

NICOLE ESTEFANIA IBAGON ESCOBAR

ALTO NÍVEL DE VARIAÇÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (TELEOSTEI, Erythrinidae) DA CÔLOMBIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, para obter o título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015**

T

I12a
2015

Ibagon Escobar, Nicole Estefania, 1987-

Alto nível de variação genética em populações de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) da Colômbia /

Nicole Estefania Ibagon Escobar. - Viçosa, MG, 2015.

vii, 30f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.23-30.

1. Traíra (Peixe) - Citogenética. 2. *Hoplias malabaricus*.
3. Filogeografia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal.
II. Título.

CDD 22. ed. 597.4809861

NICOLE ESTEFANIA IBAGON ESCOBAR

ALTO NÍVEL DE VARIAÇÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (TELEOSTEI, Erythrinidae) DA CÔLOMBIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, para obter o título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de março de 2015:

Lúcio Antônio de Oliveira Campos

Javier A. Maldonado O.
(Co-orientador)

Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Estar lejos de casa ha sido un sacrificio enorme, lejos de mis Padres que con mucho esfuerzo planearon un futuro profesional para mí. Creo que ellos nunca pensaron que mi futuro incluyera viajar fuera del país y dejar de vernos por tantos meses, sin embargo, creo que están orgullosos de este camino que he tomado y todo esto es por ellos, por hacer de mí desde que era muy pequeña, una bióloga. Este camino que hace parte de un sueño, un sueño compartido que no habría sido posible sin la presencia de mi esposo, que desde el primer momento se volvió mi compañero de viaje y fuerza para hacer lo que me gusta todos los días. Jose es la persona más bonita que conozco y por eso me encanta estar a su lado.

Jorge, mi orientador, ha viajado conmigo imaginariamente en el barco Beagle por las montañas de Colombia, entre las cordilleras hasta las dos costas, desde el Cretáceo hasta el Mioceno tardío, intentando entender como ese nuestro objeto de estudio cuenta su historia evolutiva en las hermosas aguas de Colombia. Javier, ha contribuido desde la distancia con una logística impecable, realizando la conexión del proyecto con instituciones colombianas, necesarias a la hora de hacer este tipo de trabajos.

En Brasil he conocido personas maravillosas, dentro y fuera del laboratorio, colombianos y brasileiros que han ayudado a este proceso de formación que me ha convertido en otra persona. En el laboratorio me instruyeron y tuvieron mucha paciencia Udson Santos, Natalia Travenzoli y Marina Souza además de todos los marujos del Beagle que contribuyeron a este trabajo.

Agradezco enormemente al profesor de la Universidad de Sucre y amigo Pedro Caraballo y sus estudiantes me colaboro en las salidas de campo en el bajo Magdalena. Hoy puedo mirar atrás y no veo la misma persona.

A Cristhian Conde en las colectas del Alto Magdalena.

A la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa CAPES por la beca que recibí durante este tiempo y a FAPEMIG por el apoyo en algunos viajes a eventos científicos para presentar resultados parciales del proyecto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. OBJETIVOS	1
2. ARTICULO CIENTIFICO	2
2.1 ABSTRACT	3
2.2 INTRODUCCION	4
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.4 RESULTADOS	11
2.5 DISCUSIÓN	17
2.6 REFERENCIAS	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localidades de colecta de <i>Hoplias malabaricus</i> en Colombia. 1. Quebrada La Boa; 2. Quebrada Guyubito; 3. Quebrada La Arenosa; 4. Quebrada La Bernal; 5. La Peña; 6. Finca de Asis; 7. Ciénaga Zarzal; 8. Ciénaga Atascoso; 9. Ciénaga Los Chivos; 10. Río San Jorge; 11. Río Ranchería; 12. Ciénagas de Tumaradó; 13. Ciénaga de Betancí; 14. Quebrada Jesús, 15. Caño Maraca. Triángulos amarillos: Alto + Medio Magdalena. Triángulos azules: Bajo Magdalena + Caribe. Triángulo Rojo: Dagua, Pacífico. Triángulo verde: Orinoco	7
Figura 2. Cariomorfo teñido con Giemsa de <i>Hoplias malabaricus</i> en las porciones a. Alto; b. Medio y c. Bajo Magdalena. Distribución de regiones organizadoras del nucléolo activas en la última interface celular d. Alto; e. Medio y f. Bajo Magdalena	12
Figura 3. Patrones de marcación de 5S rDNA para las poblaciones de <i>Hoplias</i> <i>malabaricus</i> del Alto (a), Medio (b) y Bajo Magdalena. Sonda 18S rDNA en Alto (d), Medio (e) y Bajo Magdalena (f).	13
Figura 4. Marcación de la sonda 5sHindIII-DNA en las poblaciones de Alto Magdalena (a), Medio Magdalena (b) y Bajo Magdalena (c).	14
Figura 5. Hibridación fluorescente in situ (FISH), sonda GA(15) de DNA para Alto (a) Medio y (b) Bajo Magdalena (c). Sonda CA(15) en Alto (d) Medio (e) y Bajo Magdalena (f).....	15
Figura 6. Relaciones filogenéticas de <i>Hoplias malabaricus</i> del Norte de Suramérica usando secuencias concatenadas (RAG2, Atpase6 y COI), La reconstrucción fue realizada análisis bayesiana. Rojo: Vertientes del Pacífico. Amarillo: Alto y Medio Magdalena. Verde: Orinoco. Azul. Bajo Magdalena + Vertientes del Caribe. Soporte estadístico de cada nodo expresado como Probabilidad posterior (Bayesiana)/Bootstrap (Parsimonia)/Bootstrap (Verosimilitud). Estrellas amarillas representan ejemplares con cariomorfo 2n=42A y cuadrados azules con 2n=40C. Barra: Distancia Molecular 0.06r	16

LISTA DE TABELAS

Tabla 1. Especímenes colectados en las porciones alta, media y baja del río Magdalena. n: número de ejemplares. Vertiente Magdalena-Cauca, AMg: Alto Magdalena, MMg: Medio Magdalena, BMg: Bajo Magdalena, Vertiente Caribe: R: Ranchería, A: Atrato, S: Sinú; Vertiente Pacífico: D: Dagua, O: Orinoco*	
Muestras con técnicas citogenéticas	8
Tabla 2. Estimado de divergencia evolutiva entre grupos de secuencias pares usando matriz concatenada	17

RESUMO

IBAGÓN, Nicole Estefanía, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Alto nível de variação genética em populações de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) da Colômbia.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientador: Javier A. Maldonado-Ocampo.

O objetivo do estudo foi reconstruir a biogeografia histórica das populações de *Hoplias malabaricus* nas bacias da Colômbia e no Norte da América do Sul usando citogenética e dados moleculares, para propor uma avaliação de estas populações na região Neotropical. Foram coletadas sessenta e nove amostras. Usando técnicas citogenéticas tradicionais e protocolos de hibridização in situ (FISH). Foram realizados inferência bayesiana e análise de máxima parcimônia usando genes mitocôndrias ATP synthase 6 (ATPase-6), cytochrome c oxidase subunit 1 e o gene nuclear recombination activating gene 2 (RAG2). As populações de *Hoplias malabaricus* do Alto e Médio Magdalena mostram o cariomorfo $2n=42A$, e as populações do Baixo Magdalena apresenta o cariomorfo $2n=40C$. Os dados moleculares mostram dois haplogrupos: O Haplogrupo I está composto pelo Alto, Médio Magdalena + Dagua (Drenagem do Pacífico) e o Haplogrupo II formado pelo baixo Magdalena + Bacias do Caribe (San Jorge, Ranchería, Atrato e Sinú) + Orinoco. A biogeografia histórica de *H. malabaricus* na Colômbia mostra grandes diferenças ecológicas entre o Alto Magdalena+Medio Magdalena + Dagua y Atrato + Baixo Magdalena + Orinoco + Sinú + Ranchería.

ABSTRACT

IBAGÓN, Nicole Estefanía, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2015. **High level of genetic variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations from Colombia.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-Adviser: Javier A. Maldonado-Ocampo

The aim of this study was to reconstruct the historical biogeography of *Hoplias malabaricus* populations in the river basins of Colombia and Northern South America using cytogenetic and molecular data, to provide an assessment of those populations in the Neotropical Region. Sixty-nine samples were collected. Cytogenetic techniques included standard and fluorescent in situ hybridization (FISH) protocols. Bayesian inference and maximum parsimony analyses were performed using mitochondrial genes ATP synthase 6 (ATPase-6), cytochrome c oxidase subunit 1 and the recombination activating gene 2 (RAG2) nuclear gene sequences. *Hoplias malabaricus* populations from the Upper and Middle Magdalena River showed the 2n=42A karyotype, whereas the population from the Lower Magdalena River had the 2n=40C karyotype. Molecular data showed two haplogroups: Haplogroup I composed of Upper, Middle Magdalena + Dagua (Pacific Coast drainage) and Haplogroup II formed by Lower Magdalena + Caribbean river basins (San Jorge, Ranchería, Atrato, and Sinú) + Orinoco. The biogeographical history of *H. malabaricus* in Colombia reflects deep ecological differences between the Upper +Middle Magdalena + Dagua River in the Pacific, and the Atrato River + Lower Magdalena + Orinoco + Sinú + Ranchería.

1. OBJETIVOS

- 1) Caracterizar los cariomorfos de *Hoplias malabaricus* de la cuenca del río Magdalena, incluyendo técnicas tradicionales de Bandeamiento y FISH.
- 2) Presentar un análisis filogeográfico de la especie basado en datos moleculares (mitocondriales y nucleares) con énfasis en las cuencas trans-Andinas en el norte de Suramérica.

2. ARTICULO CIENTIFICO

Altos niveles de variación genética entre poblaciones de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) en el norte de Suramérica

Nicole Ibagón¹, Javier A. Maldonado-Ocampo² y Jorge A. Dergam¹

¹. Departamento de Biología Animal, Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais Brasil. ². Laboratorio de Ictiología. Unidad de Ecología y Sistemática (UNESIS), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia

2.1 ABSTRACT

Aim The aim of this study was to reconstruct the historical biogeography of *Hoplias malabaricus* populations in the river basins of Colombia and Northern South America using cytogenetic and molecular data, to provide an assessment of those populations in the Neotropical Region.

Location Colombia river basins, South America.

Methods Sixty-nine samples were collected. Cytogenetic techniques included standard and fluorescent in situ hybridization (FISH) protocols. Bayesian inference and maximum parsimony analyses were performed using mitochondrial genes ATP synthase 6 (ATPase-6), cytochrome c oxidase subunit 1 and the recombination activating gene 2 (RAG2) nuclear gene sequences.

Results *Hoplias malabaricus* populations from the Upper and Middle Magdalena River showed the 2n=42A karyomorph, whereas the population from the Lower Magdalena River had the 2n=40C karyomorph. Molecular data showed two haplogroups: Haplogroup I composed of Upper, Middle Magdalena + Dagua (Pacific Coast drainage) and Haplogroup II formed by Lower Magdalena + Caribbean river basins (San Jorge, Ranchería, Atrato, and Sinú) + Orinoco.

Main conclusions The biogeographical history of *H. malabaricus* in Colombia reflects deep ecological differences between the Upper +Middle Magdalena + Dagua River in the Pacific with the 2n=42A Karyomorph, and the Atrato River + Lower Magdalena + Orinoco + Sinú + Ranchería showing 2n=40C Karyomorph.

Keywords *Hoplias malabaricus*, cytogenetics, Magdalena River, Andean Cordillera, Phylogeography

2.2 INTRODUCCION

En la región Neotropical, la distribución de los peces de agua dulce ha estado influenciada por el proceso de formación de los Andes (Lundberg, 1997; Lima & Ribeiro, 2011; Schaefer et al., 2011). El ascenso de esta cadena de montañas inició en el cretáceo tardío en la región sur de Perú, Bolivia y norte de Chile, siendo que la fase activa más reciente ocurrió hasta 8 millones de años atrás en su porción norte, afectando las cuencas de la región del Norte de Suramérica (Albert & Reis, 2011). Esta región varía drásticamente, presenta alta riqueza de especies y endemismos dentro de cada cuenca debido al surgimiento gradual de varios brazos de la cordillera de los Andes, cuando los movimientos de placas tectónicas provocaron eventos de vicarianza y de dispersión (Rodríguez-Olarte et al., 2011). Los estudios de biodiversidad pueden beneficiarse con el uso de taxa de amplia distribución en la región Neotropical, como demostrado en (Sivasundar et al., 2001; Hulen, 2004; Torrico et al., 2009; Carvalho-Costa et al., 2011; Santos, 2013)

La familia Erythrinidae, a la cual pertenecen los géneros *Hoplias*, *Erythrinus* y *Hoplerythrinus*; contiene especies que se caracterizan por presentar comportamiento sedentario, de esta forma, accidentes fisiográficos como caídas de agua o rápidos constituyen barreras que pueden reducir o interrumpir el flujo de genes entre las poblaciones que habitan en una misma cuenca (Blanco et al., 2010b). Las especies del género *Hoplias* habitan ambientes loticos y lenticos, donde son depredadores de otros peces (Taphorn, 1992), se ubican en los ríos abajo debajo de 660 m.s.n.m. (Lujan et al., 2013). La especie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) presenta uno de los problemas más complejos en la taxonomía de peces neotropicales (Oyakawa, 2003; Mattox et al., 2014), sobrelapandose en datos merísticos y morfométricos entre otras especies descritas del mismo género (Bifi, 2013). *H. malabaricus* tiene amplia distribución en la región Neotropical, desde el norte de Argentina hasta Panamá (Oyakawa, 2003), en cuencas a ambos lados de los Andes (Mattox et al., 2014).

Basado en caracteres tradicionales de morfología externa *H. malabaricus* es considerada una sola unidad taxonómica de amplia distribución (Oyakawa, 2003; Mattox et al., 2014). Desde el año 1980 han sido publicados más de 40 artículos en el área de citogenética y filogeografía sobre esta especie. Estos

estudios han sido realizados en el sur de Suramérica, en la cuenca del río Amazonas en territorio brasileiro y cuencas del noreste de Brasil. Evidencias citogenéticas sugieren que este taxón es de un complejo de especies (Bertollo et al., 1979, 2000). Siete distintos cariomorfos (A-G) son actualmente reconocidos, con diferentes números diploides, morfologías cromosómicas y presencia de sistemas de cromosomas sexuales (Bertollo et al., 2000; Santos et al., 2009; Cioffi & Bertollo, 2010). Los cariomorfos con mayor distribución en la región Neotropical son $2n=42A$ y $2n=40C$. En los últimos años, los estudios citogenéticos han sido complementados con datos moleculares permitiendo entender el proceso de vicarianza y dispersión de *Hoplias malabaricus* en Suramérica (Dergam et al., 2002; Santos et al., 2009; Pereira et al., 2012; Marques et al., 2013; Santos, 2013). Por ejemplo en la región costera de Brasil, fue posible detectar el efecto vicariante de la formación de Abrolhos en las poblaciones de *H. malabaricus* con 42 y 40 cromosomas (Pereira et al., 2012). Además, se logró demostrar un evento de captura de cabecera entre la cuenca del río San Francisco y Paraná por medio de datos citogenéticos y moleculares (Santos et al., 2009).

Hoplias malabaricus puede ser considerada paraespecie (Albert et al. 2011), este concepto agrupa especies en las que una forma ancestral puede originar una o más especies hijas sin que ella misma entre en extinción (Ackery & Vane-Wright, 1984). En este estudio, las unidades taxonómicas operacionales están representadas por poblaciones que comparten características citogenéticas y/o moleculares.

En Colombia, *H. malabaricus* se encuentra en los cinco drenajes hidrográficos: Amazonas, Orinoco, Magdalena, Pacífico y Caribe (IDEAM, 2008; Maldonado-Ocampo et al., 2008); todas ellas derivadas de la cuenca proto-Orinoco-Amazonas (Rodríguez-Olarte et al., 2011) aunque no existe registros de esta especie para la cuenca alta del río Cauca. La cuenca del río Magdalena ocupa la mayor parte de los Andes Colombianos con un área de 257,438 km², drenando las Cordilleras Oriental Central y Occidental (Restrepo & Kjerfve, 2000a, 2000b). El drenaje del Pacífico conocido también como Choco Biogeográfico, abarca el borde oeste de la cordillera occidental y el valle del río Atrato, este drenaje corre inicialmente hacia el occidente pero desemboca en el Caribe Colombiano (Mojica et al., 2004; Maldonado-ocampo

et al., 2006, 2012). El río Ranchería nace en el lado oeste de la Sierra Nevada de Santa Marta a 3875 msnm y desemboca luego de 248 km, esta vertiente comparte ictiofauna con sus vecinos el río Magdalena y Catatumbo, este último pertenece a la cuenca del Lago Maracaibo (Mojica et al., 2006). El río Sinú nace a 3400 msnm y luego de 350 km de recorrido hasta su desembocadura en San Bernardo del Viento (Acosta, 2013)

Existe una evidente falta de conocimiento de la diversidad cariotípica y molecular de las poblaciones de *H. malabaricus* en cuencas trans-andinas del norte de Suramérica. Datos preliminares moleculares sugieren que la población del Alto Magdalena es grupo hermano de todas las otras poblaciones del continente (Santos, 2013). En este sentido, este estudio tiene como objetivos: 1) Caracterizar los cariomorfos de *Hoplias malabaricus* de la cuenca del río Magdalena, incluyendo técnicas tradicionales de Bandeamiento y FISH. 2) Presentar un análisis filogeográfico de la especie basado en datos moleculares (mitocondriales y nucleares) con énfasis en las cuencas trans-Andinas en el norte de Suramérica.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y sitios de colecta

Fueron colectados 69 individuos de *Hoplias malabaricus*, en 14 localidades de cuencas trans-Andinas: Magdalena (Porción Alta, Media y Baja), Ranchería, Atrato, Sinú y Dagua, además de una localidad cis-Andina en la cuenca del Orinoco (Tabla 1, Figura 1). Los ejemplares fueron depositados en la colección de ictiología de la Pontificia Universidad Javeriana, en Colombia (MPUJ). Las localidades de colecta en Alto y Medio Magdalena son pequeñas quebradas con agua corriente, en cuanto que en el Bajo Magdalena se los especímenes fueron colectados en sistemas lentos (ciénagas).



Figura 1. Mapa de localidades de colecta de *Hoplias malabaricus* en Colombia. 1. Quebrada La Boa; 2. Quebrada Guyubito; 3. Quebrada La Arenosa; 4. Quebrada La Bernal; 5. La Peña; 6. Finca de Asis; 7. Ciénaga Zarzal; 8. Ciénaga Atascoso; 9. Ciénaga Los Chivos; 10. Río San Jorge; 11. Río Ranchería; 12. Ciénagas de Tumaradó; 13. Ciénaga de Betancí; 14. Quebrada Jesús; 15. Caño Maraca. Triángulos amarillos: Alto + Medio Magdalena. Triángulos azules: Bajo Magdalena + Caribe. Triángulo Rojo: Dagua, Pacífico. Triángulo verde: Orinoco

Todos los ejemplares incluidos en este estudio fueron identificados como *Hoplias malabaricus* de acuerdo con claves de identificación taxonómica (Géry, 1977; Oyakawa, 2003; Oyakawa & Mattox, 2009; Mattox et al., 2014). Los animales fueron sacrificados bajo el permiso no. 29/2013 de Comisión de Ética en el uso de animales (CEUA) de la Universidad Federal de Viçosa.

Tabla 1. Especímenes colectados en las porciones alta, media y baja del río Magdalena. n: número de ejemplares. Vertiente Magdalena-Cauca, AMg: Alto Magdalena, MMg: Medio Magdalena, BMg: Bajo Magdalena, Vertiente Caribe: R: Ranchería, A: Atrato, S: Sinú; Vertiente Pacífico: D: Dagua, O: Orinoco* Muestras con técnicas citogenéticas

LOCALIDAD	Coordenadas	n (♂/♀)	CODIGOS
Quebrada La Boa, Yaguará, Huila (AMg)	2°43'12,56"N 75°26'8,98"O	4(2/2)	NI01*, NI02*, NI03*, NI04*
Quebrada Guyubito, Tesalia, Huila (AMg)	2°33'56,66"N 75°36'40,41"O	1(0/1)	NI05*
Quebrada La Arenosa, El Guamo, Tolima (AMg)	4°13'37,67"N 74°59'31,68"O	6(4/2)	NI20*, NI21*, NI22*, NI23, NI24*, NI25*
Quebrada La Bernal, Honda, Tolima (MMg)	5°13'58,33"N 74°43'53,59"O	9(4/5)	NI27*, NI28*, NI29*, NI30*, NI31*, NI32*, NI33*, NI34*, NI35*
Corregimiento de La Peña, Cicuco, Bolívar (BMg)	9°13'37,04"N 74°43'44,74"O	5(2/3)	NI36, NI37, NI38, NI39*, NI47*
Finca de Asis, Magangué, Bolívar (BMg)	9°16'28,76"N 74°48'47,85"O	11(11/0)	NI40*, NI41*, NI42*, NI43*, NI44*, NI45*, NI46*, NI48*, NI49*, NI50*, NI51*
Ciénaga Zarzal, Mahates, Bolívar (BMg)	10°15'12,09"N 75°11'29,86"O	3(2/1)	NI11, NI15, NI16
Ciénaga Atascoso, Mahates, Bolívar (BMg)	10°14'51,32"N 75°12'30,51"O	4(3/1)	NI12, NI13, NI14, NI17
Ciénaga Los Chivos, Manatí, Atlántico (BMg)	10°24'10,13"N 75° 3'22,95"O	2(2/0)	NI18, NI19
Rio San Jorge, Finca Cuba, Montelibano, Córdoba (BMg)	8°0'30,3"N 75°24'17,7"O	3	JAM607, JAM608, JAM609
Ranchería (R)	Ranchería	3	JAM1372, JAM1373, JAM1374
Ciénagas de Tumaradó, Turbo, Antioquia (A)	7°50'11,67"N 77°2'1,39"O	9	NI52, NI53, NI54, NI55, NI56, NI57, JAM1383, JAM1384, JAM1385
Ciénaga de Betancí, Montería, Córdoba (S)	8°22'54"N 75°47'68"O	3	JAM580, JAM581, JAM582
Quebrada Jesús, San Cipriano, Valle del Cauca (D)	3°49'58,63"N 76°47'18,37"O	3	JAM647, JAM648, JAM649
Caño Maraca, Estado Portuguesa, Venezuela (O)	5°30'23"N 60°15'19"O	3	W1; W2; W4
Total		69	

Análisis Citogenéticos

Después de la colecta, la división celular fue estimulada en vivo mediante aplicación de levadura hidratada (Molina, 2001). Para el procesamiento, los peces fueron anestesiados con aceite de clavo (Griffiths, 2000); los cromosomas mitóticos fueron obtenidos a partir de una suspensión de células del riñón anterior o cefálico, tratamiento con colchicina (solución acuosa de 0,0125%), utilizando el método convencional de secado al aire (Bertollo et al., 1978). Aproximadamente 30 metafases se analizaron por espécimen para confirmar el número diploide y la morfología del cariotipo. Los cromosomas fueron teñidos usando coloración convencional (Giemsa 0,5%); las imágenes de las metafases fueron obtenidas en microscopio Olympus BX53 y software CellSens Dimensions, medidas en software Image Pro Plus®. Los cromosomas fueron clasificados en metacéntricos (m) o submetacéntricos (sm) dividiendo el valor de la longitud del brazo mayor por el menor (Levan et al., 1964) organizados en orden decreciente dentro de cada clase morfológica. Las regiones organizadoras del nucléolo activas en la última interfase celular fueron identificadas por impregnación con nitrato de plata (Howell & Black, 1980).

La técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) fue realizada (Pinkel et al., 1986) con modificaciones, usando secuencias de DNA repetitivo y sondas aisladas del genoma de *Hoplias malabaricus*. La sonda 5S rDNA contiene 120 pares de bases (bp) del gen codificador 5S rDNA y 200 bp de espaciador no transcrito (NTS) (Martins et al., 2006). La sonda 18S rDNA de 1400 bp fue obtenida por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR) a partir de DNA nuclear (Hatanaka & Galetti, 2004; Cioffi et al., 2009a). Las sondas 5S y 18S rDNA fueron clonadas en vectores de plásmidos y propagadas en células TOP10F de *Escherichia coli*. La sonda específica para *H. malabaricus* 5HindIII-DNA es una secuencia de 360 bp compuestas por un segmento similar al 5SrRNA de 95 bp y 265 bp similar al NTS de 5S rDNA (Martins et al., 2006). Estas sondas fueron marcadas por medio de nick-translation con digoxigenina, y solución de detección conjugada de avid-FITC y anti-avidina-biotina (Sigma).

También fueron utilizados los microsatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ marcados con Cy3 en su extremo 5'. Los cromosomas fueron contrastados con Fluoroshield DAPI (Sigma).

Análisis Filogeográficos

Se extrajo el ADN a partir de tejidos (hígado, corazón o filamentos branquiales epiaxiales) fijados en etanol (Boyce et al., 1989). El gen *ATP synthetase 6* (ATPase-6) fue amplificado con los primers L8524 y H9236 (Quenouille et al., 2004). Para las reacciones el DNA fue sintetizado en 60 µl de reacción conteniendo 0,6 µl de dNTPs (20 mM), 6 µl de tampón buffer (200 mM Tris- HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 7,2 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,6 µl de cada primer (10 µM), 0,3 µl (2,5 U) de Taq DNA polymerase (Sigma), 3 µl de DNA (100 ng/µL) and 41,7 µl de H₂O. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 94 °C (5 min), 94 °C (45 s), 60 °C (1,5 min) y 72 °C (2 min), y 35 ciclos de 94 °C (45 s), 60 °C (1.5 min) y 72 °C (12 min).

El gen *cytochrome oxidase subunit I* (COI) fue amplificado con los primers FishF1t1 y FishR1t1. Para las reacciones de PCR, el DNA fue sintetizado en 75 µl de reacción conteniendo 0,75 µL e dNTPs (20 mM), 7,5 µL de tampón (200 mM Tris- HCl, pH 8,4, 500 Mm KCl), 6 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,75 µl de cada primer (10 µM), 0,75 µl (2,5 U) de Taq DNA polymerase (Phoneutria), 6 µl de DNA (100 ng/IL) and 45,75 µl de H₂O. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 94 °C durante 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, 72 °C por 45 s, y extensión final a 72 °C por 7 min.

El gen *recombination activating gene 2* (RAG2) fue amplificado usando los primers RAG2aF y RAG2bR (Lovejoy & Collette, 2001). Para las reacciones el DNA fue sintetizado en 37,5 µl de reacción conteniendo 0,3 µl de dNTPs (20 mM), 3,75 µl de tampón (200 mM Tris- HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 3,75 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,375 µl de cada primer (10 µM), 0,1875 µl (2,5 U) de Taq DNA polymerase (Sigma), 3 µl de DNA (100 ng/µL) and 25,77 µl de H₂O. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 94 °C (2 min), 94 °C (30 s), 55 °C (40 s) y 72 °C (1.5 min), y 35 ciclos de 94 °C (30 s), 55 °C (40 s) y 72 °C (9min). Los productos de PCR fueron purificados usando PEG8000 (20% de polietilenglicol, 2,5M NaCl) y la secuenciación se llevó a cabo en la plataforma de Macrogen (Macrogen, Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias fueron alineadas usando el algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994), en el software Mega 6.0 (Tamura et al., 2013). El modelo que más se ajustó las secuencias de cada gen fue obtenido usando MrModeltest (Nylander, 2004). Se realizó un análisis de inferencia bayesiana (Huelsenbeck et al., 2001) para 10 millones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) utilizando MrBayes v. 3.2.4 (Huelsenbeck et al., 2001) para las secuencias concatenadas de los tres genes en una matriz particionada. Adicionalmente se realizó un análisis de parsimonia implementando el programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002) mediante búsqueda heurísticas con 1000 réplicas de adición al azar e intercambio de ramas TBR. Todos los datos fueron tratados como no ordenados, y todas las transformaciones de carácter fueron igualmente pesadas. Finalmente, el análisis de máxima verosimilitud (ML) (Felsenstein, 1985) fue realizado con el Criterio de Información de Akaike (AIC). En los últimos dos análisis, el soporte estadístico de los nodos fue estimado usando 1000 seudoréplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985). El programa Mega (Tamura et al., 2013) fue utilizado para estimar la distancia entre las secuencias de las cuencas del bajo Magdalena con la del río Orinoco, como base para estimar la divergencia entre la población del Alto y Medio Magdalena con la población del río Dagua.

2.4 RESULTADOS

Análisis Citogenéticos

Los especímenes colectados en las localidades ubicadas en la porción Alta y Media del río Magdalena exhibieron cariomorfo $2n=42$ y número fundamental de 84, fórmula cariotípica $22\ m/20\ sm$ para machos y hembras y sin presencia de cromosomas sexuales diferenciados, correspondiendo al cariomorfo $2n=42A$ (Bertollo et al., 2000). En las localidades muestreadas del Bajo Magdalena, *Hoplias malabaricus* presentó $2n=40$, sin cromosomas sexuales diferenciados, semejante al cariomorfo $2n=40C$ (Bertollo et al., 2000), fórmula cariotípica de $22m/18sm$ (Figura 2).

La marcación de sitios con Ag-NORs fue telomérica y correspondió a los pares submetacéntricos 15, 19 y 21 para las localidades de Alto y Medio

Magdalena, mientras que en el Bajo Magdalena se marcó un par metacéntrico (7) y uno submetacéntrico (17) (Figura 2).



Figura 2. Cariomorfo teñido con Giemsa de *Hoplias malabaricus* en las porciones a. Alto; b. Medio y c. Bajo Magdalena. Distribución de regiones organizadoras del nucléolo activas en la última interface celular d. Alto; e. Medio y f. Bajo Magdalena

Los sitios 18S rDNA fueron localizados en las regiones teloméricas de los cromosomas de *Hoplias malabaricus* de las localidades del Alto Magdalena (Par 12, 15, 19 y 21), mientras que en el Bajo Magdalena los pares marcados fueron el 15, 19 y 21. En el Bajo Magdalena las sondas de 18S rDNA marcaron el centrómero y los telómeros del par 4 además del centrómero de par 6; estos pares cromosómicos mostraron marcación intersticial muy conspicua. Las poblaciones de Alto y Medio Magdalena compartieron la marcación del par 15. La sonda 5S rDNA marcó la región intersticial del par 4 metacéntrico en las

localidades ubicadas en el Alto y Medio Magdalena, también existe un segundo par marcado en cada población (Par 8 Alto Magdalena y Par 17 Medio Magdalena) (Figura 3). En el Bajo Magdalena la marcación de esta sonda se encontró en los pares metacéntricos 6 y 10. (Figura 3).

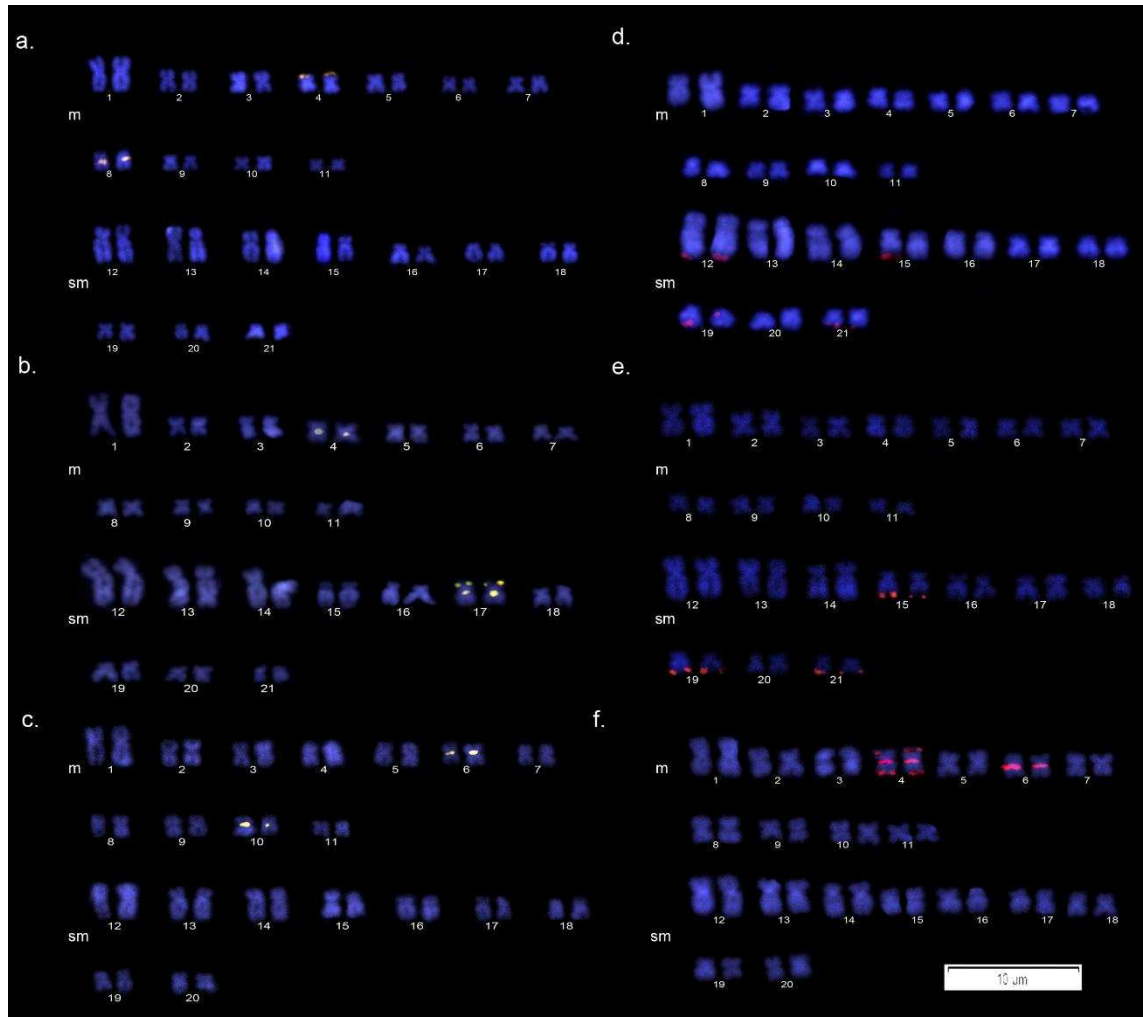


Figura 3. Patrones de marcación de 5S rDNA para las poblaciones de *Hoplias malabaricus* del Alto (a), Medio (b) y Bajo Magdalena. Sonda 18S rDNA en Alto (d), Medio (e) y Bajo Magdalena (f).

En las localidades que presentaron cariomorfo $2n=42A$ (Alto y Medio Magdalena) la marcación de la sonda 5S-HindIII-DNA corresponde a dos pares de cromosomas; mientras que en las poblaciones ubicadas en el Bajo Magdalena con cariomorfo $2n=40C$ se exhiben 11 cromosomas marcados en la región centromérica (Figura 4).

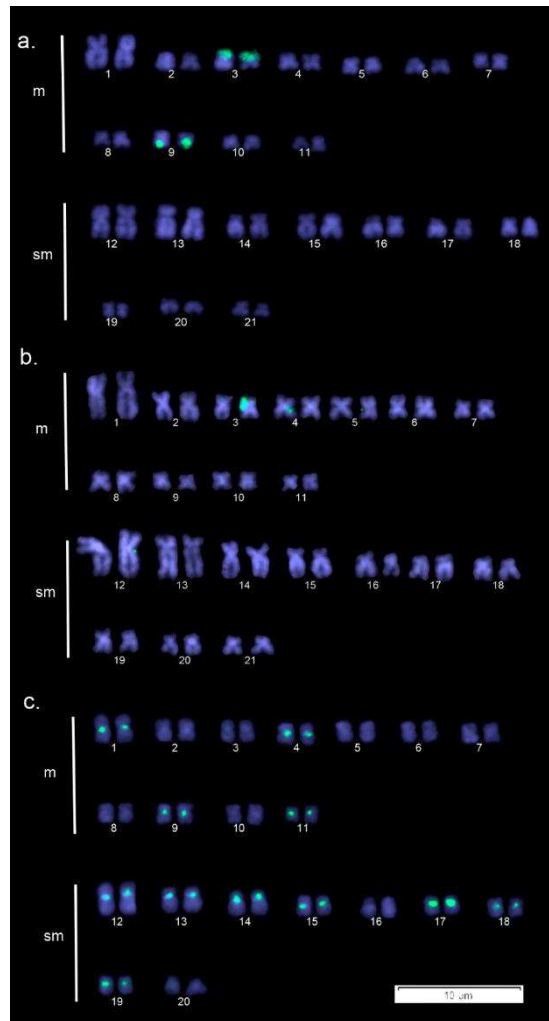


Figura 4. Marcación de la sonda 5sHindIII-DNA en las poblaciones de Alto Magdalena (a), Medio Magdalena (b) y Bajo Magdalena (c).

Las sondas $(CA)_{15}$ y $(GA)_{15}$ presentaron un patrón de bandas en la región subtelomérica en la mayoría de los brazos cromosómicos y una marca conspicua intersticial en el brazo largo del cromosoma 15 (Figura 5).

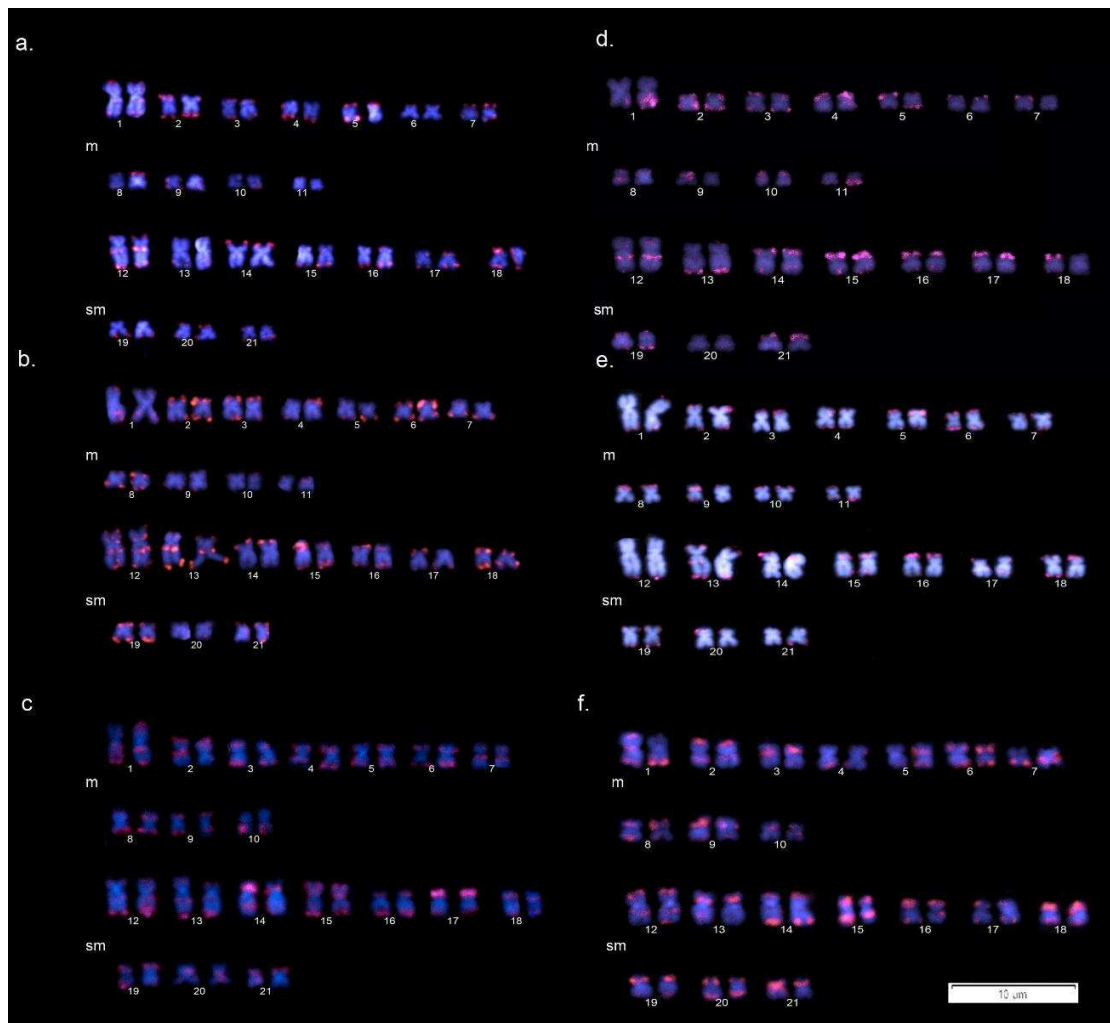


Figura 5. Hibridación fluorescente in situ (FISH), sonda GA(15) de DNA para Alto (a) Medio y (b) Bajo Magdalena (c). Sonda CA(15) en Alto (d) Medio (e) y Bajo Magdalena (f).

Análisis Filogeográficos

El alineamiento final incluyendo tres marcadores moleculares (Rag2, Atpase6, COI) resultó en una matriz con 2274 pb y 37 OTUs; estuvo compuesta por 630bp de Atpase6 cuyo modelo de sustitución fue HKY+G, 1020 bp del gen RAG2 con modelo de sustitución K2 y COI cuyo alineamiento contuvo 624 bp con modelo JC. Los sitios de transición/transversión=, frecuencia de bases A=25,1 C=26,9 G=20,3 T=27,6. Sitios no variables=1235.

El método de la inferencia bayesiana para los tres genes analizados (Atpase6, RAG2, COI1) presentan los siguientes haplogrupos: Haplogrupo I: porción alta y media del Magdalena (Amarillo) + Dagua (Rojo). Haplogrupo II: Bajo Magdalena + cuencas del Caribe (Ranchería, Atrato, Sinú) (Azul)+

Orinoco (Verde) (Figuras 6). Las topologías obtenidas con el análisis de cada gene individual fueron semejantes entre sí.

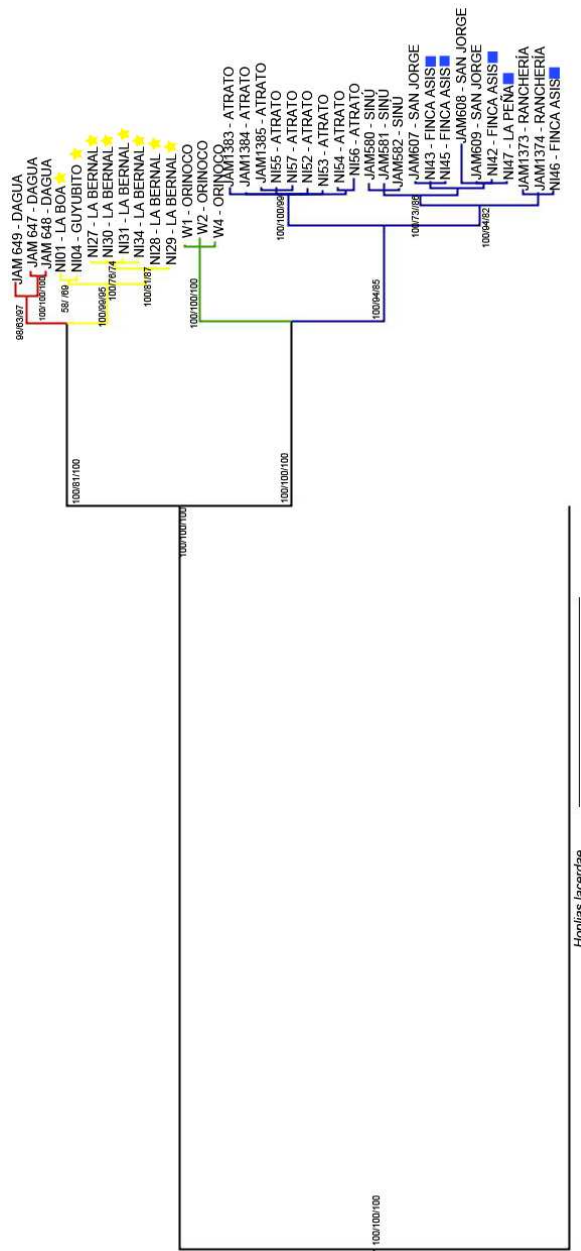


Figura 6. Relaciones filogenéticas de *Hoplias malabaricus* del Norte de Suramérica usando secuencias concatenadas (RAG2, Atpase6 y COI), La reconstrucción fue realizada análisis bayesiana. Rojo: Vertientes del Pacífico. Amarillo: Alto y Medio Magdalena. Verde: Orinoco. Azul. Bajo Magdalena + Vertientes del Caribe. Soporte estadístico de cada nodo expresado como Probabilidad posterior (Bayesiana)/Bootstrap (Parsimonia)/Bootstrap (Verosimilitud). Estrellas amarillas representan ejemplares con cariomorfo $2n=42A$ y cuadrados azules con $2n=40C$. Barra: Distancia Molecular 0.06r

El análisis de la distancia entre los haplogrupos fue realizado considerando las unidades indicadas por el análisis de las secuencias concatenadas, con la

opción “número de diferencias” de MEGA (Tabla 2). Se observa un valor máximo entre el Bajo Magdalena y el Alto y Medio Magdalena y un mínimo entre el Alto y Medio con el río Dagua. Este valor representa la mitad de divergencia entre Bajo Magdalena con el Orinoco.

Tabla 2. Estimado de divergencia evolutiva entre grupos de secuencias pares usando matriz concatenada

	Bajo Magdalena	Dagua	Alto y Medio Magdalena
Bajo Magdalena			
Dagua	21,076		
Alto y Medio Magdalena	22,284	4,542	
Orinoco	8,742	21,000	22,208

2.5 DISCUSIÓN

Análisis citogenéticos

En la cuenca del río Magdalena, las poblaciones de *Hoplias malabaricus* presentaron un patrón geográfico bien definido, exhibiendo el cariomorfo con mayor número diploide en las localidades del Alto y Medio Magdalena, y el menor número en el Bajo Magdalena, representando los dos cariomorfos con mayor distribución en la región neotropical (Bertollo et al., 2000).

La ocurrencia de marcaciones teloméricas de Ag-NORs es común en otras poblaciones de *H. malabaricus* que presentan cariomorfo $2n=42A$ y $2n=40C$ (Bertollo, 1996; Born & Bertollo, 2000, 2001; Lemos et al., 2002; Vicari et al., 2005; Cioffi et al., 2009b; Santos et al., 2009; Blanco et al., 2010a, 2010b; Cioffi & Bertollo, 2010; Pereira et al., 2012). El patrón de marcación de las Ag-NORs entre poblaciones del Alto y Medio Magdalena, difiere con las marcaciones en las poblaciones del Bajo Magdalena marcando pares diferentes en los dos cariomorfos encontrados. El patrón telomérico de las NORs es propio de *H. malabaricus*, mientras que en *Hoplias aimara* y *Hoplias intermedius* las AgNORs aparecen en la región intersticial de uno o dos pares de cromosomas (Morelli et al., 2007; Blanco et al., 2011). Fuera del género *Hoplias*, en *Hoplerythrinus unitaeniatus* las regiones de AgNORs se ubican tanto la región intersticial como terminal (Giuliano-Caetano & Bertollo, 1988, 1990; Diniz & Bertollo, 2003; Blanco et al., 2010a). La marcaciones de Ag-NOR en general, coincidieron con la sonda 18S en las poblaciones de Alto y Medio

Magdalena, esta ocurrencia es también observada en otras poblaciones de *H. malabaricus* (Cioffi et al., 2009a; Cioffi & Bertollo, 2010). Excepto en la población del Bajo Magdalena, donde los dos cromosomas portadores de sitios de 18S presentaron marcas intersticiales muy evidentes. La presencia de este tipo de marcación ocurrió en un par de cromosomas de una población de $2n=40C$ de la cuenca del río Paraguay (Cioffi & Bertollo, 2010). En su análisis, estos autores indican este par como homólogo del par sexual del cariomorfo $2n=40D$ (39machos/40 hembras). Por otro lado, estas poblaciones tienen apenas un par de cromosomas con sitios intersticiales, mientras que en el Bajo Magdalena, son dos pares de cromosomas portadores de sitios intersticiales, representando una autopomorfia de esta población y sugiere que el cariomorfo $2n=40C$ es más diversificado que lo previsto por (Bertollo et al., 2000).

El patrón de marcación de la sonda 5S rDNA también mostró diferencias significativas entre las tres poblaciones, variando en número y posición entre los cromosomas; las marcaciones con esta sonda muestran alta variación en *Hoplias malabaricus* manteniéndose siempre dos pares de cromosomas marcados en posición intersticial o centromérica (Ferreira et al., 2007; Cioffi et al., 2009a; Santos et al., 2009; Blanco et al., 2010b; Vitorino et al., 2011).

La sonda 5S HindIII fue la que demostró mayor diferencia entre los dos cariomorfos, con apenas 2 pares marcados en el Alto y Medio Magdalena y 11 pares en el Bajo Magdalena. Las otras poblaciones ya estudiadas de *Hoplias malabaricus* se asemejan a este último grupo, presentando entre 7 y 11 pares marcados con esta sonda (Martins et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Cioffi et al., 2009a, 2011b; Santos et al., 2009; Blanco et al., 2010b; Cioffi & Bertollo, 2010). La sonda 5S HindIII es una variante de 5s rDNA aislada de *Hoplias malabaricus*, conteniendo 360 bp en su totalidad de los cuales 95 son de 5S y 265 de NTS (Martins et al., 2006; Ferreira et al., 2007). La evolución de este tipo de secuencias fue descrita como la posibilidad de “pérdida o de ganancia” de este marcador durante la divergencia de *H. malabaricus* dentro de la familia Erythrinidae (Ferreira et al., 2007). Nuestros datos, basados en el patrón de la posición de las poblaciones del Alto y Medio Magdalena como grupo hermano de las poblaciones del resto de Suramérica, indican que la sonda 5S HindIII apareció en el ancestro de *H. malabaricus*.

Existe una gran acumulación de los microsatélites (GA)₁₅ y (CA)₁₅ en los cariomorfos 2n=42A (Alto y Medio Magdalena) y 2n=40C (Bajo Magdalena); estos muestran bandas sobresalientes en las regiones subteloméricas de casi todos los cromosomas. Esta situación ya había sido demostrada en otras localidades *Hoplias malabaricus* con cariomorfos 2n=42B y 2n=40D (Cioffi et al., 2011a). Los cromosomas de *Erythrinus erythrinus* muestran una marcación abundante de las sondas (GA)₁₅ y (CA)₁₅ estas generan señales evidentes de regiones de eucromatina y especialmente heterocromatina (Martinez, 2014).

Las diferencias observadas entre las poblaciones de Alto + Medio Magdalena y Bajo Magdalena sugieren que la evolución cromosómica dentro de *H. malabaricus* incluyó: reducción del número diploide, de 42 para 40, como sugerido por Pereira et al (2012), grandes alteraciones en el número y posición de las NORs y un aumento gradual de los sitios de la sonda 5S HindIII-DNA en las poblaciones de Suramérica.

Análisis Filogeográficos

El análisis filogeográfico de las poblaciones de *Hoplias malabaricus* usando secuencias mitocondriales (ATPase6 y COI1) y nucleares (Rag2) indica dos grandes haplogrupos. El haplogrupo I incluye las localidades de Alto y Medio Magdalena y la población del río Dagua. El haplogrupo II incluye poblaciones del Bajo Magdalena, Caribe y Orinoco.

La existencia en alopatria de los haplogrupos I y II dentro de la cuenca del río Magdalena pudo ocurrir por dos motivos: barreras ecológicas propias de la especie y por la diferente historia geomorfológica de secciones del Magdalena. *Hoplias malabaricus* es una especie de tipo sedentario (Rantin & Johansen, 1984; Monteiro et al., 2013), cuya movilidad puede ser interrumpida por rápidos del río Magdalena (Restrepo et al., 2000). La variación ecológica a lo largo del río parece ser responsable por lo observado en otras especies, como la especie migratoria *Prochilodus magdalenae*, la cual mostró la presencia de tres grupos a lo largo del río (Berdugo & Barandica, 2014). El aislamiento genético de poblaciones dentro de un mismo drenaje también fue descrito en la especie de pez-aguja *Potamorhaphis*, cuyas poblaciones costeras de la cuenca del Orinoco y Amazonas forman un clado independiente de las poblaciones de las cabeceras de los mismos drenajes (Lovejoy & De Araújo, 2000). Estos patrones sugieren la importancia de incluir muestreos en

varios trechos de drenajes de gran porte, como es el caso del río Magdalena, donde las poblaciones pueden tener origen diferente a lo largo del drenaje.

En el haplogrupo I, las poblaciones del Alto y Medio Magdalena están estrechamente emparentadas con la cuenca del río Dagua, del Océano Pacífico. El relieve de separación entre esas cuencas es la Cordillera Occidental, formada durante el Mioceno tardío (Albert et al., 2006). Basado en hidrogeografía y topografía, el Pacífico Colombiano está dividido en tres zonas de sur a norte: 1) Llanura costeras de los Ríos Mira, Patía, Dagua y San Juan. 2) La zona que va hasta el istmo de Panamá, por el borde costero. 3) El valle del río Atrato entre la cresta del Baudó y la cordillera Occidental (Rodríguez-Olarte et al., 2011).

No existen datos claros sobre la formación de la cuenca del río Dagua, aunque puede estar ligado al surgimiento de los Andes del norte y a capturas de cabecera como ocurrió entre el río Patía y Cauca (Maldonado-ocampo et al., 2012). Eigenmann se realizó la pregunta del porque la cuenca del Cauca no aportó a la fauna del Dagua y si el Magdalena comparte similitud en las especies encontradas y propuso que la cordillera oriental es más reciente que el río Magdalena (Eigenmann, 1920a). *Brycon henni* es una especie de Characiforme presente en las cuencas del Pacífico y Magdalena-Cauca pero no se encuentra en las cuencas del Caribe, lo que sería tomado de evidencia de flujo de fauna a través de la cordillera oriental (Eigenmann, 1920b).

La separación de la *Hoplias malabaricus* cuenca del río Magdalena como grupo hermano de las del resto de Suramérica y su similitud con ejemplares del Orinoco (Santos, 2013) ha sido también observada en *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, especie endémica de las cuencas del Atrato, Sinú y Magdalena, está aislada como grupo hermano del resto de las especies de ese género en el neotrópico (Buitrago-Suárez & Burr, 2007; Torrico et al., 2009; Carvalho-Costa et al., 2011). De la misma forma, el patrón filogeográfico de *Prochilodus magdalenae* indica que esta especie es grupo hermano del resto de especies del género en resto de Suramérica (Sivasundar et al., 2001) Esta separación es adjudicada al surgimiento de la cordillera Andina hace 13-11,5 Ma como evento vicariante. El modelo de vicarianza ha sido ampliamente corroborado en los peces neotropicales con patrones de distribución cis y transandinos (Eigenmann, 1920a; Vari, 1988; Vari &

Weitzman, 1991; Lovejoy, 1996; Retzer & Page, 1996; Lovejoy & De Araújo, 2000; Sivasundar et al., 2001; Montoya-Burgos, 2003; Albert et al., 2005).

La estrecha relación de las poblaciones del río Atrato con poblaciones del Bajo Magdalena y del Orinoco en el haplogrupo II debe ser comprendida en el contexto biogeográfico de estas cuencas. El río Atrato es un drenaje que nace al oeste de la cordillera occidental y que desemboca en el Mar Caribe, este presenta gran importancia en el ámbito biogeográfico ya que es la cuenca suramericana más cercana al Istmo de Panamá. Este río presenta grandes diferencias con los de territorio panameño, por lo que se sugiere que el límite entre Colombia y Panamá sigue la línea del bajo Mesoamérica en las cordilleras desde el Caribe hasta la costa del Pacífico Colombiano, dejando a Atrato como miembro de la región del Caribe (Smith & Bermingham, 2005). El análisis de DNA mitocondrial de peces pertenecientes a los géneros *Hypostomus*, *Pimelodella* y *Roeboides* de la cuenca del río Atrato mostró relaciones más estrechas con drenajes en la región de Panamá que con el río Magdalena, aunque muestra aislamiento con otras cuencas que drenan hacia el Pacífico (Bermingham & Martin, 1998).

Nuestros resultados corroboran parcialmente el estudio comparativo de similitud de ictiofaunas entre las cuencas del norte de Suramérica, en el cual las cuencas del Magdalena y el Orinoco se agrupan en un cluster diferente al de las cuencas del Pacífico Colombiano y Ecuatoriano, compuestas por los ríos Patía, Dagua, San Juan, Baudó y Atrato (Rodríguez-Olarte et al., 2011).

Otros grupos de vertebrados presentan patrones relevantes sobre la diversificación de la fauna y de las relaciones biogeográficas en la región Andina de Colombia. Estos estudios son de similitud de composición de especies aves, ranas, murciélagos, roedores y mariposas independientemente; fue encontrado que esta diversificación de la biota Andina es probablemente una combinación de eventos de vicarianza, la radiación local y la dispersión de los taxa; que fue independiente para cada grupo. En el caso de roedores por ejemplo los valles de Magdalena – Cauca y la ladera del pacifico muestran estrecha relación (Kattan et al., 2004). Contemplando anurofauna, las tierras de poca altitud del Choco en el occidente colombiano comparten fauna característica con Ecuador y Panamá, mientras que las tierras bajas del caribe Colombiano comparte con Venezuela y/o Panamá (Lynch et al., 1997).

Los valores de distancia entre las poblaciones del Bajo Magdalena y el Orinoco pueden resultar de la edad de separación entre estos dos drenajes (12 millones de años), con el surgimiento de la Cordillera Oriental (Lundberg, 1997). Este valor es el doble del encontrado entre las poblaciones del Alto/Medio Magdalena y el río Dagua, sugiriendo una vicarianza más reciente entre estos dos drenajes, lo cual es compatible con el surgimiento de la Cordillera Occidental en el Mioceno tardío (Albert et al., 2006).

La sistemática molecular permite dilucidar el centro origen de especies crípticas como una herramienta eficiente. En el caso de *Hoplias malabaricus*, se logró evidenciar dos grupos con historias evolutivas muy diferentes, que por un lado, aproximan las regiones del alto y medio Magdalena con un río del Pacífico y por otro, las cuencas del Caribe con el Bajo Magdalena.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradecemos al profesor Pedro Caraballo de la Universidad de Sucre (Colombia) por su acompañamiento en las colectas, al profesor Claudio Oliveira de la UNESP-Botucatu (Brasil) por la donación de muestras. La asesoría de Karla Yotoko y Lúcio Antônio de Oliveira Campos Universidade Federal de Viçosa.

2.6 REFERENCIAS

- Ackery P.R. & Vane-Wright R.I. (1984) *Milkweed Butterflies: Their cladistics and biology*. Ithaca, N. Y.
- Acosta K. (2013) La economía de las aguas del río Sinú. *Aguaita. Economía y Sociedad*, **25**, 79–114.
- Albert J.S., Crampton W.G.R., Thorsen D.H., & Lovejoy N.R. (2005) Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). *Systematics and Biodiversity*, **2**, 375–417.
- Albert J.S., Lovejoy N.R., & Crampton W.G.R. (2006) Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, **21**, 14–27.
- Albert J.S. & Reis R. (2011) Introduction to Neotropical freshwaters. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. by J.S. Albert and R.E. Reis), pp. 3–19. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Berdugo G.O. & Barandica J.C.N. (2014) Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena river basin and its tributaries, Colombia. *Genetics and Molecular Biology*, **37**, 37–45.
- Bermingham E. & Martin P. (1998) Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, **7**, 499–517.
- Bertollo L.A.C. (1996) The Nucleolar Organizer Regions of Erythrinidae genus *Hoplias* An uncommon situation. *Cytologia*, **67**, 75–81.
- Bertollo L.A.C., Born G.G., Dergam J.A., Fenocchio A.S., & Moreira-Filho O. (2000) A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, **8**, 603–613.
- Bertollo L.A.C., Takahashi C.S., & Moreira-Filho O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética*, **2**, 103–120.
- Bertollo L.A.C., Takahashi C.S., & Moreira-Filho O. (1979) Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias*. *Revista Brasileira de Genética*, **II**, 17–37.
- Bifi A.G. (2013) *Revisão taxonômica das espécies do grupo Hoplias malabaricus (Bloch , 1794) (Characiformes : Erythrinidae) da bacia do rio da Prata*. PhD Thesis. Universidade Estadual de Maringá,

- Blanco D.R., Lui R.L., Bertollo L.A.C., Diniz D., & Moreira-Filho O. (2010a) Characterization of invasive fish species in a river transposition region: Evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **20**, 1–8.
- Blanco D.R., Lui R.L., Bertollo L.A.C., Margarido V.P., & Moreira-Filho O. (2010b) Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): Evolutionary and biogeographic considerations. *Neotropical Ichthyology*, **8**, 361–368.
- Blanco D.R., Lui R.L., Vicari M.R., Bertollo L. a C., & Moreira-Filho O. (2011) Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically. *Cytogenetic and genome research*, **132**, 71–8.
- Born G.G. & Bertollo L.A.C. (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*, **8**, 111–118.
- Born G.G. & Bertollo L.A.C. (2001) Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with $2n = 42$ chromosomes. *Genetica*, **110**, 1–9.
- Boyce T., Zwick M., & Aquadro C. (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, **123**, 825–836.
- Buitrago-Suárez U.A. & Burr B.M. (2007) Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, **38**, 1–38.
- Carvalho-Costa L.F., Piorski N.M., Willis S.C., Galetti P.M., & Ortí G. (2011) Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **59**, 177–194.
- Cioffi M.B. & Bertollo L.A.C. (2010) Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X(1)X(2)Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity*, **105**, 554–561.
- Cioffi M.B., Kejnovsky E., & Bertollo L.A.C. (2011a) The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, **132**, 289–296.
- Cioffi M.B., Martins C., & Bertollo L.A.C. (2009a) Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC genetics*, **10**, 34.
- Cioffi M.B., Martins C., Centofante L., Jacobina U.P., & Bertollo L.A.C. (2009b) Chromosomal variability among allopatric populations of erythrinidae fish

hoplias malabaricus: Mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenetic and Genome Research*, **125**, 132–141.

- Cioffi M.B., Molina W.F., Moreira-Filho O., & Bertollo L.A.C. (2011b) Chromosomal distribution of repetitive DNA sequences highlights the independent differentiation of multiple sex chromosomes in two closely related fish species. *Cytogenetic and Genome Research*, **134**, 295–302.
- Dergam J.A., Paiva S.R., Schaeffer C.E., Godinho A.L., & Vieira F. (2002) Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **25**, 379–387.
- Diniz D. & Bertollo L.A.C. (2003) Karyotypic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. *Caryologia*, **56**, 303–311.
- Eigenmann B.C.H. (1920a) The Magdalena Basin and the Horizontal and Vertical Distribution of Its Fishes. *Contributions from the Zoological Laboratory of Indiana University*, 21–34.
- Eigenmann C.H. (1920b) The fishes of the rivers draining the western slope of the Cordillera occidental of Columbia, Rios Atrato, San Juan, Dagua, and Patia. *Indiana University Studies, Indiana University Bulletin*, **7**, 1–19.
- Felsenstein J. (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap Joseph Felsenstein Reviewed work (s): Published by: Society for the Study of Evolution Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2408678>. *Evolution*, **39**, 783–791.
- Ferreira I.A., Bertollo L.A.C., & Martins C. (2007) Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* “species complex.” *Cytogenetic and Genome Research*, **118**, 78–83.
- Géry J. (1977) *Characoids of the world*. T.F.H. Publications, Inc. Ltd., Neptune city.
- Giuliano-Caetano L. & Bertollo L.A.C. (1988) Karyotype variability in *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Characiformes: Erythrinidae) I. Chromosome polymorphism in the rio Negro Population (Manaus, State of Amazonas). *Revista Brasileira de Genética*, **11**, 299–306.
- Giuliano-Caetano L. & Bertollo L.A.C. (1990) Karyotypic Variability in *Hoplias unitaeniatus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae). II. Occurrence of Natural Triploidy. *Revista Brasileira de Genética*, **13**, 231–237.
- Griffiths S. (2000) The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology*, **57**, 1453–1464.
- Hatanaka T. & Galetti P.M. (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genética*, **122**, 239–244.

- Howell W. & Black D. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, **36**, 1014–1015.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R., & Bollback J.P. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science (New York, N.Y.)*, **294**, 2310–2314.
- Hulen K. (2004) *Phylogenetic Systematics of the Neotropical Electric Fish Sternopygus (Gymnotiformes: Sternopygidae)*. Msc Thesis. University of Florida,
- IDEAM (2008) *Guía técnico científica para la ordenación de las cuencas hidrográficas en colombia*. Bogotá D.C.
- Kattan G.H., Franco P., Rojas V., & Morales G. (2004) Biological diversification in a complex region: A spatial analysis of faunistic diversity and biogeography of the Andes of Colombia. *Journal of Biogeography*, **31**, 1829–1839.
- Lemos P.M.M.L., Fenocchio A.S., Bertollo L.A.C., & Cestari M.M.C. (2002) Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguaçu river basin (Paraná State, Brazil). *Caryologia*, **55**, 193–198.
- Levan A., Fredga K., & Sandberg A. (1964) Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, **52**, 201–220.
- Lima F.C.T. & Ribeiro A.C. (2011) Continental-scale tectonic controls of biogeography and Ecology. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. by J.S. Albert and R.E. Reis), pp. 145–164. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Lovejoy N.R. (1996) Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **117**, 207–257.
- Lovejoy N.R. & De Araújo M.L.G. (2000) Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needle shes of the genus *Potamorrhaphis*. *Molecular Ecology*, **9**, 259 – 268.
- Lovejoy N.R. & Collette B. (2001) Phylogenetic Relationships of New World Needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the Biogeography of Transitions between Marine and Freshwater Habitats. *Copeia*, **2**, 324–338.
- Lujan N.K., Roach K. a., Jacobsen D., Winemiller K.O., Vargas V.M., Ching V.R., & Maestre J.A. (2013) Aquatic community structure across an Andes-to-Amazon fluvial gradient. *Journal of Biogeography*, **40**, 1715–1728.
- Lundberg J.G. (1997) The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (ed. by L.

- Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena, and C.A. Lucena), pp. 49–68. Edipucrs, Porto Alegre.
- Lynch J.D., Ruiz Carranza P.M., & Ardila Robayo M.C. (1997) Biogeographic patterns of Colombian frogs and toads. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **21**, 237–248.
- Maldonado-Ocampo J., Vari R., & Usma J. (2008) Checklist of the freshwater fishes of Colombia. *Biota Colombiana*, **9**, 143–237.
- Maldonado-ocampo J.A., Usama-Oviedo J.S., Villa-navarro F.A., Ortega-lara A., Prada-pedrerros S., Jimenes-Segura L.F., Jaramillo-villa U., Arango-Rojas A., Rivas T.S., & Sanches-Garcés G.C. (2012) *Peces dulceacuícolas del Chocó biogeografico de Colombia*. WWF Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humbolt (IAvH), Universidad del Tolima. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.
- Maldonado-ocampo J.A., Villa-navarro F.A., Ortega-lara A., Prada-pedrerros S., Villa U.J., Claro A., Usma J.S., Sofia T., Lara R., Salazar W.C., & Félix J. (2006) Peces del río Atrato, zona hidrogeografica del caribe, Colombia. *Biota Colombiana*, **7**, 143–154.
- Marques D., Santos F., Silva S., Sampaio I., & Rodrigues L. (2013) Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotropical Ichthyology*, **11**, 459–466.
- Martinez J. de F. (2014) *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae): um complexo de espécies. *Estudos citogenéticos clássicos e moleculares*. Msc Thesis. Universidade Federal de São Carlos,
- Martins C., Ferreira I.A., Oliveira C., Foresti F., & Galetti P.M. (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, **127**, 133–141.
- Mattox G.M.T., Bifi A.G., & Oyakawa O.T. (2014) Taxonomic study of *Hoplias microlepis* (Günther, 1864), a trans-Andean species of trahiras (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae). *Neotropical Ichthyology*, **12**, 343–352.
- Mojica J.I., Castellanos C., Sánchez-Duarte P., & Díaz C. (2006) Peces de la cuenca del río Ranchería, La Guajira, Colombia. *Biota Colombiana*, **7**, 129–142.
- Mojica J.I., Usma J.S., & Galvis G. (2004) Peces dulceacuícolas en el chocó biogeográfico. *Colombia Diversidad Biótica Iv. La Región Chocoana De Colombia/Costa Pacífica*, **4**, 725–743.
- Molina W.F. (2001) An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, **5**, 149–152.

- Monteiro D.A., Thomaz J.M., Rantin F.T., & Kalinin A.L. (2013) Cardiorespiratory responses to graded hypoxia in the neotropical fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) and traíra (*Hoplias malabaricus*) after waterborne or trophic exposure to inorganic mercury. *Aquatic Toxicology*, **140-141**, 346–355.
- Montoya-Burgos J.I. (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, **12**, 1855–1867.
- Morelli S., Vicari M., & Bertollo L.A.C. (2007) Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group: a particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. *Brazilian Journal of Biology*, **67**, 897–903.
- Nylander J.A.A. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. <http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>.
- Oyakawa O.O.T. & Mattox G. (2009) Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotropical Ichthyology*, **7**, 117–140.
- Oyakawa O.T. (2003) Family Erythrinidae (Trahiras). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central América* (ed. by R. Reis, S. Kullander, and J.C. Ferraris), pp. 238–240. Porto Alegre: Edipucrs,
- Pereira T.L., Santos U., Schaefer C.E., Souza G.O., Paiva S.R., Malabarba L.R., Schmidt E.E., & Dergam J.A. (2012) Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography*, **40**, 905–914.
- Pinkel D., Straume T., & Gray J.W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**, 2934–2938.
- Quenouille B., Bermingham E., & Planes S. (2004) Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, **31**, 66–88.
- Rantin F.T. & Johansen K. (1984) Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to hypoxia. *Environmental Biology of Fishes*, **11**, 221–228.
- Restrepo J. & Kjerfve B. (2000a) Magdalena river: interannual variability (1975–1995) and revised water discharge and sediment load estimates. *Journal of Hydrology*, **235**, 137–149.
- Restrepo J.C.D., Kjerfve B., Hermelin M., & Restrepo J.C.D. (2000) Water discharge and sediment load from the western slopes of the Colombian Andes with focus on Rio San Juan. *The Journal of geology*, **316**, 213–232.

- Restrepo J.D. & Kjerfve B. (2000b) Water Discharge and Sediment Load from the Western Slopes of the Colombian Andes with Focus on Rio San Juan. *The Journal of Geology*, **108**, 17–33.
- Retzer M.E. & Page L.M. (1996) Systematics of the Stick Catfishes, Farlowella Eigenmann & Eigenmann (Pisces, Loricariidae). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **147**, 33–88.
- Rodríguez-Olarte D., Mojica J.I., & Taphorn D.C. (2011) Northern South America, Magdalena and Maracaibo Basins. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. by J.S. Albert and R. Reis), pp. 243–258. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Santos U. (2013) *Filogeografia de Traíras Hoplias malabaricus (Bloch, 1974) (Teleostei, Erythrinidae) das bacias hidrográficas da América do sul*. PhD Thesis. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.,
- Santos U., Völcker C., Belei F., Cioffi M.B., & Bertollo L.A.C. (2009) Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical Hoplias malabaricus (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, **75**, 2326–2343.
- Schaefer S., Albert J.S., & Reis R. (2011) The Andes: riding the tectonic uplift. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. by J.S. Albert and R.E. Reis), pp. 259–279. Berkeley and Los Angeles.
- Sivasundar A., Bermingham E., & Ortí G. (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, **10**, 407–417.
- Smith S. a. & Bermingham E. (2005) The biogeography of lower Mesoamerican freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, **32**, 1835–1854.
- Swofford D.. (2002) PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). .
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725–2729.
- Taphorn D. (1992) The characiform fishes of the Apure River drainage, Venezuela. *Biollania*, **4**, 537.
- Thompson J.D., Higgins D.G., & Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, **22**, 4673–4680.
- Torrico J.P., Hubert N., Desmarais E., Duponchelle F., Nuñez Rodriguez J., Montoya-Burgos J., Garcia Davila C., Carvajal-Vallejos F.M., Grajales a. a., Bonhomme F., & Renno J.F. (2009) Molecular phylogeny of the genus

Pseudoplatystoma (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **51**, 588–594.

- Vari R.P. (1988) The Curimatidae: a Lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes); Distribution, Endemism, and Phylogenetic Biogeography. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (ed. by P. Vanzolini and W.R. Heyer), pp. 343–377. Academia Brasileira de Ciencias, Rio de Janeiro.
- Vari R.P. & Weitzman S.H. (1991) A review of phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. *Vertebrates in the tropics*. pp. 381 – 393. Museum Alexander Koenig, Bonn.
- Vicari M.R., Artoni R., & Bertollo L.A.C. (2005) Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology*, **110**, 103–110.
- Vitorino C., Souza I., Rosa J., Valente G.T., Martins C., & Venere P.C. (2011) Molecular cytogenetics and its contribution to the understanding of the chromosomal diversification in *Hoplias malabaricus* (Characiformes). *Journal of Fish Biology*, 1239–1248.