachium* spp. (Decapoda: Palaemonidae)
de ciertos afluentes en la cuenca alta del río Napo, Ecuador

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: LIZBETH YESSSENIA PAILLACHO TAIPE

TUTOR: Ph.D. RODRIGO EDUARDO ESPINOSA BARRERA

COTUTOR: Ph.D. HUGO MAURICIO ORTEGA ANDRADE

Tena-Ecuador

2025

Unidad de Titulación

Carrera Ingeniería en Biotecnología

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 14 de marzo de 2025

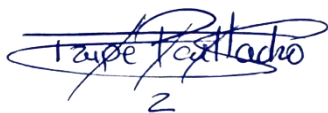
De mi consideración:

Yo, Lizbeth Yessenia Paillacho Taipe con documento de identidad 1550229577 declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en el presente documento, son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,



Lizbeth Yessenia Paillacho Taipe

CI: 1550229577

Unidad de Titulación

Carrera Ingeniería en Biotecnología

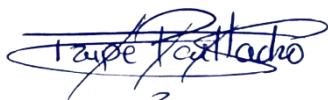
Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 14 de marzo de 2025

Yo, Lizbeth Yessenia Paillacho Taipe con documento de identidad 1550229577 en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Diversidad filogenética de *Macrobrachium* spp. (Decapoda: Palaemonidae) de ciertos afluentes en la cuenca alta del río Napo, Ecuador”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Atentamente,



Lizbeth Yessenia Paillacho Taipe
CI: 1550229577

Unidad de Titulación

Carrera Ingeniería en Biotecnología

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Tena, 14 de marzo de año

Certifico que el trabajo de titulación: “Diversidad filogenética de *Macrobrachium* spp. (Decapoda: Palaemonidae) de ciertos afluentes en la cuenca alta del río Napo, Ecuador”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de: artículo, fue realizado por Lizbeth Yessenia Paillacho Taipe, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Rodrigo Eduardo Espinosa Barrera
C.I: 1707458079

Hugo Mauricio Ortega Andrade
C.I: 1717270811

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que formaron parte de este proceso importante en mi vida, tanto en mi formación académica como personal. A mis padres, porque sin su esfuerzo y apoyo moral no habría podido culminar con mis estudios; pero sobre todo a mi madre, que creyó mucho más que yo en mis capacidades. A mis tutores, Rodrigo y Mauricio, que con sus conocimientos aportaron de manera muy significativa al aprendizaje de mi tema de tesis. A mi profe Walter, que me asesoró en los primeros pasos en el laboratorio de Biología molecular y hasta el final me brindó todo su apoyo, de verdad, muchas gracias. Al señor Carlos, técnico de TICs, que me ayudó con sus conocimientos para obtener una licencia en Geneious. A mis amigos, que siempre me alentaron a seguir adelante, a pesar de las adversidades académicas.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

PORTADA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD i

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL..... ii

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN iii

AGRADECIMIENTOS iv

TABLA DE CONTENIDO v

ÍNDICE DE TABLAS..... vi

ÍNDICE DE FIGURAS vii

ÍNDICE DE ANEXOS..... viii

RESUMEN ix

ABSTRACT..... x

NOMBRE DE LA REVISTA..... 1

INTRODUCCIÓN..... 2

MATERIALES Y MÉTODOS. 5

Área de estudio..... 5

Colecta e identificación de especímenes..... 6

Protocolos de laboratorio 6

Extracción de ADN y amplificación 6

Preparación de librerías y secuenciación 7

Métodos de análisis 8

Análisis bioinformático 8

Análisis filogenético 9

RESULTADOS..... 10

Filogenia 11

Distancia genética 12

DISCUSIÓN 14

CONCLUSIÓN..... 17

REFERENCIAS

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-4.	Secuencias del Genbank, localidades y marcadores asociados (COI y 16S rRNA) a las muestras	10
Tabla 2-4.	Porcentaje de divergencia genética para COI (p-distancia corregida), mínimos, máximos y desviación estándar (SD) entre grupos filogenéticos identificados.....	13
Tabla 3-4.	Porcentaje de divergencia genética para 16S rRNA (p-distancia corregida), mínimos, máximos y desviación estándar (SD) entre grupos filogenéticos identificados.....	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-3. Mapa de distribución geográfica de 12 localidades de muestreo en la cuenca alta del río Napo, nororiente del Ecuador	5
Figura 2-4. Árbol filogenético para el linaje de <i>Macrobrachium</i> spp. basado en el conjunto de datos concatenados de dos genes mitocondriales, Citocromo oxidasa I y 16S rRNA1	12

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A		23
Anexo B		23
Anexo C		23
Anexo D		24
Anexo E		24
Anexo F		24
Anexo G		24

RESUMEN

El estudio de la diversidad filogenética ayuda a la comprensión de los procesos evolutivos. Investigaciones sobre camarones del género *Macrobrachium* en Ecuador, hasta la fecha son limitados. Estos organismos, fundamentales en el equilibrio de ecosistemas de agua dulce, son un desafío para la taxonomía clásica, ya que su amplia distribución geográfica y una marcada plasticidad ecológica dificultan la comprensión de su evolución ecológica, producto de la competencia o disponibilidad de recursos. El objetivo principal de este estudio fue analizar la diversidad de *Macrobrachium* spp. mediante el estudio filogenético de camarones en la cuenca alta del río Napo. El diseño metodológico constó de (1) Área de estudio, con muestreos en 12 sitios durante dos épocas del año; (2) Protocolos de laboratorio, que incluyeron extracción, amplificación y secuenciación de ADN; (3) El análisis de datos incluyó procesamiento bioinformático y filogenético mediante un enfoque de máxima verosimilitud para la construcción de un árbol filogenético de genes concatenados COI y 16S. La filogenia reveló 3 linajes del área de muestreo genéticamente distintos y dos linajes correspondientes a *M. brasiliense* y *M. veredensis*, representados por altos valores de soporte nodal. La distancia genética para COI varió de 6.72 a 14.80% (p-D promedio= 10.68 ± 0.40) y en 16S varió de 2.39 a 10.14% (p-D promedio= 7.41 ± 0.21). Esto resaltó la presencia de posibles linajes con diversidad críptica relacionada particularmente con *Macrobrachium brasiliense*. La identificación de linajes genéticos únicos con posibles nuevas especies potenciales recalcó la importancia de acelerar el estudio taxonómico y biogeográfico, más aún en localidades clave de la cuenca alta del río Napo, que son el refugio de la biodiversidad acuática. Además, es fundamental promover programas de conservación en estas áreas vulnerables, que representa una de las zonas más biodiversas del mundo.

Palabras clave. Cuenca alta del río Napo, Diversidad críptica, *Macrobrachium*, sistemática filogenética.

ABSTRACT

The study of phylogenetic diversity helps to understand evolutionary processes. Research on shrimp of the genus *Macrobrachium* in Ecuador is limited to date. These organisms, fundamental in the equilibrium of freshwater ecosystems, are a challenge for classical taxonomy, since their wide geographic distribution and marked ecological plasticity make it difficult to understand their ecological evolution because of competition or availability of resources. The main objective of this study was to analyze the diversity of *Macrobrachium* spp. through the phylogenetic study of shrimp in the upper Napo River basin. The methodological design consisted of (1) Study area, with sampling at 12 sites during two seasons; (2) Laboratory protocols, which included DNA extraction, amplification and sequencing; (3) Data analysis included bioinformatic and phylogenetic processing using a maximum likelihood approach for the construction of a phylogenetic tree of COI and 16S concatenated genes. The phylogeny revealed 3 lineages from the sampling area genetically distinct and two lineages corresponding to *M. brasiliense* and *M. veredensis*, represented by high values of nodal support. The genetic distance for COI ranged from 6.72 to 14.80% (average p-D = 10.68 ± 0.40) and in 16S ranged from 2.39 to 10.14% (average p-D = 7.41 ± 0.21). This highlighted the presence of possible lineages with cryptic diversity related particularly to *Macrobrachium brasiliense*. The identification of unique genetic lineages with possible new potential species emphasized the importance of accelerating the taxonomic and biogeographic study, even more so in key localities of the upper Napo River basin, which are the refuge of aquatic biodiversity. In addition, it is essential to promote conservation programs in these vulnerable areas, which represent one of the most biodiverse areas in the world.

Keywords. Genetic distance, *Macrobrachium*, phylogenetic systematics, upper Napo River basin

NOMBRE DE LA REVISTA

Peerj Publishing

<https://peerj.com/about/author-instructions/>

Diversidad filogenética de *Macrobrachium* spp. (Decapoda: Palaemonidae) de ciertos afluentes en la cuenca alta del río Napo, Ecuador

Lizbeth Yessenia Paillacho Taipe¹

¹Grupo de investigación en Biogeografía y Ecología Espacial, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Parroquia Muyuna, Kilómetro 7 vía a Alto Tena, Ecuador

INTRODUCCIÓN

El género *Macrobrachium* (Bate, 1868) (Decapoda: Palaemonidae) representa una alta diversidad y plasticidad ecológica, con más de 100 especies cuyo rol es considerado como fundamental en el equilibrio de ecosistemas de agua dulce de regiones tropicales y subtropicales (Vega-Villasante et al., 2011; García-Guerrero et al., 2013; Bastidas, 2015; López-Sánchez, 2023; Rossi et al., 2020). En la región neotropical, se conocen al menos 57 especies del género *Macrobrachium* (Hayd & Anger, 2013), y está dentro de una de las familias más numerosas, Palaemonidae (83 especies) (De Grave et al., 2007). En países como Ecuador, Perú y Colombia, se ha documentado la presencia de 2, 8 y 20 especies de este género respetivamente, tanto en las cordilleras orientales como occidentales, lo que evidencia la riqueza y amplitud de su distribución en estas regiones, pero también la falta de estudios en Ecuador (García-Dávila & Magalhaes, 2003; Valencia & Campos, 2007; Campos, 2014; Zelada-Mázmela et al., 2025).

La región amazónica con una extensión de 5,800.000 Km² de área geográfica, se constituye como punto de acceso a la biodiversidad. Su vasta red de ríos y cuerpos de agua dulce integra un mosaico complejo de hábitats influenciados por pulsos de inundación y por el patrón de flujo de nutrientes (Junk et al., 1989) y favorece a la dinámica ecológica. En este contexto, la cuenca alta del río Napo en el nororiente del Ecuador, se conforma de humedales y alberga a las principales cuencas hidrográficas del país, representa una de las zonas más biodiversas del mundo en la región amazónica (Cisneros, 2003; Cabrera et al., 2023). De igual manera, la región Amazónica enfrenta presiones antrópicas como la contaminación química derivada de actividades extractivas (Capparelli et al., 2021; Galarza et al., 2021; Cabrera et al., 2023) y efectos del cambio climático (Aguirre et al., 2015) que podrían comprometer la supervivencia de especies que aún no han sido descritas formalmente (UICN, 2001). En la región amazónica del Ecuador, estudios actuales aun reportan a dos especies del género *Macrobrachium*, *M. brasiliense* y *M. amazonicum* (Rodríguez-Haro et al., 2024). Sin embargo, *Macrobrachium brasiliense* es la única de este género registrada formalmente

para el país según la Lista roja actualizada por De Grave, (2012). Aunque existen estudios de revisión bibliográfica sobre la biología y ecología de *Macrobrachium brasiliense* en el país (Bastidas, 2015), hasta la fecha no se han realizado investigaciones genéticas que detallen su diversidad filogenética.

Las especies biológicas son consideradas las unidades básicas para clasificar la biodiversidad y diseñar estrategias de manejo (Mayr, 1942). Gracias al estudio de De Queiroz (2007), se conoce el concepto unificado de especie, que define a las especies como linajes (serie antepasado-descendiente) metapoblacionales que evolucionan por separado, con una propiedad contingente, es decir, su evolución depende de factores evolutivos, ecológicos y genéticos. Bajo este contexto, la coexistencia de especies morfológicamente similares, pero genéticamente distintas (especies crípticas), representa un desafío para la taxonomía clásica dentro de este género, ya que dichas especies podrían pasar desapercibidas sin el uso de herramientas moleculares (Zelada-Mázmela, 2020). Este fenómeno, junto con una alta conservación entre especies puede ocasionar errores en la clasificación y por ende la subestimación de la diversidad biológica de la región (Pileggi & Mantelatto, 2010; Rossi & Mantelatto, 2013; Pileggi et al., 2014). Para superar estas limitaciones, los genes mitocondriales COI y 16S son marcadores comúnmente usados en la delimitación de especies, la identificación de especies, la detección de la diversidad críptica y el análisis de patrones filogenéticos dentro de las poblaciones (Murphy & Austin, 2005; Pérez-Losada et al., 2004; Vergamini et al., 2010).

La hipótesis de este estudio plantea la posibilidad de encontrar más de una especie de *Macrobrachium* en la región amazónica del Ecuador, específicamente en la cuenca alta del río Napo, un punto de acceso a la biodiversidad. Con el uso de la sistemática filogenética, se pretende analizar la diversidad de *Macrobrachium* spp. Para esto, (1) se analizó las variaciones genéticas entre poblaciones que se sospechan, corresponden a especies crípticas del género *Macrobrachium* spp, comunes en este género; (2) se reconstruyó una filogenia donde se identificó linajes que son ser independientes, siguiendo el concepto unificado de especie y finalmente, se evaluó la variabilidad

genética dentro del género. Este enfoque molecular es esencial en la validación taxonómica, y permite corroborar o refutar las hipótesis taxonómicas previas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Área de estudio

La colecta se realizó en 12 sitios de muestreo que cubren un gradiente altitudinal de 350 hasta los 1,019 metros sobre el nivel del mar, que abarcó aproximadamente de 35 km lineales de río en un mosaico de ambientes modificados por actividades antrópicas en la cuenca alta del río Napo (Cabrera et al., 2023; Capparelli et al., 2021; Galarza et al., 2021). Según, MECN (2009), se trata de un ecosistema piemontano andino, se ubican dentro del rango altitudinal de este estudio y representan una zona de transición entre las tierras bajas amazónicas y ecosistemas montanos. Además, presenta variabilidad en temperatura, humedad y composición vegetal, influenciada por la altitud, esto resalta en la dinámica y estructura de los ecosistemas acuáticos de la región (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2012) (Figura 1).

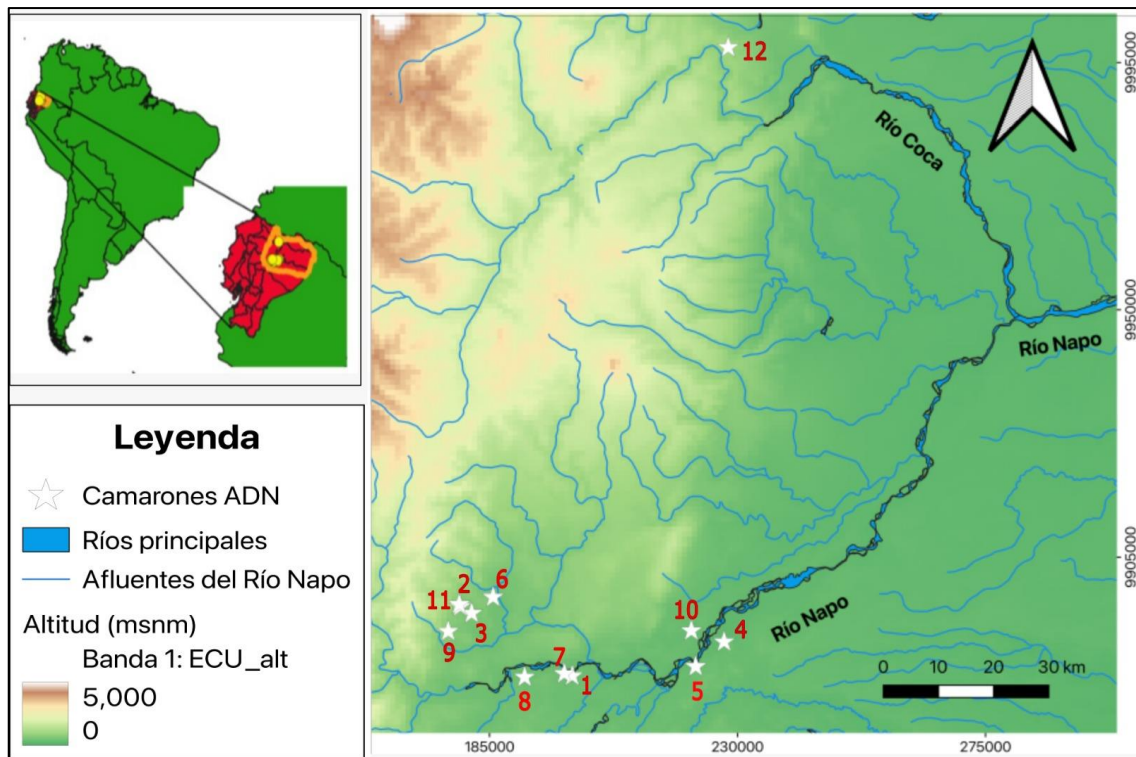


Figura 1. Mapa de distribución geográfica de 12 localidades de muestreo en la cuenca alta del río Napo, nororiente del Ecuador. El mapa contiene información de los límites de las áreas protegidas y los puntos de colecta, los sitios de muestreo se pueden visualizar en el Anexo A.

Colecta e identificación de especímenes

El Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE) aprobó el permiso para la recolecta de los especímenes con el permiso número MAAE-ARSFC-2021-1890 y accesos a recursos genéticos MAATE-DBI-CM-2021-0177. Los decápodos fueron recolectados una única vez en cada sitio y periodo, durante los meses de enero y marzo de 2022 para el período húmedo (promedio $\pm$ SD = 329.55 $\pm$ 186,73 mm³), y durante los meses de agosto y septiembre para el período seco (promedio $\pm$ SD = 220.28 $\pm$ 83.23 mm³) (Anexo A). La colecta fue realizada por dos personas durante 30 minutos en cada orilla, río arriba. Los especímenes de crustáceos se recogieron utilizando tamices circulares (60 cm de diámetro y una red de 2 mm). Los especímenes fueron introducidos en bolsas de agua a 4°C (Shock térmico) para ser transportados al laboratorio de Biología de Docencia 2 de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Los especímenes colectados fueron preservados en etanol al 96% para su conservación y almacenados a -20°C. Los especímenes fueron identificados hasta el nivel de familia y género de acuerdo con las claves dicotómicas de identificación para la región Amazónica de los países vecinos Colombia, Brasil y Perú (Campos, 2016; Garcia-Dávila & Magalhaes, 2003; Holthuis, 1951; Valencia & Campos, 2007). El sexo de cada individuo se distinguió por la presencia o ausencia del apéndice del segundo par de pleópodos (Bauer, 2004). Los especímenes analizados en este estudio pertenecientes a la colección de invertebrados del Laboratorio de Biología Integrativa de la Universidad Regional Amazónica Ikiam se encuentran en proceso de ser depositadas en las bases de datos del GenBank del NCBI.

Protocolos de laboratorio

Extracción de ADN y amplificación

Se realizó un corte transversal a partir del tercer pleópodo hacia la cola, para extraer el exoesqueleto y conservar el tejido en tubos de 2 mL, y se conservó el resto del espécimen en tubos de 15 mL con etanol al 96%. Antes de la trituración se colocó entre 15 a 20 mg de cada muestra en congelación a -80°C por 30 min. La extracción de ADN del tejido se realizó siguiendo el protocolo E.Z.N.A.[®] Insect DNA Kit (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, EE. UU) (Anexo B). La concentración y pureza de cada una fue medida a

partir de 2 µL de cada muestra mediante The NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La amplificación fue realizada mediante un Termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ HID de 96 pocillos, 0,2 ml (Thermo Scientific, EE.UU) con los marcadores degenerados, que contienen los adaptadores de Nanopore, del Citocromo oxidasa I (dgLCO-1490_F 5' TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC-GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG 3'; dgHCO-2198_R 5' ACTTGCTGTCGCTCTATCTTC-TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA 3') (Meyer & Paulay, 2005) y el gen 16S rRNA (16sSar-L_F 5' TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC-CGCCTGTTTATCAAAAACAT3'; 16sSbr-H_R 5' ACTTGCTGTCGCTCTATCTTC-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3') (Palumbi et al., 2002) provenientes del ADN mitocondrial.

La reacción final fue de 15 µL con 4.3 µL agua tipo 1, 7.5 µL de 1X FastGene Optima HotStar, 0.6 µL a 0.4 µM de marcadores, 2 µL a 50 ng/µL de ADN y 50 ng/µL de (BSA: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se usó el siguiente perfil térmico de las reacciones para COI: denaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, hibridación de 52°C por 45 seg y una extensión de 72°C por 45 seg, finalmente una extensión de 72°C por 5 min. Las condiciones del termociclador para el 16S rRNA fueron: 10 min a 95°C en denaturalización inicial, seguido de 37 ciclos de 94°C por 1 min, hibridación de 53°C por 1 min y una extensión de 72°C por 1 min, finalmente una extensión de 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en agarosa al 1.5% en una cámara de electroforesis de 50 mL horizontal configurada a 80 voltios, 400 mAMPs por 40 min y teñidos con SafeView (SafeView™ Classic DNA Stain). Los resultados se visualizaron en el Fotodocumentador ENDURO™ GDS Touch 1302 de Labnet International.

Preparación de librerías y secuenciación

Previo a la asignación de códigos de barra, los productos PCR fueron purificados utilizando AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc, Brea, California, EE.UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se asignó un código de barras de indexación, a cada muestra, utilizando el kit PCR Barcoding Expansion Pack 1-96 (EXP-PB096; ONT, Oxford, Reino Unido). El volumen final de reacción fue 12 µL compuesto por 0,5 µL de PCR

barcode, 5.5 µL de productos de PCR y 6 µL de LongAMP Taq 20 máster mix (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). EL perfil térmico que se usó fue 3 min a 65 °C, seguido de 15 ciclos de 16 seg a 95 °C, 15 seg a 60 °C y 30 seg a 65 °C, con una extensión final de 10 min a 65 °C. La reparación del ADN se realizó mediante el kit NEBNext (M6630), NEBNext Ultra II repair/dA- tailing module (E7546) y la ligación se realizó con el kit 1D (AQK.LSK109; ONT, Oxford, UK). Cada uno de estos pasos fue purificado con AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc, Brea, California, EE.UU.).

Previo a la secuenciación se cuantificó la librería utilizando Qubit (Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Para la secuenciación se realizó en un MinION Mk1C (ONT, Oxford, UK) y se utilizó una sola celda de flujo MinION (FLO-FL G001: ONT, Oxford, Reino Unido). Antes de cargar la librería, se preparó la celda de flujo utilizando el kit de cebado de celda de flujo (EXP.FLP002). El volumen final de carga fue de 30 µL con 30 µL de buffer de secuenciación (SQB); 15 µL de loading beads (LB) y 35 Fmoles de ADN en 12 µL.

Métodos de análisis

Análisis bioinformático

Los datos crudos de nanopore generados por el software MInKNOW fueron tratados empleando la imagen de Docker Desktop v4.26.0 (<https://docs.docker.com/>). Se descomprimieron los archivos con las lecturas asociadas de acuerdo con el código de barras asignado en el proceso de anclaje. Con el programa Porechop v0.2.4 (<https://github.com/rrwick/Porechop>), se eliminaron los adaptadores y regiones de baja calidad en el centro de las lecturas donde se detecten adaptadores internos. El programa NanoFilt v2.8.0 (<https://github.com/wdecoster/nanofilt>) eliminó el error con la filtración de lecturas con un umbral de 8. NanoPlot v1.43.0 (<https://github.com/wdecoster/NanoPlot>) generó gráficos que permitieron visualizar la calidad de las lecturas. Finalmente, generamos las secuencias consenso con los comandos del paquete NGSpeciesID v0.3.0 (<https://github.com/ksahlin/NGSpeciesID>) y

en conjunto con la herramienta Racon v1.4.20, obtuvimos el refinamiento final de las secuencias consenso (Vasiljevic et al., 2021).

Análisis filogenético

La identidad y afinidad filogenética de las secuencias se validaron previamente en la herramienta de búsqueda (BLASTn) mediante el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Siguiendo estudios previos (Rossi et al., 2020), se tomó como referencia a *Macrobrachium amazonicum* y *Macrobrachium borellii* para grupo externo. Las secuencias utilizadas en el análisis fueron descargadas de la base de datos GenBank el 6 de enero de 2025 (Tabla 1). Las secuencias fueron alineadas en el software Geneious Prime versión 2024.0.2 con el complemento de MAFFT v7. 490 con la configuración por defecto (<https://manual.geneious.com/en/latest/9-Alignments.html>), cada uno con los marcadores moleculares COI y 16S rRNA (Tabla 1). Mediante el software Mesquite versión 3.81 (<http://www.mesquiteproject.org/>) se concatenaron los alineamientos de cada gen para obtener una matriz final multilocus. Mediante el software online W-IQTREE v1.6.12, se estimaron los modelos evolutivos con la configuración automática (Nguyen et al., 2015); la reconstrucción filogenética se configuró con los métodos de máxima verosimilitud con los siguientes soportes estadísticos, la prueba de razón de verosimilitud aproximada de Shimodaira-Hasegawa [SH-aLRT] (Guindon et al., 2010) y la prueba Bayes aproximada [-aBayes] (Anisimova et al., 2011) con 1000 réplicas. La omisión de UltraFast Bootstrap (UFBoot), se debe a que SH-aLRT y a-Bayes han demostrado ser eficientes con un enfoque probabilístico para evaluar el soporte de los nodos en análisis filogenéticos y proporciona una estimación eficiente sin comprometer la viabilidad del análisis (Anisimova et al., 2011). El árbol filogenético fue visualizado mediante el software FigTree v1.4.4 y editado en Inkscape v1.3.2 (Inkscape project, 2024). Finalmente, las p-distancias (p-D) se obtuvieron cargando el alineamiento de cada gen en Geneious Prime v2024.0.2. Para generar la diversidad genética, en el software Excel, se calcularon las estadísticas descriptivas para cada grupo, esto incluyó la media, el valor máximo, el valor mínimo y la desviación estándar, lo que permitió evaluar la variabilidad y diversidad genética dentro y entre grupos.

RESULTADOS

Se generaron un total de 23 nuevas secuencias tanto de Citocromo oxidasa I, como de 16S rRNA provenientes de 12 sitios de la cuenca alta del río Napo, que incluyeron a COI (18 secuencias) y 16S rRNA (25 secuencias) obtenidas del GenBank. El análisis filogenético incluyó 23 especímenes de la cuenca alta del río Napo, 6 secuencias conocidas nominalmente como *Macrobrachium veredensis* y 17 de *Macrobrachium brasiliense* (Tabla 1). Mientras que, como grupo externo se incluyó a *Macrobrachium borellii* y a *Macrobrachium amazonicum*. En total se generó una matriz concatenada de 1,160 pb, de las cuales 657 pb fueron de COI y 503 pb de 16S rRNA (Anexo C). El modelo evolutivo que se ajustó a la matriz de datos moleculares fue HKY+F+G4 (Anexo D).

Tabla 1. Secuencias del Genbank, localidades y marcadores asociados (COI y 16S rRNA) a las muestras. *Macrobrachium amazonicum* y *Macrobrachium borellii* aparecen como grupo externo. *= secuencias pendientes por registrar en Genbank

Especímen	Localidad	COI	16S
<i>M_veredensis</i>	Sertão Veredas, MG	MN148915	MN149329
<i>M_veredensis</i>	Sertão Veredas, MG	MN148914	MN149330
<i>M_veredensis</i>	Sertão Veredas, MG	MN148907	MN149340
<i>M_veredensis</i>	Sertão Veredas, MG	MN148906	MN149341
<i>M_veredensis</i>	Sertão Veredas, MG	MN148908	MN149331
<i>M_veredensis</i>	Sertão Veredas, MG	MN148913	MN149342
<i>M_brasiliense</i>	Altinópolis, SP	MN148905	MN149321
<i>M_brasiliense</i>	Rio Bacajaí, PA	MN148910	MN149322
<i>M_brasiliense</i>	Rio Paranapanema, SP	MN148912	MN149323
<i>M_brasiliense</i>	Ponte Alta, TO	MN148904	MN149324
<i>M_brasiliense</i>	Ponte Alta, TO	MN148903	MN149325
<i>M_brasiliense</i>	Rio Bacajaí, PA	MN148911	MN149326
<i>M_brasiliense</i>	Rio Bacajaí, PA	MN148909	MN149327
<i>M_brasiliense</i>	Ribeirão Cascalheira, MT	MN148902	MN149328
<i>M_brasiliense</i>	Ribeirão Cascalheira, MT	MN148901	MN149332
<i>M_brasiliense</i>	Ribeirão Cascalheira, MT	MN148900	MN149333
<i>M_brasiliense</i>	Rio Xingú, PA	-	MN149334
<i>M_brasiliense</i>	Rio Bacajaí, PA	-	MN149335
<i>M_brasiliense</i>	Rio Bacajaí, PA	-	MN149336
<i>M_brasiliense</i>	Rio Bacajaí, PA	-	MN149337
<i>M_brasiliense</i>	Rio Paranapanema, SP	-	MN149338
<i>M_brasiliense</i>	Rio Paranapanema, SP	-	MN149339
<i>M_brasiliense</i>	Rio Paranapanema, SP	-	MN149343

<i>M_sp_03</i>	Vía Pano 3	*	*
<i>M_sp_05</i>	Finca Tío	*	*
<i>M_sp_06</i>	Finca Tío	*	*
<i>M_sp_08</i>	Pablito 1	*	*
<i>M_sp_09</i>	Pablito 1	*	*
<i>M_sp_11</i>	C6 Antenas	*	*
<i>M_sp_13</i>	Puente Atacapi	*	*
<i>M_sp_16</i>	Puente Atacapi	*	*
<i>M_sp_20</i>	Alto Huambuno 4	*	*
<i>M_sp_21</i>	Alto Huambuno 4	*	*
<i>M_sp_22</i>	Pablito 1	*	*
<i>M_sp_23</i>	Pablito 1	*	*
<i>M_sp_24</i>	Pablito 1	*	*
<i>M_sp_25</i>	Vía Chonta Punta 1	*	*
<i>M_sp_26</i>	Río Tiyuyacu	*	*
<i>M_sp_27</i>	Balzayacu	*	*
<i>M_sp_28</i>	Balzayacu	*	*
<i>M_sp_29</i>	Balzayacu	*	*
<i>M_sp_32</i>	Vía Chonta Punta 2	*	*
<i>M_sp_33</i>	San Jacinto	*	*
<i>M_sp_34</i>	Río Canuayacu	*	*
<i>M_sp_35</i>	Río Canuayacu	*	*
<i>M_sp_36</i>	Río Canuayacu	*	*
OUTGROUP	Localidad	COI	16S
<i>M_borellii</i>	Buenos Aires, Argentina	HM352480	HM352426
<i>M_amazonicum</i>	Santana-AP, Brasil	HM352486	HM352441

Filogenia

La filogenia resulta de cinco grupos bien soportados: El Grupo 1 incluye a 16 especímenes (SH-aLRT= 96/a-Bayes= 1), cuyo linaje hermano corresponde a *Macrobrachium brasiliense* (Grupo 2; 17 especímenes; SH-aLRT= 97.7/a-Bayes= 1) con altos valores de soporte (SH-aLRT= 100/a-Bayes= 1). El grupo 1 y 2 son hermanos del grupo 3 (2 especímenes; SH-aLRT= 91.3/a-Bayes= 0.998). Estos grupos forman un clado junto al grupo 4 (3 individuos; SH-aLRT= 97/a-Bayes= 1) con altos valores de soporte (SH-aLRT= 100/a-Bayes= 1). El grupo 5 está conformado por secuencias que corresponden a

Macrobrachium veredensis. Este último grupo mantiene una posición distal entre los demás grupos, con altos valores de soporte (SH-aLRT= 88.8/a-Bayes= 0.99) (Figura 2).

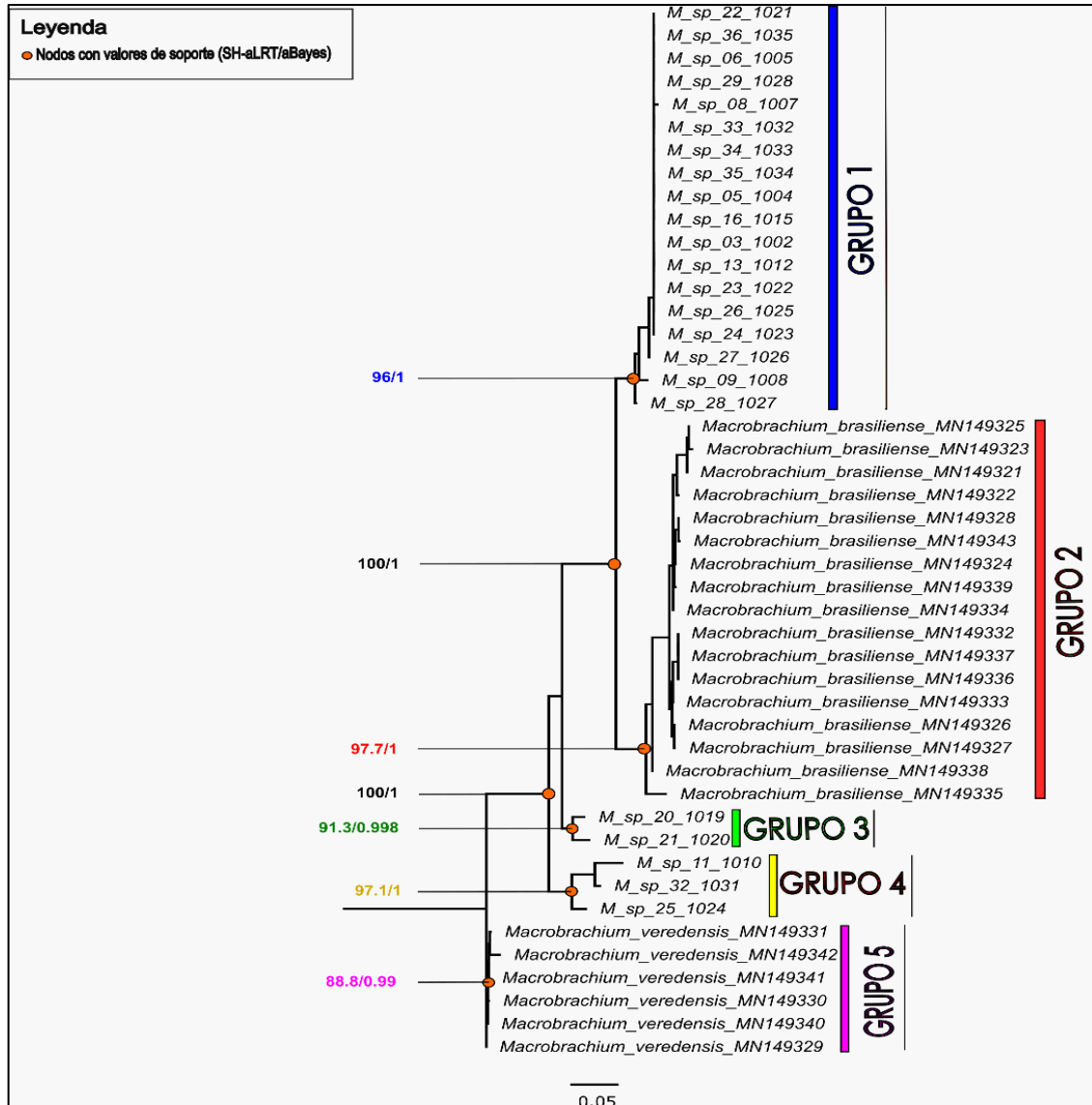


Figura 2. Árbol filogenético para el linaje de *Macrobrachium* spp. basado en el conjunto de datos concatenados de dos genes mitocondriales, Citocromo oxidasa I y 16S rRNA. Los nodos del árbol filogenético representan el soporte estadístico de SH-aLRT y a-Bayes. Las secuencias de los especímenes de la cuenca alta del río Napo corresponden filogenéticamente a los grupos 1, 3 y 4. La filogenia completa se encuentra en la Figura suplementaria (Anexo G).

Distancia genética

Observamos que la variabilidad genética en las secuencias de COI (Tabla 2), la distancia interespecífica osciló entre 6.718 a 14.802% (p-D promedio= 10.677 ± 0.404), mientras que la intraespecífica entre los especímenes del grupo 1 varió de 0 a 1.829% (p-D promedio= 0,408 ± 0.524); en el grupo 2 varió de 0 a 2.582% (p-D promedio= 1.626 ± 0.732); en el grupo 3 no hubo variación (p-D promedio= 2.29%); para el grupo 4 varió de

4.718 a 7.458% (p-D promedio= 5.682 ± 1.257) y en el grupo 5, varió de 0.172 a 1.205% (p-D promedio= 0.631 ± 0.278).

Para las secuencias de 16S rRNA (Tabla 3), la distancia interespecífica osciló entre 2 a 10.139% (p-D promedio= 7.414 ± 0.210), mientras que la intraespecífica entre los especímenes del grupo 1 varió de 0 a 5.567% (p-D promedio= 0.782 ± 1.500); en el grupo 2 varió de 0 a 3.579% (p-D promedio= 1.366 ± 0.776); en el grupo 3 no hubo variación (p-D promedio= 4.382%); para el grupo 4 varió de 1.793 a 4.582% (p-D promedio= 3.320 ± 1.153) y en el grupo 5, varió de 0 a 1.793% (p-D promedio= 0.637 ± 0.794) (Anexo E y F).

Tabla 2. Porcentaje de divergencia genética para COI (p-distancia corregida), mínimos, máximos y desviación estándar (SD) entre grupos filogenéticos identificados.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 2	7.745-9.466 (SD ± 0.386)			
Grupo 3	8.371-8.98 (SD ± 0.173)	9.294-10.327 (SD ± 0.305)		
Grupo 4	10.534-13.09 (SD ± 0.706)	12.048-14.802 (SD ± 0.915)	6.718-10.654 (SD ± 1.498)	
Grupo 5	11.36-12.392 (SD ± 0.186)	11.876-12.737 (SD ± 0.202)	9.466-10.327 (SD ± 0.246)	9.811-11.188 (SD ± 0.388)

Tabla 3. Porcentaje de divergencia genética para 16S rRNA (p-distancia corregida), mínimos, máximos y desviación estándar (SD) entre grupos filogenéticos identificados.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 2	3.386-5.765 (SD ± 0.336)			
Grupo 3	5.777-8.748 (SD ± 0.673)	7.675-8.946 (SD ± 0.313)		
Grupo 4	6.972-9.344 (SD ± 0.480)	8.946-10.139 (SD ± 0.293)	2.39-4.781 (SD ± 0.797)	
Grupo 5	4.97-9.543 (SD ± 0.985)	7.449-9.94 (SD ± 0.508)	6.163-8.151 (SD ± 0.552)	6.561-8.946 (SD ± 0.621)

DISCUSIÓN

Este estudio permitió identificar parte de la diversidad filogenética de *Macrobrachium* spp. (Decapoda: Palaemonidae) de ciertos afluentes en la cuenca alta del río Napo. El principal descubrimiento de esta investigación es la presencia de linajes diferenciados (Fig. 2) y una alta distancia genética entre grupos identificados (Tabla 2 y 3), lo que sugiere posibles nuevas especies. No obstante, su validación requiere estudios morfológicos y una revisión taxonómica formal (d'Angella & Hennig, 2024). El hecho de encontrar tres linajes con altos valores de distancia genética fue lo que esperaba, pero sobre todo que los especímenes se muestren emparentados con *M. brasiliense* o *M. amazonicum*, las únicas especies de este género reportadas actualmente para Ecuador (Rodríguez-Haro et al., 2024). De manera interesante, el alto grado de diversidad genética reportado entre los grupos es congruente con especies que comparten características similares en la región amazónica (Rossi & Mantelatto, 2013), lo que se ha determinado dentro del género *Macrobrachium* como especies crípticas (Rossi et al., 2020; Zelada-Mázmela, 2020). Si bien se observa que los grupos 1, 3 y 4 habitan en los mismos sitios, lo que podría indicar una posible diversificación simpátrica a partir de la separación de nichos ecológicos, antes que por la presencia de barreras geográficas en la cuenca alta del río Napo reportadas en (Cabrera et al., 2023) o la fragmentación de hábitats. La diferenciación de nichos ecológicos promueve el aislamiento de poblaciones en simpatría, lo que promueve con el tiempo la reducción del flujo génico favoreciendo a los procesos de diversificación (Bolnick & Fitzpatrick, 2007). En contraste, el estudio de Zelada-Mázmela (2020) sugiere que los eventos geológicos (barreras físicas que crean separación geográfica entre poblaciones), promueven a una diversificación alopátrica. Sin embargo, De Carvalho et al. (2013) argumenta que los eventos geológicos no han sido un factor determinante en la diversificación de especies amazónicas, basado en reportes de distancia genética relativamente bajas entre grupos. En nuestro estudio las distancias genéticas (d) fueron relativamente altas (Tabla 2 y 3) entre los grupos encontrados, a pesar de su distribución simpátrica.

La formación del primer clado (Grupo 1), provenientes de los sitios 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 11, y el Grupo 3 de la localidad 10, provienen de una misma red de río interconectados (Fig. 1). El primer clado, presentan distancias genéticas que oscilan dentro de un rango intraespecífico para ambos genes COI de 0 a 1.83% y 16S de 0 a 5.57%, resaltando su gran variabilidad genética como lo reporta Pileggi & Mantelatto (2010). Por otro lado, la alta variabilidad genética interespecífica en sitios diferentes presenta tres posibles escenarios, según Guerra et al. (2014) no se trata de la misma especie. El segundo clado (Grupo 2), es un linaje exclusivo de *M. brasiliense* proviene de localidades en Brasil (Tabla 1), cuyos valores de distancia genética (d) fueron, COI de 0 a 2.58% y 16S de 0 a 3.58%, más altos que los reportados en Rossi & Mantelatto (2013). El tercer clado (Grupo 3), presenta un valor de distancia genética para COI de 2.29% y 16S de 4.38%, según Pileggi & Mantelatto (2010) están dentro de la divergencia reportada y podría sugerir similitud entre especies.

El cuarto clado (Grupo 4), que corresponde a los sitios 12, 4 y 5, presenta valores de distancia genética (COI, 4.72 a 7.46% y 16S, 1.79 a 4.58%) presentados por encima de las reportadas en Pileggi & Mantelatto (2010). El último clado corresponde a *M. veredensis* (Grupo 5) provenientes de Brasil, con distancias genéticas intraespecíficas para COI de 0.17 a 1.21% y 16S de 0 a 1.79%, reportadas dentro del rango en Liu et al. (2007), rango establecido para individuos de las distintas localidades. Aunque inicialmente se hipotetizó que las poblaciones muestreadas pudieran corresponder a *M. veredensis* (Anexo G), el análisis genético reveló una distancia superior al 10%, umbral que sugieren diferenciación interespecífica (Liu et al., 2007; Acuña-Gómez, 2015), por lo tanto, se podría confirmar que no se trata de la especie nominal. La diversidad genética reportada resalta la importancia de incluir especímenes de la cuenca alta del río Napo, ya que según Hoorn et al. (2010), la Mata Atlántica y la cuenca amazónica, son ecosistemas fragmentados por millones de años debido a eventos geológicos y climáticos. Esto explica la divergencia genética observada en este grupo para la región.

Los análisis filogenéticos realizados con los genes mitocondriales COI y 16S evidenciaron un patrón congruente de la divergencia genética entre las secuencias procedentes de la

cuenca alta del río Napo. Se pudo identificar la formación de clados mayoritariamente con altos valores de soporte, que agruparon especímenes morfológicamente similares, pero con divergencias genéticas significativas (Tabla 2 y 3). Las matrices de distancias por grupos dieron a conocer variaciones que oscilaron desde los niveles más bajos (Grupo 1 y 3) hasta los más altos (Grupo 4), que se asemejan a los reportados usualmente en estudios similares para diferenciar especies de este género en particular (Rossi & Mantelatto, 2013).

Este estudio presentó un primer acercamiento a la diversidad genética del grupo analizado. En estudios posteriores se podría incorporar el análisis de datos morfológicos, biogeográficos y ecológicos que abarquen más a fondo la relación filogenética de las especies. Sin embargo, se presentaron ciertas limitaciones a considerar. El tamaño de la muestra podría influir al momento de interpretar patrones de divergencia genética, dado que un mayor número de especímenes representa de manera más precisa la diversidad (Roure et al., 2013). La falta de incorporación de análisis morfológicos junto a los moleculares limita la comprensión de los procesos evolutivos y taxonómicos (Zavalaga et al., 2024). Otro aspecto limitante fue la falta de registros previos sobre secuencias genéticas provenientes de las localidades muestreadas. Esto dificultó la comparación directa de nuestros hallazgos a la hora de discutir y validar las divergencias observadas.

La identificación de linajes genéticos únicos y posibles nuevas especies potenciales recalca la importancia de proteger los ecosistemas de la cuenca alta del río Napo, más aún en localidades clave, que son el refugio de la biodiversidad acuática (Pombosa et al., 2006). La falta de información genética, y los factores biológicos, ecológicos y ambientales deben considerarse a la hora de comprender procesos evolutivos de este género, sobre todo porque actualmente la zona de estudio se encuentra bajo fuertes presiones antrópicas (deforestación, conversión de ecosistemas, cambio climático, entre otras). Este estudio resalta la diversidad filogenética presente en la cuenca alta del río Napo en la región Amazónica, hallazgos importantes para construir la base taxonómica para delimitar las especies y su conservación en la región.

CONCLUSIÓN

Los resultados no permitieron probar la hipótesis sobre la presencia de distintas especies del género *Macrobrachium*. Sin embargo, los tres linajes dan un indicio a especies crípticas, particularmente asociado a *Macrobrachium brasiliense*. Debido a que se presentan como 3 grupos hermanos (1, 3 y 4) separados de las especies nominales incluidas en la filogenia (*M. brasiliense* y *M. veredensis*), se las identifica preliminarmente como posibles candidatos a nuevas especies. Dichos hallazgos aportan nuevos conocimientos sobre la biodiversidad del género *Macrobrachium* en la cuenca alta del río Napo en Ecuador, y resalta el uso de herramientas moleculares para su posterior delimitación taxonómica (Murphy & Austin, 2005; Pérez-Losada et al., 2004). Los grupos de esta región se separan en clados diferentes, pudiendo ser producto de posibles eventos de aislamiento ecológico en simpatria (Pileggi & Mantelatto, 2010). Estos patrones pueden estar relacionados con la presencia de diversidad críptica.

REFERENCIAS

- Acuña-Gómez, E. P. (2015). *Origen del desarrollo abreviado en el género Macrobrachium: Genética molecular, análisis filogenético y comparado* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/87440>
- Aguirre, N., Eguiguren, P., Maita, J., Coronel, V., Samaniego, N., Ojeda-Luna, T., & Aguirre-Mendoza, Z. (2015). *Vulnerabilidad al cambio climático en la Región Sur del Ecuador: Potenciales impactos en los ecosistemas, producción de biomasa y producción hídrica*. Universidad Nacional de Loja. https://www.researchgate.net/publication/298753988_Vulnerabilidad_al_cambio_climatico_en_la_Region_Sur_del_Ecuador_Potenciales_impactos_en_los_ecosistemas_produccion_de_biomasa_y_produccion_hidrica
- Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J. F., Dessimoz, C., & Gascuel, O. (2011). Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology*, 60(5), 685–699. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr041>
- Bastidas, A. (2015). Bioecología del camarón de río amazónico *Macrobrachium brasiliense*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/8720>
- Bolnick, D. I., & Fitzpatrick, B. M. (2007). Sympatric speciation: Models and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(Volume 38, 2007), 459–487. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.38.091206.095804/1>
- Cabrera, M., Capparelli, M. V., Ñacato-Ch, C., Moulatlet, G. M., López-Heras, I., Díaz González, M., Alvear-S, D., & Rico, A. (2023). Effects of intensive agriculture and urbanization on water quality and pesticide risks in freshwater ecosystems of the Ecuadorian Amazon. *Chemosphere*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139286>
- Campos, M. R. (2014). Nuevos registros de *Macrobrachium digueti* (Bouvier, 1895) para Colombia (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(147), 191. <https://doi.org/10.18257/RACCEFYN.64>
- Capparelli, M. V., Cabrera, M., Rico, A., Lucas-Solis, O., Alvear-S, D., Vasco, S., Galarza, E., Shiguango, Lady, Pinos-Velez, V., Pérez-González, A., Espinosa, R., & Moulatlet, G. M. (2021). An integrative approach to assess the environmental impacts of gold mining contamination in the amazon. *Toxics*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/toxics9070149>
- Cisneros, D. F. (2003). Herpetofauna de la Estación de Biodiversidad Tiputini, Amazonía Ecuatoriana: Ecología de una comunidad taxonómicamente diversa con comentarios sobre metodologías de inventario. *ECOLOGÍA Y AMBIENTE EN EL ECUADOR: Memorias Del I Congreso de Ecología y Ambiente, Ecuador País Megadiverso*. CD. Quito. Universidad San Francisco de Quito. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2340.5607>
- d'Angella, G., & Hennig, C. (2024). *Approaches to biological species delimitation based on genetic and spatial dissimilarity*. <https://arxiv.org/abs/2401.12126v4>

- De Carvalho, F. L., Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2013). Molecular data on the endemic prawn *Macrobrachium potiuna* 707 Molecular data raise the possibility of cryptic species in the Brazilian endemic prawn *Macrobrachium potiuna* (Decapoda, Palaemonidae). In *Lat. Am. J. Aquat. Res* (Vol. 41, Issue 4). <https://doi.org/103856/vol41-issue4-fulltext-7>
- De Grave, S. (2012). *Macrobrachium brasiliense*. In *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T197906A2504726.en>
- De Grave, S., Cai, Y., & Anker, A. (2007). Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. In *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 287–293). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7_31
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- Galarza, E., Cabrera, M., Moulatlet, G., & Espinosa, R. E. (2021). *Assessing the Quality of Amazon Aquatic Ecosystems with Multiple Lines of Evidence: The Case of the Northeast Andean Foothills of Ecuador Degradation of cotton strips in world biomes View project Ecological toxicity studies using crustacean models View project*. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03089-0>
- García-Dávila, C., & Magalhaes, C. (2003). Revisão taxonômica dos camarões de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Sergestidae) da Amazônia Peruana. *Acta Amazonica*, 33, 663–686. https://www.researchgate.net/publication/35442249_Revisao_taxonomica_dos_camaroes_de_agua_doce_Crustacea_Decapoda_Palaemonidae_Sergestidae_da_Amazonia_Peruana
- García-Guerrero, M. U., Becerril-Morales, F., Vega-Villasante, F., & Espinosa-Chaurand, L. D. (2013). Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4), 651–675. <https://doi.org/103856/vol41-issue4-fulltext-3>
- Guerra, A. L., Lima, A. V. B., Lucato Júnior, R. V., Chiachio, M. C., Taddei, F. G., & Castiglioni, L. (2014). Genetic variability and phylogenetic aspects in species of the genus *Macrobrachium*. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3646–3655. <https://doi.org/10.4238/2014.May.9.7>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hayd, L., & Anger, K. (2013). Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. *Revista de Biología Tropical*, 61(1), 39–57. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442013000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Hoorn, C., Wesselingh, F. P., ter Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C. L., Figueiredo, J. P., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F. R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T., & Antonelli, A. (2010). Amazonia Through Time: Andean Uplift,

- Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. *Science*, 330(6006), 927–931.
<https://doi.org/10.1126/science.1194585>
- Junk, W., Bayley, P., & Sparks, R. (1989). *The Flood Pulse Concept in River-Floodplain Systems: Vol. 106 (1)* (D. P. Dodge, Ed.). anadian special publication of fisheries and aquatic sciences.
https://www.researchgate.net/publication/256981220_The_Flood_Pulse_Concept_in_River-Floodplain_Systems
- Liu, M.-Y., Cai, Y.-X., & Tzeng, C.-S. (2007). Molecular Systematics of the Freshwater Prawn Genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) Inferred from mtDNA Sequences, with Emphasis on East Asian Species. *Zoological Studies*, 46(3), 278–284.
<https://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/46.3/272.pdf>
- López-Sánchez, B. (2023). *Rivers that flow into the sea: shrimp biodiversity and ecology*.
<https://www.researchgate.net/publication/371307871>
- Mayr, E. (1942). Phenomena of Geographic Variation. *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*, 33–70.
https://books.google.com/books/about/Systematics_and_the_Origin_of_Species_fr.html?hl=es&id=mAljnLp6r_MC
- MECN. (2009). *Ecosistemas del Distrito Metropolitano de Quito DMQ : MECN 2009* (S. Villamarín-Cortez & P. Mena-Valenzuela, Eds.). Dirección Metropolitana Ambiental, Fondo Ambiental.
https://inabio.biodiversidad.gob.ec/wp-content/uploads/2018/12/L_Guia_ecosistemas_DMQ-1.pdf
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2012). *Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador continental*. https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/09/LEYENDA-ECOSISTEMAS_ECUADOR_2.pdf
- Murphy, N. P., & Austin, C. M. (2005). Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zoologica Scripta*, 34(2), 187–197.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00185.x>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Palumbi, S., Martin Kewalo Marine Laboratory Sandra Romano, A., Owen McMillan Honolulu, W., Stice, L., & Grabowski, G. (2002). *Simple Fool's Guide THE SIMPLE FOOL'S GUIDE TO PCR*.
https://stacks.stanford.edu/file/druid:yh393jm6703/Simple_Fool%27s_Master%20PCR.pdf
- Pérez-Losada, M., Bond-Buckup, G., Jara, C. G., & Crandall, K. A. (2004). Molecular systematics and biogeography of the southern South American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura:

- Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. *Systematic Biology*, 53(5), 767–780. <https://doi.org/10.1080/10635150490522331>
- Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2010). Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematics*, 24(2), 194–208. <https://doi.org/10.1071/IS09043>
- Pileggi, L. G., Rossi, N., Wehrtmann, I. S., & Mantelatto, F. L. (2014). Molecular perspective on the American transisthmian species of *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae). *ZooKeys*, 457, 109–131. <https://doi.org/10.3897/zookeys.457.6818>
- Pombosa, R., Bourrel, L., Armijos, E., & Magat, P. (2006). *Monografía de la cuenca del río Napo en su parte ecuatoriana* [Monografía, Institut de recherche pour le développement]. https://www.researchgate.net/publication/320194622_Monografia_de_la_cuenca_del_rio_Napo_en_su_parte_ecuatoriana
- Rodríguez-Haro, C. E., Orellana-Guamán, A. I., Rodríguez-Haro, L. R., & Mena, E. (2024). Presencia del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarones nativos *Macrobrachium* sp. de la amazonía ecuatoriana. *Dominio de Las Ciencias*, 10(2), 238–249. <https://doi.org/10.23857/dc.v10i2.3799>
- Rossi, N., Magalhães, C., Mesquita, E. R., & Mantelatto, F. L. (2020). Uncovering a hidden diversity: A new species of freshwater shrimp *Macrobrachium* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) from Neotropical region (Brazil) revealed by morphological review and mitochondrial genes analyses. *Zootaxa*, 4732(1), 177–195. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4732.1.9>
- Rossi, N., & Mantelatto, F. L. (2013). Molecular Analysis of the Freshwater Prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) Supports the Existence of a Single Species throughout Its Distribution. *PLOS ONE*, 8(1), e54698. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0054698>
- Roure, B., Baurain, D., & Philippe, H. (2013). Impact of Missing Data on Phylogenies Inferred from Empirical Phylogenomic Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 30(1), 197–214. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss208>
- UICN. (2001). *Categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN, versión 3.1*. UICN. UICN-Unión Mundial para la Naturaleza. https://books.google.com/books/about/Categorías_y_criterios_de_la_Lista_Roja.html?hl=es&id=D5Odhr3qfZ8C
- Valencia, D. M., & Campos, M. R. (2007). Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombia. In *Zootaxa* (Issue 1456, pp. 1–44). Magnolia Press. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1456.1.1>
- Vasiljevic, N., Lim, M., Humble, E., Seah, A., Kratzer, A., Morf, N. V., Prost, S., & Ogden, R. (2021). Developmental validation of Oxford Nanopore Technology MinION sequence data and the NGSspeciesID bioinformatic pipeline for forensic genetic species identification. *Forensic Science International: Genetics*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102493>

- Vega-Villasante, F., Martínez-López, E. A., Espinosa-Chaurand, L. D., Cortés-Lara, M. C., Nolasco-Soria, H., & México, G. (2011). Crecimiento y supervivencia del langostino (*Macrobrachium tenellum*) en cultivos experimentales de verano y otoño en la costa tropical del Pacífico mexicano. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2), 581–588. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200017&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Vergamini, F. G., Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2010). Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contributions to Zoology*, 80(1), 67–83. <https://doi.org/10.1163/18759866-08001003>
- Zavalaga, F., Santamaría, J., & Siccha-Ramírez, R. (2024). Integración de análisis morfológicos y genéticos para identificación de invertebrados bento-demersales en el mar peruano. *Boletín Instituto Del Mar Del Perú*, 39(2), e404. <https://doi.org/10.53554/boletin.v39i2.404>
- Zelada-Mázmela, E. (2020). *Relaciones Filogenéticas a nivel molecular de especies del género Macrobrachium y estructura poblacional de M. inca y M. gallus de los ríos del Pacífico peruano*. [Tesis, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/8632>
- Zelada-Mázmela, E., Reyes-Flores, L. E., & Stefano-Beltrán, L. De. (2025). Phylogeny of *Macrobrachium* spp. (Decapoda, Pleocyemata) from Peru based on mitochondrial and nuclear data reveals a species complex comprising *M. digueti* (Bouvier, 1895) and *M. transandicum* Holthuis, 1950. *ZooKeys* 1224: 1-28, 1224, 1–28. <https://doi.org/10.3897/ZOOKEYS.1224.130537>

ANEXOS

Anexo A. Códigos de cada muestra colectada, sitio y número de muestreo, coordenadas y altitud, época de muestreo.

Código de muestra	N° Sitio	Sitio de muestreo	Coordenadas X	Coordenadas Y	Altitud	Época de muestreo
<i>M_sp_03</i>	9	Vía Pano 3	177503	9891499	723	Seca
<i>M_sp_05</i>	2	Finca Tío	179705	9896015	678	Seca
<i>M_sp_06</i>						Seca
<i>M_sp_08</i>						Seca
<i>M_sp_09</i>	11	Pablito 1	179496	9896408	680	Seca
<i>M_sp_22</i>						Húmeda
<i>M_sp_23</i>						Húmeda
<i>M_sp_24</i>						Húmeda
<i>M_sp_11</i>	12	C6 Antenas	228311	9997727	1019	Seca
<i>M_sp_13</i>	3	Puente Atacapi	181755	9894779	595	Seca
<i>M_sp_16</i>						Húmeda
<i>M_sp_20</i>	10	Alto Huambuno 4	221622	9891616	350	Húmeda
<i>M_sp_21</i>						Húmeda
<i>M_sp_25</i>	4	Vía Chonta Punta 1	227564	9889586	344	Húmeda
<i>M_sp_26</i>	7	Río Tiyuyacu	198569	9883819	605	Húmeda
<i>M_sp_27</i>	8	Balzayacu	191369	9883167	434	Húmeda
<i>M_sp_28</i>						Húmeda
<i>M_sp_29</i>						Húmeda
<i>M_sp_32</i>	5	Vía Chonta Punta 2	222407	9885097	535	Húmeda
<i>M_sp_33</i>	6	San Jacinto	185645	9897715	552	Húmeda
<i>M_sp_34</i>	1	Río Canuayacu	200009	9883401	405	Húmeda
<i>M_sp_35</i>						Húmeda
<i>M_sp_36</i>						Húmeda

Anexo B. Informe de extracción y cuantificación de ADN de camarones.

https://github.com/LizbethPaillacho/Metadatos_Diversidad_filogenetica_Macrobrachium_spp/blob/main/Anexo%20B%20Informe%20de%20extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20de%20camar%C3%B3n.docx.pdf

Anexo C. Matriz de similitud y Distancia p corregida, concatenada de los genes mitocondriales COI y 16S rRNA.

[https://github.com/LizbethPaillacho/Metadatos_Diversidad_filogenetica_Macrobrachium_spp/blob/main/Anexo%20C%20\(Matriz%20de%20similitud%20y%20distancia%20gen%C3%A9tica\).csv](https://github.com/LizbethPaillacho/Metadatos_Diversidad_filogenetica_Macrobrachium_spp/blob/main/Anexo%20C%20(Matriz%20de%20similitud%20y%20distancia%20gen%C3%A9tica).csv)

Anexo D. Lista de los mejores modelos evolutivos estimados en W-IQTREE. Las siguientes siglas significan lo siguiente, AIC, w-AIC: Puntuaciones y ponderaciones del criterio de información de Akaike. AICc, w-AICc: Puntuaciones y ponderaciones AIC corregidas. BIC, w-BIC: Puntuaciones y ponderaciones del criterio de información bayesiano.

ID	Modelo	LogL	AIC	w-AIC	AICc	w-AICc	BIC	w-BIC
1	HKY+F+G4	-2063.8109	4139.6218	+ 0.0000	4139.7912	+ 0.0000	4164.9454	+ 0.0000
2	K2P	-750.5928	1505.1855	+ 0.0000	1505.2411	+ 0.0000	1511.9637	+ 0.0000
3	TN+F	-750.5928	1259.8085	+ 0.0000	1260.2047	+ 0.0000	1280.1429	+ 0.0000
4	TN+F+G4	-1677.7424	3369.4848	+ 0.0000	3370.0156	+ 0.0000	3393.2083	+ 0.0000

Anexo E. Matriz de similitud y distancia-p corregida para Citocromo Oxidasa I.

https://github.com/LizbethPaillacho/Metadatos_Diversidad_filogenetica_Macrobrachium_spp/blob/main/Anexo%20E%20COI_Matrix_p.csv

Anexo F. Matriz de similitud y distancia-p corregida para 16S rRNA.

https://github.com/LizbethPaillacho/Metadatos_Diversidad_filogenetica_Macrobrachium_spp/blob/main/Anexo%20F%2016S_Matrix_p.csv

Anexo G. Árbol filogenético a partir de una matriz genética concatenada de los genes mitocondriales COI y 16S rRNA.

https://github.com/LizbethPaillacho/Metadatos_Diversidad_filogenetica_Macrobrachium_spp/blob/main/Anexo%20G%20MrBayes_codon_Macrobrachium_FULL.nex.treefile.svg