

CRISTHIAN CAMILO CONDE SALDAÑA

**HISTÓRIA EVOLUTIVA DO GÊNERO *Pimelodella* EIGENMANN &
EIGENMANN, 1888 NA REGIÃO TRANSANDINA E CARACTERIZAÇÃO
CITOGENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO NO ALTO MAGDALENA,
COLÔMBIA.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal
de Viçosa - Campus Viçosa

T

C745h
2016 Conde Saldaña, Cristhian Camilo, 1991-
História evolutiva do gênero *Pimelodella* Eigenmann &
Eigenmann, 1888 na região transandina e caracterização citogenética de
uma população no Alto Magdalena, Colômbia / Cristhian Camilo
Conde Saldaña. - Viçosa, MG, 2016.

vii, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Pimelodella* - Taxonomia. 2. Marcadores moleculares.
3. Cromossomos sexuais. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em
Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597.49

CRISTHIAN CAMILO CONDE SALDAÑA

HISTÓRIA EVOLUTIVA DO GÊNERO *Pimelodella* EIGENMANN & EIGENMANN, 1888 NA REGIÃO TRANSANDINA E CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO NO ALTO MAGDALENA, COLÔMBIA.

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

APROVADA: 01 de novembro de 2016.

Aline Ramos Fregonezi

Francisco Antonio Villa Navarro
(Coorientador)

Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es resultado de la colaboración, el apoyo y las enseñanzas de muchas personas.

Principalmente a mi familia por ser mi inspiración y apoyo en cada paso que doy.

A Jorge Dergam por recibirme en el Beagle, la confianza depositada para el desarrollo de este trabajo y todas las enseñanzas recibidas a lo largo de estos dos años.

A Francisco Villa gestor y tutor de este proyecto, le agradezco todas las enseñanzas y empeño para siempre obtener los mejores resultados. Gracias por todo profe.

A Gabriel Albornoz quien sirvió como un puente de comunicación, por su colaboración en las colectas, envío de material y recomendaciones que enriquecieron el trabajo.

A Aline Fregonezi por aceptar la participación en la banca y ofrecer su conocimiento para mejorar este trabajo, muito obrigado!

A Armando Ortega e Iván Mojica por su disposición para la revisión y préstamo de material en los museos de referencia que coordinan.

A la Colección Zoológica de la Universidad del Tolima, sección Ictiología (CZUT-IC), el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI), al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (ICNMHN) y al Museo de Ciencias Naturales, Instituto para la Investigación y Preservación del Patrimonio Cultural y Natural del Valle del Cauca (INCIVA), por proveer el material necesario para el desarrollo de este trabajo.

A la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa CAPES por la beca que recibí durante este tiempo.

A lo largo de este proceso encontré tres nuevas “familias” que tuvieron una gran importancia para mi crecimiento personal y profesional.

A la familia de la república Terreiro do Pai José, gracias muchachos por la amistad y darle a la convivencia un toque familiar y de hermandad. A Newton, Lucas, Rafa, Italo, Conrado, Luiz, Gustavo. Obrigado!

A la familia de amigos extranjeros con quienes se vivió gran cantidad de experiencias y siempre fueron un apoyo en este camino que aquí en Viçosa todos elegimos recorrer. A Erika, Nicolás, Andresito, Estefanny, Silvana, Eduardo, Juan Camilo, Take, los tiburones. Gracias a todos muchachos.

Finalmente, a la familia Beagle. A lo largo de este tiempo muchas personas pasaron por el laboratorio y de cada una de ellas aprendí cosas importantes. Nicole, Silvana, Naty Travenzoli, Lucesita, Bruno, Semone, Filipe, Manu, Naty, Fred, Ariana. Quiero agradecer de forma especial a algunas personas que estuvieron presentes en la etapa final de este trabajo. A Cynthia quien fue una grata compañía de trabajo y siempre sus consejos junto a su forma tranquila de ver las cosas enriquecieron este proyecto. A Kessinha quien con su hermosa sonrisa y su alegría mejoró los días de trabajo. A Magrela quien con su irreverencia siempre lograba sacar una sonrisa. A Marininha que siempre estuvo dispuesta para el trabajo en equipo y fue una grande ayuda en del desarrollo del FISH. A Sanely quien siempre tuvo las palabras indicadas en los momentos indicados y representó una consejera incondicional con voces de apoyo para todas las ocasiones.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS	3
ARTIGO 1. Historia evolutiva del género Pimelodella (Siluriformes: Heptapteridae) en la región transandina: implicaciones taxonómicas.	5
Resumen.....	6
1. Introducción	8
2. Materiales y métodos	12
2.1. Muestreo	12
2.2. Extracción de DNA, amplificación y secuenciamiento	16
2.3. Alineamiento y análisis filogenéticos	17
2.4. Distancias genéticas y delimitación de especies	18
2.5. Análisis morfológico y merístico.....	19
3. Resultados	20
3.1. Datos moleculares e inferencia filogenética	20
3.2. Distancias genéticas y delimitación de especies	24
3.3. Morfometría tradicional y merística	27
4. Discusión.....	32
4.1. Implicaciones taxonómicas y distribución geográfica	32
4.2. Historia evolutiva e implicaciones biogeográficas	35
4.3. Perspectivas.....	40
Apéndice A	42
Referencias.....	44
ARTIGO 2. Un patrón inusual de diferenciación cromosómica por acumulación de DNA repetitive en un sistema cromosómico sexual simple XX/XY en el bagre transandino Pimelodella cf. chagresi del cuenca del Alto Magdalena, Colombia....	52
Resumen.....	53
Introducción	54
Materiales y Métodos.....	57
Colecta de especímenes	57
Análisis Citogenéticos	57

Resultados.....	59
Discusión	63
Referencias.....	69
CONCLUSÕES GERAIS.....	76

RESUMO

CONDE-SALDAÑA, Cristhian Camilo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **História evolutiva do gênero *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 na região transandina e caracterização citogenética de uma população no alto magdalena, Colômbia.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientador: Francisco Antonio Villa Navarro.

O gênero *Pimelodella* é um dos mais diversos da família Heptapteridae, com cerca de 71 espécies descritas, das quais, nove têm distribuição na região transandina. Entre estas, *Pimelodella chagresi* tem a distribuição mais ampla, considerada um complexo de espécies definido como um grupo polifilético. Os estudos integrativos das relações interespecíficas são escassos, e ainda a taxonomia e a validade das espécies na região são confusas, resultando numa subestimação da diversidade destes peixes. Este trabalho tem o objetivo de estudar as relações evolutivas e esclarecer a taxonomia do grupo através do uso de marcadores moleculares (mitocondriais e nucleares), análise de morfometria tradicional e merística. Adicionalmente, foi feita a caracterização citogenética de uma população que ocorre na bacia alta do rio Magdalena na Colômbia, empregando técnicas tradicionais (Giemsa e NOR) e de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) usando sondas de DNA repetitivo, como microsatélites (CA₁₅ e GA₁₅) e as famílias multigênicas de RNA ribossomal (sondas 18S e 5S rDNA). Nossos resultados indicam que *Pimelodella* não representa uma unidade monofilética dentro da região transandina. As espécies avaliadas são definidas como grupos monofiléticos e as relações históricas foram inferidas. É detectada uma espécie não descrita que ocorre ao longo da bacia do rio Magdalena, historicamente reconhecida dentro do complexo *P. chagresi*. Esse complexo é restrito à bacia do rio Chagres, drenagens do pacífico no centro e oriente do Panamá. Neste trabalho é apresentado o primeiro estudo citogenético para o gênero na região transandina, indicando um número cromossômico diplóide $2n=50$ (32m+14sm+4st) e um sistema cromossômico sexual simples XX/XY, onde o cromossomo heteromórfico Y revelou uma grande acumulação de diferentes domínios de DNA repetitivo. Os estudos históricos e biogeográficos da íctiofauna regional resultam em uma ferramenta importante pra inferir padrões de diversidade, e o estudo de padrões citogenéticos na avaliação populacional do gênero *Pimelodella* poderia contribuir no esclarecimento da taxonomia e as relações interespecíficas.

ABSTRACT

CONDE-SALDAÑA, Cristhian Camilo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2016. **Integrative study of the genus *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 in the trans-Andean region.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-adviser: Francisco Antonio Villa Navarro.

Pimelodella genus is one of the most diverse of Heptapteridae family with about 71 described species, of which nine have distribution in the trans-Andean region. Among these, *Pimelodella chagresi* has the widest distribution, considered a species complex defined as a polyphyletic group. Integrative studies of interspecific relations are limited, and the taxonomic status and validity of the species are confused, resulting in an underestimation of the diversity of these fishes. This work is developed with the aim of studying the evolutionary relationships and elucidates the taxonomy of group through the use of molecular markers (mitochondrial and nuclear), analysis of traditional morphometry and meristic counts. Additionally cytogenetic characterization of one population that occur in the Upper Magdalena Basin in Colombia was performed, using traditional techniques (Giemsa and NOR) and fluorescent hybridization *in situ* (FISH) through repetitive DNA probes, like microsatellites (CA₁₅ e GA₁₅) and ribosomal RNA multigene families (sondas 18S e 5S rDNA). Our results indicated that *Pimelodella* is not a monophyletic unit within the trans-Andean region. Species evaluated are defined as monophyletic groups and historical relationships were hypothesized. Here an undescribed species that occurs along the Magdalena River Basin was detected, historically recognized within the *Pimelodella chagresi* complex. This complex was restricted to the Chagres River Basin and Pacific drainages in central and eastern Panamá. We presented the first cytogenetic study for the genera in the trans-Andean region, indicating a diploid chromosome number $2n=50$ (32m+14sm+4st) and differentiated simple sex chromosome system (XX/XY), where the heteromorphic chromosome Y revealed a large accumulation of different domains of repetitive DNA. The historical and biogeographic studies of regional ichthyofauna are an important tool to infer patterns of diversity, and study of cytogenetic patterns in the populational analysis of *Pimelodella* could contribute to the clarification of the taxonomy and interspecific relationships.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 é um dos mais diversos da família Heptapteridae (Siluriformes), com cerca de 71 espécies descritas, que tem distribuição desde Costa Rica até o sul de América do sul (Ferraris, 2007; Peixoto, 2011; Smith & Bermingham, 2005).

Estes peixes são pequenos bagres com hábitos principalmente noturnos que tendem a organizar-se em pequenos grupos e habitam canos e córregos menores (Peixoto, 2011), apresentam uma faixa lateral obscura em cada lado do corpo, nadadeiras dorsal e peitorais com espinhas serradas e um processo occipital delgado que se conecta à placa nugal (Bockmann, 1998). Apesar de não ter valor comercial ou de consumo, são um componente importante dentro dos ecossistemas aquáticos transandinos (Maldonado-Ocampo et al., 2012, 2005).

Das 71 espécies descritas, nove têm distribuição na região transandina, das quais, uma tem localidade tipo no Panamá, três na Colômbia, uma na Venezuela e três no Ecuador (Ferraris, 2007). Entre estas, *Pimelodella chagresi* tem a distribuição mais ampla, sendo registrada na Costa Rica, Panamá e as bacias do Magdalena, Cauca, Atrato, Sinú, Baudó, San Juan, San Jorge, Patía e Catatumbo na Colômbia (Ferraris, 2007; Maldonado-Ocampo et al., 2005; Moeser and Bermingham, 2005).

A taxonomia dessas espécies ainda é confusa, não só pelas descrições originais pouco detalhadas, mas também pela ausência de estudos integrativos nesta região, além disso, a provável perda do material tipo não só para *P. chagresi* senão também para espécies como, *P. reyesi* e *P. macrocephala* dificulta as comparações (Ferraris, 2007; Maldonado-Ocampo et al., 2005).

Estudos que tem implementado marcadores moleculares e análise citogenéticas para estas espécies têm-se centrado principalmente na região cisandina (Dazzani et al., 2012; de Almeida-Toledo et al., 1992; Fernandes et al., 2013; Peixoto, 2011; Souza-Shibatta et

al., 2013; Swarça et al., 2003; Vidotto et al., 2004), sendo ausentes o escassos a nível transandino.

Análises genéticas baseadas em marcadores mitocondriais (Bermingham and Martin, 1998; Martin and Bermingham, 2000) examinaram a história da diversificação de *Pimelodella* na parte inferior da América Central (LCA), identificando uma alta variabilidade genética, que define *P. chagresi* como um complexo de espécies polifilético. No entanto, a taxonomia e a validade das espécies na região transandina são incertas e confusas, resultando numa subestimação da diversidade destes peixes.

O uso de várias técnicas de análise permite a detecção fiável de unidades taxonômicas com o reconhecimento de espécies crípticas Souza-Shibatta et al. (2013), sendo importante para estabelecer padrões diversidade do gênero *Pimelodella*. Portanto, este trabalho tem o objetivo de apresentar o primeiro estudo citogenético do gênero na região transandina e, através de dados moleculares e morfológicos, estudar a história evolutiva e esclarecer a taxonomia deste grupo de peixes nesta região.

REFERÊNCIAS

- Bermingham, E., Martin, A.P., 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.* 7, 499–517. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00358.x
- Dazzani, B., Garcia, C., Peixoto, M., Trajano, E., de Almeida-Toledo, L.F., 2012. Cytogenetic and molecular analyses in troglobitic and epigean species of *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 10, 623–632. doi:10.1590/S1679-62252012005000020
- de Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Trajano, E., De Almeida Toledo Filho, S., 1992. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and its presumed ancestor, *P. transitoria*. *Caryologia* 45, 255–262. doi:10.1080/00087114.1992.10797229
- Fernandes, C.A., Damásio, J.F., Guterres, Z.R., Abelha, M.C.F., 2013. Cytogenetic Studies in Two Species of Genus *Pimelodella* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae) from Iguatemi River Basin, Brazil. *Cytologia (Tokyo)*. 78, 91–95. doi:10.1508/cytologia.78.91
- Ferraris, C.J., 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types, *Zootaxa*.
- Maldonado-Ocampo, J.A., Ortega-Lara, A., Usma-Oviedo, J.S., Galvis Vergara, G., Villa-Navarro, F.A., Vásquez Gamboa, L., Prada-Pedrerros, S., Ardila Rodriguez, C., 2005. *Peces de los Andes de Colombia: guía de campo*.
- Maldonado-Ocampo, J., Usma, J.S., Villa-Navarro, F.A., Ortega-Lara, A., Prada-Pedrerros, S., S., L.F.J., Jaramillo-Villa, U., Arango, A., Rivas, T.S., Sánchez, G.C., 2012. *Peces Dulceacuícolas del Choco Biogeografico de Colombia*. doi:10.13140/2.1.3449.9521
- Martin, A.P., Bermingham, E., 2000. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical cat sh. *Proc. R. Soc. London B* 267, 1135–1141.
- Moeser, A.A., Bermingham, E., 2005. Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi*

- (Teleostei: Pimelodidae). Mol. Ecol. Notes 5, 363–365. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.00928.x
- Peixoto, M.D.S., 2011. Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas de espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto Paraná.
- Smith, S.A., Bermingham, E., 2005. The biogeography of lower Mesoamerican freshwater fishes. J. Biogeogr. 32, 1835–1854. doi:10.1111/j.1365-2699.2005.01317.x
- Souza-Shibatta, L., Pezenti, L.F., Ferreira, D.G., de Almeida, F.S., Sofia, S.H., Shibatta, O.A., 2013. Cryptic species of the genus *Pimelodella* (siluriformes: Heptapteridae) from the Miranda river, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. Neotrop. Ichthyol. 11, 101–109.
- Swarça, A.C., Vidotto, A.P., Dias, A.L., 2003. Cytogenetic characterization of *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). Caryologia 56, 421–425. doi:10.1080/00087114.2003.10589353
- Vidotto, a P., Swarça, a C., Fenocchio, a S., Dias, a L., 2004. Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River basin (Brazil). J. Hered. 95, 517–20. doi:10.1093/jhered/esh075

ARTIGO 1.

Normas de la revista *Molecular Phylogenetics and Evolution*. ISSN: 1055-7903

Historia evolutiva del género *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) en la región transandina: implicaciones taxonómicas

Evolutionary history of the genera *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) in the trans-Andean region: taxonomic implications

Cristhian Camilo Conde-Saldaña¹⁻², Francisco Antonio Villa-Navarro² & Jorge Abdala
Dergam¹

¹ Departamento de Biología Animal, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs,
s/n, Centro, Viçosa, 36570-900, Minas Gerais, Brazil.

² Grupo de Investigación en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima.
730006299 Santa Elena parte alta, Ibagué, Tolima, Colombia.

Resumen

Nueve especies del género *Pimelodella* han sido descritas para la región transandina, sin embargo el estudio de las relaciones interespecíficas es limitado y la taxonomía no está basada en caracteres diagnósticos, lo cual resulta en un pobre estimativo de su diversidad. Con el propósito de estudiar las relaciones evolutivas y aportar al esclarecimiento taxonomico del grupo, empleamos un enfoque integrativo, usando dos marcadores mitocondriales (COI, ATPase6), un nuclear (Myh6) y una evaluación a través de morfometría tradicional y merística. Incluimos un extensivo rango de distribución, abarcando vertientes del Atlántico y Pacífico de la parte inferior de América Central (LCA), así como las principales vertientes transandinas del norte de América del Sur. Nuestros resultados indican que *Pimelodella* no representa una unidad monofilética en la región transandina, sugiriendo un origen múltiple para este grupo. A través de la inferencia filogenética, fueron propuestas seis especies definidas como unidades monofiléticas y las relaciones interespecíficas fueron hipotetizadas. Fue detectada una especie no descrita que ocurre a lo largo de la cuenca del río Magdalena, históricamente reconocida dentro del complejo *P. chagresi*. Dicho complejo aparece restringido a la cuenca del río Chagres y los drenajes del Pacífico en el centro y occidente de Panamá. Los eventos tectónicos del Mioceno y variaciones en el nivel del mar han influenciado los patrones de diversidad del género en la región, condicionando los procesos de dispersión y extinción. En la región del Chocó biogeográfico y en el istmo de Panamá, la simpatria de diferentes linajes de *Pimelodella* pueden ser explicados por la complejidad geológica de estas regiones.

Palabras clave: Región Transandina, Parte inferior de América Central, itsmo de Panamá, *Pimelodella*, dispersión, sympatría

1. Introducción

La diversificación de los peces de agua dulce está estrechamente relacionada con la historia geomorfológica de las cuencas hidrográficas en las que estos habitan (Albert & Carvalho, 2011; Bermingham & Moritz, 1998; Hernández et al., 2015). La conformación del paisaje actual del norte de América del sur ha sido definida principalmente por los eventos tectónicos del Mioceno medio y tardío, en donde los procesos orogenicos de los Andes han definido los límites de los drenajes modernos (Albert et al., 2006). En esta región, los Andes son conformados por tres cordilleras paralelas, cada una resultado de diferentes procesos geológicos que han ocurrido en periodos diferentes (Schaefer, 2011).

Se estima que el surgimiento de la cordillera central inició hace unos 35 millones de años (MA) (Schaefer, 2011), sin embargo solo con el surgimiento de la cordillera oriental (12 MA) inició la separación de los sistemas hídricos en drenajes transandinos y cisandinos (Galvis et al., 2006; Lundberg et al., 1998). Este proceso culminó tras el surgimiento de la Serranía de Merida (~8 MA) y la consecuente separación del sistema paleo-Amazons-Orinoco (Lundberg et al., 1998). Otros procesos importantes en la región transandina fueron el surgimiento de la serranía del Perijá, que separó la cuenca del Magdalena de la cuenca del Maracaibo (Galvis et al., 2006), y el cierre del istmo de Panamá hace aproximadamente 2.8 (MA) (O'Dea et al., 2016), el cual permitió múltiples colonizaciones de poblaciones putativas de peces dulceacuícolas desde América del Sur hacia Mesoamérica (Abe et al., 2014; Bermingham & Martin, 1998; Smith & Bermingham, 2005).

La región transandina es caracterizada por altos niveles de endemismo (Anderson & Maldonado-Ocampo, 2011; Schaefer, 2011), en donde el estudio de procesos históricos regionales y los patrones evolutivos resultan indispensables para la caracterización de la biodiversidad biológica (Hernández-Camacho et al., 1992; Smith & Bermingham, 2005). Dentro de esta región, el género *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 se distribuye ampliamente desde de la parte inferior de América Central (LCA), que incluye Costa Rica y Panamá, así como en los principales drenajes del Atlántico y Pacífico del norte de América del Sur (Eigenmann, 1917; Maldonado-Ocampo et al., 2012, 2005; Smith & Bermingham, 2005). Resultando en un grupo interesante para relacionar la historia evolutiva de sus especies con los procesos geomorfológicos de la región.

Actualmente son reconocidas nueve especies dentro de la región transandina: (i) *P. odynea* Schultz, 1944 con localidad tipo en la cuenca del Maracaibo, Venezuela; (ii) *P. macrocephala* (Miles, 1943) endémica de la cuenca alto del río Cauca, Colombia; (iii) *P. reyesi* Dahl & Medem, 1964 con localidad tipo en la cuenca alta del río Sinú, reportada también en la cuenca del río Atrato en Colombia (Maldonado-Ocampo et al., 2012); (iv) *P. eutaenia* Regan, 1913 con localidad tipo en la cuenca del río San Juan y reportada en los principales tributarios del Chocó biogeográfico (Maldonado-Ocampo et al., 2012); (v) *P. grisea* Regan, 1903 descrita con base en tres individuos de los ríos Durango, Sapayo y Vaquería en Ecuador; con reportes en vertientes del Pacífico colombiano (Maldonado-Ocampo et al., 2012); (vi) *P. elongata* y (vii) *P. modesta* (Gunther, 1860), con localidad tipo en la cuenca del río Esmeraldas, vertiente del Pacífico ecuatoriano; (viii) *P. yuncensis* (Steindachner, 1902) con distribución en la cuenca del río

Jequetepeque, Perú (Ferraris, 2007) y, finalmente, (ix) *P. chagresi* (Steindachner, 1876) que representa la especie con mayor rango de distribución, cuya localidad tipo está en la cuenca del río Chagres en Panamá, pero es reportada desde Costa Rica hasta las cuencas del Magdalena-Cauca, Atrato, Sinú, Baudó, San Juan, San Jorge, Patía y Catatumbo (Ferraris, 2007; Maldonado-Ocampo et al., 2012, 2005; Martin & Bermingham, 2000).

Una de los principales factores limitantes para establecer con mayor claridad la filogenia de la ictiofauna transandina y consecuentemente, la construcción de unidades biogeográficas objetivas, es la resolución de la taxonomía a nivel de especies (Rodríguez-Olarte et al., 2011). Hasta ahora, la taxonomía del género *Pimelodella* en la región transandina está basada en caracteres morfométricos-merísticos poco informativos y no diagnósticos, resultando en una baja resolución taxonómica y un pobre estimativo de la diversidad. Adicionalmente, la dificultad de avanzar en la taxonomía del grupo se agrava por la pérdida del material tipo de varias de sus especies (Ferraris, 2007), la falta de estudios que aborden la totalidad de su distribución geográfica y de abordajes integrativos, asociando datos morfológicos y moleculares.

Algunos estudios de biogeografía histórica, analizando DNA mitocondial (mtDNA) (Bermingham & Martin, 1998; Martin & Bermingham, 2000), han centrado su atención en la parte inferior de América Central, en donde el género *Pimelodella* ha mostrado una gran variabilidad genética, y *P. chagresi* es definido como un complejo de especies que aparece como un grupo polifilético. Adicionalmente, se considera que el complejo mosaico revelado por este grupo de peces es un producto de diferentes eventos de dispersión, diversificación, extinción y probablemente introgresión genética, en donde se

sugiere la implementación de marcadores moleculares adicionales y un análisis morfológico más detallado en búsqueda de caracteres diagnósticos, resaltando así, la importancia de estudiar los procesos históricos para el entendimiento de la biodiversidad regional (Bermingham & Martin, 1998). Nuestro estudio demuestra que un esfuerzo de colecta mayor puede ser fundamental para la comprensión de los linajes involucrados en la diversidad transandina de *Pimelodella*.

Bajo este panorama, nuestro trabajo presenta nuevas evidencias para elucidar el estatus taxonómico y entender la historia evolutiva del género *Pimelodella* en la región transandina. Es evaluado el monofiletismo del género así como los linajes evolutivos y las relaciones interespecíficas en la región. Para alcanzar estos objetivos, fue empleado un enfoque integrativo, usando marcadores moleculares (mitocondriales y nucleares), morfometría tradicional y merística. Nosotros incluimos un extensivo rango de distribución, abarcando vertientes del Atlántico y Pacífico de LCA, así como las principales vertientes transandinas del norte de América del Sur.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestreo

El análisis genético incluyó 96 especímenes del género *Pimelodella* de la región transandina, y representantes de los géneros *Rhamdia* e *Imparfinis* como grupo externo (Tabla 1). Las muestras analizadas provienen del Smithsonian Tropical Research Institute (STRI), Panamá; la colección de tejidos de la Colección Zoológica de la Universidad del Tolima sección ictiología (CZUT-IC); y de la Colección Zoológica de Referencia IMCN del Museo de Ciencias Naturales Federico Carlos Lehmann Valencia del INCIVA, Colombia. La Fig. 1 indica las locaciones de los individuos usados en este estudio. Adicionalmente, fueron incluidas secuencias de GenBank del gen mitocondrial COI de representantes Cisandinos del género *Pimelodella*, tres representantes de *P. laticeps* (números de acceso: JX111814, JX111815, JX111816) y tres representantes de *P. lateristriga* (números de acceso: GU702091, GU702093, GU702094).

Tabla 1. Numero de catálogo e información de las localidades de los individuos usados en este estudio.

Especie	Código	Número de catálogo	Localidad	Drenaje	Pendiente	País
<i>P. eutaenia</i>	CC01	CZUT-IC 11642	Caño Tumaradocito	Atrato-León	Atlántico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	CC02	CZUT-IC 11642	Caño Tumaradocito	Atrato-León	Atlántico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	CC15	CZUT-IC 15225	Quebrada Vesquero	Anchicaya	Pacífico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	CC16	CZUT-IC 15225	Quebrada Vesquero	Anchicaya	Pacífico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	CC17	CZUT-IC 15225	Quebrada Vesquero	Anchicaya	Pacífico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	CC18	CZUT-IC 15225	Quebrada Vesquero	Anchicaya	Pacífico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	STRI-1727	STRI-1727	Río Acla	Acla	Atlántico	Panamá
<i>P. eutaenia</i>	STRI-1728	STRI-1728	Río Acla	Acla	Atlántico	Panamá
<i>P. eutaenia</i>	STRI-1517	STRI-1517	Río Atrato	Atrato	Atlántico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	STRI-1518	STRI-1518	Río Atrato	Atrato	Atlántico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	STRI-1567	STRI-1567	Río Atrato	Atrato	Atlántico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	STRI-863	STRI-863	Río San Juan	San Juan	Pacífico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	STRI-883	STRI-883	Río San Juan	San Juan	Pacífico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	STRI-1459	STRI-1459	Río San Juan	San Juan	Pacífico	Colombia
<i>P. eutaenia</i>	STRI-1401	STRI-1401	Río Baudo	Baudo	Pacífico	Colombia
<i>P. reyesi</i>	CC03	CZUT-IC 11685	Río León	León	Atlántico	Colombia
<i>P. reyesi</i>	CC04	CZUT-IC 12665	Río León	León	Atlántico	Colombia
<i>P. reyesi</i>	CC06	CZUT-IC 12656	Río León	León	Atlántico	Colombia
<i>P. reyesi</i>	CC07	CZUT-IC 12656	Río León	León	Atlántico	Colombia
<i>P. reyesi</i>	CC10	CZUT-IC 12725	Río Suriquí	Suriquí	Atlántico	Colombia
<i>P. reyesi</i>	CC70	CZUT-IC 11669	Río Suriquí	Suriquí	Atlántico	Colombia
<i>P. reyesi</i>	AM-239	AM-239	Río Pirre	Tuira	Pacífico	Panamá
<i>P. reyesi</i>	STRI-16946	STRI-16946	Río Chichebre	Bayano	Pacífico	Panamá
<i>P. reyesi</i>	STRI-16947	STRI-16947	Río Chichebre	Bayano	Pacífico	Panamá
<i>P. odynea</i>	CC11	CZUT-IC 12602	Río Cañas	Cañas	Atlántico	Colombia
<i>P. odynea</i>	CC83	CZUT-IC 15262	Río Cañas	Cañas	Atlántico	Colombia
<i>P. odynea</i>	CC84	CZUT-IC 15262	Río Cañas	Cañas	Atlántico	Colombia
<i>P. odynea</i>	CC85	CZUT-IC 15262	Río Cañas	Cañas	Atlántico	Colombia
<i>P. odynea</i>	CC86	CZUT-IC 15262	Río Cañas	Cañas	Atlántico	Colombia
<i>P. odynea</i>	VZ-87	VZ-87	Río Mupaya	Maracaibo	Atlántico	Venezuela
<i>P. odynea</i>	VZ-88	VZ-88	Río Mupaya	Maracaibo	Atlántico	Venezuela
<i>P. odynea</i>	VZ-139	VZ-139	Río Aroa	Aroa	Atlántico	Venezuela
<i>P. chagresi</i>	STRI-3557	STRI-3557	Río Chucunaque	Tuira	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-3558	STRI-3558	Río Chucunaque	Tuira	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-4756	STRI-4756	Río Caimito	Caimito	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-4761	STRI-4761	Río Caimito	Caimito	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-7309	STRI-7309	Río Tebario	Tebario	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-7310	STRI-7310	Río Tebario	Tebario	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-11417	STRI-11417	Río San Bartolo	San Pablo	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-11419	STRI-11419	Río San Bartolo	San Pablo	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-16252	STRI-16252	Río Chagres	Chagres	Atlántico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-16253	STRI-16253	Río Chagres	Chagres	Atlántico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-17740	STRI-17740	Río Cocle del sur	Cocle del sur	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-17741	STRI-17741	Río Cocle del sur	Cocle del sur	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-20347	STRI-20347	Río Frijolito	Chagres	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-20348	STRI-20348	Río Frijolito	Chagres	Pacífico	Panamá
<i>P. chagresi</i>	STRI-27218	STRI-27218	Q. Las Palmas	Santa Maria	Pacífico	Panamá
<i>P. macrocephala</i>	IMCN-1	IMCN-1	Río Melendez	Alto Cauca	Atlántico	Colombia
<i>P. macrocephala</i>	IMCN-2	IMCN-2	Río Melendez	Alto Cauca	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella n.sp.</i>	CC14	CZUT-IC 11924	Quebrada Bacalla	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia

Tabla 1. Continuación

Especie	Código	Número de catalogo	Localidad	Drenaje	Pendiente	País
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC24	CZUT-IC 12800	Quebrada Gualanday	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC25	CZUT-IC 12800	Quebrada Gualanday	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC33	CZUT-IC 12800	Quebrada Gualanday	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC26	CZUT-IC 12801	Quebrada Guaduas	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC27	CZUT-IC 12801	Quebrada Guaduas	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC29	CZUT-IC 12801	Quebrada Guaduas	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC19	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC34	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC35	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC36	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC37	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC38	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC39	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC40	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC41	CZUT-IC 12802	Río Alvarado	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC13	CZUT-IC 11888	Río Anchique	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC20	CZUT-IC 11546	Río Anchique	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC30	CZUT-IC 12803	Río Cucuana	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC31	CZUT-IC 12803	Río Cucuana	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC32	CZUT-IC 12803	Río Cucuana	Alto Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC45	CZUT-IC 14028	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC46	CZUT-IC 14028	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC47	CZUT-IC 14028	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC48	CZUT-IC 14028	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC49	CZUT-IC 13991	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC50	CZUT-IC 14005	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC51	CZUT-IC 13991	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC53	CZUT-IC 14028	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC54	CZUT-IC 14005	Río Frio	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC71	CZUT-IC 14934	Río Aracataca	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC72	CZUT-IC 15147	Río Ariguani	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC73	CZUT-IC 15147	Río Ariguani	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC74	CZUT-IC 15147	Río Ariguani	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC75	CZUT-IC 15147	Río Ariguani	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC76	CZUT-IC 15147	Río Ariguani	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	CC82	CZUT-IC 15263	Arroyo Pechelin	Caribe	Atlántico	Colombia
<i>Pimelodella</i> n.sp.	STRI-815	STRI-815	Río Magdalena	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>P. cf. eutaenia</i>	STRI-3747	STRI-3747	Río Azucar	Azucar	Atlántico	Panamá
<i>P. cf. eutaenia</i>	STRI-3760	STRI-3760	Río Azucar	Azucar	Atlántico	Panamá
<i>P. cf. eutaenia</i>	STRI-2963	STRI-2963	Río Cascajal	Cascajal	Atlántico	Panamá
<i>P. cf. eutaenia</i>	STRI-2964	STRI-2964	Río Cascajal	Cascajal	Atlántico	Panamá
<i>P. cf. chagresi</i>	STRI-188	STRI-188	Río San Felix	San Felix	Pacífico	Panamá
<i>P. cf. chagresi</i>	STRI-189	STRI-189	Río San Felix	San Felix	Pacífico	Panamá
<i>P. cf. chagresi</i>	STRI-1173	STRI-1173	Río Abrojo	Coto	Pacífico	Costa Rica
<i>P. cf. chagresi</i>	STRI-1174	STRI-1174	Río Abrojo	Coto	Pacífico	Costa Rica
<i>P. cf. chagresi</i>	STRI-2022	STRI-2022	Río Salama Nuevo	Salama Nuevo	Pacífico	Colombia
<i>Imparfinis</i> sp.	CC77	CZUT-IC 15146	Río Ariguani	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Imparfinis</i> sp.	CC78	CZUT-IC 15146	Río Ariguani	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Imparfinis</i> sp.	CC79	CZUT-IC 15146	Río Ariguani	Bajo Magdalena	Atlántico	Colombia
<i>Rhamdia</i> sp.	CC80	CZUT-IC 15632	Río Cañas	Cañas	Atlántico	Colombia

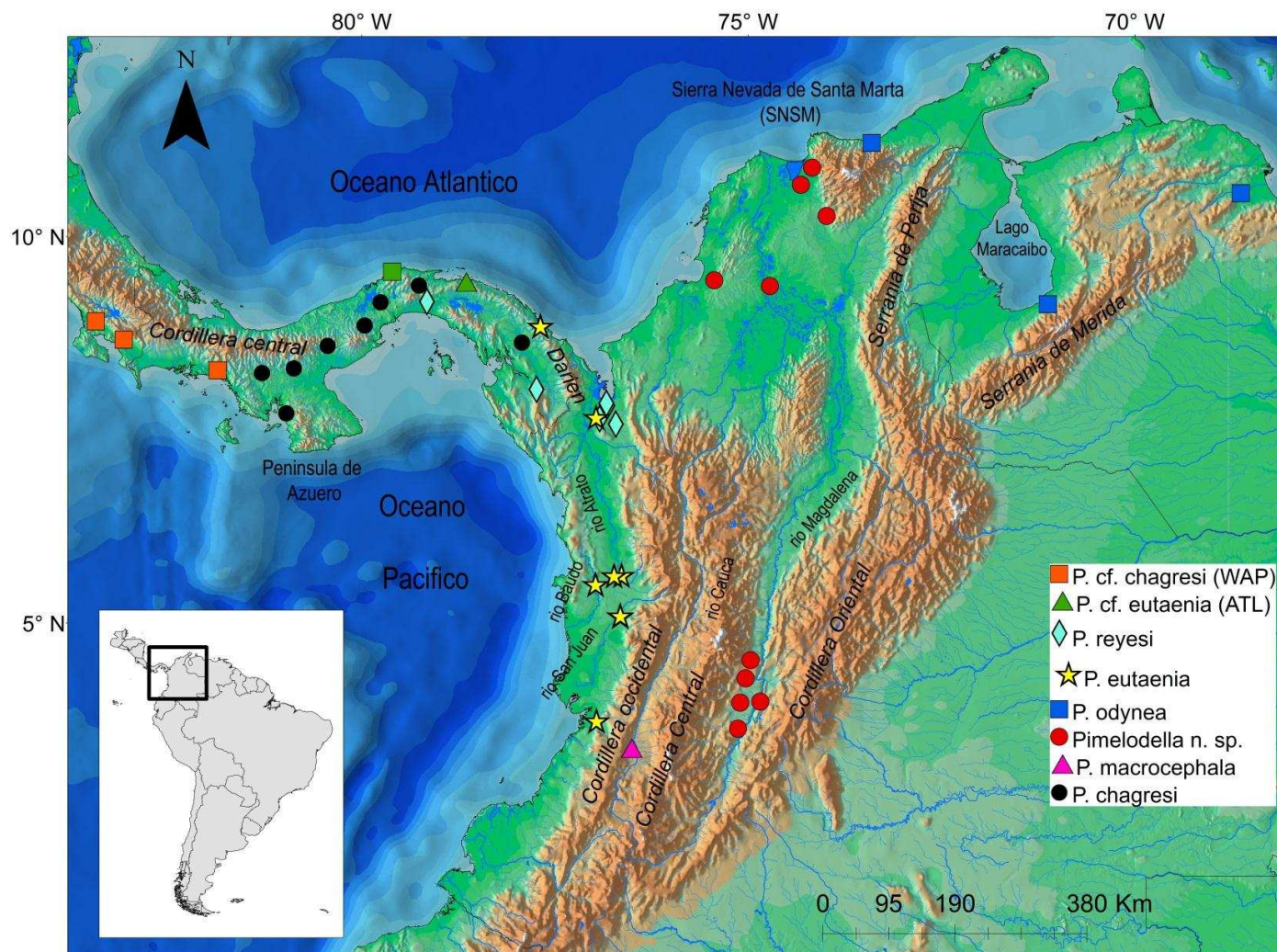


Fig 1. Parte inferior de América central (LCA) y norte de América del sur mostrando las localidades de los especímenes del género *Pimelodella* usados en este estudio.

2.2. Extracción de DNA, amplificación y secuenciamiento

El DNA fue extraído con CTAB siguiendo a Doyle & Doyle (1987) con modificaciones. Fue usada una ronda de reacción en cadena de Polimerasa (PCR) para la amplificación de dos genes mitocondriales: *Cytochrome oxidase c subunit 1* (COI) con el coctel de primers FishF1t1 y FishR1t1 (Ivanova et al., 2007; Ward et al., 2005), y *ATP synthase 6* (ATPase-6) con los primers L8524 y H9236 (Quenouille et al., 2004). Nested-PCR fue usado para la amplificación del gen nuclear *Myosin heavy chain 6* (Myh6) usando los primers F459 y R1325 (1 PCR) y F507 y R1322 (2PCR) (Li et al., 2007).

La reacción de PCR para COI fue llevada a cabo en un volumen de reacción de 25 μ L, conteniendo 17.5 μ L H₂O, 2.5 μ L de reacción buffer 10x IO (Phoneutria[®]), 2 μ L MgCl₂ (25 mM), 0.25 μ L de dNTPs (20mM), 0.25 μ L de cada primer (10 μ M), 0.25 μ L de Taq DNA polimerasa (5U/ μ l) (Phoneutria[®]), y 2 μ L DNA genómico. El PCR consistió de una desnaturalización inicial (2 min en 94°C) seguido de 35 ciclos de desnaturalización en cadena (30 s en 94°C), hibridación de primers (30 s en 50-48 °C), extensión (45 s en 72°C), y una extensión final (10 min en 72°C). La reacción de PCR para ATPase-6 fue llevada a cabo en un volumen de reacción de 20 μ L, conteniendo 13.9 μ L H₂O, 2 μ L de reacción buffer 10x IO (Phoneutria[®]), 2.4 μ L MgCl₂ (25 mM), 0.2 μ L de dNTPs (20mM), 0.2 μ L de cada primer (10 μ M), 0.1 μ L de Taq DNA polimerasa (5U/ μ l) (Phoneutria[®]), y 1 μ L DNA genómico. El PCR consistió de una desnaturalización inicial (5 min en 94 °C) seguido de 34 ciclos de desnaturalización en cadena (45 s en 94 °C), hibridación de primers (1 min 30 s en 58 °C), extensión (2 min en 72 °C), y una extensión final (10 min en 72 °C). La primera reacción de PCR para Myh6 fue llevada a cabo en un volumen de reacción de 12.5 μ L, conteniendo 9.13 μ L H₂O, 1.25 μ L de

reacción buffer 10x IO (Phoneutria[®]), 0.30 μ L MgCl₂ (50 mM), 0.12 μ L de dNTPs (20mM), 0.3 μ L de cada primer (10 μ M), 0.1 μ L de Taq DNA polimerasa (5U/ μ l) (Phoneutria[®]), y 1 μ L DNA genómico. La segunda reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen de 12.7 μ L, conteniendo 9.63 μ L H₂O, 1.25 μ L de reacción buffer 10x IO (Phoneutria[®]), 0.30 μ L MgCl₂ (50 mM), 0.12 μ L de dNTPs (20mM), 0.3 μ L de cada primer (10 μ M), 0.3 μ L de Taq DNA polimerasa (5U/ μ l) (Phoneutria[®]), y 0.5 μ L del producto de la primera reacción. El PCR para las dos reacciones consistió de una desnaturalización inicial (5 min en 95°C) seguido de 15 ciclos de desnaturalización en cadena (45 s en 95°C), hibridación de primers (1 min en 54 °C), extensión (1 min en 72°C), 15 ciclos de desnaturalización en cadena (45 s en 95 °C), hibridación de primers (1 min en 52 °C), extensión (1 min en 72 °C), y una extensión final (7 min en 72 °C). Los productos de PCR fueron secuenciados sobre una plataforma de secuenciamiento de Macrogen, Seoul, Corea del Sur.

2.3. Alineamiento y análisis filogenéticos

Las secuencias de cada marcador fueron independientemente alineadas usando Clustal W (Thompson et al., 1994) con chequeo manual de los cromatogramas de secuenciamiento en el programa MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). El sumario genético (Proporciones de sitios variables y sitios informativos para parsimonia) fue calculado para cada gen con el programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009).

Análisis Bayesiano y de Máxima Parsimonia fueron realizados separadamente para ATPase-6 (n=98), COI (n=99), Myh6 (n=77), y la matriz concatenada de estos tres

marcadores (n=97), elaborada con el programa SequenceMatrix 1.8 (Vaidya et al., 2011). El modelo de evolución molecular fue seleccionado bajo *Akaike Information Criterion* (AIC) en el programa Partition Finder v 1.1.1 (Lanfear et al., 2012). El análisis de inferencia Bayesiana fue ejecutado en el programa MrBayes versión 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) con cuatro cadenas independientes *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) de 100.000.000 generaciones cada una, con un árbol filogenético muestreado a cada 5.000 generaciones. El primer 25% de las generaciones fue descartado con *burn-in* y los árboles restantes fueron usados para generar las estadísticas y la topología. El análisis de Máxima parsimonia fue conducido con PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). Las búsquedas heurísticas se realizaron con 100 repeticiones de adición aleatoria y *TBR branch swapping*. Todos los caracteres fueron tratados como no ordenados, y todas las transformaciones de carácter fueron igualmente pesados. La robustez de los clados fue verificada con 1.000 pseudoréplicas *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Los árboles y los valores de probabilidad posterior/bootstrap fueron inspeccionados usando FigTree v1.4.0 (Rambaut & Drummond, 2012).

2.4. Distancias genéticas y delimitación de especies

La estimativa de divergencia evolutiva sobre pares de secuencias entre los grupos y el promedio de divergencia dentro de cada grupo fue estimado para los genes mitocondriales COI y ATPase-6 separadamente, usando la estimativa de distancias genéticas en el programa MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). La tasa de variación entre sitios fue modelada con la distribución gamma (*shape parameter*), el cual fue estimado con MrModeltest (Nylander, 2004).

El método exploratorio para la formulación de hipótesis de especies *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) basado en el *barcode gap* (Puillandre et al., 2012), fue aplicado en un conjunto de 93 secuencias del gen COI. El análisis fue realizado a través de la interface web (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>). El método fue evaluado con el *prior* de divergencia intraespecífica (P) de 0.005-0.1, y fueron evaluados con las dos métricas disponibles, JC69 (Jukes & Cantor, 1969) y K2P (Kimura, 1980) empleando diferentes valores para el ancho relativo del gap (X= 0.75, 1.5 y 2.0) para evaluar su impacto sobre el análisis.

2.5. Análisis morfométrico y merístico

Las medidas fueron tomadas con un calibrador digital sobre el lado izquierdo de los especímenes cuando fue posible. La metodología y terminología de las medidas fue basada en Lundberg & McDade (1986) y Bockmann, (1994). Fue realizado un análisis de componentes principales (PCA) después de la aplicación del método de Burnaby para eliminar la influencia del tamaño sobre los caracteres morfométricos. Estos análisis fueron realizados a través del programa PAST 3.12 (Hammer et al., 2001). En el análisis merístico fueron evaluados el número de radios totales de las aletas dorsal, pectoral y pélvica, así como los radios ramificados de la aleta anal y los lóbulos superior e inferior de la aleta caudal. Las espinas duras son representadas con números romanos, los radios blandos no ramificados con números romanos en minúscula y los radios blandos ramificados con números arábigos. El material comparativo examinado es presentado en el Apéndice A.

3. Resultados

3.1. Datos moleculares e inferencia filogenética

Fueron secuenciados fragmentos de 651 pb para el gen mitocondrial COI, 684 pb para ATPase 6 y 663 pb para el gen nuclear Myh6. Juntos, conformaron una matriz concatenada de 1998 pb. Las proporciones de sitios variables e informativos para parsimonia de cada gen, son presentados en la Tabla 2.

Tabla 2. Proporciones de sitios variables y sitios informativos bajo parsimonia de los genes analizados.

Gen	Sitios variables	Sitios informativos para parsimonia
COI	150 (23%)	145 (22,3%)
ATPase 6	238 (34,8%)	214 (31,3%)
Myh6	39 (5,9%)	19 (2,9%)

PartitionFinder segregó los nueve subconjuntos posibles para los tres genes en dos particiones, seleccionando el mejor modelo de substitución de nucleótidos ajustado a los datos (Tabla 3).

Tabla 3. Mejor modelo de substitución de nucleótidos para el análisis bayesiano para las particiones de datos encontradas de acuerdo al criterio AIC.

Gen	Posición del codón	Mejor modelo
COI	1, 2	HKY + I
	3	GTR + I + G
ATPase 6	1, 2	HKY + I
	2	GTR + I + G
Myh6	1, 2, 3	HKY + I

Los análisis de inferencia Bayesiana y máxima parsimonia para la matriz concatenada (Fig. 2) y cada gen separadamente (Fig. 3), soportaron el monofiletismo de cada una de las especies transandinas de *Pimelodella* evaluadas en este estudio. Sin embargo, mediante la inclusión de especies cisandinas en la reconstrucción filogenética a partir del gen mitocondrial COI (Fig. 3b), es posible inferir que *Pimelodella* no representa una unidad monofilética en la región transandina. La genealogía generada a partir de la matriz concatenada, reveló a *P. odynea* soportada como hermana del resto de especies (P=1.00, BS=99). De igual forma, con un fuerte soporte estadístico, *Pimelodella* n. sp. de la cuenca del río Magdalena aparece como grupo hermano de *P. macrocephala*, especie endémica del alto Cauca (P=1.00, BS=89). Por otro lado, es conformado un gran clado que incluye a *P. eutaenia*, *P. chagresi* y los clados WAP (vertientes del Pacífico hacia el occidente del golfo de Montijo) y ATL (vertientes del Atlántico al occidente del golfo de San Blas) (P=1.00, BS=100). Las topologías de los dos marcadores mitocondriales fueron semejantes al ser analizados separadamente, sin embargo a partir del análisis bayesiano para ATPase6, los clados WAP y ATL mostraron ser hermanos de *P. eutaenia* (P=0.59) (Fig. 3a), mientras que para COI fueron grupos hermanos de *P. chagresi* (P=0.99) (Fig. 3b). Las topologías obtenidas con el análisis de Máxima Parsimonia para cada marcador mitocondrial conformaron los mismos subclados (*P. chagresi*, *P. eutaenia*, WAP y ATL) revelando una politomia. Como es de esperar, las genealogías a partir de los marcadores mitocondriales mostraron una mayor resolución que el marcador nuclear, sin embargo, este último, soportó los clados *P. odynea* (P=0.99, BS=64) y *P. reyesi* (P=1.00, BS=85) (Fig. 3c).

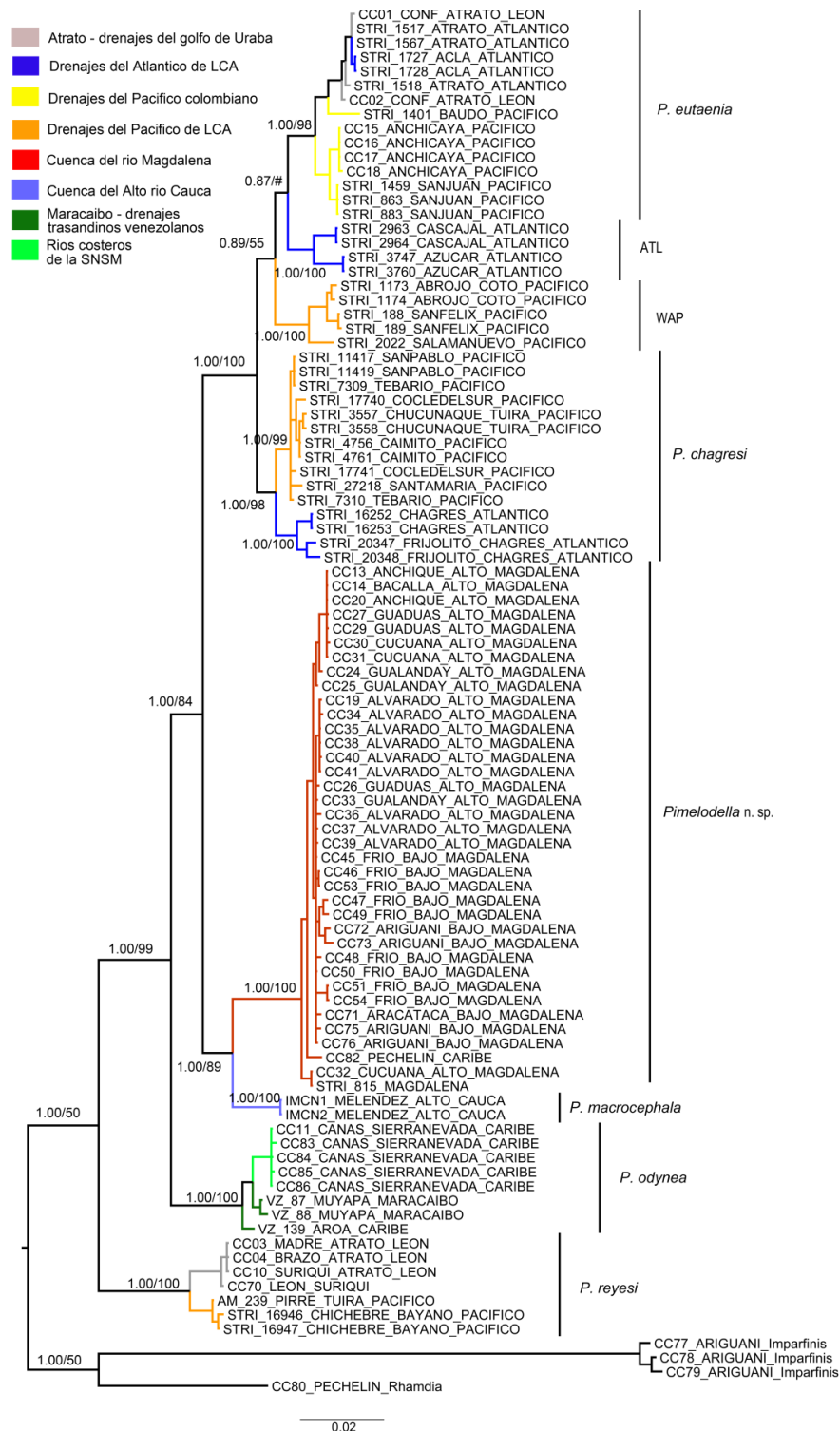


Fig. 2. Hipótesis de las relaciones filogenéticas del género *Pimelodella* en la región transandina, basado en inferencia Bayesiana de una matriz de 1998 pb que consiste de dos marcadores mitocondriales (COI, ATPase6) y un marcador nuclear (Myh6). Los números y símbolos en los nodos indican los valores de probabilidad posterior/bootstraps obtenidos para los enfoques de inferencia Bayesiana y máxima parsimonia respectivamente. # denota nodo con politomia en la topología obtenida con el análisis de máxima parsimonia.

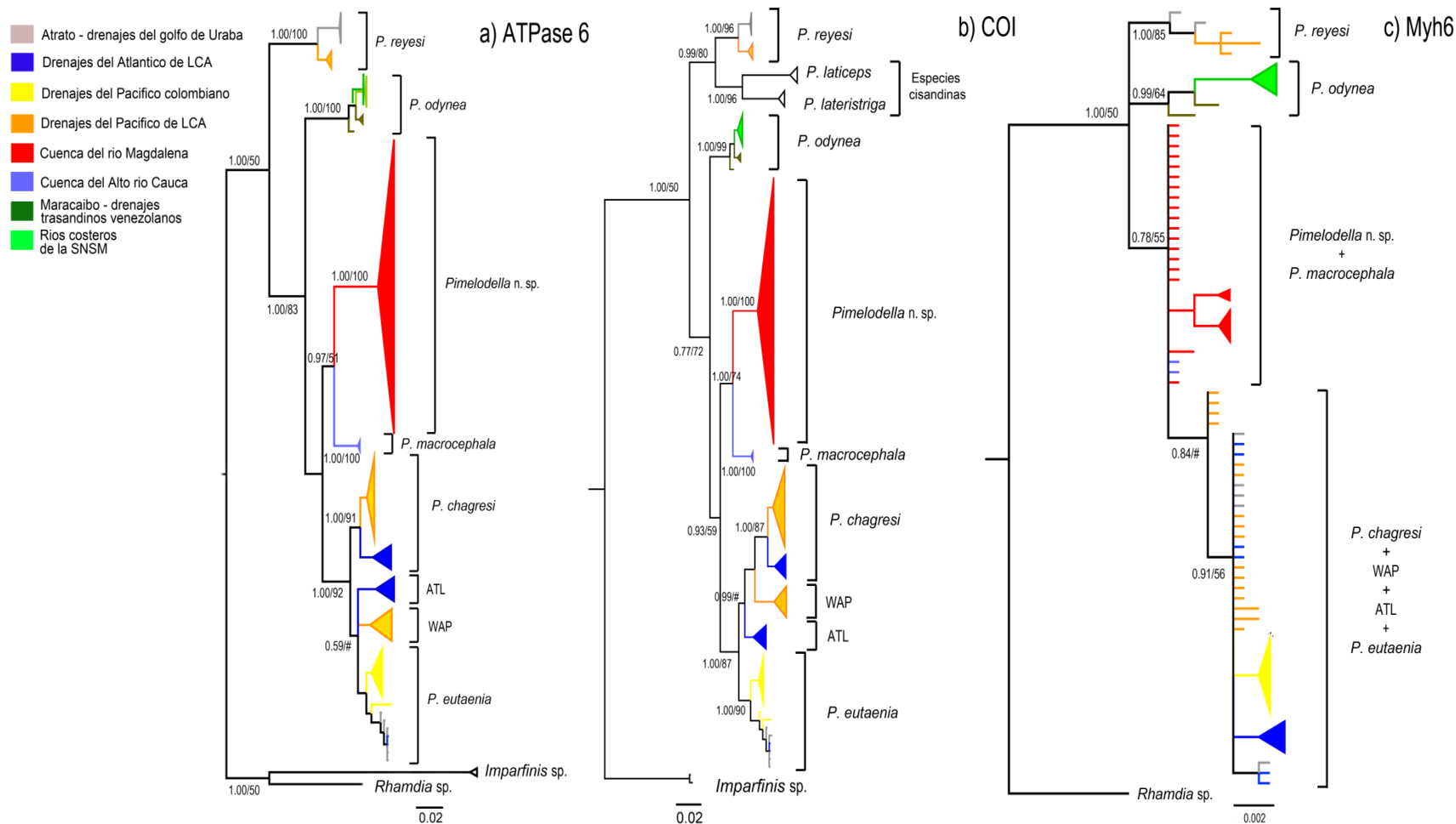


Fig. 3. Hipótesis de las relaciones filogenéticas del género *Pimelodella* en la región transandina, basado en inferencia Bayesiana con los marcadores mitocondriales COI (a), ATPase6 (b) y el marcador nuclear Myh6 (c). Los números y símbolos en los nodos indican los valores de probabilidad posterior/bootstraps obtenidos para los enfoques de inferencia Bayesiana y máxima parsimonia respectivamente. # denota nodo con politomía en la topología obtenida con el análisis de máxima parsimonia.

3.2. Distancias genéticas y delimitación de especies

Los promedios de diferenciación nucleotídica dentro de cada unidad evolutiva para los dos marcadores mitocondriales fueron relativamente bajos, alcanzando los mayores valores (0.014) para ATPase6 en *P. eutaenia* y ATL, mientras que para COI los mayores valores (0.010) se obtuvieron en *P. eutaenia*, *P. reyesi* y ATL (Tabla 4). La divergencia nucleotídica entre unidades evolutivas para ATPase6 tuvo un rango desde 0.039 (*P. chagresi* vs. *P. eutaenia*; *P. chagresi* vs. WAP) hasta 0.226 (*Pimelodella* n. sp. vs. *P. reyesi*), mientras que para COI, el rango varió desde 0.30 (*P. eutaenia* vs. ATL) hasta 0.95 (*P. reyesi* vs. WAP) (Tabla 4).

A través del método de delimitación de especies ABDG, fue estimado un numero variable de probables unidades taxonómicas operacionales (OTU)s, con un rango de 8 a 11 grupos . No se encontró diferencia en los resultados obtenidos mediante el empleo de los modelos de substitución JC69 y K2P (Tabla 5). *P. odynea*, *P. macrocephala*, *Pimelodella* n. sp., *P. chagresi* y WAP fueron mantenidos invariablemente como OTUs consistentes en todos los resultados, sin embargo, *P. reyesi*, *P. eutaenia* y ATL fueron divididos en más de un OTU en alguno de los resultados (Fig. 4).

Tabla 4. Estimativo de divergencia nucleotídica entre unidades evolutivas del genero *Pimelodella* detectadas en este estudio, basado en marcadores mitocondriales (ATPase6, COI). Promedio de divergencia dentro de cada unidad es presentado con los valores con negrita.

	<i>P. chagresi</i>		<i>P. eutaenia</i>		<i>P. reyesi</i>		<i>P. odynea</i>		<i>Pimelodella n. sp.</i>		<i>P. macrocephala</i>		ATL		WAP	
	ATPase6	COI	ATPase6	COI	ATPase6	COI	ATPase6	COI	ATPase6	COI	ATPase6	COI	ATPase6	COI	ATPase6	COI
<i>P. chagresi</i>	0,012	0,008														
<i>P. eutaenia</i>	0,039	0,042	0,014	0,010												
<i>P. reyesi</i>	0,204	0,092	0,192	0,087	0,013	0,010										
<i>P. odynea</i>	0,109	0,053	0,117	0,056	0,192	0,078	0,006	0,004								
<i>Pimelodella n. sp.</i>	0,094	0,056	0,112	0,058	0,226	0,086	0,135	0,062	0,003	0,004						
<i>P. macrocephala</i>	0,081	0,056	0,081	0,055	0,149	0,076	0,112	0,058	0,071	0,039	0,000	0,000				
ATL	0,054	0,034	0,043	0,030	0,191	0,093	0,140	0,053	0,100	0,060	0,083	0,058	0,014	0,010		
WAP	0,039	0,036	0,041	0,037	0,189	0,095	0,124	0,061	0,111	0,058	0,079	0,059	0,053	0,038	0,013	0,007

Tabla 5. Resultados del método de delimitación de especies Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) en poblaciones del genero *Pimelodella* en la región transandina.

Modelo de substitución	Ancho del gap relativo (X)	Partición	Prior de divergencia intraespecífica (P)			
			0,005	0,007	0,0097	0,0136
Jukes-Cantor (JC)	0,75	Inicial	8	8	8	8
		Recursivo	11	11	10	10
	1,5	Inicial	8	8	8	8
		Recursivo	10	10	9	9
	2	Inicial	8	8	8	8
		Recursivo	10	10	9	9
Kimura 2-parametros (K2P)	0,75	Inicial	8	8	8	8
		Recursivo	11	11	10	10
	1,5	Inicial	8	8	8	8
		Recursivo	10	10	9	9
	2	Inicial	8	8	8	8
		Recursivo	10	10	9	9

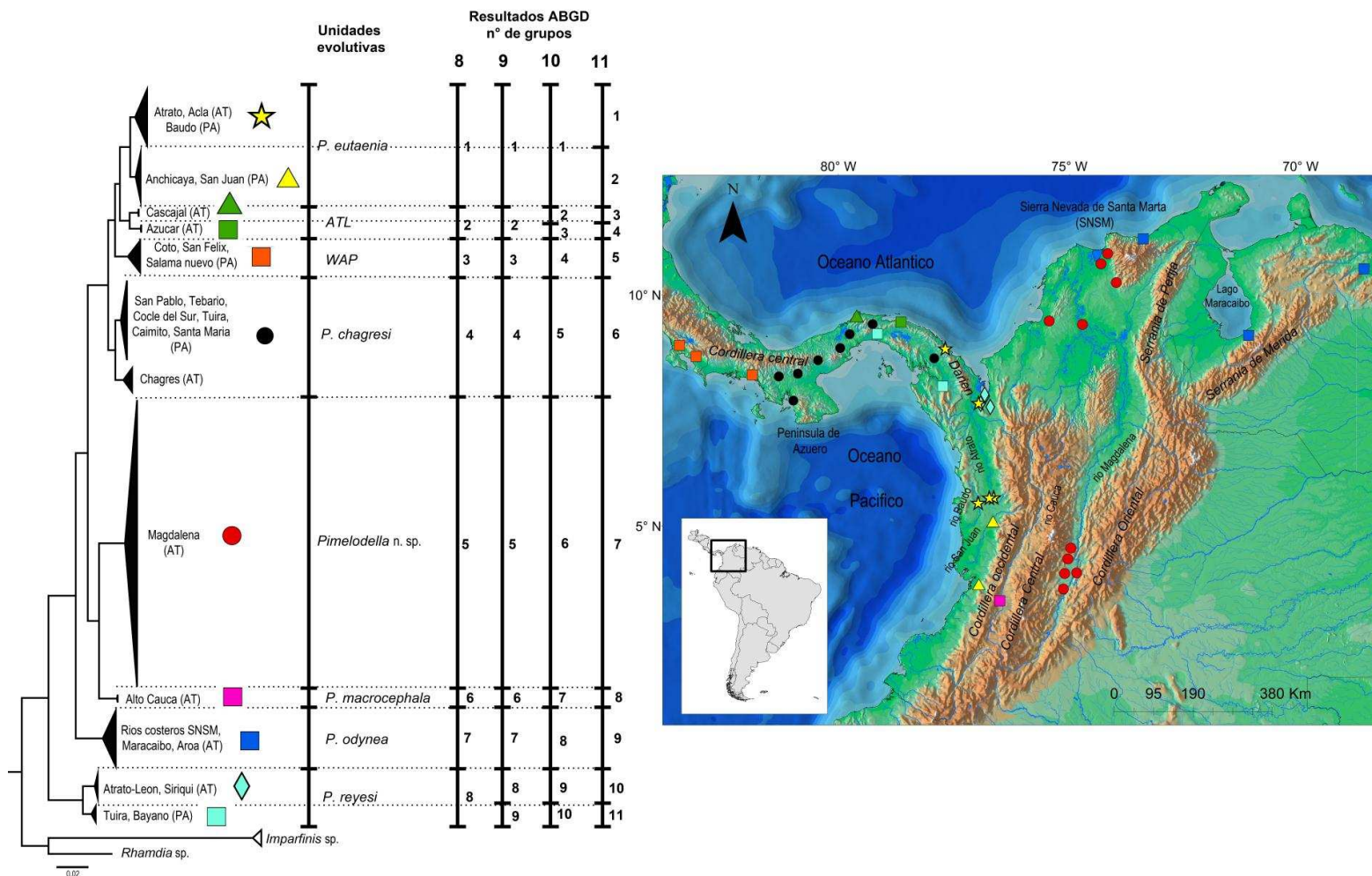


Fig. 4. Árbol filogenético (inferencia bayesiana) basado en la matriz concatenada (COI+ATPase6+Myh6), indicando los resultados obtenidos para el método de delimitación de especies ABGD: son representados los cuatro diferentes resultados mostrados en la tabla x., cuando fueron definidos 8, 9, 10 o 11 OTU's. Los símbolos en cada clado indican su rango geográfico en el mapa..

3.3. Morfometría tradicional y merística

El análisis de componentes principales (PCA) de los datos morfométricos, mostró una diferencia significativa en la forma de las especies evaluadas: *P. odynea*, *P. reyesi*, *P. modesta*, *P. grisea*, *P. eutaenia*, *P. macrocephala* y *Pimelodella* n.sp. de la cuenca del río Magdalena (Fig. 6). Después de la corrección de tamaño con el método de Burnaby, el PC1 representó el 38.9% de la variación total, PC2 el 24.7% y el PC3 13.2%.

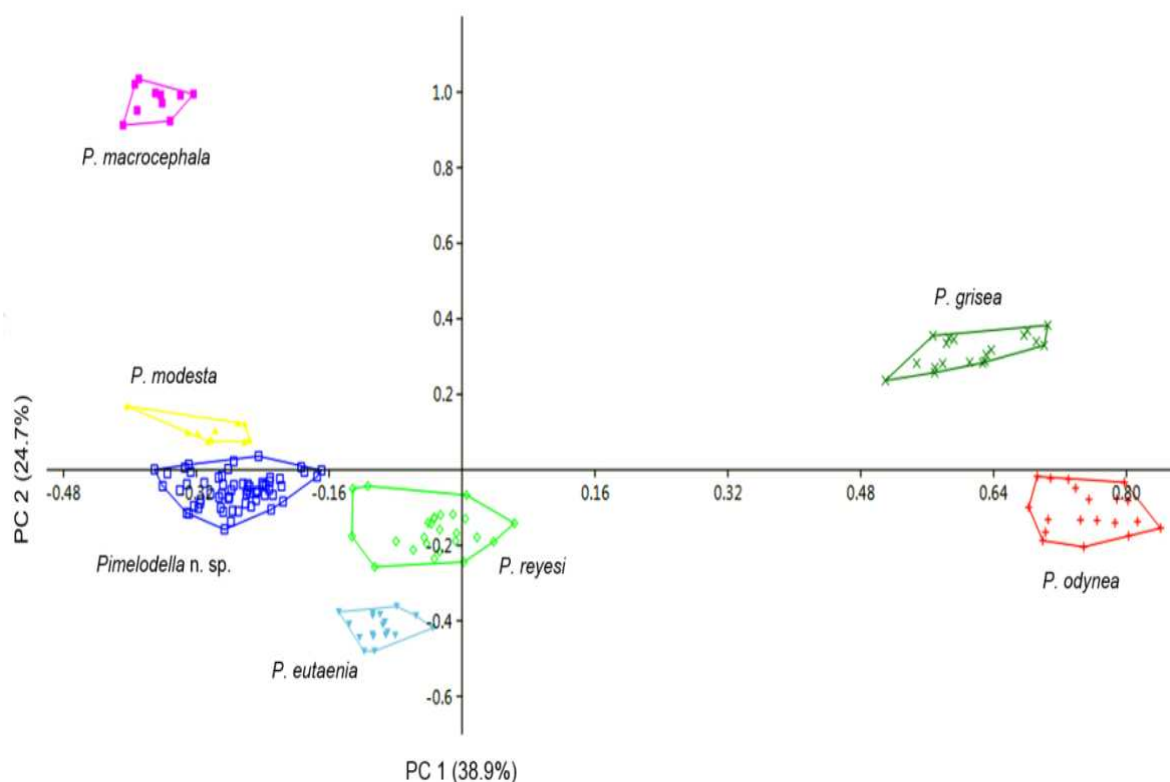


Fig 6. Representación gráfica de los componentes 1 (PC1) y 2 (PC2) para las variables morfométricas de siete especies transandinas del genero *Pimelodella*.

La comparación entre las mediciones proporcionales es proporcionada en las Tablas 6 y 7. Varias de estas mediciones son útiles para la diferenciación entre algunas especies: longitud de la espina dorsal (*P. macrocephala* vs. *P. eutaenia* y *P. reyesi*); longitud de la espina pectoral (*P. macrocephala* vs. *P. modesta*, *P. eutaenia* y *P. reyesi*); profundidad del pedúnculo caudal (*P. macrocephala* de *P. eutaenia*); longitud de la cabeza (*P. macrocephala* de todas las especies evaluadas con excepción de *P. grisea*); distancia interorbital (*P. modesta* vs. *P. eutaenia*); diámetro del ojo (*P. odynea* vs. *P. macrocephala*); *P. modesta* puede ser diferenciada de las demás especies por una combinación de caracteres relacionados a la longitud de las barbillas maxilares y mentonianas.

Los conteos correspondientes a los radios de las aletas se sobreponen en todas las especies, indicando que estas no representan características diagnósticas entre las especies analizadas (Tabla 8).

Tabla 6. Datos morfométricos de *P. odynea*, *Pimelodella* n.sp., *P. macrocephala* y *P. grisea*. Los valores son dados como porcentajes de la longitud estándar o longitud de la cabeza. SD= desviación estándar, M= media, n= número de especímenes analizados.

	<i>P. odynea</i> (n=19)				<i>Pimelodella</i> n. sp. (n=61)				<i>P. macrocephala</i> (n=10)				<i>P. grisea</i> (n=19)			
	Min	Max	M	SD	Min	Max	M	SD	Min	Max	M	SD	Min	Max	M	SD
Longitud estandar (mm)	66,9	138,2	80,7		43,0	100,7	69,2		51,2	72,1	57,8		67,9	135,3	93,9	
Porcentaje de longitud estándar																
Profundidad del cuerpo	13,9	21,5	18,3	2,3	14,0	22,0	17,58	1,6	18,6	23,5	21,1	1,8	20,2	25,1	22,1	1,2
Longitud predorsal	31,8	36,5	33,7	1,5	31,32	36,13	33,82	1,1	36,45	40,03	37,96	1,031	33,6	38,6	36,3	1,2
Longitud de la base de la aleta dorsal	12,3	15,7	14,4	0,9	12,6	16,7	14,38	0,898	12,9	15,2	13,8	0,7	14,0	16,2	14,9	0,6
Longitud de la espina dorsal	8,3	16,2	13,3	2,1	9,4	16,2	12,79	1,6	9,5	12,0	10,8	0,9	12,6	20,0	15,7	2,4
Longitud preanal	62,6	71,0	67,4	1,9	62,1	71,09	67,86	1,7	65,2	71,1	68,3	1,7	66,1	69,4	67,8	1,0
Longitud de la base de la aleta anal	11,8	16,4	13,5	1,4	11,0	15,8	13,32	1,1	12,7	15,5	13,7	1,1	11,7	16,2	13,9	1,2
Longitud prepectoral	20,3	27,0	22,5	1,6	20,1	25,42	22,39	1,4	23,6	26,4	25,4	1,0	22,0	25,3	23,9	0,9
Longitud de la espina Pectoral	12,9	16,4	14,6	1,1	12,0	17,3	15,11	1,4	11,5	14,9	13,1	1,2	12,7	19,2	16,0	1,6
longitud preventral	43,6	52,5	47,4	2,3	44,1	50,7	47,12	1,5	49,3	54,4	51,6	1,8	48,1	53,3	50,7	1,2
Longitud de la base aleta adiposa	22,8	32,9	28,1	3,1	22,6	35,8	30,62	2,7	22,9	27,6	25,8	1,5	19,9	27,8	23,9	2,5
Longitud preadiposa	55,9	67,0	61,7	3,2	56,8	65,2	61,22	1,8	59,4	67,1	65,0	2,2	62,4	68,8	65,0	1,8
Profundidad de la adiposa	2,8	6,2	4,4	0,8	3,5	6,7	5,3	0,6	3,1	4,7	3,9	0,6	3,8	5,7	4,9	0,5
Longitud del pedunculo caudal	18,8	22,6	20,3	1,0	14,1	22,2	19,7	1,3	18,6	20,0	19,1	0,5	17,8	20,6	19,4	0,9
Profundidad del Pedunculo Caudal	7,1	10,5	8,6	1,2	7,3	10,1	8,4	0,6	9,4	12,9	10,6	1,0	8,4	10,1	9,1	0,4
Distancia entre la base del ultimo radio dorsal y la aleta adiposa	11,1	19,1	15,4	2,3	11,4	19,3	14,9	1,8	14,3	19,6	16,8	1,9	13,9	19,4	16,8	1,5
Amplitud del cleitro	7,8	10,9	9,8	0,7	8,5	11,8	10,0	0,8	9,0	10,2	9,6	0,4	10,0	13,0	11,7	1,0
Longitud barbilla maxilar	53,0	98,7	73,7	14,4	54,4	84,4	71,1	7,0	53,8	64,1	57,3	2,9	51,8	65,0	58,1	3,9
Longitud barbilla mentiniana externa	17,8	37,9	28,8	5,3	18,2	39,0	28,2	3,6	20,8	26,8	25,4	1,7	22,1	28,2	25,5	1,8
Longitud barbilla mentoniana interna	12,8	20,4	17,3	2,2	11,8	22,9	16,1	2,2	13,2	17,6	15,0	1,3	12,8	17,3	14,9	1,4
Longitud de la Cabeza	20,6	23,8	22,0	0,8	20,0	23,9	22,0	1,0	25,3	27,4	26,3	0,7	21,8	25,9	24,0	0,9
Porcentaje de longitud de la cabeza																
Profundidad de la cabeza	42,9	58,4	50,6	4,9	41,9	59,4	50,8	3,4	47,9	57,5	51,7	3,7	43,9	54,4	49,3	2,6
Ancho de la cabeza	64,3	83,1	74,2	4,9	65,3	88,4	76,4	4,6	77,4	84,9	82,4	2,7	68,2	80,1	74,9	3,3
Distancia interorbital	22,2	33,3	29,2	3,4	27,2	40,5	31,6	2,6	33,8	40,1	37,1	2,0	31,2	39,0	34,33	2,3
Diametro del ojo	22,0	28,2	25,1	1,7	19,3	28,8	24,1	2,1	18,6	21,2	19,6	1,0	21,0	26,5	23,7	1,2
Longitud del hocico	39,5	45,6	41,9	2,0	38,0	46,4	41,5	2,0	37,9	41,0	39,9	1,1	40,7	47,0	42,9	1,7
Longitud de internarinar	14,2	21,1	17,9	1,7	12,8	21,7	18,2	1,8	14,4	18,7	15,8	1,2	15,1	21,4	17,8	1,8
Longitud entre narinas anteriores	14,2	21,7	16,8	1,8	14,8	21,8	17,7	1,6	16,2	19,0	17,7	0,9	16,1	21,9	18,7	1,4
longitud entre narinas posteriores	14,4	22,7	18,6	2,3	16,2	23,7	19,9	1,5	18,2	21,4	20,1	1,0	18,7	25,1	21,8	1,5
Distancia entre las comisuras bucales	24,9	41,0	32,0	3,3	25,0	41,3	33,4	3,1	31,7	39,3	35,3	2,2	29,4	37,3	33,8	2,2

Tabla 7. Datos morfométricos de *P. reyesi*, *P. modesta* y *P. eutaenia*. Los valores son dados como porcentajes de la longitud estándar o longitud de la cabeza. SD= desviación estándar, M= media, n= número de especímenes analizados.

	<i>P. reyesi</i> (n=25)				<i>P. modesta</i> (n=10)				<i>P. eutaenia</i> (n=18)			
	Min	Max	M	SD	Min	Max	M	SD	Min	Max	M	SD
Longitud estandar (mm)	55,4	130,2	87,5		58,9	102,7	85,1		54,91	154,9	98,6	
Porcentaje de longitud estandar												
Profundidad del cuerpo	14,7	23,5	20,0	1,8	17,2	24,1	19,9	1,9	15,7	21,45	17,77	1,396
Longitud predorsal	31,4	36,4	34,1	1,3	33,0	35,6	34,5	0,8	32,9	36,69	34,71	1,13
Longitud de la base de la aleta dorsal	13,4	16,3	15,1	0,8	13,5	16,9	15,0	1,1	13,01	16,47	14,67	0,886
Longitud de la espina dorsal	14,6	19,5	17,0	1,4	9,6	14,0	11,7	1,4	12,93	19,48	16,56	1,596
Longitud preanal	67,2	72,1	69,0	1,1	64,2	68,0	66,0	1,3	66,32	70,32	68,64	1,078
Longitud de la base de la aleta anal	10,2	14,7	12,5	1,2	13,0	15,4	14,3	0,8	11,49	15,03	12,83	0,901
Longitud prepectoral	21,9	26,0	23,4	1,1	20,1	24,2	22,2	1,4	20,38	25,35	22,7	1,289
Longitud de la espina Pectoral	15,3	19,7	17,7	1,2	11,2	13,5	12,5	0,6	15,39	19,35	17,15	1,092
longitud preventral	46,9	50,8	48,8	1,1	47,2	52,5	49,1	1,6	45	49,99	47,15	1,277
Longitud de la base aleta adiposa	23,6	31,2	27,0	2,2	24,4	27,7	26,1	1,2	24,86	32,45	29,13	2,192
Longitud preadiposa	59,3	65,2	62,6	1,7	61,4	65,2	63,5	1,1	59,06	66,89	62,01	1,749
Profundidad de la adiposa	3,5	6,6	5,4	0,7	2,9	6,0	4,2	0,9	3,934	6,267	5,126	0,596
Longitud del pedunculo caudal	18,4	22,6	19,9	1,1	18,0	21,6	19,9	1,2	17,85	21,65	19,8	1,111
Profundidad del Pedunculo Caudal	7,1	9,8	8,5	0,7	8,6	10,2	9,4	0,5	7,531	9,28	8,286	0,494
Distancia entre la base del ultimo radio dorsal y la aleta adiposa	10,9	16,7	14,5	1,6	14,6	19,2	17,3	1,6	12,07	18,45	14,4	1,919
Amplitud del cleitro	8,7	11,5	10,6	0,6	9,2	10,9	10,1	0,6	8,947	12,33	10,55	1,09
Longitud barbilla maxilar	66,9	90,4	82,5	5,4	39,8	51,0	45,1	3,4	56,96	91,81	77,01	8,9
Longitud barbilla mentiniana externa	21,4	39,4	32,9	3,8	16,3	21,8	18,9	1,8	23,52	34,55	28,83	2,802
Longitud barbilla mentoniana interna	11,5	22,9	18,3	2,4	8,4	12,4	10,6	1,3	13,25	18,98	15,94	1,421
Longitud de la Cabeza	21,4	24,4	22,8	0,8	21,3	24,4	23,0	0,9	20,68	24,2	22,88	0,98
Porcentaje de longitud de la cabeza												
Profundidad de la cabeza	44,3	55,4	49,9	3,1	44,2	52,8	49,1	2,5	39,12	49,69	45,66	3,454
Ancho de la cabeza	66,5	81,5	75,5	4,1	73,5	81,3	78,6	2,4	59,67	76,64	69,48	5,24
Distancia interorbital	27,0	36,6	31,9	2,4	34,8	39,3	36,6	1,4	27,23	35,19	30,9	2,1
Diametro del ojo	20,6	31,4	24,7	2,3	19,2	24,6	21,7	2,0	19,44	27,52	24,12	2,495
Longitud del hocico	39,3	46,3	43,4	2,0	40,1	47,5	42,6	2,4	36,65	46,84	43,13	2,934
Longitud de internarinar	14,5	22,0	19,5	1,7	17,4	19,3	18,3	0,8	15,86	20,9	18,62	1,592
Longitud entre narinas anteriores	13,7	21,9	18,1	1,7	18,1	21,3	19,7	1,0	14,77	22,55	17,71	1,788
longitud entre narinas posteriores	16,8	25,7	20,7	2,1	21,7	25,5	24,2	1,2	15,07	24,64	18,92	2,084
Distancia entre las comisuras bucales	25,5	37,1	32,2	3,2	29,6	40,1	34,1	3,0	26,93	37,27	31,8	2,656

Tabla 8. Conteos merísticos para *P. odynea*, *Pimelodella* n.sp., *P. macrocephala*, *P. grisea*, *P. reyesi*, *P. modesta* y *P. eutaenia*. n= número de especímenes analizados

	<i>P. odynea</i>			Magdalena			<i>P. macrocephala</i>			<i>P. grisea</i>			<i>P. reyesi</i>			<i>P. modesta</i>			<i>P. eutaenia</i>		
	n=19			n=61			n=10			n=19			n=25			n=10			n=18		
	Min	Max	Moda	Min	Max	Moda	Min	Max	Moda	Min	Max	Moda	Min	Max	Moda	Min	Max	Moda	Min	Max	Moda
Radios de la aleta dorsal	I-6	I-6	I-6	I-6	I-6	I-6	I-6	I-6	I-6	I-6	I-7	I-6	I-6	I-7	I-6	I-6	I-7	I-6	I-5	I-6	I-6
Radios de la aleta pectoral	I-7	I-10	I-8	I-8	I-9	I-8	I-8	I-8	I-8	I-7	I-8	I-8	I-7	I-10	I-8	I-7	I-9	I-8	I-8	I-9	I-9
Radios de la aleta pelvica	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5	i-5
Radios ramificados de la aleta anal	6	10	9	7	10	8	7	10	8	8	11	10	7	9	8	8	11	9	7	10	8
Radios ramificados del lobulo superior de la aleta caudal	6	8	7	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	7	6	7	8
Radios ramificados del lobulo inferior de la aleta caudal	7	8	8	7	9	8	8	8	8	8	9	8	7	8	8	7	8	8	7	8	8

4. Discusión

4.1. Implicaciones taxonómicas y distribución geográfica

El género *Pimelodella* en la región transandina representa un grupo históricamente subestimado, en donde el estudio de las relaciones interespecíficas ha sido limitado a abordajes puramente morfológicas o a regiones geográficamente restrictas. El conjunto de nuestros resultados, realizados con abordajes moleculares y morfológicas en una amplia región transandina ha definido de manera objetiva seis unidades evolutivas (*P. eutaenia*, *P. chagresi*, *P. odynea*, *P. macrocephala*, *P. reyesi*, *Pimelodella* n. sp.), las cuales podrían ser reconocidas como linajes de metapoblaciones que evolucionan separadamente (De Queiroz, 2007). La hipótesis filogenética presentada en este trabajo, basada en marcadores mitocondriales y nucleares, soporta la separación de las especies en grupos monofiléticos, concordando parcialmente con la distribución actual de las especies descritas.

También reconocemos una importante variación genética del género en la región inferior de América Central (LCA), la cual es consecuente de la conformación del paisaje en la región. Los clados que denominamos WAP (vertientes del Pacífico hacia el occidente del golfo de Montijo) y ATL (vertientes del Atlántico al occidente del golfo de San Blas), fueron definidos como grupos que han evolucionado separadamente, con una considerable diferenciación genética. Sin embargo, al presentar una aparente diversificación reciente y no contar con una evaluación morfológica, nos abstenemos de proponerlos formalmente como especies diferentes. La hipótesis de que estos grupos

representan un complejo de especies en la región mesoamericana, aún podría ser considerada.

P. chagresi descrita para la cuenca del río Chagres en Panamá, históricamente ha sido considerado un complejo de especies con amplia distribución en la región transandina (Bermingham & Martin, 1998; Maldonado-Ocampo et al., 2012, 2005; Martin & Bermingham, 2000). Actualmente las poblaciones de la cuenca del río Magdalena también son consideradas como integrantes de este complejo de especies (Mojica et al., 2006; Villa-Navarro et al., 2006), no obstante, nuestros resultados sugieren de forma contundente, que las poblaciones a lo largo de esta cuenca conforman una unidad taxonómica diferente, considerada aquí como una especie aun no descrita. De esta forma, el rango de distribución de *P. chagresi* queda restringido a la cuenca del río Chagres y los drenajes del Pacífico en el centro y occidente de Panamá.

P. eutaenia descrita para la cuenca del río San Juan, ha sido reportada ampliamente en las vertientes del Pacífico norte (Baudó, Anchicayá, Dagua) y en la cuenca del río Atrato (Maldonado-Ocampo et al., 2012; Mojica et al., 2004). Los resultados presentados por Martin & Bermingham, (2000) y nuestros resultados soportan esta distribución actual, sin embargo permiten ampliar la distribución de esta especie para las vertientes del Atlántico al oriente del golfo de San Blas en Panamá (ríos Acla y Playon Chico).

En los trabajos previos de Bermingham & Martin, (1998) y Martin & Bermingham, (2000), la evaluación de marcadores mitocondriales reveló la conformación de dos grandes grupos bien diferenciados dentro del género *Pimelodella*; el primero incluía

representantes de *P. chagresi*, *P. eutaenia* e individuos de las cuencas del Magdalena y Maracaibo, considerados hasta entonces pertenecientes al complejo *P. chagresi*. El segundo grupo era conformado por individuos del bajo Atrato y vertientes del Pacífico del centro y oriente de Panamá, considerados también dentro del complejo *P. chagresi*. De esta forma, dichas relaciones definieron un grupo polifilético. Con base en nuestros resultados, proponemos que este segundo grupo corresponde de hecho, a poblaciones de *P. reyesi*, especie que está distribuida en la cuenca del río Sinú, drenajes del golfo de Urabá (Suriquí, León), en simpatría con *P. eutaenia* en la cuenca del bajo río Atrato y con *P. chagresi* en vertientes del Pacífico panameño como el Tuira, Bayano, Santa María y Cocle del Sur.

Por otro lado, *P. odynea* fue reconocida como una especie con distribución en la región transandina venezolana, presente también en la cuenca del Catatumbo y en los ríos costeros del norte de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) en Colombia. Igualmente, fue confirmada la presencia y distribución restringida de *P. macrocephala* para el alto Cauca, especie considerada actualmente en categoría de amenaza como vulnerable (Usma & Ortega-Lara, 2012).

Dos patrones de distribución de las especies de *Pimelodella* aparecen en esta región: alopatría para *P. odynea*, *P. macrocephala* y *Pimelodella* n. sp. y simpatría para las especies del Chocó biogeográfico y en LCA. Para estas últimas, la simpatría puede ocurrir por la ocupación de diferentes nichos y una alta heterogeneidad de hábitat, en una condición paralela a la observada en linajes divergentes del género *Rhamdia* (Hernández et al., 2015).

4.2. Historia evolutiva e implicaciones biogeográficas

Nuestros resultados indican que el género *Pimelodella* no representa una unidad monofilética dentro de la región transandina (Fig. 3b), lo cual podría definir un mosaico de especies con múltiples orígenes. De acuerdo a caracteres morfológicos, otras hipótesis filogenéticas han sugerido que géneros como *Creagrutus* (Vari & Harold, 2001) y *Gymnotus* (Albert et al., 2005) no representan grupos monofiléticos en la región transandina. Esto indica que parte de la ictiofauna regional podría ser anterior a los eventos tectónicos del Mioceno que definieron el paisaje del norte de América del Sur (Lundberg et al., 1998).

Apoyándonos en los resultados de Martin & Bermingham, (2000), planteamos que *P. reyesi* y *P. grisea* podrían tener un origen diferente al resto de las especies transandinas. Estas dos especies podrían ser originarias de poblaciones que fueron sometidas a procesos de vicarianza tras el levantamiento de la cordillera oriental en el Mioceno medio (~12 MA), resistiendo los eventos de extinción masiva de peces dulceacuícolas de la región transandina que estuvieron relacionados con periodos extensos de sequía y afectaron principalmente a las especies de grande porte, como una consecuencia de la reducción de los caudales (Galvis et al., 2006; Lundberg et al., 1998).

Las demás especies transandinas evaluadas aquí, pudieron ser originarias de una colonización más reciente, a través de la región donde hoy se eleva la Serranía del Perijá, estas poblaciones colonizadoras provendrían de la región norte de Venezuela, la cual fue separada del sistema paleo-Amazonas-Orinoco en el Mioceno tardío (~8 MA) tras la elevación de la Serranía de Mérida (Lundberg et al., 1998). En esta misma época

comenzaría a formarse el alto valle del Magdalena, sin embargo su separación de la cuenca del Maracaibo y la región transandina venezolana, fue probablemente posterior a la transición del Terciario-Cuaternario, tras el levantamiento de la Serranía del Perijá (Galvis et al., 2006).

Estos eventos tectónicos del Mioceno medio y tardío, han sido los principales responsables para definir los límites de los drenajes modernos del norte de América del Sur (Albert et al., 2006). Para la cuenca del Maracaibo se ha planteado un origen híbrido, que incluye dispersión por parte de poblaciones del Magdalena y una influencia de la ictiofauna del Orinoco. Sin embargo, su aislamiento y exposición directa a los efectos de las alteraciones en los niveles del mar, han compuesto un mosaico de relictos de linajes antiguos, nuevas poblaciones que han llegado a través de procesos de dispersión y especies endémicas que han evolucionado separadamente (Rodríguez-Olarte et al., 2011).

La presencia de *P.odynea* en la cuenca del Maracaibo y ríos trasandinos venezolanos, es probablemente producto de su aislamiento y dispersión tras procesos de anastomosis de los drenajes en periodos de aumento del nivel del mar (Rodríguez-Olarte et al., 2011). Así mismo, su presencia en los cortos drenajes independientes del norte de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) podría ser explicada por eventos de dispersión desde la región transandina venezolana. La SNSM es un macizo aislado e independiente de la cordillera de los Andes, localizada en la parte norte del caribe Colombiano (Castaño-Uribe, 1999). En esta se ha encontrado corazas lateríticas a más de 2000 metros de altura, indicando que eran tierras emergidas de poca altitud en el Eoceno (Galvis et al.,

2006), constituyendo una antigua barrera que impedía la conexión con la cuenca del Magdalena. Por otro lado, la Serranía del Perijá comparte un gran número de elementos de fauna y flora con la SNSM, esto sugiere que dicha formación fue un corredor importante para la dispersión de la biota residente (Hernández-Camacho et al., 1992), la cual pudo haber sido una posible ruta para la dispersión de *P. odynea*.

Por otro lado, los procesos vicariantes pudieron haber sido los factores delimitantes de las poblaciones de *Pimelodella* en el sistema Magdalena-Cauca. Los ríos Magdalena y Cauca fluyen entre las cordilleras Oriental y Central, y entre las cordilleras Central y Occidental respectivamente, estos conforman un gran sistema que fluye hacia el mar Caribe después de su unión en la Mojana, sin embargo a lo largo de la formación del cañón de la cuenca media del río Cauca se encuentra una franja de unos 200 km de rápidos, que constituye una barrera fisiográfica impenetrable para muchas especies de peces (Ortega-lara et al., 2006; Rodríguez-Olarte et al., 2011), esta barrera pudo haber sido un fuerte impedimento para el género *Pimelodella*, generando el aislamiento de las poblaciones del alto Cauca y la consecuente especiación alopátrica entre estas poblaciones (*P. macrocephala*) y las poblaciones del río Magdalena (*Pimelodella* n. sp.).

La amplia distribución de *P. eutaenia* en los ríos del chocó biogeográfico y la LCA (Fig. 2) puede ser explicada por la conformación histórica del paisaje en esta región, en donde se ha planteado que los eventos de captura de cabecera han influenciado los patrones de dispersión de la ictiofauna (Maldonado-Ocampo et al., 2012). El área de división de las principales cuencas de esta región (Atrato, Baudó y San Juan) es tan solo de unos 10 km de radio en un área de baja altitud (200m) (Rodríguez-Olarte et al., 2011; Schaefer,

2011). Esto permitió probablemente la conexión de sus cabeceras durante distintos periodos que sumado a variaciones eustáticas, pudieron favorecer la dispersión de peces en drenajes aislados (Bermingham & Martin, 1998; Maldonado-Ocampo et al., 2012; Pereira et al., 2013). Aunque la región al oriente del golfo de San Blas en Panamá no es parte de América del Sur desde el punto de vista geográfico, se ubica adyacente de la desembocadura del río Atrato y la composición de su ictiofauna junto a evidencias batimétricas, sugieren que gran parte de esta región pudo haber conformado parte del drenaje del Atrato durante periodos de variación en los niveles del mar (Loftin, 1965; Reeves & Bermingham, 2006), generando un corredor continuo para la biota acuática, que podría explicar la presencia de *P. eutaenia* en esta región.

La distribución y composición de la ictiofauna en los drenajes del Pacífico norte colombiano y la cuenca del río Atrato indican una estrecha relación histórica con la parte inferior de América Central (Bermingham et al., 1997; Bermingham & Martin, 1998; Matamoros et al., 2014). El cierre del istmo de Panamá en el Plioceno (~2,8 MA) (O'Dea et al., 2016), permitió la colonización de Mesoamérica por parte de fuentes putativas de peces dulceacuícolas desde América del Sur (Bermingham & Martin, 1998), sin embargo la tolerancia a la salinidad fue un factor que contribuyó a definir la actual composición de los peces en esta región (Myers, 1966). La distribución de peces primarios como Characiformes y Siluriformes pudo estar restringida fuertemente por este factor, por lo tanto, la dispersión de especies como *Pimelodella*, habría sido dependiente de la formación de conexiones directas entre las cuencas, producto de cambios fisiográficos en el paisaje (Smith & Bermingham, 2005).

La ictiofauna mesoamericana muestra un patrón general de rápida divergencia en un periodo de tiempo relativamente corto, lo cual representa un factor limitante en la señal filogenética para inferir historias compartidas (Bermingham & Martin, 1998; Perdices et al., 2002). El género *Pimelodella* presenta un complejo mosaico de distribución en esta región, definido probablemente por múltiples procesos como dispersión, extinción local e introgresión genética (Martin & Bermingham, 2000). La hipótesis planteada por Bermingham & Martin, (1998) indica que este mosaico de diferentes linajes evolutivos, podrían ser producto de múltiples ondas de dispersión de poblaciones putativas provenientes del norte de América del Sur. Adicionalmente, variaciones en el nivel del mar pudieron inundar el nascente istmo, causando extinciones locales y separación alopatrica en el oriente y centro de Panamá (Smith & Bermingham, 2005). En este sentido, el linaje WAP formado por las vertientes del Pacífico en Costa Rica (Coto, Terraba) y del occidente de Panamá (San Felix, Escarrea, Tabasará) es probablemente producto de una temprana onda de dispersión que permaneció durante dichas extinciones locales. Los periodos de disminución del nivel del mar pudieron facilitar posteriores colonizaciones a través de arroyos y pantanos de tierras bajas anastomizados, que se extendieron desde el río Tuira hasta las corrientes de la Península de Azuero (Smith & Bermingham, 2005).

El mosaico de variación genética revelado por *Pimelodella* en LCA concuerda con los patrones de diversificación de la ictiofauna en esta región, donde se sugiere que la especiación regional ha jugado un papel importante en la formación de los patrones de diversidad (Smith & Bermingham, 2005). En la diversificación de grupos como *Brycon*, las extinciones locales, anastomosis de los ríos y múltiples eventos de colonización,

también han sido factores importantes (Abe et al., 2014; Reeves & Bermingham, 2006). Igualmente, carácidos como *Bryconamericus* revelan una rápida dispersión y radiación, presentando varias especies endémicas en cortos drenajes independientes (Reeves & Bermingham, 2006; Smith & Bermingham, 2005). La hidrografía de la región se caracteriza por drenajes periféricos cortos e independientes, donde su ictiofauna puede estar caracterizada por tamaños poblacionales reducidos, y la probabilidad de fijación de las mutaciones podría ser mayor que en poblaciones grandes (Page & Holmes, 1998) como las que se podrían encontrar en los drenajes del norte de América del Sur.

Nuestros resultados soportan la hipótesis de que la ictiofauna regional podría ser anterior a los eventos tectónicos del Mioceno. El género *Pimelodella* ha sido definido como un grupo con un origen múltiple dentro de la región transandina, condicionado por la conformación del paisaje la cual ha influenciado los procesos de dispersión y extinción. En este sentido, los análisis históricos y biogeográficos de la ictiofauna regional, se convierten en una herramienta importante para determinar los patrones de diversidad (Echelle et al., 2014; Smith & Bermingham, 2005).

4.3 Perspectivas

Los resultados de este trabajo han contribuido en el esclarecimiento de la taxonomía del género *Pimelodella* en la región transandina. Han servido para encaminar la búsqueda de caracteres diagnósticos a partir de la observación comparativa de la morfología externa y caracteres óseos que permita las unidades taxonómicas definidas aquí, así como la descripción de la especie históricamente no reconocida de la cuenca del río Magdalena

(en prep.). Sin embargo, aún permanecen vacíos con respecto al análisis genético de las especies que han sido descritas para Ecuador y Perú (*P. yuncensis*, *P. modesta*, *P. elongata*). La inclusión de estas poblaciones en próximos análisis podría esclarecer la identidad y las relaciones de las especies con distribución en las vertientes del Pacífico.

Apéndice A

Material examinado para el análisis de morfometría tradicional y merística.

Pimelodella odynea: **Colombia**: ríos costeros de la sierra nevada de Santa Marta: CZUT-IC 10942, 1, 69.92 mm SL, río Jerez; CZUT-IC 12602, 2, 72.42-81.96 mm SL, río Cañas; CZUT-IC 15262, 4, 66.88-76-89 mm SL, río Cañas; CZUT-IC 10922, 1, 74.73 mm SL, río Jerez. Cuenca del río Catatumbo: ICN-MHN 16913, 2, 81.31-86.93 mm SL, río Catatumbo; ICN-MHN 18004, 138.22 mm SL, río Pamplonita; ICN-MHN 18050, 1, 85.15 mm SL, río Zulia; ICN-MHN 2153, 1, 79.61 mm SL, río Catatumbo; ICN-MHN 2369, 2, 68.15-71.47 mm SL, Caño El Tigre. **Venezuela**: Zulia: MBUCV-V 2930, 3, 69.75-100.59 mm SL, El Quebradón; MBUCV-V 10712, 1, 82.85 mm SL, Quebrada Puente el Hacha. *Pimelodella* n. sp.: **Colombia**: Alto Magdalena: CZUT-IC 11888, 1, 58.77 mm SL, río Anchique; CZUT-IC 11546, 3, 43.01-52.29 mm SL, río Anchique; CZUT-IC 1052, 4, 56.01-77.42 mm SL, río Anchique; CZUT-IC 12800, 2, 45.26-76.06 mm SL, Quebrada Gualanday; CZUT-IC 8542, 1, 61.62 mm SL, Quebrada Gualanday; CZUT-IC 8571, 1, 73.3 mm SL, Quebrada gualanday; CZUT-IC 8618, 1, 51.76 mm SL, Quebrada Gualanday; CZUT-IC 12802, 9, 61.38-89 mm SL, río Alvarado-Palmar; CZUT-IC 10818, 6, 68.3-100.68 mm SL, río Alvarado-El País. Medio Magdalena: CZUT-IC 12585, 11, 60.93-93.65 mm SL, Quebrada El Rosario-río Samana; CZUT-IC 12567, 4, 54.34-94.81 mm SL, río Samana; ICN-MHN 13948, 1, 78.27 mm SL, río Suarez-Santander. Bajo Magdalena: CZUT-IC 14028, 5, 54.52-78.33 mm SL, río Frío; CZUT-IC 14005, 2, 49.48-59.3 mm SL, río Frío; CZUT-IC 13991, 1, 56.26 mm SL, río Frío; CZUT-IC 15147, 6, 61.26-77.79 mm SL, río Ariguani; CZUT-IC 15115, 1, 64.12 mm SL, río Ariguani. Arroyo Pechelin: CZUT-IC 15263, 1, 66.23 mm SL; ICN-MHN 3230, 1, 75.99 mm SL. *Pimelodella macrocephala*: **Colombia**: Alto Cauca: IUQ 242, 3, 57.64-72.07 mm SL, Quebrada La Aurora, IUQ 165, 3, 59.43-62.27 mm SL, Quebrada Naranjal; IMCN 4432, 4, 51.21-52.38 mm SL, Quebrada Marianazo. *Pimelodella grisea*: **Colombia**: IMCN 4359, 4, 108.51-135.25 mm SL, Quebrada El chorro-río Cajambre; IMCN 1795, 5, 87.17-105.89 mm SL, río San Juan; ICN-MHN 19219, 5, 82.31-107.01 mm SL, río Rosario; ICN-MHN 19186, 5, 67.89-90.57 mm SL, río Mira. *Pimelodella reyesi*: **Colombia**: Cuenca del río Sinú: ICN-MHN 375, 3, 55.35-

120.9 mm SL, Esmeraldas; ICN-MHN 6911, 1, 55.4 mm SL, río Sinú; ICN-MHN 6838, 1, 128.84 mm SL, río Sinú; IMCN 3026, 1, 125.56, Quebrada Koredo; IMCN 3018, 1, 124.95 mm SL; Cuenca del río Atrato: ICN-MHN 1623, 1, 118.33 mm SL, río Atrato; ICN-MHN 3610, 1, 112.33 mm SL, río Cutí; ICN-MHN 1330, 2, 110.65-130.19 mm SL, río Tutunendo; río León: CZUT-IC 12656, 11, 56.55-76.01 mm SL; CZUT-IC 12665, 1, 67.19 mm SL; CZUT-IC 12725, 1, 83.86 mm SL, río León-río Suriquí; CZUT-IC 11669, 1, 102.4 mm SL, río León-río Suriquí. *Pimelodella modesta*: **Colombia**: cuenca del río Patía: IMCN 2645, 2, 65.19-68.72 mm SL, Quebrada Las Tallas; IMCN 2244, 2, 79.94-89.28 mm SL, río Esmitia; CZUT-IC 12154, 1, 100.27 mm SL, río Patía; CZUT-IC 12135, 3, 92.65-102.72 mm SL, río Mazamorrás, CZUT-IC 12126, 2, 58.87-92.68 mm SL, río Patía. *Pimelodella eutaenia*: CZUT-IC 15225, 4, 108.64-118.59 mm SL, Quebrada Vesquero-río Anchicaya; CZUT-IC 15226, 1, 87.15 mm SL, río Anchicaya; CZUT-IC 12134, 1, 100.58 mm SL, río Mazamorrás-río Patía; CZUT-IC 12094, 3, 77.56-90.65 mm SL, quebrada Las Tallas-río Patía; IMCN 1946, 1, 83.81 mm SL, Quebrada El Llano- río san Juan; IMCN 2630, 2, 132.17-154.92 mm SL, río San Juan; ICN-MHN 112, 2, 98.07-106.13 mm SL, río Baudó; ICN-MHN 16373, 1, 57.92 mm SL, río San Juan; CZUT-IC 11642, 3, 54.91-57.92 mm SL, Caño Tumaradocito.

Referencias

- Abe, K.T., Mariguela, T.C., Avelino, G.S., Foresti, F., Oliveira, C., 2014. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evol. Biol.* 14, 152. doi:10.1186/1471-2148-14-152
- Albert, J.S., Carvalho, T.P., 2011. Neogene Assembly of Modern Faunas, in: *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. pp. 119–136.
- 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). *Syst. Biodivers.* 2, 375–417.
doi:10.1017/S1477200004001574
- 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. *J. South Am. Earth Sci.* 21, 14–27. doi:10.1016/j.jsames.2005.07.010
- Anderson, E.P., Maldonado-Ocampo, J.A., 2011. Una Perspectiva Regional de la Diversidad y Conservación de Peces Andinos Tropicales. *Conserv. Biol.* 25, 30–39. doi:10.1111/j.1523-1739.2010.01568.x
- Bermingham, E., Martin, A.P., 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.* 7, 499–517. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00358.x
- Bermingham, E., McCafferty, S.S., Martin, A.P., 1997. Fish Biogeography and Molecular Clocks: Perspectives from the Panamánian Isthmus, in: *Molecular*

- Systematics of Fishes,. pp. 113–128. doi:10.1016/B978-012417540-2/50009-9
- Bermingham, E., Moritz, C., 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.* 7, 499–517. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00358.x
- Bockmann, F.A., 1994. Description of *Mastiglanis asopos*, a new Pimelodid catfish from northern Brazil, with comments on phylogenetic relationships inside the subfamily Rhamdiinae (Siluriformes: Pimelodidae). *Proc. Biol. Soc. Washingt.* 107, 760–777. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Castaño-Urbe, C., 1999. Sierras y Serranías de Colombia. Colección Ecológica Banco de Occidente, Cali. Colombia. 205 pp.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* 56, 879–886. doi:10.1080/10635150701701083
- Echelle, A.A., Schwemm, M.R., Lang, N.J., Nagle, B.C., Simons, A.M., Unmack, P.J., Fisher, W.L., Hoagstrom, C.W., 2014. Molecular systematics and historical biogeography of the *Nocomis biguttatus* species group (Teleostei: Cyprinidae): Nuclear and mitochondrial introgression and a cryptic Ozark species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 81, 109–119. doi:10.1016/j.ympev.2014.09.011
- Eigenmann, C.H., 1917. *Pimelodella* and *Typhlobagrus*. *Mem. Carnegie Museum* VII, 229–258.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies : An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N. Y). 39, 783–791.
- Ferraris, C.J., 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1–628.

- Galvis, G., Mojica, J.I., Duque, S.R., Castellanos, C., Sánchez-duarte, P., Arce, M., Gutierrez, Á., Jiménez, L.F., Santos, M., Vejarano, S., Arbeláez, F., Prieto, E., Leiva, M., 2006. Peces del medio Amazonas. Región de Leticia, Editorial. ed, Conservación Internacional. Serie de guías tropicales de campo N.5. Forma e Impresos, Bogotá. doi:10.1590/S1679-62252006000400011
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. (http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Hernández, C.L., Ortega-Lara, A., Sánchez-Garcés, G.C., Alford, M.H., 2015. Genetic and Morphometric Evidence for the Recognition of Several Recently Synonymized Species of Trans-Andean *Rhamdia* (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia* 103, 563–579. doi:10.1643/CI-14-145
- Hernández-Camacho, J., Walschburger, T., Ortiz-Quijano, R., Hurtado-Guerra, A., 1992. Origen y distribución de la biota suramericana y colombiana, in: Halffter, G. (Ed.), *LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE IBEROAMÉRICA I*. Xalapa, pp. 55–104.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T.S., Hanner, R.H., Hebert, P.D.N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes* 7, 544–548. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. *Mamm. Protein Metab.* 21–123. doi:citeulike-article-id:768582
- Kimura, M., 1980. Journal of Molecular Evolution A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol* 16, 111–120. doi:10.1007/BF01731581

- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, msw054.
doi:10.1093/molbev/msw054
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701. doi:10.1093/molbev/mss020
- Li, C., Ortí, G., Zhang, G., Lu, G., 2007. A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. *BMC Evol. Biol.* 7, 44. doi:10.1186/1471-2148-7-44
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
doi:10.1093/bioinformatics/btp187
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S.L., Wesselingh, F., 1998. The stage for neotropical fish diversification a history of tropical south american rivers. *Phylogeny Classif. Neotrop. Fishes* 603.
- Lundberg, J.G., McDade, L.A., 1986. On the South American Catfish *Brachyrhamdia imitator* Myers (Siluriformes, Pimelodidae), with phylogenetic evidence for a large intrafamilial lineage. *Not. Natutae* Number 463, 1–24.
- Maldonado-Ocampo, J.A., Ortega-Lara, A., Usma-Oviedo, J.S., Galvis Vergara, G., Villa-Navarro, F.A., Vásquez Gamboa, L., Prada-Pedrerros, S., Ardila Rodriguez, C., 2005. *Peces de los Andes de Colombia: guía de campo*.
- Maldonado-Ocampo, J., Usma, J.S., Villa-Navarro, F.A., Ortega-Lara, A., Prada-Pedrerros, S., S., L.F.J., Jaramillo-Villa, U., Arango, A., Rivas, T.S., Sánchez, G.C., 2012. *Peces Dulceacuícolas del Choco Biogeografico de Colombia*.

doi:10.13140/2.1.3449.9521

- Martin, A.P., Bermingham, E., 2000. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical cat sh. *Proc. R. Soc. London B* 267, 1135–1141.
- Matamoros, W. a, McMahan, C.D., Chakrabarty, P., Albert, J.S., Schaefer, J.F., 2014. Derivation of the freshwater fish fauna of Central America revisited : Myers ' s hypothesis in the twenty-first century. *Cladistics* 31, 1–12. doi:10.1111/cla.12081
- Mojica, J.I., Galvis, G., Sánchez-Duarte, Paula Castellanos, C., Villa-Navarro, F.A., 2006. Peces del valle medio del río Magdalena, Colombia. *Biota Colomb.* 7, 23–38.
- Mojica, J.I., Usma-Oviedo, J.S., Galvis, G., 2004. Peces dulceacuícolas en el chocó biogeográfico-Catalogo, in: Rangel, O. (Ed.), *Colombia Diversidad Biótica IV: El Chocó Biogeográfico/Costa Pacífica*. Universidad Nacional de colombia, Bogotá, Colombia, pp. 729–748.
- Myers, G.S., 1966. Derivation of the freshwater fish fauna of Central America. *Copeia* 766–773.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v. 2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- O'Dea, A., Lessios, H.A., Coates, A.G., Eytan, R.I., Restrepo-Moreno, S.A., Cione, A.L., Collins, L.S., de Queiroz, A., Farris, D.W., Norris, R.D., Stallard, R.F., Woodburne, M.O., Aguilera, O., Aubry, M.-P., Berggren, W.A., Budd, A.F., Cozzuol, M.A., Coppard, S.E., Duque-Caro, H., Finnegan, S., Gasparini, G.M., Grossman, E.L., Johnson, K.G., Keigwin, L.D., Knowlton, N., Leigh, E.G., Leonard-Pingel, J.S., Marko, P.B., Pyenson, N.D., Rachello-Dolmen, P.G., Soibelzon, E., Soibelzon, L., Todd, J.A., Vermeij, G.J., Jackson, J.B.C., 2016.

- Formation of the Isthmus of Panamá. *Sci. Adv.* 2, 1–12.
doi:10.1126/sciadv.1600883
- Ortega-lara, A., Usma, J.S., Bonilla, P.A., Santos, N.L., 2006. Peces de la cuenca alta del río Cauca, Colombia. *Biota Colomb.* 7, 39–54.
- Page, R.D.M., Holmes, E.C., 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach.*
- Perdices, A., Bermingham, E., Montilla, A., Doadrio, I., 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 172–189. doi:10.1016/S1055-7903(02)00224-5
- Pereira, T.L., Santos, U., Schaefer, C.E., Souza, G.O., Paiva, S.R., Malabarba, L.R., Schmidt, E.E., Dergam, J.A., 2013. Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *J. Biogeogr.* 40, 905–914. doi:10.1111/jbi.12044
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21, 1864–1877.
doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x
- Quenouille, B., Bermingham, E., Planes, S., 2004. Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 66–88.
doi:10.1016/S1055-7903(03)00278-1
- Rambaut A, Drummond AJ. FigTree, version 1.4.0. Available:
<http://tree.bio.ed.ac.uk/sci-hub.cc/software/figtree>. 2012.
- Reeves, R.G., Bermingham, E., 2006. Colonization, population expansion, and lineage turnover: Phylogeography of Mesoamerican characiform fish. *Biol. J. Linn. Soc.* 88, 235–255. doi:10.1111/j.1095-8312.2006.00619.x

- Rodríguez-Olarte, D., Mojica, J.I., Taphorn, D.C., 2011. Northern South America: Magdalena and Maracaibo Basins, in: Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. pp. 243–258.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61, 539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Schaefer, S., 2011. The Andes: Riding the Tectonic Uplift, in: Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. pp. 259–278.
- Smith, S.A., Bermingham, E., 2005. The biogeography of lower Mesoamerican freshwater fishes. J. Biogeogr. 32, 1835–1854. doi:10.1111/j.1365-2699.2005.01317.x
- Swofford, D.L., 2002. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 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 Res. 22, 4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Usma J.S., Ortega-Lara, A., 2012. *Pimelodella macrocephala*. Pp. 137. En: Mojica, J.I.; Usma, J.S., Álvarez-León, R., Lasso, C. A. (Eds), 2012. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales Bogotá, D.C., Colombia, 319 pp.

- Vaidya, G., Lohman, D.J., Meier, R., 2011. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27, 171–180. doi:10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x
- Vari, R.P., Harold, A.S., 2001. Phylogenetic study of the neotropical fish genera *Creagrutus* Günther and *Piabina* Reinhardt (Teleostei:Ostariophysi:Characiformes), with a revision of the cis-Andean species. *Smithson. Contrib. to Zool.* 1–239. doi:10.5479/si.00810282.613
- Villa-Navarro, F.A., Zúñiga-Upegui, P.T., Castro-Roa, D., García-Melo, J.E., García-Melo, L.J., Herrada-Yara, M.E., 2006. Peces del alto Magdalena, cuenca del río Magdalena, Colombia. *Biota Colomb.* 7, 3–21.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 1847–1857. doi:10.1098/rstb.2005.1716

ARTIGO 2.

Normas de la revista Zebrafish. ISSN: 1545-8547

**Un patrón inusual de diferenciación cromosómica por acumulación de DNA
repetitive en un sistema cromosómico sexual simple XX/XY en el bagre
transandino *Pimelodella* cf. *chagresi* del cuenca del Alto Magdalena, Colombia**

**An unusual pattern of chromosomal differentiation by accumulation of repetitive
DNAs in XX/XY sex chromosome system in the trans-Andean catfish *Pimelodella*
cf. *chagresi* from the Upper Rio Magdalena Basin, Colombia**

Cristhian Camilo Conde-Saldaña¹⁻², Francisco Antonio Villa-Navarro² & Jorge Abdala
Dergam¹

¹ Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs,
s/n, Centro, Viçosa, 36570-900, Minas Gerais, Brazil.

² Grupo de Investigación en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima.
730006299 Santa Elena parte alta, Ibagué, Tolima, Colombia.

Resumen

Aunque la gran mayoría de peces neotropicales no presenta cromosomas sexuales diferenciados, varios sistemas cromosómicos sexuales han sido identificados; estos sistemas son evolutivamente importantes ya que interrumpen la recombinación de regiones cromosómicas y pueden estar asociados a la acumulación de DNA repetitivo. Este trabajo constituye la primera caracterización citogenética en representantes transandinos de la familia Heptapteridae. Es estudiado el bagre *Pimelodella* cf. *chagresi* utilizando técnicas tradicionales (Giemsa y Ag-NOR) y técnicas de hibridización fluorescente *in situ* usando sondas de DNA repetitivos, incluyendo microsatelites (CA₁₅ y GA₁₅) y las familias multigenes de RNA ribosomal (sondas 18S y 5S rDNA). La especie presentó un número cromosómico diploide $2n=50$ (32m+14sm+4st) y un sistema cromosómico sexual simple XX/XY, donde el cromosoma heteromórfico Y reveló una marcada acumulación de los dos tipos de DNA repetitivo. Estos resultados reflejan la relevancia de las secuencias de DNA repetitivo en el proceso de diferenciación de cromosomas sexuales en peces, específicamente en la evaluación poblacional del género *Pimelodella* en la región trasandina, un grupo con una historia evolutiva compleja donde la taxonomía es pobremente entendida y la identidad de las especies aún no ha sido definida.

Introducción

Aunque la gran mayoría de peces neotropicales no presenta cromosomas sexuales diferenciados¹, varios sistemas de cromosomas sexuales han sido identificados, incluyendo sistemas simples (ZZ/ZW, XX/XY, XX/X0) o múltiples ($X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY_1Y_2 , ZZ/ZW_1W_2 , $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$)²⁻⁴. Los procesos evolutivos de la formación de cromosomas sexuales aún no son completamente entendidos, sin embargo factores como la interrupción de la recombinación en algunas regiones de estos cromosomas⁵ y la consecuente acumulación de DNA repetitivo, han sido establecidas como propiedades de la diferenciación de estos elementos⁶⁻⁸.

Las secuencias de DNA repetitivo constituyen una gran parte del genoma en eucariotas, las cuales han mostrado tener un importante papel en la estructura, función y evolución del genoma en peces⁹. Estos elementos pueden ser repeticiones dispersas como los elementos transponibles (TEs) o repeticiones de DNA en tandem, que incluyen, satélites, minisatélites, microsatélites y familias multigenes que codifican para algunas proteínas como histonas y RNAs ribosmales (rRNA)¹⁰.

El mapeamiento de secuencias repetitivas en peces es una herramienta útil para inferir procesos evolutivos en la diferenciación de cromosomas sexuales^{7,11,12}. No obstante, aunque el estudio de la asociación dinámica entre DNAs repetitivos y la diferenciación de cromosomas sexuales en peces ha aumentado en las últimas décadas, la información disponible aún es limitada, considerando el número de especies descritas, que constituye

más de la mitad del número aproximado de vertebrados reconocidos, con unas 31.800 especies distribuidas en 536 familias¹³.

De particular interés ha sido el estudio de la distribución de los agrupamientos de los genes ribosomales rDNA y sus implicaciones evolutivas en peces^{14,15}, estos genes codifican las moléculas del rRNA y son representados por dos diferentes familias multigenes que son organizadas en clases repetitivas, denominadas DNA ribosomal 45S (rDNA) y 5S rDNA. La 45S rDNA contiene los genes que codifican para los 18S, 5.8S y 26S-28S rRNAs y espaciadores (IGS, ITS1 y ITS2), mientras que el 5S rDNA consiste de secuencias repetitivas que codifican para el 5S rRNA, separadas entre sí por un espaciador no transcrito (NTS)^{16,17}.

Aunque son condiciones raras, son varios los casos en los que se han reportado la asociación entre alguna de estas familias multigenes y cromosomas sexuales en peces^{11,18-20} y la presencia de estos elementos en cromosomas sexuales ha llegado a ser definida como una característica común en algunos grupos²¹. De igual forma, otros dominios de secuencias repetitivas han mostrado un papel importante en la diferenciación de cromosomas sexuales, como los microsatélites^{7,12}, estas secuencias son repeticiones en tándem con menos de nueve nucleótidos, de los cuales los dinucleótidos han mostrado ser los más comunes en varias especies¹⁰. Teóricamente, estas secuencias repetitivas son consideradas como altamente dinámicas e inherentemente inestables, las cuales han contribuido a la compresión de la variabilidad genética entre poblaciones y es posible que jueguen un papel importante en la evolución de cromosomas sexuales,

siendo definidas como tempranos colonizadores en la diferenciación de dichos elementos^{9,10}.

La diversidad en sistemas sexuales y los diferentes escenarios encontrados entre la dinámica de las secuencias repetitivas y la diferenciación cromosómica, hace de los peces un interesante modelo para el estudio del proceso evolutivo de cromosomas sexuales. Las fuerzas moleculares que propagan y mantienen estas secuencias en el genoma, siguen siendo discutidas^{5,10}, y en este contexto, nuevos estudios que aumenten el marco teórico de esta dinámica, representan un aporte interesante e importante para la comprensión del papel que los diferentes dominios de DNAs repetitivos han jugado en la diferenciación de cromosomas sexuales en los diferentes grupos de peces.

Este trabajo constituye la primera caracterización citogenética en representantes trasandinos de la familia Heptapteridae, donde fue estudiado el mapeamiento y patrones de distribución de DNA repetitivo en el cariotipo de *Pimelodella* cf. *chagresi*, incluyendo microsatélites y las familias multigenes de RNA ribosomal, enfatizando su distribución dentro de cromosomas sexuales.

Materiales y Métodos

Colecta de especímenes

Diez especímenes de *Pimelodella* cf. *chagresi* (2 machos y 8 hembras) fueron colectados en el río Alvarado, cuenca alta del río Magdalena, Colombia (04°31'23.6"N 074°58'09.2"W). Los ejemplares fueron depositados en la Colección Zoológica de la Universidad del Tolima, Tolima, Colombia (CZUT-IC 12802). Para el procesamiento de los especímenes, estos fueron anestesiados y eutanaciados con aceite de clavo en concentración de 300 mg.L⁻¹ (Lucena et al., 2013), siguiendo las normas aprobadas por la Comisión de Ética en el uso de Animales de la Universidad Federal de Viçosa (CEUA) autorización no. 52/2015.

Análisis Citogenéticos

Fue inducida la estimulación mitótica *in vivo* mediante la aplicación intramuscular de solución enriquecida con glucosa de levadura hidratada²². Tras un periodo de estimulación de 12 horas, fue aplicada colchicina (0.0125%) intraperitonealmente para llevar a cabo la interrupción de la división celular. Finalmente, los cromosomas mitóticos fueron obtenidos de una suspensión celular a partir de la extracción del riñón, siguiendo el método convencional de secado al aire²³.

Laminas conteniendo cromosomas mitóticos, fueron preparadas con tinción convencional con giemsa (10%), y fueron identificadas las regiones organizadoras nucleolares (NORs) activas por impregnación con nitrato de plata²⁴. La distribución de las familias multigenes de los genes ribosomales (rDNA) y DNA microsatélite fueron

mapeadas por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) siguiendo a Pinkel *et al.*²⁵ con modificaciones. Las sondas de DNA ribosomal 18S y 5S fueron marcadas usando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con digoxigenina-11-dUTP o biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) y la señal fue detectada con anti-digoxigenina-rhodamina o FITC- Avidina (Roche Applied Science). Las sondas para los microsatelites (GA)₁₅ y (CA)₁₅ fueron sintetizadas y marcadas con el fluorocromo Cy3 en la terminación 5' (Sigma).

Las imágenes digitales fueron capturadas con un microscopio Olympus BX53F con cámaras Olympus DP73 y MX10 para técnicas coloridas y fluorescentes respectivamente; las imágenes fueron capturadas con el sistema CellSens (Olympus Corp.). Los cromosomas fueron clasificados de acuerdo a la relación de sus brazos (longitud del brazo más largo/longitud del brazo más corto), en metacéntricos (1,00-1,69), submetacéntricos (1,70-2,99) y subtelocéntricos (3,00-6,99) siguiendo a Levan *et al.*²⁶.

Resultados

La evaluación de las metafases mitóticas de *Pimelodella* cf. *chagresi* en la región del alto río Magdalena, revelaron un número cromosómico diploide $2n=50$ y número fundamental $NF=100$, compuesto de 32 metacéntricos, 14 submetacéntricos y 4 subtelocéntricos. Fue identificado un sistema sexual simple XX/XY, donde el cromosoma X es un pequeño elemento submetacéntrico y el elemento Y heteromorfo presenta un notable tamaño mayor a los elementos restantes del complemento cromosómico (Fig. 1).

La técnica FISH usando la sonda rDNA 18S (Fig. 2A, B) y tinción con plata (Ag-NOR) (Fig. 1) revelaron la presencia invariable de genes activos de la familia ribosomal 45S, en la región terminal de los brazos cortos de un par autosómico submetacéntrico. La sonda rDNA 5S (Fig. 2C, D) fue localizada sobre los brazos cortos de un par autosómico metacéntrico, en posición pericentromérica. Sin embargo, un tercer sitio adicional para ambas sondas 18S y 5S, fue encontrado en una organización sinténica sobre los brazos largos del cromosoma sexual heteromorfo Y en machos (Fig. 2B, D).

De igual forma, el cromosoma Y de *Pimelodella* cf. *chagresi* reveló una fuerte acumulación de los microsatélites $(GA)_{15}$ y $(CA)_{15}$ sobre los brazos largos, contrastando con las marcaciones presentes en los elementos autosómicos, las cuales fueron preferencialmente acumuladas en las regiones teloméricas (Fig 3).

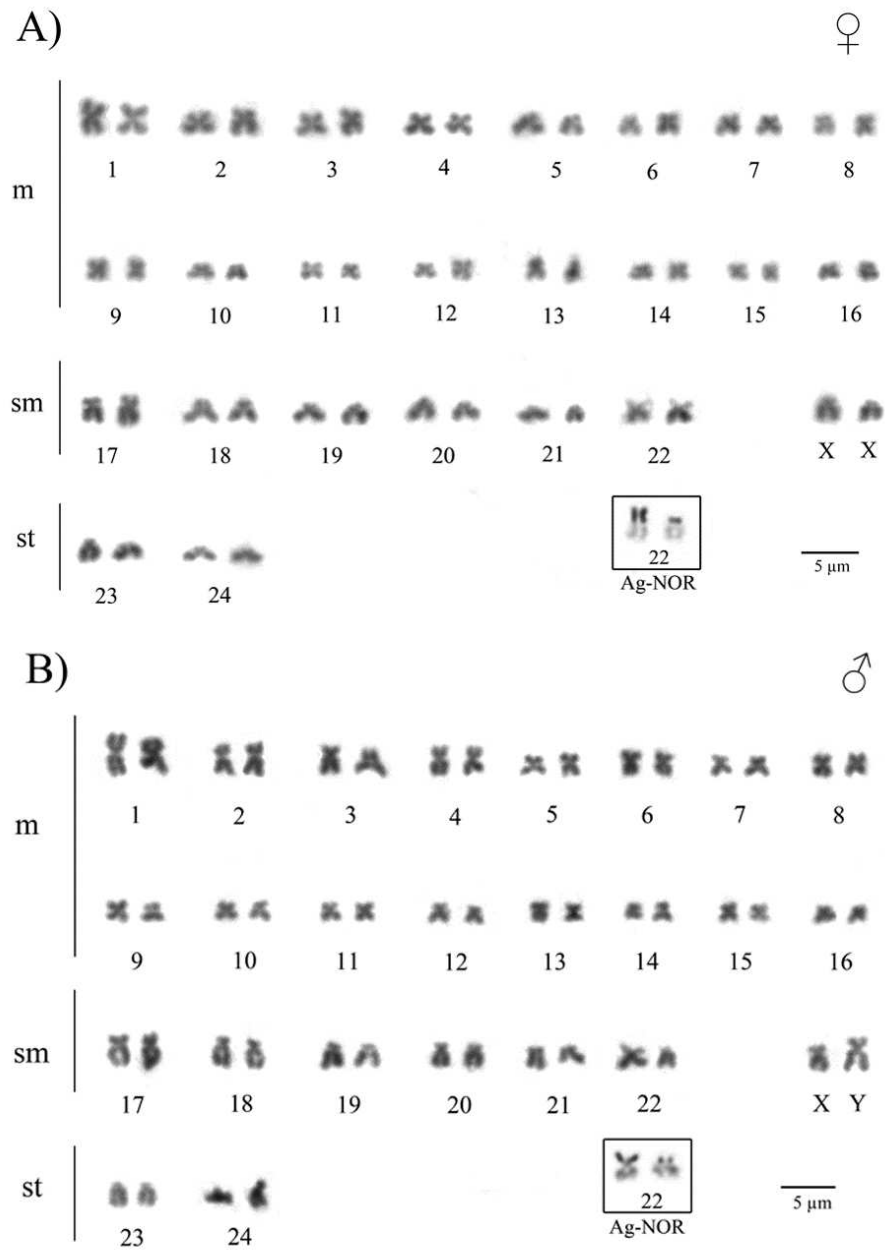


Figura 1. Cariotipo con tinción Giemsa de *Pimelodella* cf. *chagresi*, para hembras (A) y machos (B), cromosomas con Ag-NORs destacados en las cajas. m: metacéntricos, sm: submetacéntricos, st: subtelocéntricos.

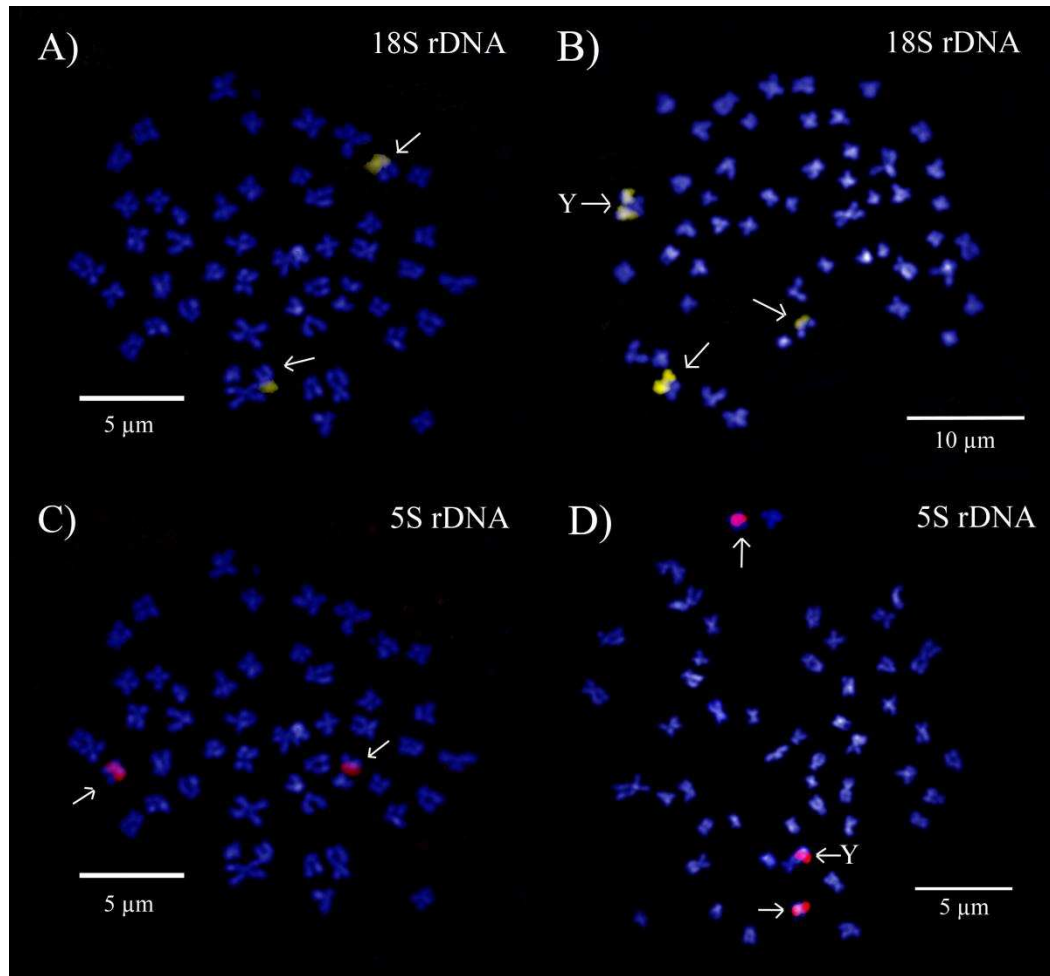


Figura 2. Patrones de FISH para *Pimelodella cf. chagresi* obtenidos con las sondas de rDNA 18S (A, B), y rDNA 5S (C, D), en hembras (A, C) y machos (B, D). m: metacéntricos, sm: submetacéntricos, st: subtelocéntricos. Las flechas indican cromosomas con señales fluorescentes para los genes rDNA.

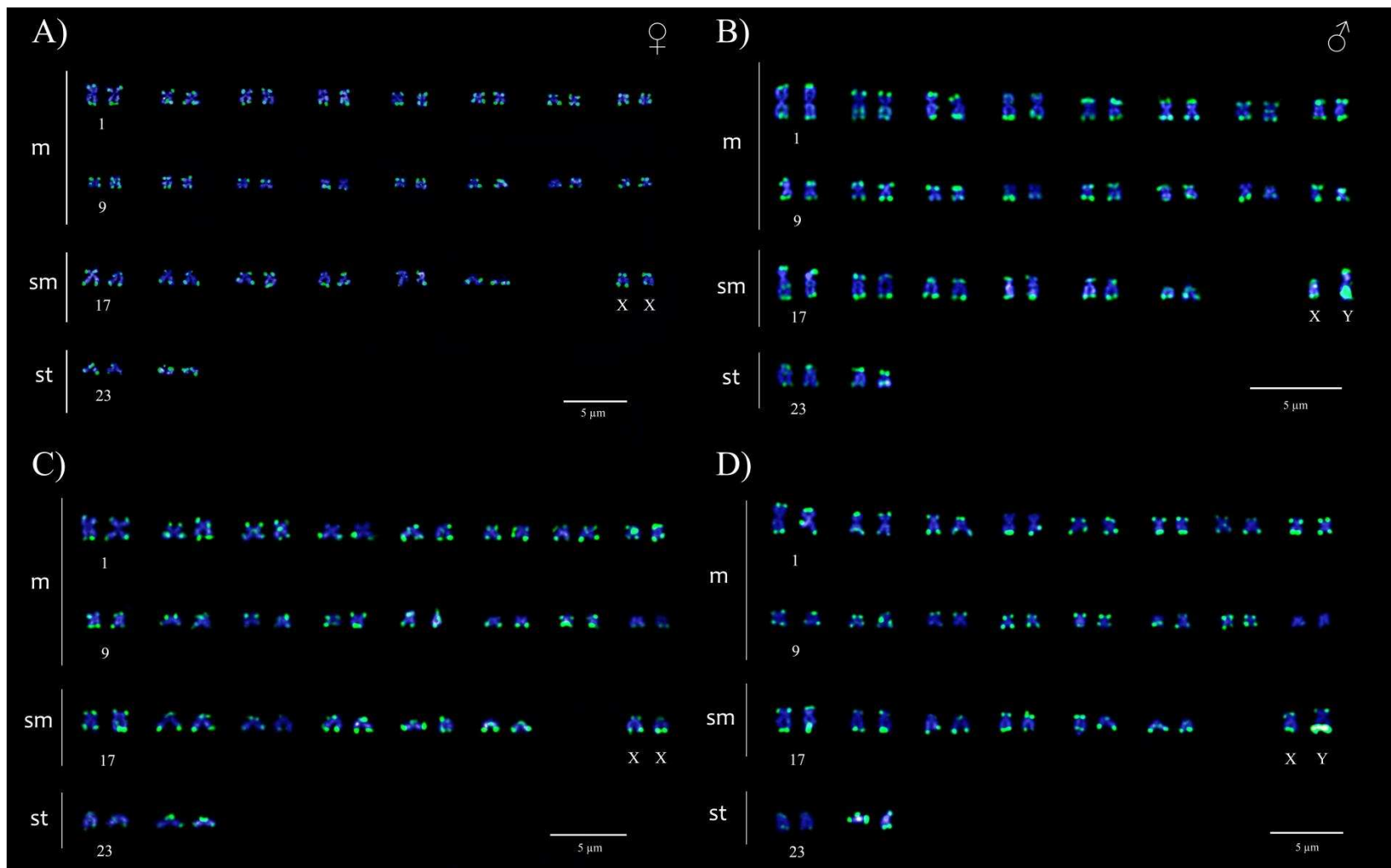


Figura 3. Patrones de FISH para *Pimelodella cf. chagresi* obtenidos con las sondas de DNA microsatélite GA₍₁₅₎ (A, B) y microsatélite CA₍₁₅₎ (C, D), en hembras (A, C) y machos (B, D). m: metacéntricos, sm: submetacéntricos, st: subtelocéntricos.

Discusión

Este trabajo representa el primer estudio citogenético para el género *Pimelodella* en la región transandina. Los principales estudios para este género han sido concentrados en la región cisandina²⁷⁻³³, en donde el número diploide presenta un rango de $2n=46$ hasta $2n=58$. El número diploide de $2n=50$ en *P. cf. chagresi* se encuentra dentro de este rango, y a su vez, comparte otras características comunes de la familia Heptapteridae como la predominancia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, con la presencia de un par de regiones organizadoras nucleolares activas (NORs)³⁴.

Como probable condición plesiomórfica del cariotipo de Heptapteridae, ha sido propuesto el número cromosómico $2n=58$, donde la reducción del número diploide ha sido resultado de eventos sucesivos de fusión cromosómica³⁴, sin embargo el planteamiento de que el número diploide en Siluriformes podría ser un resultado de paralelismo y convergencia, permanece sin resolver³⁵.

Aunque la diferenciación de cromosomas sexuales en Siluriformes es una condición rara, el sistema sexual simple XX/XY en *Pimelodella* ya ha sido reportado. En *Pimelodella* sp. el par sexual heteromórfico fue caracterizado por un cromosoma largo submetacéntricos (X) y un cromosoma metacéntrico pequeño (Y)³⁶, mientras que en *Pimelodella boschmani* el heteromorfismo se caracterizó por un par metacéntrico en donde el cromosoma Y presentó un mayor tamaño con respecto al cromosoma X³⁰. En el par sexual de *Pimelodella cf. chagresi*, constituido por elementos submetacéntricos, el mayor tamaño del cromosoma Y estuvo asociado con la acumulación de diferentes dominios de secuencias repetitivas. Los patrones de distribución de DNAs repetitivos

mostraron un registro inusual de organización sinténica de las familias multigenes 5S y 45S rRNA, sumado a una fuerte acumulación de DNAs microsátélites en la diferenciación del cromosoma sexual específico Y en el sistema simple XX/XY.

La capacidad de los cromosomas sexuales para retener y acumular DNA repetitivo es atribuida a la interrupción de la recombinación en algunas regiones de estos cromosomas^{5,37}. Este proceso de acumulación y heterocromatinización se ha definido como una probable etapa predecesora a la degeneración genética de estos cromosomas, la cual conllevaría a una posterior reducción y, finalmente, desaparición de dichos elementos³⁸. Sin embargo, se ha sugerido que la acumulación de secuencias repetitivas no implica necesariamente una degeneración genética, abriendo el cuestionamiento hacia cuales serían las posibles alternativas evolutivas de los cromosomas sexuales^{7,37}.

En peces, se ha reportado la diferenciación de cromosomas sexuales con base en la acumulación de microsátélites^{7,12,39}, DNA satélite^{40,41}, elementos transponibles (TEs)^{8,19}, así como rDNA 5S¹⁸ o rDNA 18S^{20,21,42,43}. Aunque este tipo de estudios han sido más abundantes en las últimas décadas, las fuerzas moleculares que propagan y mantienen los diferentes tipos de DNAs repetitivos en el genoma, aún siguen siendo discutidas^{5,44}.

En los sistemas XX/XY y ZZ/ZW el cromosoma sexual específico (Y o W) es generalmente de menor tamaño con relación al X o Z y es a menudo degenerado o enteramente heterocromático⁹. El notable mayor tamaño del cromosoma Y de *Pimelodella* cf. *chagresi* indica que este aún no presenta una degeneración genética, y el

heteromorfismo es resultado de la acumulación de DNAs repetitivos, así como ha sido observado en el cromosoma sexual W para algunas especies de *Leporinus*^{7,45}.

Como los microsatélites representan un componente altamente dinámico y son distribuidos abundantemente a través del genoma⁴⁶, se sugiere que estos elementos pueden ser tempranos colonizadores de cromosomas sexuales, contribuyendo de forma significativa en los procesos de diferenciación y heterocromatinización⁷. La acumulación de secuencias repetitivas puede ser un resultado de diferentes eventos de transposición y amplificación en la cercanía de la región determinadora del sexo¹⁸, esto hace posible que los microsatélites tengan un papel importante en la evolución de cromosomas sexuales, como consecuencia de su alta facilidad para adoptar inusuales y variadas conformaciones de DNA⁹.

La distribución de los microsatélites (CA)₁₅ y (GA)₁₅ en *Pimelodella* cf. *chagresi* es consistente con el patrón general que revela el mapeamiento de microsatélites en cromosomas autosómicos en peces, en el que se muestran una acumulación predominante en regiones teloméricas y centrómeros^{7,12,47}. No obstante, se ha reportado que la acumulación en cromosomas sexuales puede mostrar patrones de variación intragenérico, sugiriendo diferentes dinámicas evolutivas para estos cromosomas entre las especies¹².

La colocación de las familias multigenes 5S y 45S rRNA en el cromosoma Y de *Pimelodella* cf. *chagresi*, representa un patrón inusual nunca antes reportado en cromosomas sexuales de peces. Estas familias generalmente son localizadas en áreas

separadas dentro del genoma⁴⁸ y, en teleósteos, se observa un patrón general de una marcación simple en un único par cromosómico para cada familia^{14,15}. Aunque la gran mayoría de estudios citogenéticos en peces revelan este patrón, la rara organización sintética en el mapeamiento de estos genes ha sido reportada en cromosomas autosómicos para este grupo^{21,49–51} siendo hipotetizada como una posible condición ancestral⁵².

La presencia de rDNA en cromosomas sexuales de peces ha sido reportada en algunas especies. En *Oncorhynchus mykiss* fue detectada la presencia de uno de los loci de los genes ribosomales 5S rRNA en la diferenciación del cromosoma X, sugiriendo que la presencia de estos genes podrían haber estado en el cromosoma X ancestral, cerca del sitio de transposición donde ocurrió el evento de amplificación¹⁸. En la familia Erythrinidae, la presencia de estas secuencias repetitivas en cromosomas sexuales muestra patrones variables, en *Hoplias malabaricus* fue detectada la presencia de genes ribosomales 18S rRNA, consecuente con una región organizadora nucleolar activa (NOR) en el cromosoma X⁴², mientras que en *Erythrinus erythrinus* fue reportada la asociación de genes 5S rRNA y elementos transponibles (TEs) en la diferenciación del cromosoma Y¹⁹. En otros grupos, la presencia de señales de los genes 18S rRNA en el cromosoma W, parece ser una característica compartida por varias especies, como el caso del género de *Triportheus*^{11,21}.

Se ha planteado que el proceso evolutivo y organización de las familias multigenes de los genes ribosomales rDNA están sometidos a procesos de homogenización por factores como duplicación y delección, el entrecruzamiento desigual o la conversión de genes^{53–55}.

Sin embargo, se ha sugerido que la evolución de estos genes en el genoma, no solo involucra estas fuerzas homogenizadoras, sino que aparentemente se da por efectos mixtos entre diferentes mecanismos, en los que se involucra la creación de nuevos genes por duplicación^{54,56}.

La inserción de un segmento genómico derivado de un evento de duplicación podría iniciar el proceso evolutivo de la diferenciación de cromosomas sexuales⁵⁷. Entonces, la considerable acumulación de diferentes dominios de DNA repetitivo en el cromosoma sexual Y de *Pimelodella* cf. *chagresi*, podría indicar diferentes procesos de translocación o transposición en la diferenciación de este elemento, los cuales han sido retenidos por la supresión de la recombinación en esta área³⁷, influenciando de esta forma la transición evolutiva de cromosomas homologos a cromosoma sexual heteromórfico.

En nuestros resultados, observamos que la presencia de la señal 18S rDNA en el cromosoma sexual Y no representa una región NOR activa, y esto también podría representar la presencia de pseudogenes^{50,58}. Adicionalmente, la presencia de una tercera marcación de genes 5S rRNA en este cromosoma, en el que la supresión de la recombinación puede causar degeneración genética o acumulación de mutaciones de pérdida de función sin reducir el *fitness*⁵, soportan el planteamiento en el que las perspectivas filogenéticas basadas en los patrones de mapeamiento de los genes rRNA deben ser tomadas con cuidado, debido a que estos marcadores pueden reflejar su particular vía evolutiva y no la historia evolutiva del grupo taxonómico⁵⁹.

En este estudio ha quedado reflejado el potencial papel de las secuencias de DNA repetitivo para la diferenciación de cromosomas sexuales. Sin embargo, además de

contribuir con información adicional al panorama evolutivo de los cromosomas sexuales en peces, también podría direccionar futuros estudios en donde se incluya el análisis citogenético en la evaluación poblacional del género *Pimelodella* en la región trasandina, un grupo con una historia evolutiva compleja⁶⁰ donde la taxonomía es pobremente entendida y la identidad de las especies aún no ha sido definida.

Referencias

1. De Oliveira RR, Feldberg E, Dos Anjos MB, Zuanon J. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *J Fish Biol.* 2009;75(9):2209–25.
2. Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr PM. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia.* 1993;46(2–3):115–25.
3. Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado Á, Foresti F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica.* 2006;128(1–3):1–9.
4. De Oliveira RR, Feldberg E, Dos Anjos MB, Zuanon J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica.* 2008;134(2):243–9.
5. Bergero R, Charlesworth D. The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends Ecol Evol.* 2009;24(2):94–102.
6. Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC. Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in neotropical fishes. *Cytogenet Genome Res.* 2011;132(3):188–94.
7. Cioffi MB, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina W, Diniz D, et al. The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogenet.* 2012;5(1):28.
8. Schemberger MO, Oliveira JIN, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Cestari MM, et al. Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Atinopterygii:Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the w sex cromosome. *Zebrafish.*

2014;11(6):518–27.

9. Cioffi M de B, Bertollo LAC. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Repetitive DNA*. 2012;7:197–221.
10. Lopez-Flores I, Garrido-Ramos MA. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dyn*. 2012;7:1–28.
11. Artoni RF, Bertollo LAC. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity (Edinb)*. 2002;89(1):15–9.
12. Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, Kejnovsky E, Molina WF, Liehr T, et al. Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (characiformes, anostomidae): Unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 2013;142(1):40–5.
13. Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. *Fishes of the World*. 5th Editio. John Wiley & Sons; 2016. 752 p.
14. Martins C, Galetti PM. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? *Genetica*. 2001;111(1–3):439–46.
15. Gornung E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: A review of research. *Cytogenet Genome Res*. 2013;141(2–3):90–102.
16. Long EO, Dawid IB. Repeated Genes in Eukaryotes. *Annu Rev Biochem*. 1980;49(1):727–64.
17. Martins C, Wasko AP. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. Williams CR, editor. *Focus genome Res*. 2004;(1):335–63.
18. Morán, P, Martínez, J.L., García-Vázquez, E. & Pendas AM. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet*. 1996;79:145–50.

19. Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus* . Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol Biol*. 2010;
20. Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, et al. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): Dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*. 2013;141(7–9):329–36.
21. Diniz D, Laudicina A, Bertollo LAC. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol*. 2009;32(1):37–41.
22. Lee MR, Elder FFB. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenet Genome Res*. 1980;26(1):36–40.
23. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (pisces, erythrinidae). *Rev Bras Genet*. 1978;1(2):103–20.
24. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980 Aug;36(8):1014–5.
25. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(9):2934–8.
26. Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 1964;52(2):201–20.
27. de Almeida-Toledo LF, Foresti F, Trajano E, De Almeida Toledo Filho S. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and its presumed ancestor, *P. transitoria*. *Caryologia*. 1992;45(3–4):255–62.
28. Swarça AC, Vidotto AP, Dias AL. Cytogenetic characterization of *Pimelodella*

- aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). *Caryologia*. 2003;56(4):421–5.
29. Vidotto AP, Swarca AC, Fenocchio AS, Dias AL. Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River basin (Brazil). *J Hered*. 2004;95(6):517–20.
 30. Garcia C, de Almeida-Toledo LF. Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia*. 2010;63(1):32–40.
 31. Dazzani B, Garcia C, Peixoto M, Trajano E, de Almeida-Toledo LF. Cytogenetic and molecular analyses in troglitic and epigean species of *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from Brazil. *Neotrop Ichthyol*. 2012;10(3):623–32.
 32. Fernandes CA, Damásio JF, Guterres ZR, Abelha MCF. Cytogenetic Studies in Two Species of Genus *Pimelodella* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae) from Iguatemi River Basin, Brazil. *Cytologia (Tokyo)*. 2013;78(1):91–5.
 33. Souza-Shibatta L, Pezenti LF, Ferreira DG, de Almeida FS, Sofia SH, Shibatta OA. Cryptic species of the genus *Pimelodella* (siluriformes: Heptapteridae) from the Miranda river, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. *Neotrop Ichthyol*. 2013;11(1):101–9.
 34. de Borba RS, da Silva EL, Pacheco ACS, Parise-Maltempi PP, Alves AL. Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Rev Fish Biol Fish*. 2012;22(2):509–18.
 35. Eler ES, Dergam JA, Vênere PC, Paiva LC, Miranda GA, Oliveira AA. The karyotypes of the thorny catfishes *Wertheimeria maculata* Steindachner, 1877 and *Hassar wilderi* Kindle, 1895 (Siluriformes: Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. *Genetica*. 2007;130(1):99–103.
 36. Dias AL, Foresti F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae

- (Siluroidei).pdf. Rev Bras Genética. 1993;16(3):585–600.
37. Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity (Edinb)*. 2005;95(2):118–28.
 38. Steinemann S, Steinemann M. Y chromosomes : born to be destroyed. 2005;1076–83.
 39. Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 2011;132(4):289–96.
 40. Cioffi MB, Bertollo L a C. 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 (Edinb)*. 2010;105(6):554–61.
 41. Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC. Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sex Dev*. 2010;4(3):176–85.
 42. Born GG, Bertollo LAC. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosom Res*. 2000;8(2):111–8.
 43. Artoni RF, Bertollo LAC. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity (Edinb)*. 2002;89(1):15–9.
 44. Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Jr MG. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes : Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. 2006;133–41.
 45. Koehler MR, Dehm D, Guttenbach M, Nanda I, Haaf T, Molina WF, et al. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces , Anostomidae). 1 . Karyotype analysis , heterochromatin distribution and sex chromosomes. 1997;5:12–22.

46. Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 2006;255(1–4):1–29.
47. da Cunha MS, Reis VJC, Dergam JA. Closely Related Syntopic Cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the Upper Piranga River, Upper Doce Basin in Southeastern Brazil. *Zebrafish*. 2016;13(2):112–7.
48. Drouin G. The Concerted Evolution of 5s Ribosomal Genes Linked to the Repeat Units of Other Multigene Families. *Mol Biol Evol*. 1995;481–93.
49. Mandrioli M, Colomba MS, Vitturi R. Chromosomal analysis of repeated DNAs in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces, Labridae). *Genetica*. 2000;108(2):191–5.
50. Hatanaka T, Manoel P, Jr G. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus*. 2004;1829:239–44.
51. Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Arttoni RF, Moreira-Filho O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet*. 2011;5(4):31–42.
52. Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Chicca M, Rossi R. Chromosomal mapping of 18S-28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. *Genome*. 2003;46(3):473–7.
53. Hillis DM, Moritz C, Porter C a, Baker RJ. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science*. 1991;251(4991):308–10.
54. Nei M, Rooney AP. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet*. 2005;39:121–52.
55. Liao DQ. Concerted evolution: Molecular mechanism and biological implications. *Am J Hum Genet*. 1999;64(1):24–30.

56. Pinhal D, Yoshimura TS, Araki CS, Martins C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *BMC Evol Biol.* 2011;11(1):151.
57. Kikuchi K, Hamaguchi S. Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Dev Dyn.* 2013;242(4):339–53.
58. Martins C, Galetti PMJ. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome.* 2001;44:903–10.
59. Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC, Martins C. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evol Biol.* 2012;12:198.
60. Martin AP, Bermingham E. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. *Proc R Soc London B.* 2000;267(January):1135–41.

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho representa a primeira caracterização citogenética do gênero *Pimelodella* na região transandina. Foi encontrado um padrão pouco comum de acumulação de DNA microssatélite e DNA ribossomal no cromossomo sexual heteromórfico Y em *Pimelodella* cf. *chagresi*, indicando a relevância da acumulação de sequências de DNA repetitivo no processo de diferenciação de cromossomos sexuais em peixes.

O gênero *Pimelodella* não foi definido como uma unidade monofilética na região transandina, indicando um mosaico de espécies com origens diferentes. Os eventos tectônicos do Mioceno e mudanças eustáticas do nível do mar têm influenciado os padrões de diversidade do gênero nesta região, condicionando os processos de dispersão e extinção. Dois padrões de distribuição das espécies de *Pimelodella* aparecem na região transandina: alopatria para *P. odynea*, *P. macrocephala* e *Pimelodella* n. sp. e simpatria para as espécies do Chocó biogeográfico e da parte inferior de América Central. Este padrão de simpatria pode ser explicado pela complexidade geológica destas regiões. Adicionalmente, foi detectada a presença de uma espécie não descrita para a bacia do rio Magdalena na Colômbia, que tinha sido reconhecida historicamente dentro do complexo de ampla distribuição *Pimelodella chagresi*. Este complexo foi restrito à bacia do rio Chagres e as drenagens do Pacífico, centro e ocidente de Panamá. Nossos resultados confirmam a importância de estudos integrativos e para a estimativa dos padrões reais de diversidade biológica.