

Revisión de las técnicas para la caracterización de la dieta en mamíferos dulceacuícolas, ¿Hacen uso de herramientas moleculares?

Sara Naydu González Niño*

*Estudiante de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia. e-mail
sara_gonzalez@javeriana.edu.co

Resumen

Conocer la composición de la dieta de los mamíferos dulceacuícolas es relevante para identificar su papel dentro de la red de procesos que establecen el funcionamiento de los ecosistemas. Son variados los mecanismos para la caracterización de la dieta, sin embargo se desconoce la implementación de herramientas moleculares en estos. Para conocerla, se revisaron ochenta y tres documentos en una ventana de treinta años, registrados en una base de datos y en un buscador académico. Se encontró que veinticuatro de treinta y nueve especies presentan publicaciones al respecto. Las especies con mayor número de estudios fueron las amenazadas, emblemáticas y/o carismáticas, en contraste las menos estudiadas fueron algunas endémicas y con diferentes categorías de conservación. De las categorías utilizadas para analizar la caracterización de la dieta, la de post ingestión fue la más utilizada. Se propone la inclusión de dos subcategorías y una técnica con el fin de permitir la clasificación de todos los mecanismos utilizados. Finalmente se recomienda ampliar el uso de herramientas moleculares debido a su precisión al identificar a nivel de especie los componentes de la dieta.

Palabras clave: dieta, mamíferos dulceacuícolas, herramientas moleculares, caracterización, técnicas, categorías.

Introducción

Los mamíferos dulceacuícolas son vertebrados que presentan adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permite permanecer parcial o completamente en los cuerpos de agua durante su vida (Bourlière, F. 1964., Anderson, C. & Valenzuela, A. 2011., Reidenberg, J. 2007.). Las nutrias, manatíes, delfines de río, hipopótamos, castores, ornitorrincos, entre otros;

habitan en los ecosistemas de agua dulce, debido a que, representan fuente de alimento, protección y agua potable. La distribución geográfica de estos organismos es bastante amplia (Trujillo, F. et al. 2004) ya que se encuentran en todos los continentes excepto en la Antártida, muchas de las especies tienen un amplio rango de distribución pero para otras es restringido a ciertas zonas (Verón, G. Patterson, B. & Reeves, R. 2008), a su vez gran parte de estas especies de mamíferos dulceacuícolas a nivel mundial se encuentran en algún grado de amenaza para su conservación por las diferentes actividades antrópicas en los ecosistemas donde habitan (Tabla1).

Por otra parte, algunos de estos mamíferos actúan como controladores de poblaciones de las plantas herbáceas, por ejemplo, los hipopótamos consumen gramíneas del género *Panicum*, o especies como *Urochloa mosambicensis*, *Hemarthria altissima*, *Cynodon dactylon* entre otras (Chritz, K. et al. 2016., Scotcher, J. Stewart, D. & Breen, C. 1978) que crecen alrededor de los lagos, manteniendo los espejos de agua abiertos y libres de vegetación, a la vez sus heces sirven como una valiosa fuente de nutrientes para el lago (Borchert, J. 2018., Verón, G. Patterson, B. & Reeves, R. 2008). Sin embargo, el conocimiento sobre aspectos ecológicos de estos mamíferos sigue siendo desigual con respecto a los mamíferos terrestres y esto puede estar relacionado con que el 80% de las especies a nivel mundial viven en ecosistemas terrestres, el 15% en ecosistemas marinos y solo el 5% restante en agua dulce (Zhang, S. 2017), además los mamíferos terrestres son más conspicuos y más fáciles de detectar en comparación a los acuáticos (Macisaac, H., Tedla, R. & Ricciardi, A. 2011); esto se puede ver reflejado en pocos estudios en ciertas especies de mamíferos dulceacuícolas, en temas como la caracterización de la dieta.

Es de gran importancia conocer e identificar la dieta de estos mamíferos, ya que desempeñan papeles determinantes en los ecosistemas que habitan (Martínez, L. & Mandujano, S. 1995). Los mamíferos acuáticos incluyen especies herbívoras y granívoras que regulan la presencia de plantas, dispersan semillas, influyendo de manera importante en la dinámica de las comunidades vegetales (Martínez, L. & Mandujano, S. 1995); y a su vez, estas especies son fuente básica de alimento para algunos mamíferos carnívoros (orden Carnivora), que además de encontrarse en los niveles más altos de la cadena trófica, suelen ser indicadores de la calidad del ecosistema (Lavariega, M. et al. 2012., Schneider, M. 2009).

Para la identificación de la dieta de los mamíferos dulceacuícolas, históricamente se han realizado una amplia gama de diferentes enfoques. La primer técnica usada para mamíferos herbívoros, desde la década de 1930, ha sido la evaluación de forrajeo de vegetación en un área

determinada teniendo en cuenta la cantidad y condiciones previas de la vegetación, para posteriormente observar la removida por aquellos mamíferos (Pechanec, J. & Pickford, G. 1937., Stoddart, L. 1935); más adelante en los años 1950 - 1970 aproximadamente, para la caracterización de la dieta de los mamíferos se usó como técnica la observación directa del comportamiento de alimentación del animal (Smith, A. & Hubbard, R. 1954., Bjugstad et al. 1970) y con el transcurso del tiempo en la década de 1980 se empezó a usar métodos de análisis de contenido estomacal (Hyslop, E. 1980), análisis macro y microhistológico en heces fecales (Jaksic, F. et al. 1980., Johnson, M. 1983., Emmons, L. 1987).

Posteriormente la variedad de técnicas, fueron agrupadas en tres grandes categorías por Litvaitis et al. (1996): 1. Observacionales: consiste en observar directamente al animal y ver que está consumiendo. 2. Sitios de alimentación: se mide o estima la cantidad de vegetación que es consumida por los mamíferos herbívoros. 3. Post ingestión: identifica lo que consume un animal, analizando ya sea los restos en el tracto digestivo, en las heces fecales o en las regurgitaciones (Gallina, S. 2011). Esta agrupación fue tomada como base de esta revisión ya que acoge las distintas técnicas que se han utilizado históricamente para la caracterización de la dieta, con el fin de realizar un recorrido general de las múltiples alternativas para realizar este tipo de estudios en mamíferos dulceacuícolas.

Existe una herramienta que aunque no fue considerada por Litvaitis et al. 1996, está tomando auge en la caracterización de la dieta de mamíferos terrestres (Espunya, M., Rivera, L. & Bartolomé, J. 2014., Symondson, W. 2002., Grattarola, F. 2015), marinos (Deagle, B. et al. 2005., Marshall, H. et al. 2009., Brassea, E. 2016) y recientemente en los dulceacuícolas (Gillet, F. et al. 2015., Hawlitschek, O. et al. 2018). Esta consiste en el análisis molecular de los contenidos estomacales o de las heces mediante el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN, al ser una molécula estable, puede mantenerse en condiciones ambientales extremas, como es el caso de la maquinaria enzimática del tracto gastrointestinal en mamíferos y permanecer en los restos de tejidos de presas consumidas, al menos de forma fragmentada (Schubbert, R., Lettmann, C. & Doerfler, W. 1993).

Si con las técnicas basadas en morfología existen sesgos, como en el análisis macro y microhistológico de muestras fecales o la observación directa de presas en el momento de alimentación, la implementación de técnicas moleculares genera resultados con mayor exactitud en términos de resolución taxonómica de las especies presa que componen la dieta

de un organismo (Bowen, W. & Iverson, S. 2013., O'Rorke, R., Lavery, S. & Jeffs, A. 2011). Además, es un método no invasivo para los mamíferos en estudio (Brassea, E. 2016). Aunque esta técnica también presenta desafíos en cuanto a la diferenciación entre el material genético de la presa y del depredador, se ha descrito que esto es posible realizando la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) que permite amplificar pequeñas regiones específicas del ADN de organismos presa (Bowen, W. & Iverson, S. 2013) y se excluye la amplificación del material genético del depredador descartando de las secuencias obtenidas, aquella que sea la del depredador, tomando como referencia por ejemplo secuencias de GenBank. Otro reto consiste en la extracción del ADN, ya que se trabaja con muestras degradadas o difíciles, pero según estudios realizados por Ortega, J. et al. (2018) la mejor forma de resolver dicho inconveniente radica en el uso de Kits de extracción comerciales o a partir de la extracción inorgánica con la resina Cheelex®, los cuales facilitan la extracción a partir de este tipo de muestras.

El objetivo de esta revisión es identificar en artículos científicos, tesis y libros especializados, las categorías o grupos de técnicas propuestas por Litvaitis et al. 1996 que han permitido caracterizar la dieta de mamíferos dulceacuícolas en una ventana de observación de 30 años (1990 a 2020). Paralelamente, estimar la influencia de las herramientas moleculares en dichas categorías y/o técnicas. Para tales propósitos se identificará cuál ha sido la categoría más utilizada en estudios de caracterización de dieta en mamíferos dulceacuícolas a nivel mundial, determinar las especies que más se han estudiado en cuanto a la caracterización de la dieta. Por último, se propone la utilización del marcador molecular citocromo oxidasa I (COI) como una herramienta, sencilla y económica para la caracterización de la dieta de dos especies de nutrias neotropicales con distribución en Colombia.

A partir de esta revisión se quiere responder a la pregunta de investigación: ¿Hacen uso de herramientas moleculares para la caracterización de la dieta de mamíferos dulceacuícolas? y de esta forma presentar las ventajas de usar dichas herramientas para este tipo de estudios ecológicos.

Materiales y métodos

1. Recopilación de información:

Se utilizó la base de datos de la biblioteca Alfonso Borrero Cabal de la Pontificia Universidad Javeriana y el buscador Google académico para: (1) Elaborar un listado de especies de mamíferos de agua dulce a nivel mundial utilizando las palabras clave: mamíferos + dulceacuícolas/ mammals + freshwater, (2) buscar documentos científicos (artículos, artículos

de revisión, libros y tesis) relacionados con las técnicas utilizadas en la caracterización de la dieta, usando las palabras clave: técnicas + identificación + dieta + mamíferos + acuáticos, (3) realizar una tercera búsqueda con las siguientes palabras clave: dieta + mamíferos + acuáticos + molecular, para identificar trabajos que utilizaron herramientas moleculares. Con el fin de ampliar y confirmar la información obtenida hasta ese momento, se repitieron las búsquedas, pero esta vez por cada especie de mamíferos dulceacuícolas. Estas búsquedas se realizaron en tres meses (desde Marzo hasta Junio de 2020) y la información obtenida se organizó en una tabla por especie de mamífero dulceacuícola y tipo de documento científico encontrado y revisado. En un cuadro sinóptico se clasificó la bibliografía encontrada por especie según las categorías propuestas por Litvaitis et al. (1996), para la caracterización de la dieta de mamíferos dulceacuícolas. Mediante un diagrama tipo pastel se estimó la frecuencia de uso de cada una de las categorías propuestas por Litvaitis et al. (1996). De la misma forma, se obtuvo la frecuencia en la que se han utilizado las diferentes categorías por cada especie dulceacuícola.

2. Ejemplo de caso

Para la propuesta de la utilización del marcador molecular citocromo oxidasa 1 (COI) en el ejemplo de caracterización de la dieta de dos nutrias del neotrópico *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) y *Pteronura brasiliensis* (Zimmermann, 1780) distribuidas en la orinoquía de Colombia, se realizó una búsqueda inicial de las especies ícticas de la cuenca del río Orinoco que se reportan como componentes de la dieta de las nutrias *L. longicaudis* y *P. brasiliensis*. Se descargaron el día 20 de marzo de 2020 de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) en formato FASTA, las secuencias para el marcador COI de las especies de peces encontradas en la bibliografía. Estas secuencias fueron alineadas manualmente y también con el programa MEGA X (www.megasoftware.net/) en el cual, al momento de subir las secuencias genéticas se generó su respectiva matriz en la que no se realizó la traducción de nucleótidos a aminoácidos por lo tanto no se determinaron si habían codones de parada en la matriz, con esta posteriormente se alineo usando el software MUSCLE y así rectificar que el alineamiento manual no tuviera errores, dicho alineamiento no mostro diferencias con respecto al realizado manualmente; este procedimiento se realizó para construir finalmente un árbol de distancias Kimura 2 parámetros (Kimura, M. 1980) con el mismo programa MEGA, el modelo de sustitución usado para este árbol fue Kimura 2 parámetros, ya que este tiene en cuenta la probabilidad de observar las transiciones y transversiones de los nucleótidos de las secuencias genéticas.

Para las especies ícticas que no contaron con secuencias de COI en GenBank, se solicitaron muestras de tejido al laboratorio de Ictiología de la Pontificia Universidad Javeriana, con el fin de obtener secuencias genéticas en el Laboratorio de Genética de poblaciones molecular y Biología evolutiva (LGPMBE) de la misma institución y generar así una base de datos genética de referencia para dieta íctica de las dos especies de nutrias. Para cada muestra de tejido se realizó extracción de ADN con resina Chelex 100® y el ADN fue cuantificado en NanoDrop. Se realizó la amplificación del gen COI con los cebadores (COIfish R1: 5'ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA 3' y COIfish F1: 5'TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC 3') mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El mix de la PCR se preparó de acuerdo con el protocolo estandarizado en el LGPMBE, así: para un volumen final de 25 µL, se adicionaron 2.5 µL de buffer 10x, 3 µL de MgCl₂ 3mM, 1 µL de dNTPs 1mM, 1 µL de GenTaq® (Laboratorio de Genética y Biología Molecular LTDA.) y 1µL de cada cebador (8pmol). El volumen de ADN extraído se ajustó para alcanzar una concentración de 50 ng y el volumen de agua MiliQ varió según la muestra. Para las condiciones de amplificación se siguieron las propuestas por Bertasi, B et al. (2015) y Pinedo-Castro, M (2017). Los productos de la PCR fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 30 minutos en una cámara Midecell Thermo a 100 voltios (400 A), utilizando como agente intercalante bromuro de etidio a 10 mg/mL según el protocolo estandarizado del LGPMBE. Los amplificados se visualizaron en un transiluminador Vilver Loumat comprobando que las bandas presentaran un peso aproximado a 655 pares de bases (pb). El peso de las bandas del producto amplificado se estimó utilizando el marcador de peso molecular Quick-Load® Purple 2-log DNA Ladder de BioLabs. En los casos donde las bandas fueron tenues o no se observaron se procedió a depositar el gel en un recipiente con buffer TBE 0.5 X y bromuro de etidio (10 mg/mL). Este recipiente se cubrió con aluminio y se ubicó sobre un agitador orbital de Thermo Fisher Scientific por 15 minutos a temperatura ambiente. Pasados los 15 minutos se observó el gel nuevamente en el transiluminador. Se tomó foto de las bandas en los geles como evidencia de la amplificación.

El propósito de realizar este ejemplo de caso y finalmente obtener el árbol de distancias genéticas fue tener una base de datos de referencia de las especies de peces que hacen parte de la dieta de las dos nutrias analizadas, usando las secuencias ícticas encontradas en GenBank y aquellas procesadas en el laboratorio, para de esta forma al analizar con herramientas moleculares mediante el marcador COI, las muestras fecales de las nutrias y al obtener secuencias genéticas de los organismos consumidos sería más sencillo compararlas con el árbol construido e identificar a que especie íctica pertenece la secuencia hallada.

Nota: Por razones de la pandemia de covid-19 el procesamiento de muestras en el laboratorio se realizó hasta la amplificación.

Resultados

1. Recopilación de la información:

A través de la búsqueda bibliográfica se identificaron las especies de mamíferos dulceacuícolas a nivel mundial. En el listado, además de la especie, se encuentra la clasificación taxonómica a nivel de género y familia, el nombre común, la distribución geográfica, el estado de conservación, el tipo y número de documentos científicos sobre la caracterización de dieta (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de especies de mamíferos dulceacuícolas a nivel global y tipo de bibliografía encontrada sobre la identificación de dieta. El * hace referencia a especies emblemáticas o a familias cuyas especies se consideran carismáticas.

Orden	Familia	Especie	Nombre común (Distribución geográfica)	Estado de conservación	Artículo	Capítulo de libro	Tesis	Total documentos por especie
Cetartiodactyla	Hippopotamidae	<i>Hippopotamus amphibius</i> *	Hipopótamo (África meridional)	Vulnerable (VU)	9	-	-	9
		<i>Choeropsis liberiensis</i>	Hipopótamo pigmeo (Centro-occidente de África)	En peligro de extinción (EN)	-	-	1	1
	Iniidae	<i>Inia araguaiaensis</i>	Delfín del Río Araguaia (Brasil)	No encontrado	-	-	-	-
		<i>Inia geoffrensis</i>	Delfín rosado (Norte y centro de Suramérica)	En peligro de extinción (EN)	-	-	-	-
		<i>Lipotes vexillifer</i>	Baiji (Centro oriente de China)	En peligro crítico (CR)	-	-	-	-
	Delphinidae	<i>Sotalia fluviatilis</i>	Norte y centro de Suramérica	Datos insuficientes (DD)	3	-	-	3
		<i>Sotalia guianensis</i>	Delfín costero (Centro y Suramérica)	Casi amenazado (NT)	7	-	-	7
	Platinistidae	<i>Platanista gangetica</i>	Delfín del Ganges	En peligro de extinción	1	-	-	1

				(EN)				
Carnivora	Mustelidae*	<i>Aonyx capensis</i>	Nutria africana sin garras (África meridional)	Casi amenazado (NT)	1	-	-	1
		<i>Aonyx cinereus</i>	Nutria enana (Sur oriente de Asia)	Vulnerable (VU)	1	-	-	1
		<i>Hydriectis maculicollis</i>	Nutria de cuello manchado (África meridional)	Casi amenazado (NT)	-	-	-	-
		<i>Lontra canadensis</i>	Nutria de río del norte (América del norte)	Preocupación menor (LC)	2	-	-	2
		<i>Lontra longicaudis</i>	Lobito de río (Centro y Suramérica)	Casi amenazado (NT)	5	-	1	6
		<i>Lontra provocax</i>	Huillín (Sur de Chile y Argentina)	En peligro de extinción (EN)	-	-	-	-
		<i>Lutra lutra</i>	Nutria paleártica (Eurasia)	Casi amenazado (NT)	6	-	-	6
		<i>Lutra sumatrana</i>	Nutria de Sumatra (Sur oriente de Asia)	No encontrado	-	-	-	-
		<i>Lutrogale perspicillata</i>	Nutria lisa (centro sur de Asia)	Vulnerable (VU)	-	-	-	-
		<i>Mustela lutreola</i>	Visón europeo (Europa y Rusia europea)	En peligro crítico (CR)	1	-	-	1
		<i>Neovison vison</i>	Visón americano (América del norte)	Preocupación menor (LC)	7	-	-	7
		<i>Pteronura brasiliensis</i>	Nutria gigante (Norte y centro de Suramérica)	En peligro de extinción (EN)	5	-	-	5
			Phocidae	<i>Pusa sibirica</i>	Nerpa (Lago Baikai, Rusia)	Preocupación menor (LC)	-	-
Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Chironectes minimus</i>	Yapok (Centro y Suramérica)	Preocupación menor (LC)	2	1	-	3
Eulipotyphla	Talpidae	<i>Galemys pyrenaicus</i>	Desmán de los pirineos (Norte de Europa)	Vulnerable (VU)	5	-	-	5
		<i>Desmana moschata</i>	Desmán ruso (Rusia)	En peligro de extinción (EN)	-	-	-	-

Insectivora	Tenrecidae	<i>Limnogale mergulus</i>	Tenrec acuático (Madagascar)	Vulnerable (VU)	1	-	-	1
		<i>Oryzorictes hova</i>	Tenrec de arroz (Madagascar)	Preocupación menor (LC)	-	-	-	-
		<i>Oryzorictes tetradactylus</i>	Tenrec de arroz de cuatro dedos	Datos insuficientes (DD)	-	-	-	-
		<i>Potamogale velox</i>	Musaraña nutria (Centro occidente de África)	Preocupación menor (LC)	2	-	-	2
Monotremata	Ornithorhynchidae	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Ornitorrinco (Oriente de Australia)	Casi amenazado (NT)	2	-	-	2
Rodentia	Castoridae	<i>Castor canadensis</i>	Castor americano (América del norte)	Preocupación menor (LC)	1	-	-	1
		<i>Castor fiber</i>	Castor europeo (Eurasia)	Preocupación menor (LC)	-	-	-	-
	Caviidae	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capibara o Chigüiro (Suramérica)	Preocupación menor (LC)	4	1	-	5
	Cricetidae	<i>Ondatra zibethicus</i>	Rata almizclera (América del norte)	Preocupación menor (LC)	1	-	-	1
		<i>Arvicola sapidus</i>	Rata de agua (Europa)	Vulnerable (VU)	-	-	-	-
		<i>Arvicola amphibius</i>	Rata topera	Preocupación menor (LC)	1	-	2	3
	Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	Nutria roedora (Centro y sur de Suramérica)	Preocupación menor (LC)	7	-	-	7
	Sirenia	Trichechidae	<i>Trichechus manatus</i>	Manatí americano (Sur de Norteamérica, Centroamérica y Norte de Suramérica)	Vulnerable (VU)	3	-	-
<i>Trichechus inunguis</i>			Manatí del Amazonas (Cuenca del Río Amazonas)	Vulnerable (VU)	-	-	-	-
<i>Trichechus senegalensis</i>			Manatí africano (Centro occidente de África)	Vulnerable (VU)	-	-	-	-
Total documentos por tipo					77	2	4	83

De las 39 especies de mamíferos dulceacuícolas encontradas en la búsqueda bibliográfica, en 24 se encontraron estudios sobre la caracterización de la dieta, siendo los artículos científicos (77) los documentos más utilizados para su divulgación, seguidos de los capítulos de libro (2) y las tesis (4). En cuanto a las especies, a la que se le ha realizado más estudios es: *Hippopotamus amphibius* con 9 documentos, por otra parte, los que menos estudios tienen reportados son: *Platanista gangetica*, *Aonyx capensis*, *Choeropsis liberiensis*, *Aonyx cinereus*, *Mustela lutreola*, *Limnogale mergulus*, *Castor canadensis* y *Ondatra zibethicus* con un documento cada uno.

Se revisó la metodología utilizada en cada uno de los documentos encontrados en la búsqueda bibliográfica, con el fin de separarlos según Litvaitis et al. (1996) en las siguientes categorías: observacionales, sitios de alimentación y post ingestión. En cada una de estas, se identificaron un grupo de técnicas y las especies en las cuales fueron reportadas (Figura 1).

En la categoría observacional se incluyen trabajos que reportan el uso de la técnica de observación directa, la cual consiste en la identificación o reconocimiento visual de las presas o plantas que sirven de alimento al individuo (mamífero dulceacuícola) durante el momento de la alimentación. En la búsqueda bibliográfica, esta técnica fue utilizada en 8 especies diferentes: *L. lutra* (Kruuk, H. & Moorhous, A. 1990), *O. anatinus* (Kruuk, H. 1993), *H. hydrochaeris* (Felix, G. et al. 2014., Aldana, J. et al. 2007), *O. zibethicus* (Ching, C. & Chih-tang, Y. 1990), *M. coypus* (Guichón, M. et al. 2003), *H. amphibius* (Dudley, J. 1998., Dibloni, T. et al. 2012., Mekonen, S. & Hailemariam, B. 2016), *P. brasiliensis* (Carter, S. et al. 1999) y *Ch. liberiensis* (Conway, A. 2013). La segunda técnica, que se reporta en la categoría observacional es la de observación de la anatomía del cráneo, la cual se ha usado en *H. hydrochaeris* (Samuels, J. 2009), *Potamogale velox* (Grossnickle, D. 2020) y *Chironectes minimus* (Medellín, R. 1991). En esta técnica, la dieta se identifica por el reconocimiento de la morfometría geométrica y lineal del cráneo (mandíbula) y dentadura (Samuels, J. 2009). Por otro lado, en la categoría de sitios de alimentación se incluye solamente la técnica de rastros y mordidas en la vegetación, ya que en los documentos científicos revisados se reporta solo el uso de esta técnica, aunque existen otras como la medición de ramas consumidas (Gallina, S. 2011). Esta técnica solo se reporta en herbívoros, por lo que se aprecia en el hábitat propio de la especie en el que se detectan rastros como pisoteos demarcando el camino (Lewison, R. & Carter, J. 2004) y a su vez, mordiscos en la vegetación circundante, por lo cual se deduce que

tales especies vegetales hacen parte de la dieta de estos organismos. La categoría de sitios de alimentación se reportó en *Trichechus manatus* (Gómez, A. 2010), *H. hydrochaeris* (Arteaga, M. & Jorgenson, J. 2007), *M. coypus* (Borgnia, M. Galante, M. & Cassini, M. 2014) y *H. amphibius* (Lewison, R. & Carter, J. 2004) (Figura 1).

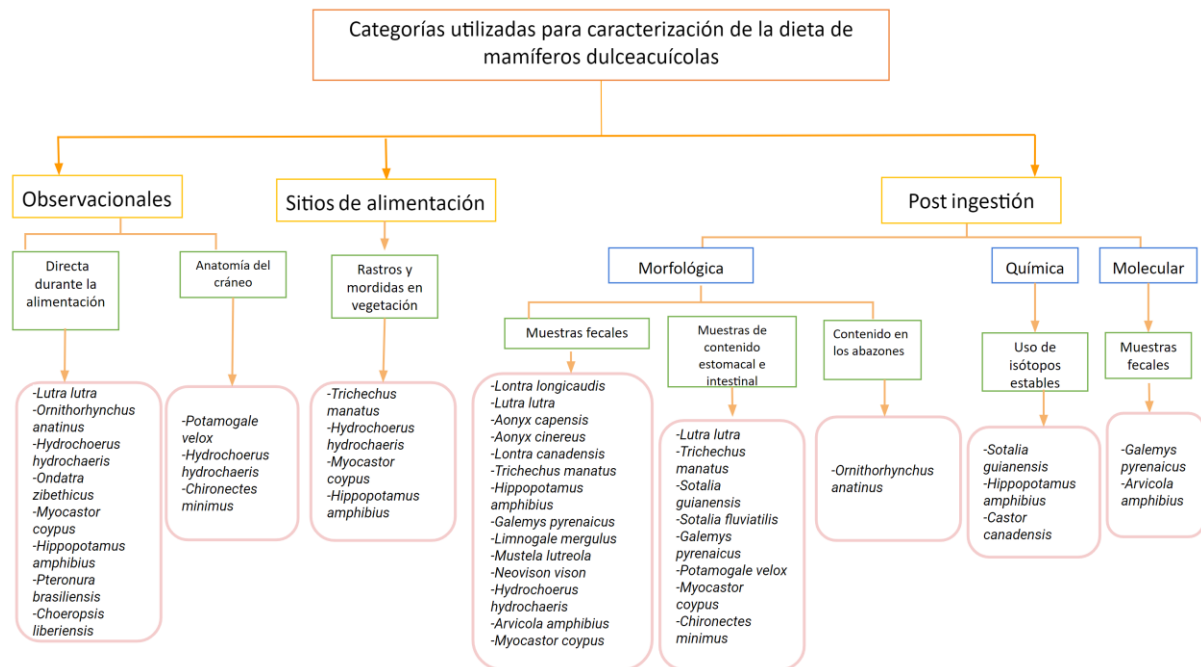


Figura 1. Categorías para la caracterización de la dieta de mamíferos dulceacuícolas según Litvaitis et al. (1996). Los recuadros azules corresponden a las subcategorías, las cuales hacen referencia a la forma de identificación de las muestras de la categoría post ingestión y los verdes corresponden a las técnicas.

Finalmente, la categoría más amplia es la de post ingestión, ya que abarca el mayor número de técnicas reportadas para la caracterización de la dieta (Figura 1). Dentro de estas se encuentra la subcategoría de identificación morfológica de la a partir de muestras que ya han sido digeridas por el animal y que provienen de heces fecales, contenido estomacal o intestinal y contenido en los abazones, para el caso de los ornitorrincos (Faragher, R. et al. 1979). Dentro de la categoría de post ingestión se reporta el uso de herramientas moleculares para la caracterización de dieta, principalmente mediante el uso de muestras fecales, donde solo se han estudiado dos especies de mamíferos dulceacuícolas: *Arvicola amphibius* en la que se utilizó *metabarcoding* (identificación de múltiples especies mediante secuenciación de alto rendimiento utilizando el ADN total o típicamente degradado extraído de una muestra

ambiental) (Pavan, A., , Gireesh, P. & Lakra, W. 2015) y el intrón plastídico *trnL* (determina la presencia de poaceas) como cebador (Østby, N. 2019) y en *Galemys pyrenaicus* los análisis se realizaron mediante metabarcoding (Gillet, F. et al. 2015., Hawlitschek, O. et al 2018). En las especies *Lontra longicaudis* (Cruz, F. et al. 2017., Monroy, O. & Mundo, V. 2009., Chemes, S., et al. 2010., Mayor, R. & Botero, A. 2010., Spínola, R. & Vaughan, C. 1995., Quintela, F. et al. 2008., Silva, R., Weber, F. & Zuanon, J. 2013), *L. lutra* (Lanszki, J. et al. 1999., Britton, R., Pegg, J. & Shepherd, J. 2006., Kruuk, H. & Moorhous, A. 1990., García, P. et al. 2009., Acera, F., Morales, J. & Lizana, M. 2004), *A. capensis* (Andarge, E., Wube, T. & Balakrishnan, M. 2017), *A. cinereus* (Kruuk, H. et al. 1994), *Lontra canadensis* (Roberts, N. et al. 2008., Fretueg, G. 2015), *T. manatus* (Flores, L. et al. 2013., Castelblanco, N. et al. 2009), *H. amphibius* (Michez, A. et al. 2013., Noirard, C. et al. 2004), *Limnogale mergulus* (Benstead, J., Barnes, K. & Pringle, C. 2001), *M. lutreola* (Maran, T. et al. 1998), *N. vison* (Salo, P. et al. 2010., Krawczyk, A., Bogdziewicz, M. & Czyż, M. 2013., Schuttler, E., Cárcamo, J. & Rozzi, R. 2008., Brzeziński, M. et al. 2018., Zschille, J. et al. 2013., Melero, Y. et al. 2008), *H. hydrochaeris* (Jean, A. et al. 2011) y *M. coypus* (Borgnia, M., Galante, M. & Cassini, M. 2000., Abbas, A. 1991., Colares, I. et al. 2010., Galende, G., Troncoso, A. & Lambertucci, S. 2012., Wilsey, B., Chabreck, R. & Linscombe, R. 1991) se reporta el análisis fecal común, mediante identificación morfológica (Figura 1).

Las muestras de contenido estomacal o intestinal se obtienen directamente del animal muerto. En esta técnica se identifican las presas encontradas en el contenido estomacal e intestinal, mediante análisis morfológicos, este análisis se ha reportado en: *L. lutra* (Britton, R., Pegg, J. & Shepherd, J. 2006), *T. manatus* (Castelblanco, N. et al. 2009), *S. guianensis* (Rupil, G. et al. 2018., Madeira, A. & Siciliano, S. 2007., Daura, F., Wedekin, L. & Simoes, P. 2011., Moreira, X. 2012., Madeira, A. & Arruda, R. 2014., Cremer, M., Pinheiro, P. & Simoes, P. 2012), *Sotalia fluviatilis* (Beltrán, S., & De Araujo, M. 2006., Madeira, A. & Arruda, R. 2004., Livio, M. et al. 2003), *G. pyrenaicus* (Gosálbez, J. & Castien, E. 1994., Santamarina, J. 1993), *P. velox* (Chivers, D. & Hladik, C. 1980), *M. coypus* (Wilsey, B., Chabreck, R. & Linscombe, R. 1991) y *C. minimus* (Benck, J., Zanin, C. & Zanella, N. 2019). La técnica de toma de contenido de abazones ha sido reportada para el ornitorrinco (*O. anatinus*), ya que guarda su alimento en esas estructuras. Al extraer el alimento encontrado allí se realiza identificación morfológica (McLachlan, T., Dickman, C. & Grant, T. 2010). Dentro de la misma categoría se encuentra una técnica que basándose en el análisis químico de isótopos estables hace la identificación de los alimentos consumidos, este se basa en las proporciones de los isótopos de Carbono y de

Nitrógeno en los diferentes tejidos de la presa (Gestal, N. 2016) obtenidos de muestras fecales, contenido estomacal o restos encontrados en el esmalte dental (Renaud, J. et al. 2005., Silva, F. et al. 2013). Esta técnica se ha reportado en *S. guianensis* (Silva, F. et al. 2013), *H. amphibius* (Chritz, K. et al. 2016., Boisserie, J. et al. 2005., Grey, J. & Harper, D. 2002) y *C. canadensis* (Milligan, H. & Humphries, M. 2010) (Figura 1).

En cuanto a la frecuencia de uso de las técnicas agrupadas en tres grandes categorías según Litvaitis et al. (1996), la categoría de post ingestión fue la más frecuente, siendo usada en 64 de los 83 estudios encontrados en la bibliografía (77%), seguida de la observacional con el 17% correspondiente a 14 documentos y, los sitios de alimentación con el 6% correspondiente a 5 estudios. Vale resaltar que dentro de la categoría de post ingestión se incluye el análisis molecular, específicamente en la técnica de análisis de muestras fecales (Figura 2).

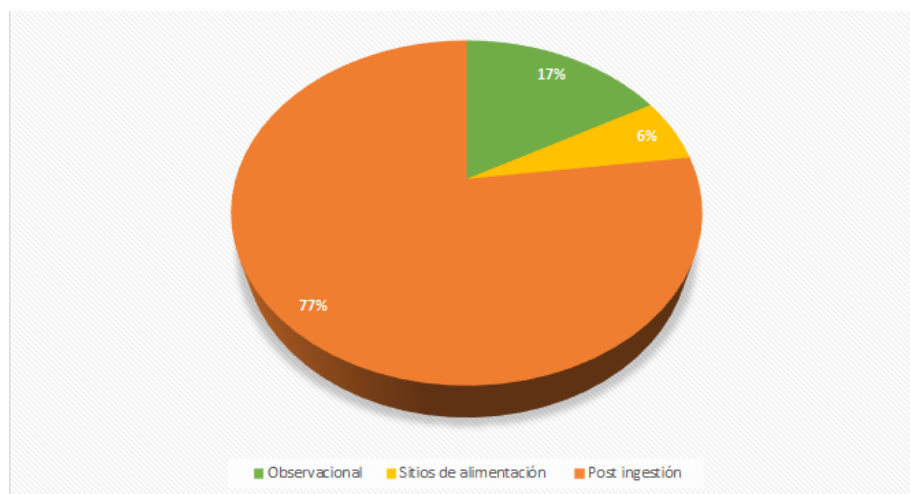


Figura 2. Frecuencia del uso de las técnicas para la caracterización de la dieta en mamíferos dulceacuícolas agrupadas en las categorías observacional, sitios de alimentación y post ingestión

Los resultados de la búsqueda de documentos científicos en los que se identifica la categoría más utilizada para la caracterización de la dieta de los mamíferos de agua dulce a nivel mundial, indicaron que la mayoría de estudios se han realizado en el hipopótamo *H. amphibius* para el cual se registraron 9 documentos científicos de los cuales 3 utilizaron la categoría observacional, 1 la de los sitios de alimentación y 5 la de post ingestión (Figura 3).

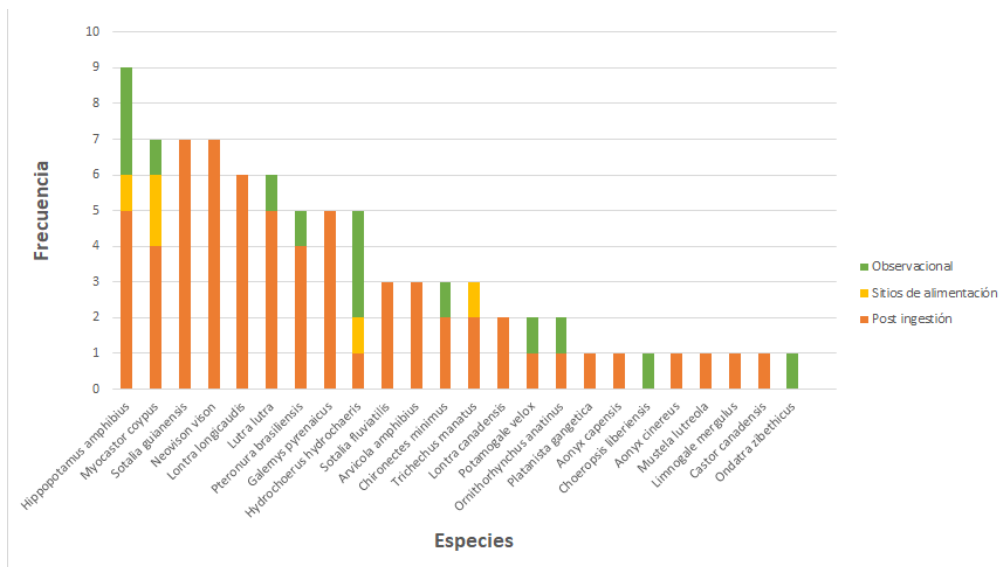


Figura 3. Frecuencia del uso de las categorías de técnicas para el análisis de la dieta en mamíferos dulceacuícolas por especie.

La segunda frecuencia en términos de número de documentos la presentan las especies *M. coypus*, *S. guianensis* y *N. vison* con 7 documentos, sin embargo, solamente *M. coypus* ha sido estudiado mediante las tres categorías (1 observacional, 2 por sitio de alimentación y 4 por post ingestión), las otras dos especies solo han sido analizadas por la técnica de post ingestión. Con 6 estudios se encuentran las especies *L. longicaudis* y *L. lutra*. La primera de ellas solamente con estudios post ingestión y la segunda con 5 post ingestión y 1 observacional. *P. brasiliensis*, *G. pyrenaicus* e *H. hydrochaeris* cuentan con 5 trabajos cada una. *G. pyrenaicus* ha sido analizada solo por la categoría de post ingestión, mientras que *P. brasiliensis* lo ha sido por post ingestión (4 documentos) y observacional (1 documento) y *H. hydrochaeris* por 3 de tipo observacional, 1 por sitios de alimentación y 1 post ingestión. *S. fluviatilis*, *A. amphibius*, *Ch. minimus* y *T. manatus* presentan 3 estudios cada uno. Las dos primeras especies han sido estudiadas solamente por post ingestión, la tercera por post ingestión (2) y observacional (1) y la cuarta por post ingestión (2) y sitios de alimentación (1). Seguidamente 2 estudios para *L. canadensis*, *P. velox* y *O. anatinus*. La primera especie con estudios de post ingestión y las otras dos con estudios de post ingestión (1) y observacional (1). Finalmente, con 1 estudio que representa la menor frecuencia para las especies *P. gangetica*, *A. cinereus*, *M. lutreola*, *L. mergulus*, *C. canadensis*, *O. zibethicus* y *Ch. liberiensis*, de las cuales las dos últimas han sido analizadas por técnicas observacionales, las demás por técnicas de post ingestión. De las 39 especies de mamíferos dulceacuícolas reportadas, 15 de ellas no presentan estudios asociados a su dieta.

Ejemplo de caso

Para la propuesta de la utilización del marcador molecular COI en el ejemplo de caracterización de la dieta de dos nutrias del neotrópico *L. longicaudis* y *P. brasiliensis*, se encontraron 61 especies ícticas registradas como componentes de la dieta de estas dos nutrias (Gonzalez, I. & Castillo, O. 2012., Becerra, M., Mallea, H. & Van, P. 2015., Chemes, S., Giraudo, A. & Gil, G. 2010., Rosas, F., Zuanon, J. & Carter, S. 2006). Cuarenta y uno (41) secuencias del gen COI correspondientes a cada una de las especies fueron descargadas del GenBank (código acceso Genbank), de estas especies solo se descargó una secuencia por cada una y se solicitaron 20 muestras de tejido correspondientes a 11 especies al Laboratorio de Ictiología de la Pontificia Universidad Javeriana, las 9 especies de peces faltantes no se encontraron sus secuencias genéticas, ni muestras de tejido disponibles en la colección (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de peces que conforman la dieta de las nutrias *Pteronura brasiliensis* y *Lontra longicaudis* en la cuenca del Orinoco. (-) Indica que no existe la secuencia en GenBank o que no hay tejido en la colección. (*) Especies en las cuales la secuencia corresponde al género.

Espece íctica	Código acceso GenBank	Código Tejido	Espece íctica	Código acceso GenBank	Código Tejido
<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	MH507424.1		<i>Hoplias malabaricus</i>	MH411351.1	
<i>Acestrorhynchus falcirostris</i>	MH411383.1		<i>Knodus alpha</i>	MH003217.1	
<i>Acestrorhynchus heterolepis</i>	-		<i>Knodus breviceps</i>	MH003220.1	
<i>Acestrorhynchus microlepis</i>	-	-	<i>Knodus cinarucense</i>	-	-
<i>Acestrorhynchus minimus</i>	-	-	<i>Knodus cismontanus</i>	-	-
<i>Acestrorhynchus nasutus</i>	MH507427.1	-	<i>Knodus deuterodonoides</i>	-	-
<i>Aequidens sp.</i>	MH931545.1		<i>Knodus macarenae</i>	-	-
<i>Aequidens diadema</i>	GU817291.1		<i>Leiarius marmoratus</i>	MH411518.1	
<i>Aequidens tetramerus</i>	EU888037.1		<i>Leporinus arimaspi</i>	-	-
<i>Ancistrus sp.</i>	KP772604.1		<i>Leporinus boehlkei</i>	MF664284.1	
<i>Aphyocharas alburnus</i>		2829 2830	<i>Leporinus brunneus</i>	KY524535.1	
<i>Aphyocharas erythrurus</i>	-	-	<i>Leporinus enyae</i>	-	-
<i>Aphyocharas pusillus</i>	-	-	<i>Leporinus friderici</i>	EU185563.1	
<i>Astyanax abramis</i>	KY267610.1		<i>Leporinus granti</i>	-	-
<i>Astyanax bimaculatus</i>	FJ439410.1		<i>Leporinus nattereri</i>	-	-
<i>Astyanax fasciatus</i>	MF415739.1		<i>Leporinus octomaculatus</i>	KF568989.1	
<i>Astyanax integer</i>		3171	<i>Leporinus parae</i>	MF677847.1	

		3172			
<i>Astyanax metae</i>	KY268243.1		<i>Leporinus punctatus</i>	-	-
<i>Astyanax venezuelae</i>	KY268266.1		<i>Leporinus yophorus</i>	-	-
<i>Auchenipterus ambyiacus</i>	-	-	<i>Odontostilbe</i>		3167
<i>Auchenipterus nuchalis</i>	MG911855.1		<i>Oxydoras niger</i>	MG911861.1	
<i>Brycon whitei</i>		3199 3200	<i>Parodon sp.</i>		3214
<i>Bryconamericus cismuntanus</i>	MH002955.1		<i>Pimelodus blochii</i>	MG911916.1	
<i>Bryconamericus macarenae</i>	MH003002.1		<i>Pimelodus ornatus</i>	MH411503.1	
<i>Chaetostoma</i>		1336 1339	<i>Pimelodus pictus</i>	MH411497.1	
<i>Chaetostoma dorsale</i>		3140 3141	<i>Potamotrygon motoro</i>	MH411254.1	
<i>Creagrutus</i>		3404 3402 3403	<i>Potamotrygon orbignyi</i>	MH411260.1	
<i>Creagrutus dorsale</i>	-	-	<i>Prochilodus mariae</i>	KX086756.1	
<i>Crenicichla alta</i>	AY263860.1		<i>Prochilodus rubrotaeniatus</i>	MH068840.1	
<i>Crenicichla geayi</i>		3190 3191	<i>Salminus hilarii</i>	MF464011.1	
<i>Crenicichla johanna</i>	MG911958.1		<i>Synbranchus marmoratus</i>	MH507468.1	
<i>Electrophorus electricus</i>	MH411395.1		<i>Triportheus auritus</i>	MF182364.1	
<i>Farlowella mitoupibo</i>		2825 2826	<i>Triportheus brachipomus</i>	MF182365.1	
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	MG911835.1		<i>Triportheus orinocensis</i>		3213
<i>Hoplias curupira</i>	MG699476.1				

Aunque se realizó el proceso de extracción, cuantificación y amplificación de las muestras de tejido, los amplificadores obtenidos hasta el 13 de marzo del año en curso no se enviaron a secuenciar por el inicio de la cuarentena nacional, por ende, no se cuenta con secuencias obtenidas en el laboratorio para este ejemplo, sin embargo, se obtuvo un árbol de distancias con las secuencias descargadas de GenBank (Figura 4). Para ese propósito, las secuencias se alinearon y fueron cortadas en sus extremos obteniendo 41 secuencias (Anexo 1) de 415 pares de bases (pb).

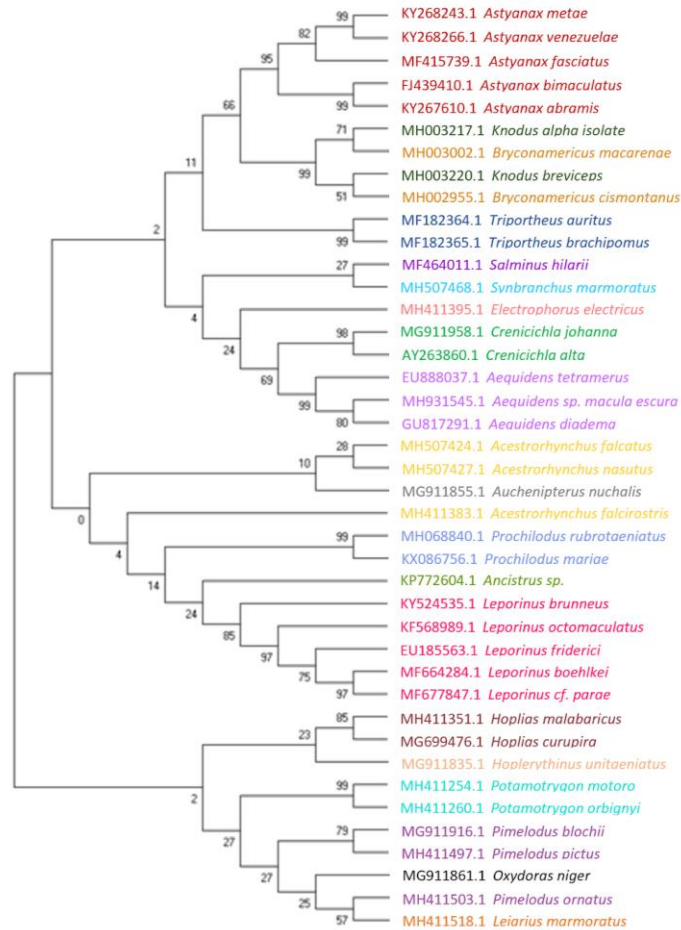


Figura 4. Árbol Neighbour joining con la distancia Kimura 2 parámetros para las secuencias del gen COI de las especies ícticas registradas en GenBank que componen la dieta de las especies *Pteronura brasiliensis* y *Lontra longicaudis*. El número bajo cada rama es el valor de Bootstrap.

En el árbol se observa el poder de discriminación del marcador COI en cuanto a especies y se evidencia la relación entre ellas formando agrupaciones de géneros con valores de bootstrap elevados (BP>50%), por ejemplo *Astyanax* (BP: 95%), *Triportheus* (BP:99%), *Crenicichla* (BP:98%), *Aequidens* (BP:80%), *Prochilodus* (BP:99%), *Leporinus* (BP:85%), *Hoplias* (BP:85%) y *Potamotrygon* (BP:99%).

Discusión/ Conclusiones

Al realizar la búsqueda de las especies de mamíferos dulceacuícolas a nivel mundial y los documentos científicos publicados sobre el estudio de dieta de estos organismos, se pudo evidenciar que la cantidad de revistas científicas enfocadas en mamíferos acuáticos es menor en comparación con la información reportada para mamíferos marinos. Esto refleja una menor

cantidad de estudios científicos especializados en mamíferos dulceacuícolas, a pesar de que algunas de estas especies son de gran importancia, ya que son consideradas como megafauna de los ríos y lagos, sus poblaciones tienden a decrecer. Refoyo, P. (2010) menciona que la disminución de especies en ecosistemas de agua dulce es del 41% con respecto a los ecosistemas terrestres a nivel mundial, esto se complica aún más si se tiene en cuenta que gran cantidad de los vertebrados acuáticos se encuentran en algún grado de amenaza (Chaves, M. & Santamaría, M. 2006) debido a la constante contaminación de fuentes hídricas, competencia con poblaciones humanas pesqueras, fragmentación del hábitat, captura incidental en redes de pesca, caza ilegal, entre otras (Herrera, O. et al. 2017). Por lo cual debería incentivarse la investigación en estas especies. A pesar de la importancia ecológica que tienen estos mamíferos, como “ingenieros del ecosistema”, modificando el hábitat donde se encuentran, influenciando en la riqueza de especies, en la heterogeneidad del paisaje, incidiendo en el transporte de nutrientes de ecosistemas acuáticos a terrestres, entre muchos otros roles (Rumiz, D. 2010., Roemer, G., Gompper, M. & Valkenburgh, B. 2009., Moss, B. 2015). Además, solo 24 especies de las 39 incluidas en este trabajo han sido analizadas respecto a su dieta, lo que impide tener un amplio conocimiento de la red trófica de los ecosistemas que habitan. La zonificación de estudios de la ecología trófica en ciertos grupos de mamíferos dulceacuícolas puede deberse a la categoría de amenaza de cada especie, al hecho de que sea un mega herbívoro y a su vez una especie emblemática como el caso de *H. amphibius* y en el caso de las especies de la familia Mustelidae (*L. longicaudis*, *N. vison* y *L. lutra*) las cuales presentan la segunda mayor cantidad de estudios hasta el momento, puede estar atribuido a que las nutrias en general son consideradas como especies carismáticas, además de tener varias de sus especies en peligro de extinción (Villavicencio, A. 2018). Por otro lado, las especies que tienen menos estudios de dieta son *P. gangética*, *L. mergulus* y *M. lutreola* con tamaños poblacionales reducidos, difíciles de estudiar en medio silvestre y en riesgo de extinción *P. gangética* categorizada según la IUCN en peligro de extinción (EN) (Smith, B. & Braulik, G. 2012), *L. mergulus* categorizada como vulnerable (VU) (Stephenson, P., Soarimalala, V. & Goodman, S. 2016) y *M. lutreola* en peligro crítico (CR) (S.A. 2016).

La asignación de los documentos científicos en la categoría observacional se basó en la observación directa durante el momento en que el animal se alimentaba, según lo propuesto por Litvaitis et al. (1996). Sin embargo, en algunos artículos se considera que mediante la observación de la forma o anatomía del cráneo (mandíbula y dentadura) se puede conocer cuál es la dieta del animal, razón por la cual se decidió abrir en dos técnicas esta categoría. La

primera, directa durante la alimentación y la segunda, anatomía del cráneo. En el caso de la categoría post ingestión, se basó en la forma en la que se identificaban las muestras morfológica o químicamente. En la morfológica, se identificó si las muestras utilizadas procedían de la digestión total (heces fecales) o de digestión parcial (contenido estomacal), mientras que para la identificación química (isótopos estables) se identificó si las muestras provenían del contenido estomacal o de la ingestión, como los restos de alimento encontrados en el esmalte dental. A partir de esta organización de las técnicas dentro las categorías propuestas por Litvaitis et al. (1996) se consideró que las tres categorías no abarcaban todas las formas y técnicas con las cuales se han estudiado las dietas de este grupo de mamíferos, ya que deja por fuera tanto la técnica de isótopos estables, como el análisis de los contenidos de los abazones propio de los ornitorrincos, muy probablemente porque para el año de su publicación (1996) no se conocían o no se aplicaban estas técnicas a este tipo de estudios. En la bibliografía consultada se encontró que el primer artículo que utiliza la técnica de isótopos estables es del 2002, mientras que la del análisis de los abazones data de 2010, lo cual constituye evidencia de que estas técnicas no fueron conocidas por el autor. Por las anteriores razones se propuso la jerarquía de categorías Litvaitis et al. (1996), subcategorías (morfológica, química y molecular para la post ingestión) y técnicas observadas en la figura 1.

En cuanto a la influencia de las herramientas moleculares para la caracterización de la dieta se propuso que esta se incluya también como una subcategoría dentro de la categoría post ingestión, ya que estas herramientas sirven como medio para la identificación de presas y plantas consumidas, en esta revisión se encontró que solamente en tres artículos se hizo uso de las herramientas moleculares- Metabarcoding, dos de ellos en *G. pyrenaicus* y uno en *A. amphibius*, específicamente en muestras fecales, lo cual indica que este tipo de herramientas no se incluyeron en las categorías propuestas por Litvaitis et al. (1996), ya sea por desconocimiento, pues se está aplicando desde 2015 según esta revisión o por la idea generalizada de lo costoso de esta herramienta.

Mientras en estudios de caracterización de dieta en mamíferos terrestres se ha utilizado en mayor medida las herramientas moleculares, principalmente mediante barcoding convencional (Farrell, L., Roman, J. & Sunquist, M. 2000., Khanam, S. et al. 2015., Napolitano, C. 2006), o mediante el uso de la técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction _ Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Fajardo, U., Cossíos, D. & Pacheco, V. 2014).

La categoría de post ingestión al ser drásticamente la más utilizada según las publicaciones revisadas, con el 77% de frecuencia de uso, corresponde a que cada una de las técnicas que la componen, principalmente la técnica de muestras fecales representan la forma más fácil de obtención de las muestras, porque no es invasiva para el animal, ya que no le causa estrés ni daños físicos al momento de tomarlas (Heymann, E. et al. 2004), además no es una técnica que traiga dificultades por el comportamiento tímido o agresivo del animal (Muñoz, C. et al. 2017). Por otro lado en cuanto al contenido estomacal y/o de los abazones, al encontrar cuerpos sin vida por diversas causas, es más sencillo y confiable aprovechar su contenido para estudios de dieta, sin embargo si el estudio implica el sacrificio de un animal no sería ético, ya que estos mamíferos por lo general están catalogados en alguna categoría de amenaza (Casper, R. et al. 2007). Aunque por tales ventajas esta técnica de uso de muestras fecales en la categoría post ingestión, es la más utilizada para estudios de dieta actualmente, también tiene desventajas importantes al realizar la identificación de presas o plantas consumidas de manera morfológica, ya que solo tiene en cuenta restos duros y además puede ser difícil llegar a una correcta clasificación taxonómica hasta especie de aquel resto de alimento (Tollit, D. et al. 1997. & Casper, R. et al. 2007), generalmente solo se logra identificar su orden y familia (Symondson, W. 2002); por lo tanto no es la técnica más precisa para este tipo de estudios.

Cada una de las técnicas utilizadas para el estudio de la dieta tiene ventajas y desventajas. Es preocupante que la categoría más utilizada y sus técnicas, presenten restricciones debido a los procesos de digestión que modifican y/o degradan las muestras, subestimando en los resultados la diversidad de especies que constituyen la dieta de los mamíferos dulceacuícolas.

Sin embargo existe una herramienta que aunque ha sido considerada en pocos estudios ofrece resultados precisos en cuanto a la identificación a nivel de especie de las muestras, caracterizando en ellas la riqueza y diversidad de lo consumido, independientemente del efecto del proceso digestivo por el cual han pasado.

El análisis de fragmentos de ácidos nucleicos específicamente del gen COI, el cual ha sido catalogado como el código de barras de la vida (barcoding), debido a que presenta una variación interespecífica suficientemente amplia para varios grupos de aves, peces, mamíferos, lepidópteros e insectos, según estudios, permitiendo buena correspondencia entre la identificación molecular y la identificación basada en caracteres morfológicos de las especies (Paz, A. González, M. & Crawford, A. 2011), por lo cual se ha implementado como herramienta de identificación en el análisis de dietas en muestras fecales, detectando el

consumo de presas blandas o frágiles (Parsons et al., 2005), aunque también puede presentar dificultades como que las secuencias genéticas de las presas o plantas no se encuentren secuenciadas en GenBank para la comparación con las obtenidas en las muestras fecales (Muñoz, C. et al. 2017) del mamífero dulceacuícola. Aun así es una herramienta muy útil y confiable que debería apoyar las técnicas tradicionales usadas ampliamente hasta el momento. Precisamente la categoría en la cual el barcoding puede apoyar significativamente la caracterización de la dieta es la de post ingestión- subcategoría morfológica, ya que en cada una de sus técnicas puede ser implementada. En el ejemplo de caso se pretende explicar el uso de esta herramienta en su forma convencional, utilizando el código de barras, enfocado en los peces que componen la dieta de las nutrias. Se aprovecha las secuencias obtenidas en otros estudios y que han sido registradas en el GenBank, como referencia para comparar y como insumo para un banco de secuencias específico. En caso de que no haya determinadas secuencias en el GenBank se pueden obtener en el laboratorio y enriquecer las dos bases de datos. A partir de la selección de muestras ya sea de contenido estomacal o de heces fecales, se procede a la extracción de ADN con cualquier método (orgánico, inorgánico o kit), amplificación con cebadores específicos (peces) y secuenciación convencional Sanger. En algunos casos, cuando el depredador tiene cercanía genética a la presa, su ADN se podría excluir o restringir de la amplificación usando primers de bloqueo (Shehzad et al. 2012) o enzimas de restricción como las endonucleasas (Dunshea, G. 2009).

Posteriormente, la identidad taxonómica de las secuencias obtenidas se compara mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) con las secuencias del GenBank y se integran al banco de datos específico con el cual se elabora un árbol de distancias y se ubica dentro del árbol la posible identidad taxonómica de la muestra analizada. De esta manera se identifica por dos vías la especie a la cual pertenece la muestra. El uso de COI se debe a que este cebador es ampliamente usado en animales, muestra gran variación interespecífica y amplia cobertura de especies (Daza, L. 2018).

Esta es la base del procedimiento metabarcoding utilizado en los tres artículos de las especies *G. pyrenaicus* y *A. amphibius*. La diferencia radica en que este realiza la identificación taxonómica de muestras a gran escala que incluyen el ADN de muchas especies diferentes sin aislar previamente estas muestras individualmente (Hawlitschek, O. et al 2018), empleando primers universales por lo cual no se suele usar cebadores como COI ya que este son específicos para cada organismo y a su vez el metabarcoding utiliza secuenciación de próxima generación o de alto rendimiento la cual produce millones de secuencias y pueden abarcar diferentes

longitudes cortas de fragmentos de ADN (Mordoh, A. 2019). El uso de las herramientas moleculares ya sea barcoding o metabarcoding es la vía directa para obtener resultados certeros de la identificación taxonómica de las especies que hacen parte de la dieta, ya que se evidencia en esta revisión que el porcentaje de uso de esta herramienta ha sido mínimo con solo el 3.6% del 100% de artículos revisados, lo que responde a la pregunta de investigación planteada.

En conclusión se logró identificar que de las treinta y nueve especies de mamíferos dulceacuícolas encontradas en la búsqueda bibliográfica sólo en veinticuatro de ellas se han realizado estudios de caracterización de la dieta, lo cual pone de manifiesto la necesidad de ampliar el estudio a todas las especies de este grupo, teniendo en cuenta que son eslabones indispensables en la cadena trófica de los ecosistemas (Rumiz, D. 2010). Se propone la inclusión de tres nuevas subcategorías, diferenciando la identificación química (isótopos estables) de la identificación morfológica y de la identificación molecular en la categoría post ingestión y en la subcategoría de identificación morfológica, el análisis de dieta a partir contenido en los abazones. De igual forma en la categoría observacional la inclusión de la técnica anatomía del cráneo. Se identificó que la categoría más utilizada en los documentos analizados para la caracterización de la dieta corresponde a la post ingestión, dentro de la cual la técnica de identificación morfológica a partir de muestras fecales es la más frecuente, por su facilidad de colecta y por ser no invasiva. A su vez las especies más estudiadas en cuanto a la caracterización de la dieta fueron aquellas catalogadas como emblemáticas y/o carismáticas, además de estar categorizadas en algún grado de amenaza. Las especies con menos estudios son aquellas que son endémicas o que se encuentran en preocupación menor, en peligro crítico o sin datos. Finalmente, se recomienda el uso de las herramientas moleculares ya sea barcoding o metabarcoding ya que son la vía directa para obtener resultados certeros de la identificación taxonómica de las especies que hacen parte de la dieta y pueden ser implementadas en cada una de las técnicas de la categoría más utilizada, es decir, la post ingestión.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Javeriana, a Myreya Pinedo por su apoyo incondicional, guía durante este proceso y a Jairo Pérez por su colaboración, y, por último, pero no por eso menos importante a mis amigos y a mi familia.

Bibliografía:

- Anderson, C. & Valenzuela, A. (2011). Aquatic mammals. Encyclopedia of Biological Invasions. https://www.researchgate.net/publication/284420420_Aquatic_mammals Consultado el 4 de mayo de 2020.
- Becerra, M., Mallea, H. & Van, P. (2015). The use of premaxillary bones of six fish species in giant otter (*Pteronura brasiliensis*) diet analysis. Latin American Journal of Aquatic Mammals. Vol 10, No 2.
- Bertasi, B et al. (2015). Sviluppo di una metodica molecolare per la ricerca di specie ittiche in prodotti alimentari. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italy.
- Borchert, J. (2018). Animales de agua dulce. Arizona State University, school of life sciences. <https://askabiologist.asu.edu/animales-agua-dulce> Consultado 17 de abril de 2020.
- Bourlière, François. (1964). El Mundo de los Mamíferos. Ed. Juventud. España.
- Brassea, E. (2016). Análisis metagenómico de la dieta de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*, Gray 1864) en México. Cicese. Ensenada, Baja California, México. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/677/1/Thesis_EBrassea.pdf
- Bowen, W. & Iverson, S. (2013). Methods of estimating marine mammal diets. A review of validation experiments and sources of bias and uncertainty. Marine mammal science. https://www.researchgate.net/publication/259551690_Methods_of_estimating_marine_mammal_diets_A_review_of_validation_experiments_and_sources_of_bias_and_uncertainty consultado el 04 de Mayo de 2020.
- Chaves, M.E. y Santamaría, M. (2006). Informe sobre el avance en el conocimiento y la información de la biodiversidad 1998 - 2004. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D.C., Colombia. Tomo 2. 230- 240p.
- Chemes, S., Giraud, A. & Gil, G. (2010). Dieta de *Lontra longicaudis* (*Carnivora, Mustelidae*) en el Parque Nacional El Rey (Salta, Argentina) y su comparación con otras poblaciones de la cuenca del Paraná. Mastozoología Neotropical. 17; 1; 10-2010; 19-29.
- Chritz, K. et al. (2016). Hippopotamus (*H. amphibius*) diet change indicates herbaceous plant encroachment following megaherbivore population collapse. Scientific Reports, volume 6, Article number: 32807. <https://www.nature.com/articles/srep32807> Consultado el 4 de mayo de 2020.
- Daza, L. (2018). Uso del gen citocromo oxidasa i (coi) y código de barras en estudios de genética y biología molecular para la identificación de especies animales. Tesis de especialización universidad nacional abierta y a distancia escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente.
- Deagle, B. et al. (2005). Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. Molecular Ecology.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-294X.2005.02531.x> Consultado el 22 de mayo de 2020.

-Desbiez, A., Santos, S., Alvarez, J. *et al.* (2011). Forage use in domestic cattle (*Bos indicus*), capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in a seasonal Neotropical wetland. *Mammal Biology*. 76, 351–357. doi.org/10.1016/j.mambio.2010.10.008

-Dibloni, T., Soulama, S., Ouedraogo, I. & Wendengoudi, G. (2012). Feeding habits of *Hippopotamus amphibius* and Carrying capacity in the biosphere reserve of “Mare aux Hippopotames” in the South-Sadanian zone of Burkina Faso. *Zoological Society of Pakistan. Volume 28, Issue 2*. pp. 58 - 59.

-Dudley, J. (1998). Reports of carnivory by the common hippo *Hippopotamus Amphibius*. *South African Journal of Wildlife. Volume 28, Issue 2*, pp. 58 - 59.

- Dunshea G (2009) DNA-Based Diet Analysis for Any Predator. *PLoS ONE* 4(4): e5252. [doi:10.1371/journal.pone.0005252](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005252)

-Emmons, L. (1987). Comparative feeding ecology of felids in a Neotropical rainforest. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 20:271–283.

-Espinosa, L. (2007). Capítulo 17. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X (Compiladores) *Ecología Molecular*. México ISBN 978-968-817-839-3

-Espunya, M., Rivera, L. & Bartolomé, J. (2014). Estudio comparativo de los componentes vegetales presentes en heces de herbívoros, mediante técnicas microhistológicas y moleculares. Universidad autónoma de Barcelona. <https://ddd.uab.cat/pub/artpub/2014/221116/0b494bpv7.pdf> Consultado el 22 de mayo de 2020.

- Fajardo, U., Cossíos, D. & Pacheco, V. (2014). Dieta de *Leopardus colocolo* (Carnivora: Felidae) en la Reserva Nacional de Junín, Junín, Perú. <http://doi.org/10.15381/rpb.v21i1.8248>

- Farrell, L., Roman, J. & Sunquist, M. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* (2000) 9, 1583–1590

-Felix, G. *et al.* (2014). Feeding behavior and crop damage caused by capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in an agricultural landscape. *Brazilian Journal of Biology*. Vol.74 no.4. doi.org/10.1590/1519-6984.02113.

-Flores, L., Morales, B., Castelblanco, N., Padilla, J. & Auil, N. (2013). Elementos de la dieta del manatí *Trichechus manatus manatus* en tres sitios importantes para la especie en México y Belice Diet items of manatee *Trichechus manatus manatus* in three priority sites for the species in Mexico and Belize. *Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos*. Vol. 5: 25-36.

- Fretueg, G. (2015). Summer Diet Characteristics of North American River Otters (*Lontra canadensis*) in Central Illinois. *The American Midland Naturalist*. 173(2), 294-304. doi.org/10.1674/amid-173-02-294-304.1.
- Gallina, S. (2011). Manual de técnicas para el estudio de fauna silvestre. Instituto de ecología INECOL. Capítulo 10. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/717/cap10.pdf> Consultado el 11 de abril de 2020.
- García, P. et al.(2009). Nuevos datos sobre la distribución y dieta de la nutria paleártica (*Lutra lutra*) en la provincia de Salamanca. Departamento de Biología Animal. Universidad de Salamanca. *Ecología*, N.º 22, 2009, pp. 117-125.
- García, P., & Mateos, I. (2007). Comportamiento cavernícola del Desmán ibérico *Galemys pyrenaicus* (E. GEOFFROY SAINT-HILAIRE, 1811) en la montaña Palentina. Universidad de Salamanca.
- García, R., Onofri, O., Lagares, A., Varela, L. & Manjarrez, N. (2008). Utilización de resina Chelex en la extracción de ADN de varios tipos de tejidos de la tortuga marina *Caretta caretta*, para la amplificación de marcadores moleculares. *El Caribe las ciencias básicas e ingeniería*, pp.343-354
- Gestal, N. (2016). Utilización del estudio de isótopos estables de C y N en heces de mamíferos en condiciones controladas para la determinación de dieta en animales silvestres. Univesidade Da Coruña. https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17361/GestalFreire_Nerea_TFG_2016.pdf?sequence=2&isAllowed=y consultado junio 3 de 2020.
- Gómez, A. (2010). Plantas emergentes y flotantes en la dieta del manatí (Familia: Trichechidae: *Trichechus manatus*) en el caribe de Costa Rica. Instituto Internacional en Conservación y Manejo de Vida Silvestre, Universidad Nacional. Vol. 2: 119-134.
- Gómez, J. & Jorgenson, J. (1999). An overview of the giant otter fisherman problem in the Orinoco basin of Colombia. *UICN Otter Specialist Group*, 16(2), 90-96
- Gonzalez, I. & Castillo, O. (2012). Tendencia trófica de la nutria (*Lontra longicaudis*) en el río ospino, portuguesa, venezuela. Programa Ciencias del Agro y del Mar. Universidad Ezequiel Zamora, UNELLEZ, Guanare 3350, Po. Venezuela.
- Gosálbez, J. & Castián, E. (1994). Diet of *Galemys Pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) in the North of the Iberian Peninsula. *Netherlans journal of Zoology*. 45(3-4): 422-430. doi:[10.1163/156854295X00393](https://doi.org/10.1163/156854295X00393).
- Grattarola, F. (2015). Aportes de la ecología molecular al estudio de mamíferos en Uruguay. Instituto de investigaciones Biológicas Clemente Estable. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/17162/1/uy24-17527.pdf> Consultado el 22 de mayo de 2020.

- Grey, J. & Harper, D. (2002). Using Stable Isotope Analyses to Identify Allochthonous Inputs to Lake Naivasha Mediated via the Hippopotamus Gut. Isotopes in Environmental and Health Studies. Volume 38, Issue 4. pp.245-250.
- Grossnickle, D. (2020). Feeding ecology has a stronger evolutionary influence on functional morphology than on body mass in mammals. *Evolution*. doi:10.1111/evo.13929.
- Guillet, F. (2015). A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces. Mammalian Biology. 80, 505–509 doi.org/10.1016/j.mambio.2015.08.002.
- Hawlitschek, O., Fernández, A., Balmori, A. & Castresana, J. (2018). A pipeline for metabarcoding and diet analysis from fecal samples developed for a small semi-aquatic mammal. *Plos One* 13(8): e0201763. doi.org/10.1371/journal.pone.0201763.
- Herrera, O. et al. (2017). Plan de acción para la conservación de los mamíferos acuáticos de Venezuela: delfines de agua dulce, nutrias y manatíes 2017- 2027. Caracas, Venezuela. http://omacha.org/wp-content/uploads/2019/06/plan_accion_conservacion_mamiferos_acuaticos_venezuela.pdf. Consultado el 05 de junio de 2020.
- Heymann, E. et al. (2004). Monitoreo no-invasivo de animales silvestres -análisis genéticos y endocrinológicos a base de muestras fecales en 'pichicos barba blanca' (*Saguinus mystax*, Callitrichidae, Primates) en la Estación Biológica Quebrada Blanco (EBQB), Perú.
- Hyslop, E. (1980). Stomach contents analysis - a review of methods and their application. *J. Fish Biol.* 17, 411-429.
- Jaksic, F., Schlatter, R. & Yanes, J. (1980). Feeding ecology of central Chilean foxes, *Dusicyon culpaeus* and *Dusicyon griceus*. *Journal of Mammalogy* 61:254–260.
- Johnson, M.K., H. Wolford y H.A. Pearson. 1983. Microhistological techniques for food habits analyses. Research Paper SO-199. US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, New Orleans, Louisiana
- Lanszki, J., Kormendi, S., Hancz, C. & Zalewski, A. (1999). Feeding habits and trophic niche overlap in a Carnivora community of Hungary. *Institute, Polish Academy of Sciences*. 44(4):429-42.
- Lavariega, M. et al. (2012). Mamíferos medianos y grandes de la Sierra de Villa Alta, Oaxaca, Mexico. Laboratorio de Vertebrados Terrestres (Mastozoología), Instituto Politécnico Nacional (IPN). <https://www.redalyc.org/pdf/457/45725085002.pdf> Consultado 17 de abril de 2020.
- Lewison, R. & Carter, J. (2004). Exploring behavior of an unusual megaherbivore: a spatially explicit foraging model of the hippopotamus. *Ecological Modelling*, 171(1-2), 127–138. doi:10.1016/s0304-3800(03)00305-3.

- Livaitis, J.A., K. Titus y E.M. Anderson. 1996. Measuring vertebrate use of terrestrial habitats and food. Pp. 254–274. En: Bookhout, T.A. (ed.). Research and management techniques for wildlife and habitats. The Wildlife Society, Bethesda, Maryland.
- Livio, M., Andrade, M., Aguiar, R. & Pascon, P.(2003).Feeding habits of marine tucuxi, *Sotalia fluviatilis*, at ceará state, Northeastern Brazil. *Lajam* 2(2): 117-122. doi:10.5597/lajam00040
- Kelkar, N. et al. (2018). Foraging and feeding ecology of *Platanista* : an integrative review. The mammal society. Volume 48, Issue 3, pp. 194-208.
- Kruuk, H., Kanchanasaka, B., O’Sullivan, S., & Wanghongsa, S. (1994). Niche separation in three sympatric otters *Lutra perspicillata*, *L. lutra* and *Aonyx cinerea* in Huai Kha Khaeng, Thailand. *Biological Conservation*, 69(1), 115–120. doi:10.1016/0006-3207(94)90334-4.
- Kruuk, H., Kanchanasaka, B., O’Sullivan, S., & Wanghongsa, S. (1994). Niche separation in three sympatric otters *Lutra perspicillata*, *L. lutra* and *Aonyx cinerea* in Huai Kha Khaeng, Thailand. *Biological Conservation*, 69(1), 115–120. doi:10.1016/0006-3207(94)90334-4.
- Kruuk, H. & Moorhous, A. (1990). Seasonal and spatial differences in food selection by otters (*Lutra lutra*) in Shetland. *Journal of Zoology*. 221(4), 621–637. doi:10.1111/j.1469-7998.1990.tb04021.x
- Kruuk, H. (1993). The Diving Behaviour of the Platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) in Waters with Different Trophic Status. *The Journal of Applied Ecology*. Vol 30 no.4. pp. 592-598.
- Macisaac, H., Tedla, R. & Ricciardi, A. (2011). Patterns and rate of growth of studies in invasión ecology. Chapter 5.
- Madeira, A. & Arruda, R. (2004). Biology of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*.Volume 84, Issue 6.pp. 1245-1250.
- Madeira, A. & Siciliano, S.(2007). Stomach contents of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia guianensis*) from Rio de Janeiro, south-eastern Brazil.*Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Volume 87, Issue 1. pp. 253-254.
- Madeira, A. & Arruda, R. (2014). Marine debris ingestion by coastal dolphins: What drives differences between sympatric species?. *Science Direct*. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.057
- MacDonald, D. (2001). *The encyclopedia of mammals*.
- Maran, T., Kruuk, H., Macdonald, D. W., & Polma, M. (1998). Diet of two species of mink in Estonia: displacement of *Mustela lutreola* by *M. vison*. *Journal of Zoology*, 245(2), 218–222. doi:10.1111/j.1469-7998.1998.tb00093.x
- Marshall, H. et al. (2009). Molecular identification of prey in the stomach contents of Harp Seals (*Pagophilus groenlandicus*) using species-specific oligonucleotides. *Molecular Ecology*

Resources. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0998.2009.02713.x>
Consultado el 22 de mayo de 2020.

- Martinez, L & Mandujano, S. (1995). Hábitos alimentarios del pecarí de collar (*Pecari tajacu*) en un bosque tropical caducifolio de Jalisco, México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 64:1-20.
- Mayor, R. & Botero, A. (2010). Dieta de la nutria neotropical *Lontra longicaudis* (*Carnivora, Mustelidae*) en el río Roble, Alto Cauca, Colombia. Universidad del Quindío. Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental. Vol. 15 N.º 1.
- McLachlan, A., Dickman, C. & Grant, T.(2010).Diet and dietary selectivity of the platypus in relation to season, sex and macroinvertebrate assemblages. *Journal of zoology*. Volume 280, Issue 3.Pages 237-246.
- Milligan, H., & Humphries, M. (2010). The importance of aquatic vegetation in beaver diets and the seasonal and habitat specificity of aquatic-terrestrial ecosystem linkages in a subarctic environment. *Oikos*. 119(12), 1877–1886. doi:10.1111/j.1600-0706.2010.18160.x
- Monroy, O. & Mundo, V. (2009). Nicho trófico de la nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) en un ambiente modificado, Temascaltepec, México. *Revista Mexicana de biodiversidad*. vol.80 no.3.
- Moreira, X., Da Silva, E., Bassoi, M. & Aguiar, R. (2012).Feeding habits of Guiana dolphins, *Sotalia guianensis*, from south-eastern Brazil: new items and a knowledge review.*Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Volume 92, Issue 8 (Marine Mammals).pp. 1723-1733.
- Mekonen, S. & Hailemariam, B. (2016). Ecological behaviour of common hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*, LINNAEUS, 1758) in boye wetland, jimma, ethiopia. *American Journal of Scientific and Industrial research*. 2153-649X, doi:10.5251/ajsir.2016.7.2.41.49.
- Michez, A., Doucet, J., Dendoncker, N., Bouché, P. & Vermeulen, C. (2013). Preliminary description of the diet of *Hippopotamus amphibius* L. in Loango National Park (Gabon)/Première description du régime alimentaire de *Hippopotamus amphibius* L. au Parc National de Loango (Gabon). Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. Volumen 17, N.º 4, (2013): 580-583.
- Mordoh, A. (2019). Secuenciación masiva de ADN: la próxima generación. *Dermatología Argentina* Vol. 25 N° 1. 02-08 ISSN 1515-8411
- Muñoz, C. et al. (2017). Colecta y conservación de muestras de fauna silvestre en condiciones de campo. Universidad autónoma Metropolitana. Cap. 1. pp.121.
- Napolitano, C. (2006). Ecología trófica del gato andino (*oreailurus jacobita*) y el gato colocolo (*lynchailurus colocolo*) en el altiplano de la región de Tarapacá. Universidad de Chile, facultad de ciencias veterinarias y pecuarias escuela de ciencias veterinarias.

- Noirard, C. et al. (2004). Diets of sympatric hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*) and zebu (*Bos indicus*) during the dry season in the "W" National Park (Niger Republic). *Game & Wildlife Science*. Vol.21 No.3 pp.423-431 ref.21.
- Ortega, J et al. (2018). Comparación de tres métodos de extracción de adn de muestras de piel y pelo de jaguar (*Panthera onca*). Universidad Nacional abierta y a distancia.
- O'Rorke, R., Lavery, S. & Jeffs, A. (2011). PCR enrichment techniques to identify the diet of predators. *Molecular Ecology Resources*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0998.2011.03091.x> Consultado el 22 de mayo de 2020.
- Østby, N. (2019). DNA Metabarcoding Diet Analysis of Water Vole (*Arvicola amphibius*) in Northern Norway. NTNU.
- Parsons, K., Piertney, S., Middlemas, S., Hammond, P. & Armstrong, J. (2005). DNA-based identification of salmonid prey species in seal faeces. *J. Zool., Lond.* 266, 275–281.
- Pavan, A., Gireesh, P. & Lakra, W. (2015). DNA Metabarcoding: A New Approach for Rapid Biodiversity Assessment. División de Genética y Biotecnología, ICAR-Central Instituto de Pesca Educación, Versova Bombay 61
- Pechanec, J. & Pickford, G. 1937. A weight estimate methods for determination of range of pasture production. *Journal of American Society of Agronomy* 29:894–904.
- Phillips, K., McCallum, N. & Welch, L. (2012). A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100 ® and the QIAGEN DNA investigator Kit (manual and automated). *Forensic Science International: Genetics* 6(2):282-285 doi 10.1016/j.fsigen.2011.04.018
- Pinedo, M. (2010). Sistemática molecular y filogeografía del género *Lagothrix* mediante el gen mitocondrial COII. Pontificia Universidad Javeriana Tesis de maestría
- Quintela, F., Porciuncula, R. & Colares, E. (2008). Dieta de *Lontra longicaudis* (Olfers) (*Carnivora, Mustelidae*) em um arroio costeiro da região sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Repositório Institucional da Universidade Federal do Rio Grande*. Vol. 3, n. 3, pp. 119-125.
- Refoyo, P. et al. (2010). La pérdida de biodiversidad, responsabilidad y soluciones. Colegio de biólogos de la comunidad de Madrid. http://www.conama10.conama.org/conama10/download/files/GTs%202010/12_final.pdf#page=33. Consultado el 05 de junio de 2020.
- Reidenberg, J. (2007). Anatomical adaptations of aquatic mammals. American association for anatomy. <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ar.20541> Consultado el 22 de mayo de 2020.
- Moss, B. (2015). Mammals, freshwater reference states, and the mitigation of climate change. <https://doi.org/10.1111/fwb.12614>

- Roemer, G., Gompper, M. & Valkenburgh, B. (2009). The Ecological Role of the Mammalian Mesocarnivore. *BioScience*, Volumen 59, Número 2, febrero de 2009, páginas 165-173 <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.2.9>
- S.A. (2016). *Mustela lutreola*. La Lista Roja de especies amenazadas de la UICN 2016: e.T14018A45199861. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T14018A45199861.en>
- Schneider, M. (2009). Freshwater Mammals as Indicators of Habitat Condition. *Conservation Monitoring in Freshwater Habitats* pp 33-44.
- Schubbert, R., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1993). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. Institute of Genetics, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany.
- Scotcher, J. Stewart, D. & Breen, C. (1978). The diet of the hippopotamus in Ndumu game reserve, natal, as determined by faecal analysis. Department of Botany, University of Natal, Pietermaritzburg 3200. <https://journals.co.za/docserver/fulltext/wild/8/1/3169.pdf?expires=1589039535&id=id&accname=guest&checksum=5A5AB7A27D66A14D22A2BEF02115C7F5> Consultado el 4 de mayo de 2020.
- Silva, R., Weber, F. & Zuanon, J. (2013). Feeding ecology of the giant otter (*Pteronura brasiliensis*) and the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) in Jaú National Park, Amazon, Brazil. *Journal of Natural History*. doi.org/10.1080/00222933.2013.800607
- Silva, F. et al. (2013). Use of carbon and nitrogen stable isotopes to study the feeding ecology of small coastal cetacean populations in southern Brazil. *Biota Neotropica*. vol.13 no.4. doi.org/10.1590/S1676-06032013000400009.
- Singh, U., Kumari, M. e Iyengar, S. (2018). Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biological Procedures Online*. 20:12 <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0077-6>
- Stoddart, L. 1935. Range capacity determinations. *Ecology* 16:531–533
- Smith, A. & Hubbard, R. (1954). Preference ratings for winter deer forages from Northern Utah ranges based on browsing time and forage consumed. *Journal of Range Management* 7:262–265
- Smith, B. & Braulik, G. (2012). *Platanista gangetica*. La Lista Roja de la UICN de Especies Amenazadas 2012:e.T41758A17355810. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T41758A17355810>.
- Spínola, R. & Vaughan, C.(1995). Dieta de la nutria neotropical (*Lutra longicaudis*) en la Estación Biológica La Selva, Costa Rica. Universidad Nacional, Programa Regional de la Maestría en Manejo de Vida Silvestre, Apdo. 1350. vol. 4, no. 2, pp. 125-132.

-Stephenson, P., Soarimalala, V. & Goodman, S. (2016). *Limnogale mergulus*. La Lista Roja de la UICN de Especies Amenazadas 2016:e.T11979A97189690. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T11979A97189690.en>

-Symondson, W. (2002). Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-294X.2002.01471.x> Consultado el 22 de mayo de 2020.

- Verón, G. Patterson, B. & Reeves, R. (2008). Global diversity of mammals (Mammalia) in freshwater. Springer Science. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-8259-7_59 Consultado el 4 de mayo de 2020.

-Villavicencio, M (2018). Aspectos de ecología trófica de la nutria gigante (*Pteronura brasiliensis*) y su interacción con la actividad pesquera en la estrella fluvial de Inírida, Guainía-Colombia. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias, Pontificia universidad Javeriana, Colombia.

- Zhang, S. (2017). Why Are There So Many More Species on Land When the Sea Is Bigger?. *The Atlantic*. Online <https://www.theatlantic.com/science/archive/2017/07/why-are-there-so-many-more-species-on-land-than-in-the-sea/533247/>. Consultado el 21 de junio de 2020.

Anexo 1: Secuencias del gen COI descargadas de GenBank correspondientes a las especies de peces que conforman la dieta de las nutrias

>MF182364.1 *Triportheus auritus* haplotype 8 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

```
AAATTTATAATGTTATCGTCACTGCACATGCATTCGTAATAATTTTCTTTATAGTA
ATACCAGTAATGATCGGGGGCTTCGGAAATTGACTTGTGCCCTAATGATTGGAG
CCCCCGACATGGCCTTCCCCCGGATAAACAAACATGAGTTTCTGACTCCTGCCCCC
GTCCTTCTTCTACTACTAGCATCCTCAGGGGTTGAAGCAGGAGCAGGAAGTGGT
TGAACCGTTTACCCACCACTTGCGGGAAATCTCGCCCACGCAGGGGCCTCCGTTG
ACCTAACTATTTTCTCGCTGCATCTCGCAGGGGTTTCTCCATTCTAGGTGCAATC
AACTTTATCACCACCATTATTAACATAAAGCCCCCAGCAATCTCACAATACCAAA
CACCCCTATTTGTCTGAGCCGTATTAAT
```

>MF182365.1 *Triportheus brachipomus* haplotype 9 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAATGTTATTGTTACTGCGCACGCATTCGTAATAATTTTCTTTATAGTA
ATACCAGTAATAATTGGGGGCTTCGGAAATTGACTTGTACCCCTAATGATTGGGG
CCCCGATATGGCCTTCCTCGGATAAACAATATGAGTTTCTGACTCCTGCCCC
ATCCTTCCTCCTACTACTGGCATCCTCAGGAGTTGAAGCAGGAGCAGGGACTGGC
TGAACCGTCTACCCACCACTTGCAGGAAACCTCGCCCACGCAGGAGCCTCCGTTG
ACCTAACTATCTTCTCACTACATCTCGCAGGAGTTTCCTCCATTTTAGGTGCAATT
AATTTTATCACTACTATTATTAATATAAAAACCCCCAGCAATCTCACAATACCAA
CACCCCTATTTGTTTGAGCCGTGTTAAT

>MF664284.1 *Leporinus boehlkei* isolate L910 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAATGTTATCGTTACCGCGCACGCTTTCGTGATAATCTTCTTCATAGTA
ATGCCAATTATAATCGGGGGCTTCGGAAACTGATTAGTTCCACTAATGATTGGTG
CACCCGACATGGCATTTCACGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTACCCCC
ATCCTTTCTCCTCCTACTAGCATCTTCCGGAGTAGAAGCCGGGGCCGGAACAGGT
TGAACGGTATATCCGCCGCTTGCCGAAACTTAGCCCATGCAGGTGCTTCCGTCG
ACCTTACCATCTTCTCCCTCCACCTCGCCGGTGTTCCTCCATTCTTGGGGCTATT
AATTTTATTACAACGATTATTAATATAAAAACCTCCAGCCATCTCACAATATCAA
CCCCTTTATTTGTCTGGGCCGTCCTGAT

>MF677847.1 *Leporinus cf. parae* RS-2018 aislar el gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa L631 I (COI), cds parciales; mitochondrial

AAATTTATAATGTTATCGTTACCGCACACGCTTTCGTAATAATCTTCTTCATAGTA
ATGCCAATTATAATTGGGGGCTTTGGAAACTGATTAATCCCACTAATGATTGGTG
CGCCCGACATGGCATTTCGCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTACCCCC
ATCCTTTCTCCTCCTACTAGCATCTTCCGGAGTAGAAGCCGGAGCCGGGACAGGT
TGAAGTGTATATCCCCCGCTTGCTGGAAACTTAGCCCATGCAGGTGCTTCCGTTG
ACCTTACCATCTTCTCCCTTCATCTCGCCGGTGTCTCCTCCATTCTTGGGGCTATT
AATTTTATTACAACGATTATTAACATAAAAACCTCCAGCCATCTCACAATATCAA
CCCCTTTATTTGTCTGGGCCGTCCTAAT

>MF415739.1 *Astyanax fasciatus* voucher ADN7426 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AGGTATATAATGTTCTGGTAACCGCACATGCTTTTGTATAATTTTCTTCATAGTT
ATACCCGTTATAATTGGAGGCTTTGGAAATTGACTAATCCCACTTATAATTGGTG
CCCCAGACATGGCCTTCCTCGAATAAATAACATAAGTTTTTACTTCTTCCACC
ATCTTTCCTTCTCCTTCTAGCATCCTCTGGGGTTGAAGCCGGGGCAGGGACAGGA

TGAACCGTATAACCCCTCTTGCCGAAATCTTGCACACGCAGGAGCTTCCGTTG
ATCTAACAATCTTCTCATTACACTTAGCTGGTGTATCCTCAATTTAGGGGCAATT
AATTTTATTACAACCTATTATTAATATGAAACCCCCAGCCATCTCACAGTATCAAA
CACCTTTGTTTGTCTGGGCTGTTTTAGT

>MF464011.1 *Salminus hilarii* isolate SH_151 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene,
partial cds; mitochondrial

AAATTTACAATGTGATTGTTACTGCACATGCGTTTGTGATAATCTTCTTTATAGTT
ATGCCAGTCATGATCGGGGGCTTTGGTAATTGACTGGTGCCCTTAATAATCGGAG
CCCCAGATATAGCTTTTCCCTCGCATGAACAATATAAGCTTTTGACTTCTACCCCCG
TCTTTTCTTCTACTCCTCGCTTCTCTGGGGTAGAAGCAGGGGCTGGAACAGGTT
GGACTGTGTACCCCTCTTGCAGGAAACATCGCCACGCAGGAGCTTCTGTTGA
TTAACTATCTTCTCGCTCCACCTTGCTGGTGTTCCTCGATTCTAGGGGCCATCA
ACTTTACTACTACGATTATTAACATGAAACCCCCAGCCGCCTCTCAGTACCAGAC
ACCTCTATTCGTCTGGGCGGTGTTAAT

>KY524535.1 *Leporinus brunneus* voucher ANSP 192149 cytochrome oxidase subunit I (COI)
gene, partial cds; mitochondr

AGATTTATAATGTCATCGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATAATTTTCTTTATGGTA
ATACCAATTATAATTGGGGGCTTTGGAACTGATTAGTACCGCTAATGATCGGTG
CACCCGACATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGTTTCTGACTTCTTCCCC
ATCTTTTCTTCTTCTGCTAGCCTCTTCTGGTGTAGAAGCTGGGGCTGGGACCGGCT
GAACTGTTTACCCCCACTTGCCGGAACTTAGCCACGCAGGTGCCTCCGTTGA
CCTAACTATTTTCTCCCTACATCTCGCCGGTGTTCCTTCCATTCTTGGGGCTATTA
ATTCATTACAACCTATTATTAACATAAAACCTCCGGCCATCTCACAATATCAGAC
CCCCCTATTTGTTTGGGCTGTCTTAAT

>MH068840.1 *Prochilodus rubrotaeniatus* voucher MHNG 2690 cytochrome c oxidase subunit
I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AGATTTATAATGTTATCGTTACCGCACATGCTTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTA
ATGCCAATTATGATTGGAGGATTTGGGAACTGACTAGTTCCTCTGATGATCGGGG
CCCCCGACATAGCATTCCCCCGAATAAATAACATAAGCTTTTGACTACTACCCCC
ATCCTTCTTCTCCTCCTAGCCTCCTCCGGAGTTGAGGCCGGAGCCGGGACAGGT
TGAAGTGTATATCCCCCTCTCGCCGGGAACTTAGCCACGCAGGAGCCTCTGTAG
ACTTAACCATTTTCTCACTTCACCTCGCTGGGGTTTCTTCAATTCTGGGAGCAATT
AACTTTATTACAACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCTCAATATCAAA
CACCTTTGTTTGTGTGAGCCACTCTAAT

>KX086756.1 Vale de Prochilodus mariae LBP 2188 15562 gen de la subunidad citocromo c oxidasa 1 (Cox1), CD parcial; mitochondrial

AGATTTATAACGTTATCGTTACCGCACATGCTTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTA
ATGCCAATTATGATTGGAGGATTTGGGAACTGACTAGTTCCTCTAATGATCGGGG
CCCCGACATAGCATTCCCCCGAATAAATAACATAAGCTTTTGACTACTACCCCC
ATCCTTTCTTCTCCTCCTAGCCTCCTCCGGAGTTGAAGCCGGGGCCGGAACAGGT
TGAAGTGTCTATCCGCCTCTCGCCGAACTTAGCCCACGCAGGAGCCTCTGTAG
ACTTAACCATTTTTTCACTTCACCTCGCTGGGGTTTCTTCAATTCTGGGAGCAATT
AACTTTATTACAACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCTCAATATCAA
CACCTTTATTTGTGTGAGCCATTCTAAT

>EU185563.1 Leporinus friderici voucher LBP655 8087 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAATGTTATCGTTACCGCACATGCTTTCGTAATAATCTTCTTCATAGTG
ATGCCGATTATAATTGGGGGCTTCGGAACTGACTAGTTCCTAATGATTGGCG
CACCCGACATGGCATTTCACGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTACTGCCCC
ATCTTTCCTCCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTAGAGGCCGGGGCCGGAACAGGT
TGAAGTGTCTACCCGCCACTTGCTGGAACTTGGCCCACGCAGGCGCTTCCGTCG
ACCTTACCATCTTCTCCCTGCATCTCGCCGGTGTCTCCTCCATTCTTGGAGCCATT
AATTTTATTACAACAATTATTAACATAAAACCCCCAGCCATCTCACAATATCAA
CCCCCTATTTGTCTGGGCGTCCTAAT

>KF568989.1 Leporinus octomaculatus aislado L091 gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), cds parciales; mitochondrial

AAATTTATAATGTTATTGTTACCGCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTCATAGTA
ATACCAATTATAATTGGGGGCTTCGGAACTGACTAATCCCTAATGATTGGCG
CGCCCGACATGGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGTTTTTACTTCTACCCCC
ATCTTTTCTCCTTCTACTAGCATCTTCCGGAGTAGAGGCCGGAGCTGGAACAGGC
TGAAGTGTTTATCCTCCCCTTGCTGGAAACCTAGCCCACGCAGGTGCCTCCGTAG
ACCTTACCATTTTTTCCCTCCATCTCGCCGGTGTCTCCTCTATTCTTGGGGCTATTA
ATTTTATTACAACAATTATTAATATAAAACCTCCAGCTATTTACAATATCAGAC
CCCTTTATTTGTCTGAGCCGTCCTAAT

>MG911855.1 Auchenipterus nuchalis voucher IIAP-CIIAP-00884-3 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AGATTTACAATGTCATCGTTACTGCTCATGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTA
ATACCAATTATGATTGGAGGATTTGGAAATTGACTTATTCCCCTAATGATTGGAG

CCCCTGATATAGCCTTCCCCCGAATAAATAACATAAAGCTTTTGACTACTCCCCCT
TCCTTCCTACTACTCCTGGCCTCTTCAGGTGTTGAAGCAGGGGCCGGAACCGGAT
GAACTGTTTACCCCCCACTTGCCGGAAATCTTGCACATGCTGGAGCTTCCGTAGA
TCTTACCATTTTTTCCCTCCATCTGGCAGGTGTCTCTTCTATTTTAGGAGCCATCA
ACTTCATTACAACAATTATCAACATGAAACCCCCAGCTATTTACAATACCAAAC
ACCCCTGTTTGTGTGAGCAACGCTAAT

>MH003217.1 *Knodus alpha* isolate STRI-00531 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATCTACAACGTTATCGTAACTGCACATGCATTTGTGATAATCTTCTTTATAGTA
ATACCAGTAATAATTGGAGGCTTCGGAAACTGACTCGTCCCCCTCATGATTGGTG
CCCCAGACATGGCCTTCCCTCGAATAAACAATATGAGTTTCTGACTACTCCCCC
ATCCTTTCTTCTCCTACTAGCCTCATCTGGAGTTGAAGCCGGAGCGGGAACAGGA
TGAAGTGTCTACCCTCCGCTCGCCGGCAATCTGGCGCATGCAGGGGCTTCCGTAG
ACCTAACAATTTTCTCACTTCACCTAGCCGGGGTATCTTCTATTCTAGGGGCAATC
AATTTTATTACTACTATTATTAATATGAAACCCCCAGCTATTTACAGTACCAAAC
ACCCTTATTTGTCTGAGCCGTCTTAAT

>MH003220.1 *Knodus breviceps* isolate LBPV-1843 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATCTACAACGTTATCGTAACTGCACATGCATTTGTGATAATTTTCTTTATGGTA
ATGCCAGTAATAATTGGGGGCTTTGGGAACTGACTCGTGCCCCTAATAATCGGTG
CCCCAGACATGGCCTTCCCTCGAATGAACAACATAAGTTTCTGACTACTCCCCC
ATCCTTCCTTCTCCTACTAGCCTCCTCTGGAGTTGAAGCCGGGGCGGGAACAGGG
TGAAGTGTCTATCCTCCACTCGCTGGCAACCTAGCACATGCAGGAGCTTCTGTAG
ACCTGACAATTTTCTCACTTCACCTAGCCGGAGTATCTTCTATTCTAGGGGCAATC
AATTTTATTACTACCATTATTAATATGAAGCCCCCAGCTATTTACAATACCAA
CACCTTGTTTGTCTGAGCTGTTCTGAT

>MH507424.1 *Acestrorhynchus falcatus* voucher IIAP-CIIAP-00972-4 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AAATCTACAACGTCATCGTTACAGCCCATGCATTCGTAATAATTTTTTTTATAGTA
ATACCCGTAATAATTGGAGGCTTTGGTAACTGACTAATTCCCTTGATACTAGGGG
CCCCTGATATAGCATTCCCCCGAATAAATAACATAAAGCTTCTGACTTCTCCCCC
ATCATTCCCTTCTTCTTTAGCTTCATCAGGAATTGAAGCAGGAGCCGGAACCGGT
TGAACAGTATACCCACCTCTTGCAGGAAATTTAGCTCATGCCGGGGCCTCAGTTG
ACCTAACGATTTTCTCCCTTCATTTAGCAGGGGTTTCTTCCATCTTTGGCGCCATT

AATTTCAATTACAACAATCATCAATATGAAACCTCCCGCCATTTCCCAATATCAAA
CACCCCTATTTGTATGGGCCGTGTTAAT

>MH411383.1 *Acestrorhynchus falcirostris* voucher IIAP-CIIAP-01089-7 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AGGTCTATAACGTCATTGTTACAGCCCATGCGTTCGTTATAATCTTTTTTATGGTG
ATACCAGTTATAATTGGGGGCTTTGGCAACTGACTTGTACCACTTATGCTCGGGG
CACCAGACATGGCCTTTCCCCGAATAAACAATATAAGCTTTTGATTACTCCCCC
ATCTTTCCTTCTTCTCCTAGCCTCTTCAGGCGTTGAAGCTGGGGCTGGGACCGGCT
GAACTGTTTACCCCCACTCGCAGGAACTTAGCCCATGCTGGGGCCTCCGTAGA
TTAGCTATTTTTTCTCTTCACCTTGCCGGGATTCATCAATCCTGGGAGCCATTA
ACTTTATCACAACAATTATCAATATAAAACCCCCAGCCACTTCTCAATACCAAAC
GCCCTATTCATCTGAGCCGTTCTTAT

>MH507427.1 *Acestrorhynchus nasutus* voucher IIAP-CIIAP-00969-3 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAATGTTATCGTCACAGCTCATGCATTCGTAATAATTTTTCTTTATAGTA
ATACCAATCATAATTGGGGGCTTTGGCAATTGACTTATTCCCCTCATGTTAGGGG
CCCCAGACATGGCCTTTCCCCGAATAAATAACATAAGCTTTTGGCTTCTCCCCC
CTCCTTTCTACTTCTCCTGGCTTCTTCAGGTGTTGAAGCGGGGGCCGAACCGGCT
GGACTGTATATCCCCCCTTGCTGGGAATTTGGCTCATGCAGGGGCCTCTGTAGA
TTAACTATTTTTTCCCTGCATCTTGCCGGAGTCTCCTCAATTTTAGGGGCCATCA
ACTTCATTACTACAATCATTAACATAAAACCCCCGCCATCTCTCAGTACCAAAC
ACCTTTATTTGTCTGAGCCGTTTAAAT

>MG911958.1 *Crenicichla johanna* voucher IIAP-CIIAP-00925-3 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AACTTTTCAATGTAATCGTGACTGCACACGCCTTCGTTATAATCTTCTTTATGGTT
ATACCTATTATAATTGGAGGCTTTGGCAACTGATTAATCCCCCTGATATTGGGCG
CCCCTGATATAGCCTTCCCTCGAATAAATAATATAAGCTTTTGACTTCTACCCCC
TCATTTATACTCCTGCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAGGCTGGAGTTGGCACAGGGT
GAACCGTCTACCCCCACTAGCAGGCAATCTGGCACACACCGGCCCTCTGTCTGA
TCTAGCTATCTTTTCCCTCCACCTGGCTGGTGCCTCCTCAATCCTGGGAGCAATTA
ACTTCATCACAACACTATTATTAACATGAAACCCCCAGCCATAACTATTTATCAAAT
ACCCTTATTTGTCTGAGCCCTTTAAAT

>MG911861.1 *Oxydoras niger* voucher IIAP-CIIAP-00888-2 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAACGTTATTGTCACTGCCCATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTG
ATACCAATTATGATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTTCCACTAATGATCGGAG
CCCCAGACATGGCGTTCCCCCGAATAAATAATATGAGTTTCTGACTACTCCCGCC
ATCCCTCCTCCTATTGCTATCCTCGTCCGGAGTTGAAGCAGGAGTGGGAACAGGG
TGAACCGTCTACCCTCCCCTTGCCGGGAACCTCGCACACGCAGGAGCATCTGTAG
ACCTAGCTATTTTCTCCCTCCACCTAGCAGGGGTATCATCAATCCTGGGAGCTAT
CAACTTCATCACAACAATTATTAACATGAAGCCTCCGGCTATCTCACAATATCAA
ACACCGCTGTTTCGTATGAGCAATCCTAAT

>MH411395.1 *Electrophorus electricus* voucher IIAP-CIIAP-01016-4 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondria

AGATTTATAATGTAGTTGTAAGTGCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATGGTT
ATACCAATTATGATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAATCCACTGATAATTGGGG
CTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAATATAAGCTTCTGATTACTCCCTCCT
TCATTCATTTTACTTCTCGCTTCCCTCCGGGGTTGAAGCCGGAGCCGGCACCGGTTG
AACTGTATACCCCCCCTTGCAGGTAATCTTGCCCATGCTGGAGCCTCGGTAGAT
TTAACAATTTTTTCCCTACACTTGGCTGGCATGTCCTCAATTCTAGGATCAATTAA
CTTCATTACAACCATTATCAACATAAAACCTCCAGCAGCCTCTCAATACCAAACA
CCCTTGTTTGTGGGCCTTGTTAAT

>MH411351.1 *Hoplias malabaricus* voucher IIAP-CIIAP-01026-5 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AGATTTATAATGTTATCGTACTGCACATGCCTTCGTGATAATTTTCTTCATAGTA
ATGCCTATCATAATCGGGGGATTCGGGAACTGACTTGTTCCCCTCATGATTGGAG
CACCTGACATAGCCTTCCACGAATAAATAACATAAGTTTCTGACTTCTTCCCC
CTCATTACTTCTCCTGTTAGCCTCCTCTGGCGTAGAAGCGGGAGTCGGGACAGGC
TGAAGTGTACCCCCCTTGCAGGAAACCTTGCACATGCAGGAGCCTCCGTCG
ACCTGGCAATCTTTTCTCTCCATCTTGCAGGGGTCTCCTCAATTTTAGGGGCCATC
AATTTTATCACAACAATTATTAACATAAAACCCCTGCCATCTCACAATACCAA
CCCCCTATTTGTTTGGAGCTATTTAAT

>MG911835.1 *Hoplerythrinus unitaeniatus* voucher IIAP-CIIAP-00878-5 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AGATTTATAATGTTATCGTACTGCGCACGCCTTCGTAATAATTTTCTTCATAGTA
ATACCAATCATGATTGGAGGCTTTGGAAACTGACTTATCCCTCTTATGATCGGAG
CACCCGACATGGCCTTTCCACGAATAAACAATATGAGCTTTTACTTCTTCCACC
TTCCCTTCTATTACTCTTAGCTTCATCAGGGGTTGAAGCTGGGGTAGGAACAGGC

TGAACCGTCTACCCCCCTCTTGCCGAAATCTTGCCCACGCAGGAGCCTCAGTTG
ATTTAGCAATTTTCTCCCTTCATCTTGACAGGTGTATCCTCAATCCTAGGGGCCATT
AACTTTATTACAACAATTATTAATATAAAACCACCCGCCATCTCACAGTATCAGA
CTCCTCTGTTTCGTGTGGGCCACCCTAAT

>MG911916.1 *Pimelodus blochii* voucher IIAP-CIIAP-00909-4 cytochrome oxidase subunit I
gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTACAACGTTATCGTACTGCTCATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATGGTA
ATACCAATCATGATCGGAGGATTTGGAAATTGATTAATCCCACTAATGATCGGAG
CACCAGACATGGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTCCCACC
ATCATTCTCTCTCTACTTGCCTCATCAGGGGTAGAAGCTGGAGCAGGAACAGGA
TGAAGTGTATACCCCCCTCTCGCCGAAACCTTGACATGCAGGAGCTTCTGTAG
ACCTAACTATTTTCTCCCTCCACCTAGCAGGGGTGTCATCCATTTTAGGAGCCATT
AACTTCATCACAACAATTATTAACATGAAACCCCCAGCAATCTCGCAATACCAA
CACCATTATTTGTATGATCAGTCCTAAT

>MH411503.1 *Pimelodus ornatus* voucher IIAP-CIIAP-01051-3 cytochrome oxidase subunit
I gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAATGTTATTGTTACGGCCCATGCCTTCGTAATAATTTTCTTCATGGTT
ATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGGAATTGACTGGTCCCACTAATAATTGGGG
CACCAGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGCTTTTACTACTTCCCCC
CTCTTTTCTGCTATTACTTGCCTCCTCGGGGGTAGAAGCCGGAGCGGGGACAGGT
TGAAGTGTATATCCCCCTCTTGCCGGGAATTTGGCACATGCAGGGGCCTCTGTAG
ACCTGACTATTTTCTCCCTACATTTAGCAGGTGTATCCTCTATCCTGGGGGCTATT
AACTTCATTACAACAATCATTAAACATGAAACCTCCCGCTATTTTACAATATCAA
CGCCCTTGTTTCGTATGATCCGTCCTAAT

>MH411497.1 *Pimelodus pictus* voucher IIAP-CIIAP-01050-5 cytochrome oxidase subunit I
gene, partial cds; mitochondrial

AGATTTATAACGTTATCGTACTGCCACGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTA
ATACCAATCATAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTTCCCACTAATAATTGGAG
CGCCAGATATAGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTGCCCCC
CTCCTTCCTTCTCTACTTGCCTTCATCAGGAGTAGAAGCCGGAGCAGGGACAGGA
TGAAGTGTATACCCCCCTCTCGCCGAAACCTTGACATGCAGGAGCTTCTGTAG
ATTTAACTATTTTCTCCCTTCATTTAGCAGGGGTGTCATCTATTTTAGGTGCCATT
AACTTCATCACAACAATCATTAAACATGAAAGCCTCCCGCTATTTTACAATACCAGA
CGCCTCTGTTTGTATGATCTGTCCTAAT

>MH411518.1 *Leiarius marmoratus* voucher IIAP-CIIAP-01104-5 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTACAACGTCATTGTTACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATTTTCTTCATAGTA
ATACCTATTATGATCGGAGGGTTTGGAAATTGACTAATTCCCCTAATAATTGGAG
CACCCGACATGGCTTTCCACGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTACTTCCCC
ATCCTTTCTACTATTACTCGCCTCGTCTGGGGTAGAAGCCGGAGCAGGGACAGGA
TGGACCGTATATCCCCCTCTTGCTGGAAATCTCGCACATGCAGGAGCTTCTGTAG
ACCTAACCATTTTCTCTTTGCATCTGGCAGGGGTCTCATCAATCTTGGGGGCTATT
AACTTCATTACAACAATCATTAAACATGAAACCCCCAGCTATTTACAATAACAAA
CACCCTGTTTGTGTGGTCCGTCCTGAT

>MH411254.1 *Potamotrygon motoro* voucher IIAP-CIIAP-00933-9 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AAATCTATAACGTAGTCGTTACTGCCACGCCTTCGTAATAATTTTCTTCATAGTT
ATACCGATTATAATCGGTGGGTTTGGTAACTGACTAGTTCCACTAATAATCGGAG
CCCCAGACATAGCCTTCCACGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTTCCACC
ATCCTTCCTACTCCTACTAGCCTCAGCAGGAGTCGAAGCTGGAGCTGGCACAGGA
TGAACAGTTTATCCACCCCTAGCCGGAACTTAGCACACGCCGGAGCCTCTGTTCG
ACTTAACCATTTTCTCTCTACACCTAGCCGGCATCTCTTCCATTCTAGCATCCATT
AACTTCATCACCACAATCATTAAACATAAAACCACCAGCAATCTCTCAATAACAAA
CACCCTATTTGTCTGATCTATCCTCAT

>MH411260.1 *Potamotrygon orbignyi* voucher IIAP-CIIAP-00936-6 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AAATCTATAACGTAGTCGTTACTGCCACGCCTTCGTAATAATTTTCTTCATAGTC
ATACCGATTATAATCGGTGGGTTTGGTAACTGACTAGTTCCACTAATAATTGGGG
CCCCAGACATAGCCTTCCACGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTTCCACC
ATCCTTCCTACTCCTACTAGCCTCGGCAGGAGTCGAAGCTGGAGCTGGCACAGGA
TGAACAGTTTATCCACCCCTAGCCGGAACTTAGCACACGCCGGAGCCTCTGTTCG
ACTTAACCATTTTCTCTCTACACCTAGCCGGCATCTCTTCCATTCTAGCATCCATT
AACTTCATCACCACAATCATTAAACATAAAACCACCAGCAATCTCTCAATAACAAA
CACCCTATTTGTCTGATCTATCCTCAT

>MH507468.1 *Synbranchus marmoratus* voucher IIAP-CIIAP-01148-3 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTACAATGTTATCGTAACAGCACATGCATTTGTAATAATCTTCTTTATAGTA
ATACCAATTATAATTGGCGGTTTGGAAATTGACTAGTCCATTAATAATCGGCT

CCCCGATATAGCCTTTCCTCGAATAAACAATATAAGTTTCTGGCTCCTTCCACCC
TCCTTCTTACTTCTATTAGCATCCGCTGGAGTAGAAGCCGGTGCAGGAACAGGAT
GAACCGTTTACCCCCACTCGCAGGTAACGTTACACACGCAGGCGCCTCTGTGGA
TTAACAATCTTCTCCTTACATCTAGCAGGAGCCTCCTCAATTCTAGGTGCTATCA
ACTTCATCACTACCATTATTAACATAAAACACCCTACCGTTACACAATACCAAAC
CCCTTTATTCGTATGATCAATTATAAT

>MH002955.1 *Bryconamericus cismontanus* isolate MPUJ-694 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATCTACAATGTTATCGTAACTGCACATGCATTTGTGATAATTTTCTTTATAGTA
ATACCAGTAATAATTGGAGGCTTCGGGAACTGGCTTGTGCCCTAATAATTGGTG
CCCCTGACATAGCCTTTCGCCGAATGAACAACATAAGTTTCTGACTACTACCCCC
ATCTTTCCTCCTCCTACTAGCCTCATCTGGAGTCGAAGCCGGAGCGGGAACAGGA
TGAAGTGTATATCCCCCACTTGCTGGAAACCTAGCACATGCAGGAGCTTCTGTAG
ACCTAACAATTTTCTCACTTCACTTAGCGGGGGTGTCTTCCATTCTAGGTGCAATC
AATTTTATTACTACCATTATTAATATAAAACCCCCAGCCATCTCACAATACCAA
CACCTTTATTTGTCTGAGCTGTTCTGAT

>MH003002.1 *Bryconamericus macarenae* isolate MPUJ-1563 *Bryconamericus macarenae* cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAACGTTATCGTAACTGCACATGCATTTGTGATAATCTTCTTTATAGTA
ATACCAGTAATAATTGGAGGCTTTGGAAACTGACTTGTACCTCTCATGATCGGTG
CCCCAGACATAGCCTTCCCCCGAATAAATAATATGAGTTTCTGACTACTCCCCC
ATCCTTCCTTCTCCTACTAGCCTCATCTGGAGTTGAAGCTGGAGCGGGAACAGGA
TGAAGTGTTTACCCCCCACTCGCTAGCAACCTAGCACATGCAGGGGCTTCTGTAG
ACCTAACAATTTTCTCACTTCACTAGCCGGGGTGTCTTCCATTCTAGGGGCAATC
AATTTTATTACTACTATTATTAATATGAAACCCCCAGCTATTCACAATACCAAAC
ACCCTTATTTGTTTGAGCTGTCCTAAT

>FJ439410.1 *Astyanax bimaculatus* voucher AT4066ARG cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AGGTTTACAATGTTCTGGTAACCGCACATGCTTTCGTTATAATTTTCTTTATAGTC
ATACCAGTAATAATTGGAGGCTTTGGAAATTGACTCATTCCGCTCATGATTGGTG
CTCCAGATATAGCCTTCCCTCGGATAAACAACATAAGTTTCTGACTTCTTCCACC
ATCCTTCCTTCTCCTCCTAGCATCCTCCGGAGTTGAAGCTGGAGCGGGAACAGGG
TGAAGTGTATACCCCCCCTTGCCGGAAACCTTGCACATGCAGGAGCCTCTGTAG
ACTTAACAATTTTTTCACTTCACTTGGCTGGTGTCTCCTCAATCTTAGGGGCAATT

AACTTTATTACAACAATTATTAATATAAAAACCCCCAGCTATTTTACAATACCAA
CACCTTTATTTGTCTGAGCTGTATTAGT

> KY268243.1 *Astyanax metae* voucher LBPV-74627-LBP-18700 gen de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (COI), cds parciales; mitocondrial

AAGTATACAATGTTCTAGTAACCGCACATGCTTTTGTATAATTTTCTTTATAGTC
ATGCCCGTAATAATTGGGGGCTTTGGGAACTGGTTAATTCCGTTAATAATTGGCG
CCCCAGACATGGCCTTCCCCCGAATAAATAACATAAGTTTCTGACTCCTCCCCC
ATCCTTCCTTCTCCTTTTAGCATCATCTGGGGTTGAAGCTGGGGCGGGAACAGGG
TGAAGTGTGTACCCCCCTCTTGCCGAAACCTTGCACATGCGGGGGCTTCTGTTG
ATCTAACTATCTTTTCTCTTCACCTAGCCGGTGTTCCTCAATCTTGGGGGCAATT
AATTTTATTACAACCATTATTAATATAAAAACCTCCAGCTATTTTACAATACCAA
CACCTTGTTTGTCTGGGCTGTTCTAGT

> KY268266.1 *Vale Astyanax venezuelae* LBPV-74622-LBP-18701 gen de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (COI), cds parciales; mitocondrial

AAGTATATAATGTTCTAGTAACCGCACATGCTTTTGTATAATTTTCTTTATAGTC
ATGCCTGTAATAATCGGGGATTTGGGAACTGATTAATTCCGCTTATAATTGGCG
CCCCAGACATGGCCTTCCCCCGAATAAATAACATAAGTTTTTACTTCTCCCCC
ATCCTTCCTTCTCCTTTTAGCATCGTCTGGGGTTGAAGCTGGGGCGGGAACAGGG
TGAAGTGTCTACCCCCCTCTTGCCGAAACCTTGCACATGCAGGGGCTTCTGTGG
ATCTAACAATCTTTTCACTACACCTAGCCGGTGTTCCTCAATCTTGGGGGCAATT
AATTTTATTACAACCATTATTAACATGAAACCCCCAGCTATTTTACAGTATCAA
CACCTTGTTTGTCTGGGCTGTCCTAGT

> KY267610.1 *Astyanax abramis* voucher LBPV-41614 gen de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (COI), cds parciales; mitocondrial

AGGTTTACAATGTTCTGGTAACCGCACATGCTTTCGTTATAATTTTCTTTATAGTC
ATGCCAGTAATGATTGGAGGCTTTGGAAATTGACTCATTCCGCTCATGATTGGTG
CTCCAGATATAGCCTTCCCCCGAATAAACAACATAAGTTTCTGACTCCTTCCACC
ATCTTTCCTTCTCCTCCTAGCATCCTCCGGAGTTGAAGCTGGAGCGGGAACAGGA
TGAAGTGTATACCCCCCCTTGCCGAAACCTTGCACATGCAGGGGCTTCTGTAG
ACTTAACAATTTTTTCACTTACCTAGCTGGTGTCTCCTCAATCTTAGGGGCAATT
AACTTTATTACAACAATTATTAACATAAAAACCCCCAGCTATTTTACAATACCAA
CACCTTTATTTGTCTGAGCTGTCTTAGT

>MH931545.1 *Aequidens* sp. *macula escura* TH-2018 aislado 100514 gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), cds parciales; mitocondrial

AAATTTATAATGTAATTGTTACTGCACACGCCTTTGTAATAATTTTCTTTATGGTT
ATACCCATCATAATTGGGGGCTTTGGAACTGACTAATTCCACTAATAATTGGTG
CCCCTGACATAGCCTTCCCGCGAATAAATAATATGAGCTTCTGACTCTTGCCCC
CTCCTTTCTCCTCCTTCTAGCCTCTTCAGGAGTAGAAGCTGGTGCTGGCACAGGGT
GGACTGTTTATCCTCCCCTGGCAGGCAACTTGGCACACGCTGGCCCCTCCGTGGA
CCTAACCATCTTTTCCCTCCACTTGGCCGGTGTCTCTTCAATTCTTGGAGCAATTA
ATTTTATTACAACAATTATTAATATAAAACCTCCAGCTATCTCCAATACCAAAC
GCCCCTATTCATCTGAGCACTTTTAAT

>KP772604.1 *Ancistrus* sp. 'INPA 43862' bio-material UFAM CTGA 14547 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AGATCTACAATGTCATCGTTACCGCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTT
ATACCAATTATGATCGGGGGCTTTGGAAATTGACTAGTTCCACTAATGATTGGAG
CGCCCGACATAGCCTTCCCACGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTTCTCCCCCC
TTCATTCTTCTCTTACTAGCCTCTTCGGGAGTTGAAGCAGGGGCAGGGACAGGT
TGAAGTGTATACCCACCCCTTGCCGGAACTTAGCCCACGCAGGAGCTTCAGTTG
ACCTAACTATTTTCTCACTACACCTAGCTGGTGTATCTTCAATTCTAGGTGCAATT
AACTTCATTACTACAATTATCAACATAAAACCCCCAGCTATTTCACAATATCAAA
CCCCCTATTTGTGTGGGCCGTACTTGT

>GU817291.1 *Aequidens diadema* cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAATGTAATTGTTACTGCACACGCCTTTGTAATAATTTTCTTTATGGTC
ATACCCATCATAATCGGGGGCTTTGGCAACTGACTAATTCCACTAATAATTGGCG
CCCCTGATATAGCCTTCCCGCGAATAAATAATATGAGTTTCTGACTCTTGCCCCC
TCCTTTCTTCTCCTTTTGGCTTCCTCAGGGGTTGAAGCTGGTGTGGCACAGGGTG
GACTGTATACCCCCATTGGCAGGCAACCTAGCACACGCCGGCCCCTCCGTAGAC
CTAGCTATTTTTTCCCTCCACTTAGCCGGCGTCTTCAATTCTTGGGGCAATTA
TTTTATTACAACAATTATTAATATAAAACCCCCAGCTATCTCCAGTACCAAACA
CCCCTATTCATCTGAGCACTTTTGAT

>EU888037.1 *Aequidens tetramerus* cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

AAATTTATAATGTAATTGTTACTGCACACGCCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTT
ATACCCATTATGATTGGAGGTTTTGGTAACTGGCTAATTCCACTAATAATTGGCG
CCCCGATATAGCCTTCCCCCGAATAAACAATATGAGCTTCTGACTCTTACCCCC
CTCCTTTCTACTACTTCTCGCCTCTTCGGGGGTAGAAGCCGGTGTGGCACAGGG

TGGACTGTTTATCCCCATTAGCAGGAAACCTGGCACACGCTGGCCCATCCGTGG
ACTTAGCCATCTTTTCCCTCCATTTGGCCGGTGTCTCTTCCATTCTAGGGGCAATT
AATTTTCATCACCACAATTATTAATATAAAACCCCCAGCCATCTCCCAGTACCAA
CGCCCTTATTTATCTGGGCCCTTTTAAT

>AY263860.1 *Crenicichla alta* cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS;
mitochondrial gene for mitochondrial product

AGCTTTTTAATGTTATTGTTACTGCACATGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTT
ATACCCGTAATAATCGGAGGCTTTGGCAACTGGCTAATTCCTCTAATACTTGGCG
CTCCTGACATGGCTTTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTTTGACTCCTACCCCT
TCATTCATTCTCCTATTAGCCTCCTCAGGCATCGAAGCAGGGGTGGGCACAGGAT
GAACCGTCTACCCCCCGCTAGCAAGTAATCTTGCACATACTGGCCCCTCTGTAGA
TTAGCTATCTTCTCCCTTCACCTAGCAGGTGCCTCCTCAATCTTAGGAGCAATTA
ATTTTATTACTACCATTATTAACATAAAACCCCCAGCCATGACTATCTACCAAAT
ACCCTTGTTTGTTTGAGCTCTTTTAAT

>MG699476.1 *Hoplias curupira* voucher GFSU141049 cytochrome oxidase subunit 1 (COI)
gene, partial cds; mitochondrial

AGATTTACAATGTTATCGTCACTGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTC
ATACCAATTATGATCGGAGGATTCGGAAACTGACTTGTCCCCCTCATAATTGGGG
CGCCAGATATGGCTTTCCACGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCCC
CTCATTGCTACTCCTGTTGGCCTCATCAGGAGTGGAGGCCGGAGTCGGAACAGGC
TGAAGTGTCTACCCTCCCCTTGCGGGAAACCTTGCCCATGCAGGTGCTTCTGTAG
ACCTGGCCATCTTCTCCCTCCACCTCGCAGGGGCCTCCTCTATTCTAGGGGCTATC
AATTTTATTACAACAATTATCAACATGAAACCACCTGCCACCTCACAATATCAAA
CTCCACTATTTGTGTGGGCGACTTTGGT