

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS						  
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 4

Estudio Filogeográfico del Pataló, *Ichthyoelephas longirostris* (Steindachner, 1879) en la Cuenca del Magdalena y el Río Ranchería

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Perdomo Aguirre	Yuly Alejandra
Cruz Flor	Wilson Rodrigo

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Carrillo Ávila	Mauricio

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciado en Educación Básica con Énfasis en Ciencias Naturales y Educación Ambiental

FACULTAD: Educación

PROGRAMA O POSGRADO: Licenciatura en Educación Básica con Énfasis en Ciencias Naturales y Educación Ambiental

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS						  
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 4

CIUDAD: Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2015 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 118

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías X Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general X
 Grabados___ Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___
 Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros_ X

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Conservación	Conservation
2. Filogenia	Phylogeny
3. Caracterización genética	Genetic characterization
4. Citocromo oxidasa y 16S	Cytochrome oxidase and 16S
5. ADN mitocondrial	DNA mitochondrial

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El *Ichthyoelephas longirostris* conocido con el nombre común Pataló es una especie endémica de Colombia, con una distribución geográfica en las cuencas del Magdalena y la del río Ranchería. Las poblaciones son seriamente afectadas por la contaminación, el incremento de la erosión debido a la deforestación, explotaciones mineras y la presión pesquera, generando que se encuentre reportada en el libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia como especie en peligro.

Esta condición de especie amenazada y la incertidumbre sobre su correcta clasificación taxonómica, debido a su amplio rango de distribución en la cuenca Magdalénica y el río

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS						  
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	3 de 4

Ranhería y a su vez su relación con la especie ecuatoriana hace importante dirigir esfuerzos para realizar estudios para determinar si existen más de una especie, con el fin de proponer información a las autoridades competentes para que diseñen políticas de conservación y manejo de la especie.

Dentro de los estudios que se pueden realizar se encuentran los que se basan en los análisis filogeográficos. Estos estudios consideran el espacio y el tiempo para mapear la genealogía de genes de interés, por lo tanto en este trabajo se utilizaron genes del ADN mitocondrial como el 16S y COI. Los análisis filogenéticos y la variación del polimorfismo con estos marcadores moleculares indican que el grupo ancestral se encuentra en la cuenca del Magdalena y del cual se han derivado los individuos de la cuenca del Ranhería, como consecuencia de diversos factores geológicos e hidrográficos.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The *Ichthyoelephas longirostris* known by the common name Pataló is endemic to Colombia, with a geographical distribution in the basin of the Magdalena and the River Ranheria. The populations are seriously affected by pollution, increased erosion due to deforestation, mining and fishing pressure that is creating reported in the Red Book of freshwater fishes of Colombia as an endangered species.

This condition of endangered species and uncertainty about its correct taxonomic classification, due to its wide range in the basin Magdalénica and the river Ranhería and turn your relationship with the species ecuatorian made important efforts to conduct studies to determine if there are more than a kind, with a view to proposing information to the competent authorities to design policies for conservation and management of the species.

Within the studies that can be performed are those based on the phylogeographic analyzes. These studies consider the space and time for mapping the genealogy of genes of interest, so in this work by mitochondrial DNA genes as the 16S and COI were used. Phylogenetic analysis of polymorphism and variation with these molecular markers indicate that the ancestral group is in the Magdalena basin and which have been derived individuals Ranheria basin as a result of various geological and hydrographic factors.

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS				  		
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	4 de 4

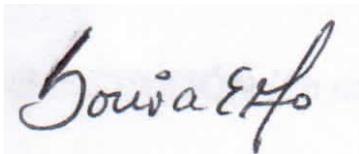
APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Juan Manuel Perea



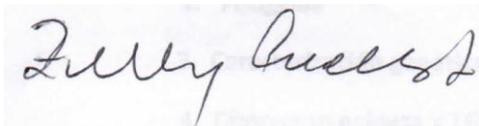
Firma:

Nombre Jurado: Sonia Echeverry



Firma:

Nombre Jurado: Zully Cuellar



Firma:

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS					  	
	CARTA DE AUTORIZACIÓN						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 2

Neiva, 24 de julio de 2015

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad Neiva

El (Los) suscrito(s):

Yuly Alejandra Perdomo Aguirre, con C.C. No. 1075233479 y Wilson Rodrigo Cruz Flor, con C.C. No.1075238816, autores de la tesis y/o trabajo de grado titulado ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DEL PATALÓ, *Ichthyocephalus longirostris* (STEINDACHNER, 1879) EN LA CUENCA DEL MAGDALENA Y EL RÍO RANCHERÍA presentado y aprobado en el año 2015 como requisito para optar al título de Licenciado en Educación Básica con Énfasis en Ciencias Naturales y Educación Ambiental; autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.

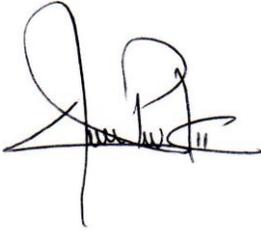
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

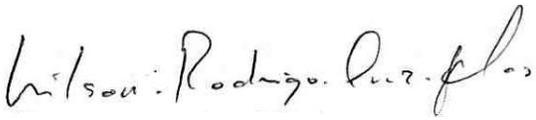
De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS						  
	CARTA DE AUTORIZACIÓN						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 2

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: 

Firma: 



**ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DEL PATALÓ, *Ichthyoelephas longirostris*
(STEINDACHNER, 1879) EN LA CUENCA DEL MAGDALENA Y EL RÍO
RANCHERÍA**

Presentado por:

**WILSON RODRIGO CRUZ FLOR
YULY ALEJANDRA PERDOMO AGUIRRE**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN EDUCACIÓN BÁSICA CON ENFASIS EN
CIENCIAS NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
NEIVA
2015**



**ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DEL PATALÓ, *Ichthyoelephas longirostris*
(STEINDACHNER, 1879) EN LA CUENCA DEL MAGDALENA Y EL RÍO
RANCHERÍA**

Presentado por:

**WILSON RODRIGO CRUZ FLOR
YULY ALEJANDRA PERDOMO AGUIRRE**

Trabajo realizado para optar al título de:

**LICENCIADO EN EDUCACION BÁSICA CON ENFASIS EN CIENCIAS
NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL**

DIRIGIDO POR:

Mauricio Carrillo Ávila, PhD.

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN EDUCACIÓN BÁSICA CON ENFASIS EN
CIENCIAS NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
NEIVA,
2015**

DEDICATORIA

Yuly Alejandra Perdomo, la vida me ha enseñado que lo más importante es la familia por esta razón a ellos dedico la realización de este trabajo en especial a mi Madre Norma Constanza Aguirre y mi Padre Jorge Eliecer Perdomo por su apoyo incondicional y las voces de aliento que día a día me impulsaron a seguir adelante en el cumplimiento de las metas propuestas.

A Alerso Rojas por su paciencia y fortaleza en los momentos difíciles.

Wilson Rodrigo Cruz Flor, la vida consiste en tomar decisiones algunas más acertadas que otras, para mi esta investigación fue la decisión más acertada, formándome en todos los aspectos. De todo corazón y con un alto grado de significancia le agradezco a mis padres y hermano por su apoyo, a mi familia en general, a los abuelos, amigos, a Luisa Paola Espinosa y Alejandra Perdomo por aguantar mi mal genio, a la mujer que me desvela por su paciencia, a todos los que han apoyado y en especial a mi querido

Profesor doctor Mauricio Carrillo Ávila por su amor a la ciencia, docencia y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que de una manera u otra han contribuido para que este trabajo de grado logre llevarse a cabo, pero en especial queremos agradecerle a:

Nuestro director, Mauricio Carrillo Ávila por todos los conocimientos compartidos y las experiencias vividas a lo largo del desarrollo de este trabajo, porque se convirtió en un apoyo incondicional en lo profesional y lo personal, por fomentar en nosotros ese espíritu científico y lograr hacer grandes cosas.

Carlos Arturo Franco, Luis Javier Narváez, Hilda del Carmen Dueñas, Sonia Echeverry, y demás profesores del Programa de Ciencias Naturales y Educación Ambiental que aportaron sus conocimientos en nuestra formación académica.

A todos los compañeros de clases con los que compartimos en el transcurso de la carrera.

A los todos los integrantes del Laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética, en especial a Luisa Paola Espinosa quien nos acompañó y también vivió todas las adversidades y triunfos generados en el desarrollo de esta investigación.

A Don Ezequiel Macías quien siempre estuvo atento a colaborarnos en lo que necesitábamos.

A la Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana por financiar la investigación.

A la facultad de Ciencias Exactas y Naturales por darnos la posibilidad de hacer uso del Laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética y realizar todos los procedimientos moleculares.

Y a todas las personas que en este momento no recuerdo pero que también fueron muy importantes en el cumplimiento de esta gran meta.

Resumen

El *Ichthyoelephas longirostris* conocido con el nombre común Pataló es una especie endémica de Colombia, con una distribución geográfica en las cuencas del Magdalena y la del río Ranchería. Es considerado un pez detritívoro que se alimenta principalmente de *Navicula spp.* y de *Synedra spp.* (Bacillariaceae) que se desarrollan en los ríos de aguas claras y limpias. Debido a su hábito alimenticio las poblaciones son seriamente afectadas por la contaminación, el incremento de la erosión debido a la deforestación, explotaciones mineras principalmente del oro y la presión pesquera dado a su gran aceptación para el consumo debido a la calidad de su carne, que en algunos casos utilizan para su captura métodos destructivos de pesca como la dinamita: lo que ha conllevado a la desaparición en algunas áreas.

A pesar de existir pocos estudios de historia natural y pesquerías, esta especie se encuentra reportada en el libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia como especie en peligro.

Esta condición de especie amenazada y la incertidumbre sobre su correcta clasificación taxonómica de la especie colombiana, debido a su amplio rango de distribución en la cuenca Magdalénica y el río Ranchería y a su vez su relación con la ecuatoriana hace importante dirigir esfuerzos para realizar estudios para determinar si existen más de una especie, con el fin de proponer información a las

autoridades competentes para que diseñen políticas de conservación y manejo de la especie.

Dentro de los estudios que se pueden realizar se encuentran los que se basan en los análisis filogeográficos. Estos estudios consideran el espacio y el tiempo para mapear la genealogía de genes de interés, por lo tanto en este trabajo se utilizaron genes del ADN mitocondrial como el 16S y COI. Los análisis filogenéticos y la variación del polimorfismo con estos marcadores moleculares indican que el grupo ancestral se encuentra en la cuenca del Magdalena y del cual se han derivado los individuos de la cuenca del Ranchería, como consecuencia de diversos factores geológicos e hidrográficos

Índice

Antecedentes y Justificación	15
Formulación del Problema	20
Objetivos de Investigación	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	23
Marco Teórico	24
Colombia y su Biodiversidad.....	25
Características Generales de la Cuenca Magdalena y el Río Ranchería	26
Características del Pataló <i>Ichthyoelephas longirostris</i> (Steindachner, 1879) ...	26
La filogeografía de Peces de Agua Dulce	31
El ADN Mitocondrial Como Marcador Molecular	34
Materiales y Métodos.....	39
Área de Estudio	39
Extracción y Cuantificación del ADN.....	40
Amplificación de las Secuencias de ADN Mitocondrial.....	42
Purificación y Secuenciamiento de los Productos de PCR	45
Análisis estadísticos	47
Resultados	50
Gen Mitocondrial 16S	50
Gen Mitocondrial COI.....	58

Discusión.....	66
Gen ADNmt 16S.....	66
Gen ADNmt COI	69
Conclusiones.....	79
Bibliografía.....	81
Anexos	96

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i> Ejemplar del Pataló del río Ranchería <i>Ichthyoelephas longirostris</i>	28
<i>Figura 2.</i> Proporción de artículos publicados en diferentes regiones (AF: África, AS: Asia, EU: Europa, SA: Suramericana, NA: Norteamérica, sin incluir México) sobre filogeografía y para cada grupo taxonómico.....	33
<i>Figura 3.</i> Mapa genético del ADN mitocondrial humano.	35
Figura 4 Localización de los puntos de colecta de las muestras de <i>Ichthyoelephas longirostris</i>	39
Figura 5 Gel de agarosa al 1% con muestras de ADN de Pataló de la cuenca del río Magdalena.	41
Figura 6 Amplificación del gen 16S con muestras de Pataló del río Magdalena.	43
Figura 7 Amplificación del gen COI con muestras de Pataló del río Magdalena.	45
Figura 8 Verificación y alineación del gen 16S de individuos de la localidad del Magdalena (Neiva) y Ranchería.....	51
Figura 9 Red de haplótipos del gen mitocondrial 16S con los individuos de los ríos Magdalena y Ranchería.	53

Figura 10 Gráficos de Mismatch distribution de cada una de las localidades del río Magdalena y Ranchería	57
Figura 11 Construcción del árbol filogenético con el gen mitocondrial 16S bajo el modelo evolutivo HKJ para la especie <i>I. logirostris</i>	58
Figura 12 Verificación y alineación del gen COI de individuos de la localidad del Magdalena (Neiva) y Ranchería	59
<i>Figura 13.</i> Red de haplótipos del gen mitocondrial COI con los individuos de los ríos Magdalena y Ranchería	61
Figura 14 Gráficos de Mismatch distribution de cada una de las localidades del río Magdalena y Ranchería.....	64
Figura 15 Construcción del árbol filogenético con el gen mitocondrial 16S bajo el modelo evolutivo HKJ para la especie <i>I. logirostris</i>	65
Figura 16 Modelo para un aislamiento secuencial de los drenajes del Noreste de sur América resultado del movimiento tectónico del Mioceno	75

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Número de individuos presentes en cada uno de los haplótipos encontrados en las localidades.....</i>	52
Tabla 2. <i>Diversidad genética observada en cada una de las localidades con el gen mitocondrial 16S en la especie <i>I. longirostris</i>. Diversidad haplotípica (H_d), diversidad nucleotídica (π).....</i>	52
Tabla 3. <i>Resultados del AMOVA para el gen mitocondrial 16S de los individuos de la especie <i>I. longirostris</i> de los ríos Magdalena y Ranchería.....</i>	54
Tabla 4. <i>Índice de diferenciación genética entre las poblaciones.....</i>	54
Tabla 5. <i>Valores de las pruebas de neutralidad para la especie <i>I. longirostris</i> en las localidades del ríos Magdalena y Ranchería.</i>	56
Tabla 6. <i>Distribución por localidad de los haplótipos del gen COI para la especie <i>I. longirostris</i>.</i>	60

Tabla 7. *Diversidad genética observada en cada una de las localidades con el gen mitocondrial COI en la especie I. logirostris. Diversidad haplotípica (Hd), Diversidad nucleotídica (π)..... 60*

Tabla 8. *Resultados del AMOVA para el gen mitocondrial COI de los individuos I. longirostris de los ríos Magdalena y Ranchería. 62*

Tabla 9. *Índice de diferenciación genética entre las poblaciones..... 62*

Tabla 10. *Valores de las pruebas de neutralidad para el gen COI en las localidades de los ríos Magdalena y Ranchería en la especie I. logirostris 63*

Antecedentes y Justificación

La falta de estudios en biodiversidad en las diferentes especies de peces del país, estimación poblacional, condiciones mínimas para su reproducción y conservación están generando una gran disminución de estas.

Inicialmente se creía que los recursos pesqueros eran ilimitados y si bien es cierto que son renovables, la sobre explotación ha generado que muchas especies se encuentren en riesgo de extinción (SIPA, 2010). A esta problemática de reconocer que los recursos son no autosostenibles sino que necesitan un tiempo, se le suma la contaminación ambiental producida por el ser humano.

Este punto de vista ilimitado de las riquezas de las aguas continentales, va asociado al inicio de las primeras civilizaciones, donde todo su marco existencial está situado cerca a estas fuentes fluviales, donde toda la población dependía de la producción del río, sin ellos intervenir en su equilibrio, viéndose desde entonces la gran dependencia a los recursos acuícolas.

Se estima que la pesca y la acuicultura proporciona medios de subsistencia e ingresos a unos 54,8 millones de personas en el sector primario de la producción pesquera en el mundo para el 2010 (FAO, 2012). Sin embargo, la disminución en capturas en diferentes fuentes fluviales así como en varios países sudamericanos como Argentina, Colombia, Paraguay y la República Bolivariana de Venezuela, y países de América del norte (FAO, 2012), hace vulnerable a este sector.

Esta situación se ve reflejada también en Colombia, principalmente en la cuenca del Magdalena, la fuente hídrica más importante del país, en donde al realizar una comparación de las capturas en el primer trimestre de 2010, se encontró una disminución gradual y constante, reportando un descenso del 34% en los desembarcados en febrero con respecto a enero y del 24% en los desembarcados en marzo comparado con febrero (SIPA, 2010). Muchos asocian esta disminución a la falta de conocimiento de las épocas reproductivas de estas especies que van relacionadas con la subienda.

La subienda en el río Magdalena es una migración de los peces aguas arriba, con fines reproductivos, fenómenos naturales que se traduce en beneficios sociales y económicos para los pescadores y comunidades ribereñas, debido a que se incrementa significativamente las capturas. La alta presión de pesca durante esa temporada afecta seriamente los recursos pesqueros, debido a que coinciden con el periodo reproductivo de las especies reofílicas (especies que migran en contra de la corriente de los ríos alcanzando su madures sexual) (CCI, 2006).

Muchas de estas especies que alberga la cuenca del Magdalena participan en la subienda y se encuentran reportadas con algún grado de vulnerabilidad como el *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Buitrago-Suárez y Burr 2007) (En peligro crítico) y *Prochilodus magdalenae* (Steindachner 1878) (Vulnerable), algunas que realizan desplazamiento cortos como *Ichthyoelephas longirostris* (Steindachner 1879) (En peligro crítico), y otras que sus hábitos ecológicos han sido poco descritos como *Brycon labiatus* (Steindachner 1879) (En peligro) , *Notarius*

bonillai (Miles 1945) (En peligro) y *Ageneiosus pardalis* (Lütken 1874) (Vulnerable), además de ser afectadas por las altas presiones pesqueras y la falta de control que debe ser realizados por las diferentes entidades públicas encargadas de la pesca y acuicultura y centros de educación, ha llevado en los últimos años a una disminución en las capturas, sumado a esto el deterioro del hábitat, pocos estudios biológicos y ecológicos que involucren estimaciones poblacionales, variabilidad genética poblacional con marcadores moleculares e inadecuadas políticas de manejo y conservación (Mojica, Usma, Álvarez León, & Lasso, 2012), es necesario realizar estudios poblacionales y de biodiversidad, para determinar la riqueza poblacional y el estado actual de las especies.

Una de las especies importantes para el país y que está presente en la cuenca del Magdalena y el río Ranchería en la Guajira, es el *Ichthyoelephas longirostris* (Steindachner, 1879) conocido con el nombre común de Pataló en la cuenca del Magdalena, jetudo en el Valle, Pataló hocicón en Santander, besote o jetón en el río Ranchería.

Según Mojica *et al.*, (2012) el Pataló, pertenece a la familia prochilodontidae, orden characiformes, y esta reportado como en peligro (A2c) en la categoría nacional y en peligro crítico CR (A2c) a nivel regional en la cuenca del río Ranchería.

Para esta especie solo se han realizado estudios por Román (1993), Román-Valencia y Ortiz-Muñoz (2001) y Patiño (1973) que describen la historia natural

del jetudo, con el fin de establecer características biológicas de *Ichthyoelephas longirostris* en la cuenca del río la vieja, además de ampliar sus características de la reproducción y distribución geográfica y realizar un cultivo experimental de peces en estanques respectivamente.

Un método para evaluar el estado de las especies, asociado a la distribución geográfica y a la genética de poblaciones, es la filogeografía, que juega un papel importante ya que permite esclarecer patrones evolutivos de las poblaciones de una misma especie e inferir procesos a escala micro y macroevolutiva como flujo genético, tamaño efectivo de la población, secuencias de colonización, cuellos de botella, determinación de fronteras entre especies e identificación y delimitación de unidades de manejo para la conservación (Avice, 2000; Freeland, Kirk & Petersen, 2011; Domínguez & Vázquez, 2009).

Estudios de este tipo se han realizado en especies del orden Characiformes y familia Prochilodontidae en la cual pertenece el Pataló. Entre los estudios más recientes es el reportado por Aguirre-Pabón *et al.*, (2013) en bocachico, con un muestreo de 20 sitios a lo largo de la cuenca del Magdalena y con un total de 292 individuos analizados, estudiando las variaciones a nivel de ADN mitocondrial (gen D-loop), encontrando 233 haplótipos de los cuales 206 son privados y 27 son compartidos entre los sitios ubicados en la parte media y superior del río Magdalena, mostrando una alta diversidad genética en la población del bocachico, indicando que la población no está pasando por un cuello de botella (reducción drástica en el tamaño poblacional) y que el buen estado genético se ve favorecido

por el comportamiento migratorio de los individuos, permitiendo el flujo de genes en toda la cuenca del Magdalena.

Estudios afines han sido desarrollados por Guisande *et al.*, (2012) el cual buscaba realizar una reconstrucción filogenética basada en el marcador mitocondrial 16s ADNr y el gen nuclear 18s ADNr, genes que proporcionan un marco para la identificación de las principales diferencias entre Acestrorhynchida, Anostomidae, Characidae, Ctenoluciidae, Curimatidae, Cynodontidae, Gasteropelecidae, Prochilodontidae and Serrasalminidae; Oliveira *et al.*, (2011) proponen una nueva definición a la familia Characidae y una nueva hipótesis de relaciones para los Characiformes basado en análisis filogenéticos de secuencias de ADN de dos genes mitocondriales (16s rARN y Cytb) y tres genes nucleares (Myh6; RAG1 y RAG2); y Sivasundar *et al.*, (2001), que utilizando una secuencia de ADN mitocondrial infirieron la relaciones filogenética de las especies de Prochilodus en los ríos Paraná, Amazonas, Orinoco y cuenca del Magdalena.

Estos trabajos revelan la importancia y la capacidad de los genes mitocondriales para la identificación de especies e inferencias filogenéticas, eventos demográficos y procesos de selección, revelando que la variación de un gen no es conservada entre especies pertenecientes a la misma familia debido a la diferente historia evolutiva asociada al cambio del paisaje como consecuencia de eventos orogénicos e hidrológicos que dejan una huella a nivel molecular.

Formulación del Problema

En los últimos 50 años los seres humanos han transformado los ecosistemas más rápida y extensamente que en ningún otro período de tiempo comparable de la historia humana, en gran parte para resolver prontamente las demandas crecientes de alimento, agua dulce, madera, fibra, combustible, entre otras, generando una pérdida considerable y en gran medida irreversible de la diversidad de la vida sobre la Tierra. (Rudas *et al.*, 2007).

Colombia a nivel mundial es categorizada como una de las potencias más ricas en diversidad biológica. Actualmente esta condición ha ido disminuyendo por falta de políticas apropiadas para el uso sostenible de los recursos naturales que evidentemente han contribuido a colocar un sin número de especies en condiciones preocupantes para la ecología del país.

Además, se podría considerar que las prácticas no sostenibles de los recursos pesqueros que contribuyen a la degradación, son también consecuencias de la poca educación ambiental generada en los diferentes centros educativos sobre conservación de especies, en este caso de especies dulceacuícolas.

Los procesos de deterioro y fragmentación de los ecosistemas y la consecuente pérdida de biodiversidad, han sido poco analizados en Colombia desde todos los ámbitos incluyendo el educativo. En buena medida este rezago obedece a las limitaciones de información que impiden identificar con detalle la evolución y

los cambios en los ecosistemas. En consecuencia, son pocos los elementos de juicio sustentados en la evidencia empírica que aportan a la formulación de políticas orientadas a frenar o detener procesos de degradación (Rudas *et al.*, 2007).

Dentro de las especies endémicas dulceacuícolas del país se encuentra el Pataló, con una distribución geográfica en la cuenca del Magdalena y la del río Ranchería. Su categorización lo ubica en peligro a nivel nacional y en peligro crítico para el río Ranchería, debido a la destrucción de su hábitat natural. No se conocen estimativas poblacionales de la especie (Mojica *et al.*, 2012).

Aunque se conoce muy poco del Pataló, ecológicamente se ha logrado establecer que habita principalmente en los afluentes laterales de los grandes ríos de la cuenca del Magdalena y del río Ranchería. Prefiere aguas rápidas, claras y es poco usual capturarlo en las ciénagas de la parte baja. No participa de la subienda, pero al parecer efectúa desplazamientos cortos durante los meses de verano (Mojica *et al.*, 2012).

Actualmente la distribución de dichos afluentes presenta una separación geográfica por la sierra Nevada de Santa Marta, lo que ha establecido un aislamiento reproductivo evitando flujo génico entre los individuos que habitan la cuenca del Magdalena y el río Ranchería.

Esta interferencia de flujo génico no solo se da por barreras geográficas, sino también por barreras químicas o aislamiento por distancia que se presenta en la

misma cuenca creando subespecies, como lo encontrado por Dahl (1971) el cual encontró diferencias morfológicas entre Pataló de la ciénaga del bajo río Magdalena hasta aguas abajo de la ciénaga de Plato Magdalena, denominando a esta subespecie *Ichthoelephas longirostris neglectus*, sin conocerse registros posteriores de captura en este sector.

Teniendo en cuenta su amplio rango de distribución de la especie en la cuenca del Magdalena y el río Ranchería, la categoría que presenta según el libro de peces dulceacuícolas en **PELIGRO CRÍTICO** y la incertidumbre en su correcta clasificación taxonómica, se hizo necesario realizar el estudio filogeográfico para determinar la existencia de una o más especies del Pataló en el país.

De esta manera se podrá proporcionar información para que las autoridades competentes propongan medidas de conservación y manejo para frenar la disminución de la población y finalmente evitar la extinción de la especie.

Objetivos de Investigación

Para la realización de esta propuesta investigativa se plantean cuatro objetivos, uno general y tres específicos:

Objetivo General

Determinar si existe una o más especies de Pataló, *I. longirostris* (Steindachner, 1879) en la cuenca del Magdalena y el río Ranchería.

Objetivos Específicos

- Analizar la variación genética del Pataló, *I. longirostris* utilizando marcadores tipo ADNmt (gen 16s y gen Citocromo Oxidasa Subunidad I).
- Proporcionar información para que las autoridades competentes propongan medidas de conservación y manejo.
- Proponer una herramienta pedagógica para la enseñanza de la Biología Molecular

Marco Teórico

La diversidad ecosistémica actualmente no es conocida en su totalidad por la falta de estudios. Hoy en día, en donde las actividades humanas tienen mayor efecto en el equilibrio natural de las poblaciones existentes sobre el planeta Tierra, se hace imprescindible realizar investigaciones no solo con el fin de aumentar el inventario biológico de especies, sino proporcionar información del estado poblacional para tomar medidas de manejo y conservación de las mismas.

Según Mora, *et al.*, (2011) la biodiversidad predicha es alrededor de 7.77 millones de especies de animales, 298.000 especies de plantas, 611.000 especies de fungí, 36.400 especies de protozoos y 27.500 especies de chromista, en total una aproximación de más o menos de 8.74 millones de eucariotas existentes sobre la tierra, restringiendo estas aproximaciones a los taxones marinos con una predicción de 2.21 millones de especies de eucariotas en los océanos del mundo.

El número de especies vivientes sobre la tierra es desconocido. Existe aproximadamente 1.7 millones de especies nombradas y la posibilidad de otros 10 millones (no calculando bacterias y arqueas) que no han sido descritas todavía. Estudios basados en la identificación de ADN pueden ser de vital importancia el descubrimiento de especímenes que representan los taxones sin describir (Stoeckle, 2003).

Colombia y su Biodiversidad

Dentro de los 17 países biológicamente más ricos del mundo, en cuyos territorios se encuentra entre el 60 y el 80 por ciento de la vida (Londoño, 2001), se halla la república de Colombia que se ubica en la esquina noroccidental de Suramérica con una extensión territorial de 2.070.408 Km² incluidos las áreas terrestres (1.141.748 km²) y marinas (880.376 Km²). Gracias a estas características, sumadas a su posición geográfica, que la ubica en la zona ecuatorial, la posicionan como uno de los 12 países más ricos en la biodiversidad a nivel mundial en donde se alberga el 70% de la biodiversidad (Romero *et al.*, 2007).

Aunque no existen inventarios biológicos detallados y completos para todo el país, sí se conoce que a nivel de especie, Colombia es considerada como la cuarta nación en biodiversidad a nivel mundial (Romero, *et al.*, 2007).

Una parte de esta biodiversidad colombiana se concentra en sus aguas continentales. La riqueza hídrica del país se manifiesta en una extensa red fluvial superficial que lo cubre (Londoño, 2001), ofreciendo recursos naturales y económicos.

Características Generales de la Cuenca Magdalena y el Río Ranchería

La fuente fluvial más importantes para el país es la cuenca del Magdalena, que comprende 256.622 km², correspondiente al 22.5% de la superficie del país, representando el escenario de las principales pesquerías de aguas continentales, ya que en ella se concentra la mayor población dedicada a esta actividad, la cual está estimada en aproximadamente 30 mil pescadores artesanales (Beltrán *et al.*, 2000), la cual alberga 167 especies de peces dulceacuícolas de las 838 (distribuidas en 44 familias y 13 ordenes) reportadas para el país (Mojica, 1999).

Otra fuente fluvial de interés es el río Ranchería que es uno de los más importantes del departamento de la Guajira. Nace en la laguna de Chirigua que está ubicada en la Sierra Nevada de Santa Marta a 3700 m de altura sobre el nivel del mar y desemboca directamente en el mar Caribe de la ciudad de Riohacha (Polania *et al.*, 2006; Mojica, *et al.*, 2006).

Características del Pataló *Ichthyoelephas longirostris* (Steindachner, 1879)

Dentro de las especies dulceacuícolas del país se encuentra el Pataló, *Ichthyoelephas longirostris* (Steindachner, 1879), que es una especie con distribución en la cuenca Magdalénica y el río Ranchería (Patiño, 1973; Román-Valencia y Ortiz-Muñoz, 2001; Mojica *et al.*, 2012).

Se caracteriza por presentar una coloración verde oscura en el dorso y blanco-plateado ventralmente, con bandas azules oscuras a los lados del cuerpo que se extiende desde el borde posterior del opérculo hasta la base de la aleta caudal entre manchas amarillas continuas; una mancha peduncular azul oscura, redondeada; la aleta dorsal es amarilla-verdosa, con bandas oscuras en la base. Las aletas pectoral, anal, pélvicas y adiposa de rosadas; la aleta caudal es verde oscura excepto su extremo que registra una banda rosada (Román-Valencia, 1993; Castro & Vari, 2004).

Según Román-Valencia (1993) morfológicamente el Pataló tiene un hocico de 1,6-1,7 en la longitud de la cabeza; cabeza 3,8-5,0 en la longitud estándar; profundidad del cuerpo 2,8- 4,5 en la longitud estándar. Distancia prepectoral 3,7-4,5 en la longitud estándar; distancia preanal 1,2-1,6 en la longitud estándar. Dientes presentes en los labios. 34 a 37 en la línea lateral, 6-7 en la línea lateral, hacia el origen de la aleta dorsal; 5-6 escamas debajo de la línea lateral hacia el origen de las ventrales y 4-5 hacia el origen de la anal. Boca protráctil e inferior, labios gruesos; cabeza punteada; ojos con membrana adiposa; membranas branquiales unidas al istmo; aletas sin escamas excepto en sus bases; aleta anal cóncava, su primer radio ramificado, generalmente el más largo; caudal furcada (Figura 1).



Figura 1. Ejemplar del Pataló del río Ranchería *Ichthyoelephas longirostris*

En Colombia se identifica al Pataló como *I. longirostris* (Steindachner, 1879), mientras la especie hermana *I. humeralis* se encuentra distribuida al Norte de Ecuador. *I. longirostris* se diferencia de *I. humeralis* por que la longitud de la boca es 48,8% - 55.7% HL (Longitud de la cabeza) versus 34.5% - 45.4% HL respectivamente. El ancho horizontal de la órbita del ojo es de 11,1% - 16.3% HL versus 19.4% - 36.1% HL respectivamente, el número de escamas entre el inicio de la aleta dorsal y la línea lateral (generalmente 7, raramente 6 versus 6, respectivamente), número de dientes en la fila interior en cada lado de la mandíbula superior (50 a 76 versus 27 a 47, respectivamente) (Castro & Vari, 2004).

La clasificación taxonómica según Mojica *et al.*, (2012) es:

Reino: Animalia

Orden: Characiformes

Familia: Prochilodontidae

Género: *Ichthyoelephas*

Especie: *Ichthyoelephas longirostris* (Steindachner, 1879)

El Pataló es considerado un pez detritívoro que se alimenta principalmente de *Navicula spp.* y de *Synedra spp.* (Bacillariaceae) (Román-Valencia, 1993) que se desarrollan en los ríos de aguas claras y limpias. Debido a su hábito alimenticio las poblaciones son seriamente afectadas por la contaminación, el incremento de la erosión debido a la deforestación, explotaciones mineras principalmente del oro y la presión pesquera dado a su gran aceptación para el consumo debido a la calidad de su carne principalmente en la cuenca alta del río Magdalena debajo de la represa de Betania; que en algunos casos utilizan para su captura métodos destructivos de pesca como la dinamita: lo que ha conllevado a la desaparición en algunas áreas (Román, 1993; Román & Ortiz, 2001; Mojica *et al.*, . 2012; Castro & Vari, 2004).

Según Patiño (1973), la especie se reproduce en aguas torrentosas, migrando en cardúmenes. A pesar de existir pocos estudios de historia natural y pesquerías, esta especie se encuentra reportada en el libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia como especie en peligro (Mojica *et al.*, 2012).

En el caso de la cuenca del río Ranchería, la construcción de la represa El Cercado fragmentó las poblaciones, interrumpiendo sus desplazamientos a lo largo del eje del río sin proponer políticas de manejo y conservación, las cuales se deberían realizar cuando es intervenido y dividido el hábitat de una especie con una barrera geográfica que interfiere en el flujo génico. Dicho aislamiento generado por la fragmentación generalmente promueve una reducción en la diversidad genética de las poblaciones, afectando la plasticidad de adaptación de las especies frente a posibles cambios ambientales que se producen con el tiempo (Frankham, Ballou, & Briscoe, 2008). Las variaciones locales y globales generadas por las intervenciones pueden influir en procesos evolutivos y las respuestas a estos cambios requieren alta variación genética para asegurar el éxito reproductivo y el mantenimiento de una especie (Sork & Smouse, 2006).

Esta condición de especie amenazada y la incertidumbre sobre su correcta clasificación taxonómica de la especie colombiana, debido a su amplio rango de distribución en la cuenca Magdalénica y el río Ranchería y a su vez su relación con la ecuatoriana hace importante dirigir esfuerzos para realizar estudios para determinar si existen más de una especies, con el fin de diseñar políticas y programas de manejo y conservación de la especie.

La filogeografía de Peces de Agua Dulce

La filogeografía es un campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica entre especies próximas (Avice, 2000). Se presenta como una herramienta valiosa, pues permite esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie y ha demostrado ser útil para inferir procesos demográficos a escala micro y macroevolutiva, como flujo genético, tamaño efectivo de la población, secuencias de colonización, cuellos de botella, determinación de fronteras entre especies e identificación y delimitación de unidades de manejo para la conservación (Avice, 2000; Freeland, *et al.*, 2011; Domínguez & Vázquez, 2009).

Como el propio nombre dice, la filogeografía considera el espacio y el tiempo para mapear la genealogía de genes de interés, o sea, la distribución espacial de los alelos cuyas relaciones filogenéticas son conocidas o pueden ser estimadas (Avice, 2000). Además de eso, análisis filogeográficos apropiados pueden ofrecer datos importantes con relación a los procesos evolutivos que determina los patrones contemporáneos de diversificación y separación histórica de linajes génicos, aunque estas tengan comportamiento estrictamente neutro. Poblaciones históricamente aisladas son las principales candidatas a diferencias en la adaptación genética, pues ellas habrían tenido una exposición potencialmente larga a presiones de selección divergentes sin la influencia homogenizadora del flujo génico (Avice, 2000).

Dado que en filogeografía se analizan genealogías para determinar los impactos de los eventos históricos en la composición y estructura genética de poblaciones actuales, han logrado revolucionar la interpretación conjunta de patrones y procesos de ecología, biogeografía y la genética de poblaciones (Domínguez & Vázquez, 2009).

El patrón filogeográfico más conspicuo es aquel en el que hay una marcada subdivisión genealógica entre poblaciones o grupos de poblaciones (haplogrupos) y una marcada estructuración espacial (alopátrica); generalmente se observa en escalas regionales amplias y es un patrón común en pequeños mamíferos, insectos y herpetofauna, dada su poca vagilidad (Vázquez-Domínguez, 2007).

Este análisis conjunto de aspectos filogenéticos, de genética de poblaciones y de biogeografía en poblaciones naturales, han tenido repercusiones importantes en las áreas de biología evolutiva, ecología y conservación (Domínguez & Vázquez, 2009).

En ecología y conservación existe un incremento de investigaciones realizadas en el campo filogeográficos como lo muestra la figura 2 (Vázquez, 2007), entre un periodo del 2000 hasta el 2003, algunos taxones representaron que son más estudiados, como los mamíferos, roedores y los peces de agua dulce.

Los peces de agua dulce en general presentan patrones filogeográficos marcados, sobre todo aquellos confinados a cuerpos de agua aislados como el pez

de desierto *Gila atraria*, en el que se observan dos filogrupos distintivos, asociados a un río y a un lago; dentro de los filogrupos hay a su vez estructuración de las poblaciones, asociada a eventos vicariantes concordantes con la historia hidrológica pleistocénica de la zona (Johnson, 2002).

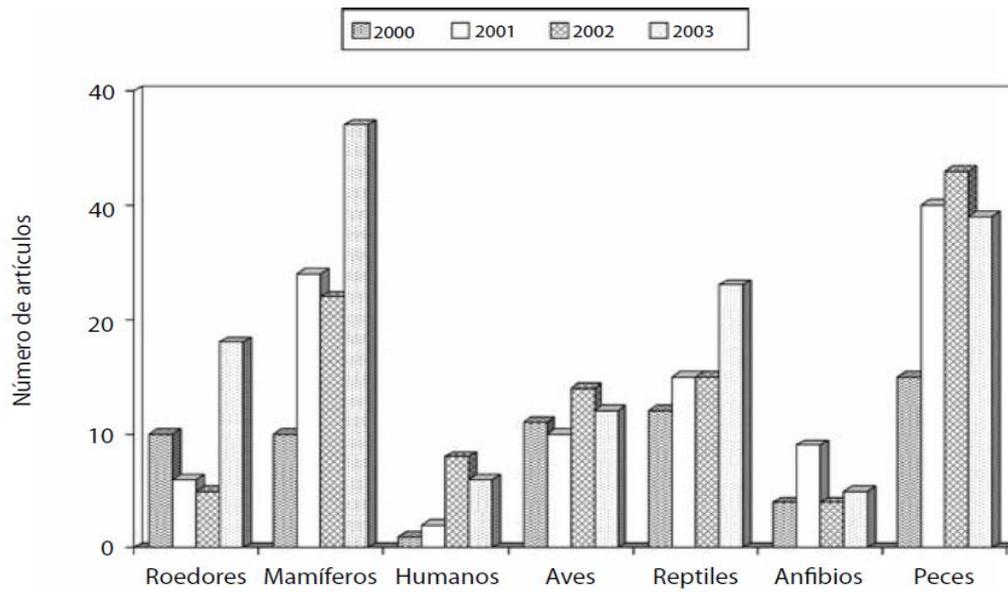


Figura 2. Proporción de artículos publicados en diferentes regiones (AF: África, AS: Asia, EU: Europa, SA: Suramericana, NA: Norteamérica, sin incluir México) sobre filogeografía y para cada grupo taxonómico. (Vásquez, 2007).

Para los estudios filogeográficos la reproducción sexual cumple un papel importante ya que de esta manera los individuos transmiten su información genética. En la reproducción sexual, la descendencia obtiene su material genético del padre y de la madre siendo una herencia biparental, pero algunos orgánulos de la célula tienen su propio ADN. Estos son las mitocondrias y los cloroplastos en plantas que no son obtenidos de forma biparental sino uniparental. Típicamente el ADN de estos orgánulos se presenta de una forma súper enrollada, circular, de

cadena sencilla, estos genomas son más pequeños que los nucleares, (Freeland, *et al.*, 2011).

Para los estudios de filogeografía se hace necesario la utilización de marcadores moleculares los cuales están constituidos por fragmentos de ADN que pueden ser de tamaños muy diferentes, desde pequeñas secuencias hasta grandes trozos que pueden contener algún gen, si bien no importa que dichos fragmentos tengan o no secuencias codificantes, caracterizados porque se pueden detectar pequeñas variaciones con mínimas cantidades del material, que no afectan el fenotipo: son altamente neutros, pueden detectarse a lo largo del todo el genoma y no muestran epistasia (cuando la expresión de un gen depende de la expresión de otros) ni pleiotropía (cuando un gen es el encargado de caracteres distintos no relacionados) (Cubero, 2003).

El ADN Mitocondrial Como Marcador Molecular

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una herramienta importante en los estudios de las relaciones evolutivas de los individuos, especies y poblaciones ya que presenta características peculiares como la herencia uniparental generalmente materna, ausencia de recombinación y las altas tasas evolutivas, comparadas con el genoma nuclear (Calcagnotto, 2001).

El ADN mitocondrial está involucrado primariamente en la respiración celular, en los procesos que generan energía procedente de la alimentación. El ADN

mitocondrial contiene 13 genes codificantes de proteínas, 22 de ARNs de transferencia y dos ribosomales ARNs, hay también región control que contiene sitios para replicación e iniciación de transcripción (Freeland *et al.*, 2011) (Figura 3).

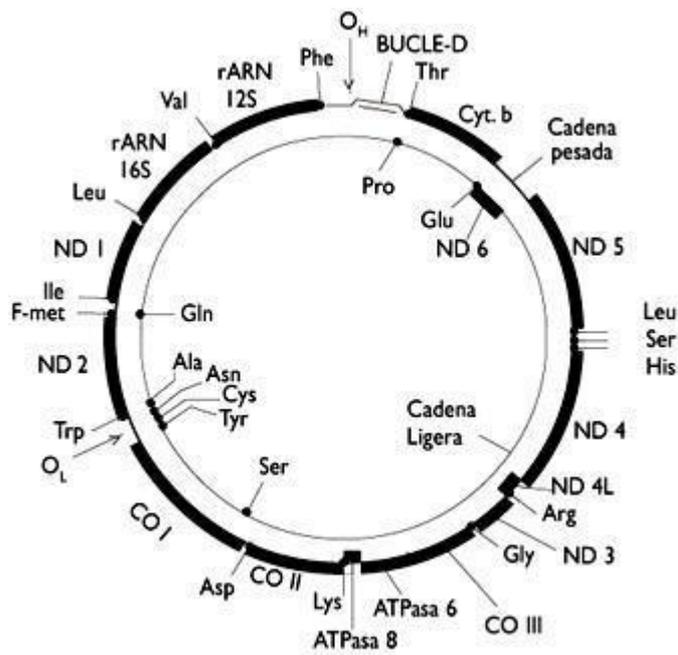


Figura 3. Mapa genético del ADN mitocondrial humano. (López-Pérez, & Montoya, 2001)

Aunque algunos genes mitocondriales son encontrados en diferentes especies, el total de la estructura, el tamaño y la organización de los genes son relativamente conservados. Por tal razón se utilizan los marcadores moleculares tipo mitocondrial para inferir relaciones entre los individuos (Freeland *et al.*, 2011).

La utilidad del ADNmt como marcador molecular para estudios filogeográficos fue descubierta en la década de los 70's por Avise, *et al.*, (1979).

Ya Brown, *et al.*, (1979) descubrieron la elevada tasa de evolución de las secuencias del ADNmt, aproximadamente 2% de divergencia por millón de años.

Independientemente de la causa, la rápida evolución de las secuencias es un prerequisite para la utilidad del ADNmt como un marcador filogenético microevolutivo (He, *et al.*, 2008), permitiendo, por ejemplo, trazar historias evolutivas en análisis de alta resolución de eventos recientes (como especiación rápida), estimar la estructura poblacional, analizar eventos de hibridación, evaluar flujo génico entre otros (Avise, 1986; Avise *et al.*, 1987; Meyer, 1994; Avise, 2004; Clabaut, *et al.* 2005).

A pesar de la rápida tasa de evolución del ADNmt, algunos genes pueden ser más conservados y esto permite una gran plasticidad en relación a las aplicaciones de este genoma en inferencias filogenéticas, pues permite resolver divergencias que ocurrieron hace 100 millones de años hasta variaciones inter-poblacionales (Meyer & Wilson, 1990; Irwin, *et al.*1991; Cantatore *et al.*, 1994; Lydeard & Roe, 1997; Akihito *et al.*, 2000; Kumazawa & Nishida, 2000; Farias, *et al.*, 2001).

El gen 16s ARNr tiene un alto nivel de variación de nucleótidos entre los genes ADNmt y muestra un alto nivel de divergencia entre especies (Schlick *et al.*, 2006). El 16S rARN es un oligonucleótido de aproximadamente de 1.500 nt, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (Rodicio & Mendoza, 2004).

La exacta función del gen 16s ARNr aún no ha sido bien descrita pero se cree que está vinculada al pliegue y despliegue del complejo de la estructura secundaria de esta molécula integral para la translocación del ribosoma a lo largo de ARNm (Anderson, 1998), o sea, interactuando con el sitio de unión al ribosoma para posicionar el AUG en el sitio P (Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, & Losick, 2008).

Otro gen de interés es el citocromo oxidasa, el cual es la enzima responsable para la respiración celular en eucariotas y procariotas, compuesta de 13 subunidades (Holmo *et al.*, 1987; Saraste, 1994).

La subunidad I (COI), es muy utilizado para la identificación de especies debido a su alta tasa de variación, que según Herbert *et al.*, (2003) es altamente efectivo en el sistema de identificación para animales vivos, debido a que la región del COI es una región estandarizada entre 400 y 800 pb, que presenta inferencias que pueden ser valoradas y comparadas dentro y entre algunos especímenes y especies (Ward, 2009).

Aunque el empleo de COI es aceptado en numerosas investigaciones y que algunos autores enfatizan que un solo gen, como el citocromo oxidasa subunidad I, podría ser suficiente para diferenciar una gran mayoría de grupos taxonómicos (Hebert, Cywinska, Ball, & De Waard, 2003), otros sugieren que es poco probable que el uso de un solo gen, especialmente uno mitocondrial, proporcione datos

balanceados, universalmente aceptables o suficientes para el reconocimiento taxonómico de linajes en muchas especies.

Es necesario hacer énfasis que los genomas mitocondriales, comparados con los nucleares, tienen formas hereditarias y patrones evolutivos distintos, lo que puede resultar en evaluaciones de biodiversidad muy diferentes (Rubinoff, 2006), por tales razones para la presente investigación se utilizaron los genes mitocondriales 16S y COI

Materiales y Métodos

Área de Estudio

Para la caracterización genético-poblacional se colectaron un total de 70 individuos en dos puntos de muestreo (figura 4) distribuidos de la siguiente forma: parte alta de la cuenca del Río Magdalena (Neiva) con 35 individuos en el mes de octubre del 2013 y río Ranchería (El Cercado, Represa río Ranchería y Las Lajas) con 35 individuos en el mes de noviembre del 2013. Todas las muestras fueron obtenidas de la faena diaria de los pescadores de cada región.



Figura 4. Localización de los puntos de colecta de las muestras de *Ichthyoelephas longirostris*. Atlas Geográfico. Obtenido de <http://atlasgeografico.net/mapa-hidrografico-de-colombia-con-sus-ros.html>.

Identificación de la especie

Para tener la certeza que las muestras colectadas de los individuos de la actual investigación pertenecen a la especie *I longirostris* se realizó una identificación de la especie por medio de la clave taxonómica de Maldonado-Ocampo, *et al.*, (2005), y con el *software* Ipez, el cual utiliza medidas morfométrica para la identificación de diferentes taxones de peces

Extracción y Cuantificación del ADN

El aislamiento del ADN se realizó a un total 70 muestras de tejido, 35 pertenecientes a la localidad de Neiva y 35 a la localidad del río Ranchería. Dicho procedimiento se realizó en el laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Surcolombiana. Se utilizó tejido solido (musculo o aleta), debidamente conservado en etanol al 96%, siguiendo el método de tampón salino (sin fenol) propuesto por Sambrook *et al.*, (1989) con algunas modificaciones:

Aproximadamente 80 mg de tejido debidamente fraccionado se le adicionó 400 µl de solución de digestión (NaCl 0.4 M; Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA pH=8.0 a 2 mM), 40 µl de SDS 20% (Cf= 2%) y 8 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) (Cf=400 µg/µl) y se mezcló por 30 s. La solución fue incubada en un termobloque a 55°C durante toda la noche. Después de este tiempo se adicionó 300 µl de NaCl (6M), se homogenizó y se centrifugó por 30 min a 10000 rpm. Se transfirió el

sobrenadante a otro tubo estéril y se adicionó el mismo volumen de isopropanol, mezclando por inmersión. La solución fue incubada a -20°C durante una hora y luego centrifugada por 20 min a 10000 rpm. El sobrenadante se descartó y se adicionó 300 μl de etanol al 70% centrifugándolo por 5 minutos a 1000 rpm y nuevamente se descarta el sobrenadante. Los residuos de etanol en las muestra de ADN se evaporó en un termobloque a 37°C durante 40 min y rehidratado con 80 μl TE (tris-HCL 10 mM; EDTA 1 mM ph 8,0). Finalmente la muestra fue tratada con 2 μl de RNase (20 mg/ml) a 4°C por 24 horas y almacenada en un congelador a -20°C .

La integridad y calidad del ADN de las muestras fue verificada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% sumergido en tampón Tris-Borato-EDTA (1x) utilizando como marcador molecular *Sybr Safe DNA gel stain* (10,000X in DMSO) y azul de bromofenol 6X (azul de bromofenol 0,25%, xilene cianol 0.25% y glicerol 30%) como cargador molecular (figura 5).

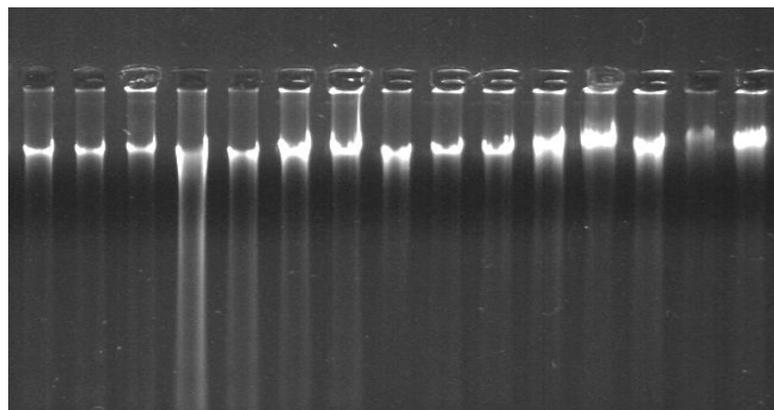


Figura 5. Gel de agarosa al 1% con muestras de ADN de Pataló de la cuenca del río Magdalena.

La cuantificación del ADN se realizó con la ayuda del *THERMO A CIENTIFIC NANODROP 2000*, del laboratorio de Inmunología de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana.

Amplificación de las Secuencias de ADN Mitocondrial

Gen mitocondrial 16S.

Las secuencias mitocondriales del gen 16s fueron amplificadas vía PCR mediante la utilización de los *primer's* universales: 16Sar 5' ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT 3' y 16Sbar 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACGT 3' (Palumbi, 1996), siguiendo las condiciones establecidas por Calcagnotto, *et al.* (2005), con algunas modificaciones, en un volumen final de *Mix* de 30 μ l el cual contenía: 10-50 ng de ADN, tampón 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 y KCl 500 mM), 2.3 mM (MgCl₂), 10 pmol de cada *primer's*, 0.25 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), y 0.5 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies). Las reacciones fueron realizadas en un termociclador *MultiGene OptiMax Thermal Cycler* y el programa de amplificación consistió en un desnaturalización inicial de 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 51.8°C (temperatura de *annealing*), 45s a 72°C; finalizando con una temperatura de extensión de 72°C por 7 min.

Después de cada reacción de PCR, 2 μ l de cada muestra fueron aplicadas con ayuda de un cargador (azul de bromofenol 6X; azul de bromofenol 0,25%,

xilene cianol 0.25% y glicerol 30%) en un gel de agarosa al 2%, teñido con *Sybr Safe DNA gel stain* (10,000X in DMSO), y sometidos a electroforesis (80 Volts por 2 horas). Posteriormente, el gel fue visualizado en el fotodocumentador *E-Gel Imager System life technologies*, teniendo como referencia para los tamaños de los amplicones un Ladder de 100 pb invitrogen (1.0 µg/ µl) (Figura 6).

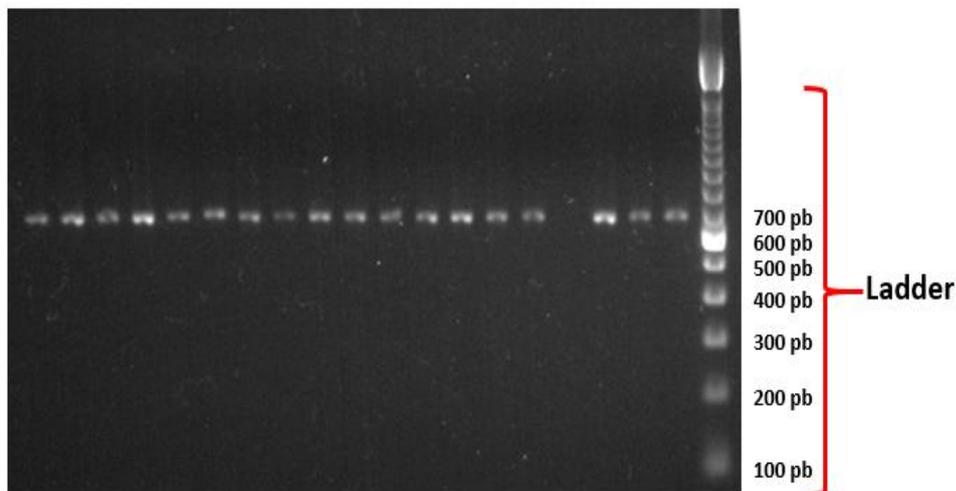


Figura 6. Amplificación del gen 16S con muestras de Pataló del río Magdalena. Tamaño aproximado de 700 pb (pares de base).

Gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI)

Para la amplificación del fragmento del gen mitocondrial COI fueron utilizados los *primer's* universales LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'), desarrollados por Folmer, *et al.*, (1994) siguiendo el protocolo establecido por los autores con algunas modificaciones, en un volumen final de *Mix* de 30 µl el cual contenía: 10-50 ng de

ADN, tampón 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 y KCl 500 mM), 2.3 mM (MgCl₂), 10 pmol de cada *primers*, 0.25 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), y 1 U de la enzima Taq ADN polimerasa (*Invitrogen Life Technologies*).

Las reacciones fueron realizadas en un termociclador *MultiGene OptiMax Thermal Cycler* y el programa de amplificación consistió en un desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido de 40 ciclos de 60s a 94°C, 60s a 47.8°C (temperatura de *annealing*), 120s a 72°C; finalizando con una temperatura de extensión de 72°C por 7 min.

Después de cada reacción de PCR, 2 µl de cada muestra fueron aplicadas con ayuda de un cargador (azul de bromofenol 6X; azul de bromofenol 0,25%, xilene cianol 0.25% y glicerol 30%) en un gel de agarosa al 2%, teñido con *Sybr Safe DNA gel stain* (10,000X in DMSO), y sometidos a electroforesis (80 Volts por 2 horas). Posteriormente, el gel fue visualizado en el fotodocumentador *E-Gel Imager System life technologies*, teniendo como referencia para los tamaños de los amplicones un Ladder de 100 pb invitrogen (1.0 µg/ µl)(Figura 7).

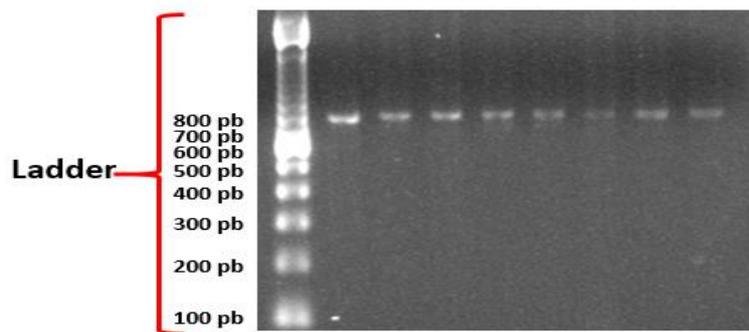


Figura 7. Amplificación del gen COI con muestras de Pataló del río Magdalena.

Tamaño aproximado de 800 pb (pares de bases).

Purificación y Secuenciamiento de los Productos de PCR

Los productos obtenidos de PCR se purificaron mediante el protocolo del polietilenglicol (PEG) propuesta por Sambrook *et al.*, (1989) y el *kit* de purificación *Giaquick Gel Extraction kit* (50) siguiendo las condiciones del fabricante.

Con el protocolo del polietilenglicol (PEG) a 28 μ l de muestra se le adicionó 28 μ l de solución de PEG 20% (polietilenglicol 6000-7000 10% y 2,5 M NaCl) más 2 μ l de azul. Posteriormente, se incubó a 37°C por 15 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se descartó y se adicionó 125 μ l de etanol al 80% frio, se centrifugó a 13.000 rpm por 2 minutos y se descartó el sobrenadante de nuevo (este último paso se realizó una vez más). El amplicon fue incubado a 37°C en un termobloque por 40 min y rehidratado con 15 μ l agua tipo 1 (ultra-pura) (MQ).

La purificación mediante el kit se realizó de la siguiente manera: se colocó una columna *QIAquick* dentro de un tubo de 2 ml y se adicionó 27 μ l del amplicon, 135 μ l de buffer QG y 10 μ l de acetato de sodio (3 M con pH 5) y se centrifugó por 1 min, el filtrado fue descartado y la columna *QIAquick* se colocó de nuevo en el mismo tubo. Se adiciono 750 μ l de buffer PE y se centrifuga por 1 min y se descartó el filtrado pero la columna *QIAquick* se colocó en un tubo nuevo. Después se adiciono 30 μ l de buffer BE y se esperó por 1 min y se centrifugó por otro minuto. El botón del amplicon se resuspendio con 15 μ l de solución hidratante.

Para verificar la calidad del proceso de purificación todos los amplicones fueron visualizados mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2% sumergido en tampón Tris-Borato-EDTA (1x) utilizando como marcador molecular *Sybr Safe DNA gel stain* (10,000X in DMSO) y azul de bromofenol 6X (azul de bromofenol 0,25%, xilene cianol 0.25% y glicerol 30%) como cargador molecular.

Todos los productos de PCR del gen 16S y COI purificados fueron secuenciados por la empresa MACROGEN Inc. Seoul, Korea del Sur. (<http://www.macrogen.com>).

Análisis estadísticos

Con el fin de realizar comparaciones filogenéticas se realizó una verificación visual de las asignaciones y variaciones de las bases nitrogenadas en cada una de las secuencias en el *Software* BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999), el alineamiento fue realizado en una interface del *Software* BioEdit 7.2.5 denominado *CLUSTAL W*, el cual usa el algoritmo de *neighbor-joining* con un punto medio de enraizamiento para crear un árbol guía, que es usado para generar un alineamiento global. El árbol guía sirve como una aproximación para clados que tienden a compartir inserciones y deleciones.

La variación del polimorfismo de ADN fue realizada con ayuda del *Software* MEGA 6 desarrollado por Tamura, *et al.*, (2013) y DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) que tiene en cuenta el contenido de GC (guaninas y citosinas) en posiciones codificantes y no codificantes, evaluando la diversidad haplotípica, que es la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes (Nei, 1987), número total de mutaciones, diversidad nucleotídica (π) que es el número promedio de diferentes nucleótidos por sitio entre dos secuencias de ADN (Nei and Li, 1979).

Las relaciones genealógicas entre los haplotipos fueron estimadas por redes haplotípicas de tipo de *median-joining* calculadas en el *software* NETWORK (Fluxus Technology).

Las estimativas de la subdivisión poblacional fueron realizadas con un análisis de varianza molecular AMOVA, mediante el *software* ARLEQUIN,

evaluando la homogeneidad de las varianzas de poblaciones origen de varias muestras (Gomes-biedman *et al.*, 2001).

Las inferencias demográficas fueron realizadas con las pruebas de neutralidad Tajima D y Fu and Li, que buscan verificar la hipótesis que la selección no ha actuado en el gen, basandose en la detección de las diferencias entre los estimadores pi (π) y theta (Θ) donde el primero (π) se refiere a la diversidad nucleotídica que es el número de sitios diferentes entre dos secuencias tomadas al azar y theta (Θ) que es calculado a partir de la expresión $\Theta=4N_e\mu$ por lo tanto (π) se ve afectado por los alelos que poseen mayor frecuencia y es independiente del tamaño de la muestra y (Θ) si se ve afectado por el tamaño de la muestra y la divergencia genética (Castillo, 2007).

Valores negativos para las pruebas de neutralidad de Tajima D y Fu and Li, indican que la población puede estar pasando por una selección purificadora o expansión poblacional y valores positivos son evidencia que la población puede estar pasando por un cuello de botella o una selección positiva (Holsinger, 2012).

Siendo estas inferencias demográficas corroboradas por los valores del *Mismatch distribution* que evalúa si la población están en equilibrio demográfico.

El árbol filogenético se realizó con el *software* TREEFINDER (Gangolf, 2004) donde el programa infiere grandes árboles por máxima verosimilitud bajo

una variedad de modelos evolutivos de secuencias, aceptando datos de secuencias o aminoácidos y toma la tasa de heterogeneidad en cuenta.

Como estrategia pedagógica se plantea utilizar la presente investigación como una herramienta para la enseñanza de la asignatura de biología molecular y lograr contextualizar los contenidos que se abordan en la materia y despertar interés en los estudiantes su aprendizaje. (Ver anexo 2)

Resultados

Con esta investigación se generó un estudio de caso denominado “ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DEL PATALÓ, *Ichthyoelephas longirostris* (STEINDACHNER, 1879) EN LA CUENCA DEL MAGDALENA Y EL RÍO RANCHERÍA” en donde se expone una aplicación práctica de conceptos de la Biología Molecular y sus herramientas (Ver anexo 2).

Por otro lado la caracterización del polimorfismo y la diversidad genética serán presentadas separadamente para cada uno de los marcadores moleculares de los genes mitocondriales 16S y COI.

Gen Mitocondrial 16S

Verificación visual y alineación

Con el gen mitocondrial 16S se amplificaron y se purificaron un total de 19 muestras con un tamaño promedio de 555 pb, de las cuales 10 se colectaron en el río Magdalena en la localidad de Neiva y 9 en el río Ranchería en la Guajira, entre las localidades de Chorreras y la represa del Ranchería, las cuales fueron verificadas y alineadas en la interfase *Clustal W* presente en el *software* Bioedit (Hall, T.A. 1999) (Figura 8).

Las secuencias que presentaron bases nitrogenadas asignadas erroneamente (picos superpuestos) por el *software* del secuenciador fueron verificadas y corregidas manualmente, aquellas secuencias que presentaron cadenas superpuestas fueron eliminadas de los respectivos análisis ya que estas podrían generar resultados dudosos.

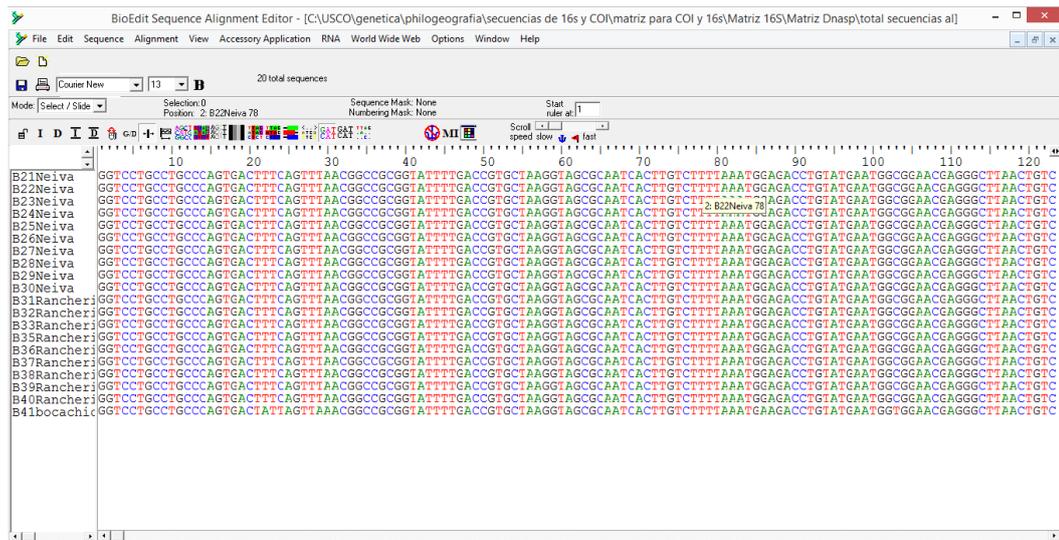


Figura 8. Verificación y alineación del gen 16S de individuos de la localidad del Magdalena (Neiva) y Ranchería.

Variación del polimorfismo.

Las variaciones del polimorfismo con este marcador generaron un total de 4 haplótipos entre las localidades del Magdalena y Ranchería (Tabla 1), con 2 sitios polimórficos, con un total de 2 mutaciones.

Tabla 1. *Número de individuos presentes en cada uno de los haplótipos encontrados en las localidades.*

Localidad	Haplotipos				Total
	1	2	3	4	
Río Magdalena	9	1			10
Río Ranchería	7		1	1	9
Total	16	1	1	1	19

Estimando el polimorfismo del gen tomando a las dos localidades como una sola, la diversidad haplotípica fue de 0.205 (Hd), diversidad nucleotídica de 0.00038 (π). En la tabla 2, se indican las variaciones del polimorfismo presente en cada una de las localidades.

Tabla 2. *Diversidad genética observada en cada una de las localidades con el gen mitocondrial 16S en la especie I. longirostris. Diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π).*

	Magdalena	Ranchería
Hd	0,200	0,222
π	0,00036	0,00041

En la construcción de la red de haplótipos para el 16S con las muestras analizadas (Figura 9) se observa la existencia de 4 haplótipos, uno ancestral en el que agrupan la mayor cantidad de individuos de las localidades del río Magdalena y el río Ranchería, debido a que comparten el mismo haplótipo, derivando de este los haplótipos restantes. La muestra 35 del río Ranchería presenta dos pasos

mutacionales, y la muestra 23 del Magdalena y 31 de Ranchería presenta solo un paso mutacional.

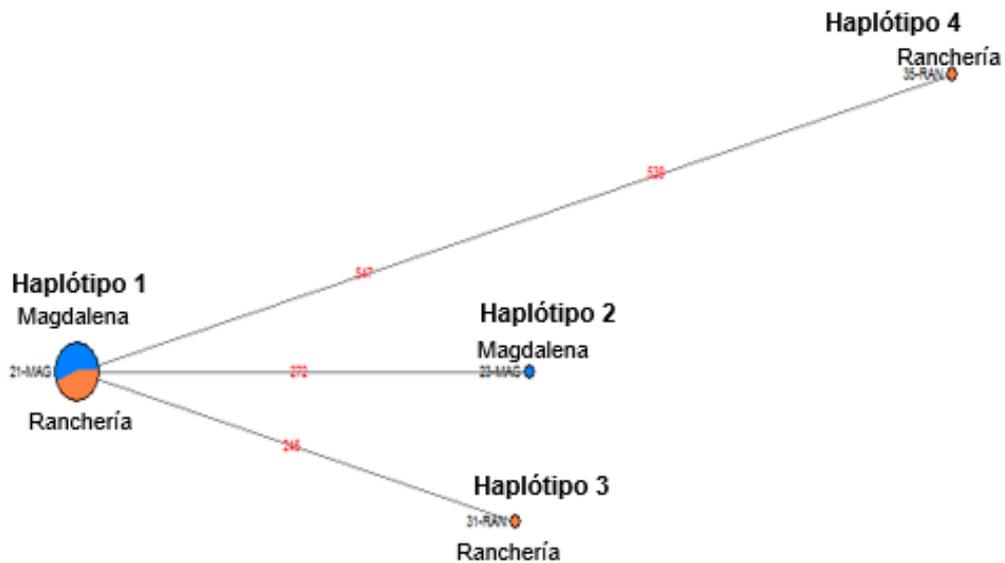


Figura 9. Red de haplótipos del gen mitocondrial 16S con los individuos de los ríos Magdalena y Ranchería. En el haplótipo ancestral agrupan 9 individuos del río Magdalena (azul) y 7 individuos del río Ranchería (naranja).

Estimativas de subdivisión poblacional.

Análisis de varianza molecular.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) para el gen mitocondrial 16S, indica que la mayor fuente de variación se encuentra dentro de las poblaciones con un promedio del 99.35% mientras que la variación entre las poblaciones es de 0.65% (Tabla 3)

.Tabla 3. Resultados del AMOVA para el gen mitocondrial 16S de los individuos de la especie *I. logirostris* de los ríos Magdalena y Ranchería.

Fuente de variación	d.f	Suma de cuadrados	Componente de la variación	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	0.223	0.00137	0.65
Dentro de la poblaciones	17	3.567	0.20980	99.35
Total	18	3.789	0.21118	

La variación encontrada entre las poblaciones por el análisis del AMOVA es soportada por los valores del (FST), donde, según Wright (1978), la población del *I. logirostris* no presenta ninguna estructuración poblacional entre los individuos del río Magdalena con respecto a los del río Ranchería (Tabla 4).

Tabla 4. Índice de diferenciación genética entre las poblaciones

Índice de fijación
FST : 0.00650

Prueba de significación (1023 permutaciones)

P= 0.31183

Inferencias demográficas.

Pruebas de neutralidad.

En la prueba de neutralidad el índice de tajima's D para el gen 16S se han encontrado valores globales tajima's $D = -1,51077$ ($P > 0.10$) indicando que la población puede estar pasando por una selección purificadora o una expansión poblacional (Holsinger, 2012).

Por otro lado para el índice Fu and Li's que busca apoyar la prueba anterior sus valores globales fueron $-2,02215$ ($0.10 > P > 0.05$) lo cual indica un exceso en el número de alelos que podría ser esperado como consecuencia de una reciente expansión poblacional o de un *autostop* genético (Holsinger, 2012).

Para ambos índices según la prueba de significancia estadística el valor calculado no es significativo, o sea que el gen tiene un comportamiento neutro. En la tabla 5, se pueden observar los valores obtenidos para los índices de Tajima's D y Fu and Li's por localidades para el gen 16s.

Tabla 5. Valores de las pruebas de neutralidad para la especie *I. logirostris* en las localidades del ríos Magdalena y Ranchería.

Prueba	Localidades	
	Río Ranchería	Río Magdalena
Tajima'D	-1,08823 P > 0.10	-1,11173 P > 0.10
Fu and Li'S D*	-1,18990 P > 0.10	-1,24341 P > 0.10
Fu and Li's F*	-1,28293 P > 0.10	-1,34668 P > 0.10

Nota: Fu and Li'S D* comparaciones del número derivado de mutaciones de *singleton* y el total de números de derivados de las variaciones nucleotídica, el asterisco indica sin un grupo externo, Fu and Li's F* comparaciones del número derivado de mutaciones de *singleton* y las principales diferencias par a par entre la secuencias, el asterisco indica sin grupo externo (Ramirez, *et al.*, 2008).

Mismatch distribution.

Los resultados obtenidos con *Mismatch distribution* tanto para la localidad del río Magdalena como la del río Ranchería se superponen a la curva de lo esperado y lo observado, indicando que no existe ninguna diferenciación genética entre los individuos y que la población está en equilibrio mutacional y deriva (Figura 10).

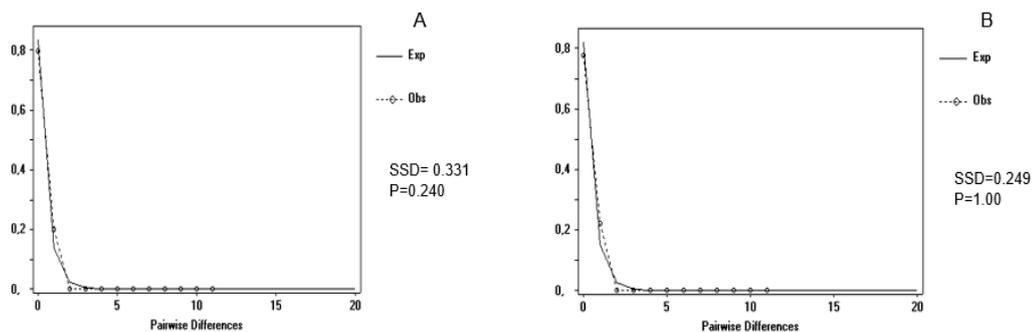


Figura 10. Gráficos de *Mismatch distribution* de cada una de las localidades del río Magdalena (A) y Ranchería (B).

Construcción del árbol filogenético.

La reconstrucción del árbol filogenético se realizó en el *software* TREEFINDER bajo el modelo evolutivo HKJ propuesto por el *Software* JModeltest (Posada, 2008) el cual es quien mejor explica la evolución que siguen las secuencias, obteniendo como resultado una politomia debido a que todos los individuos se desprenden del mismo nodo sin poder visualizar una divergencia y distancia evolutiva entre los individuos del río Magdalena y Ranchería (Figura 11)

Consensus over 1000 Replicates

Consensus Level: 90

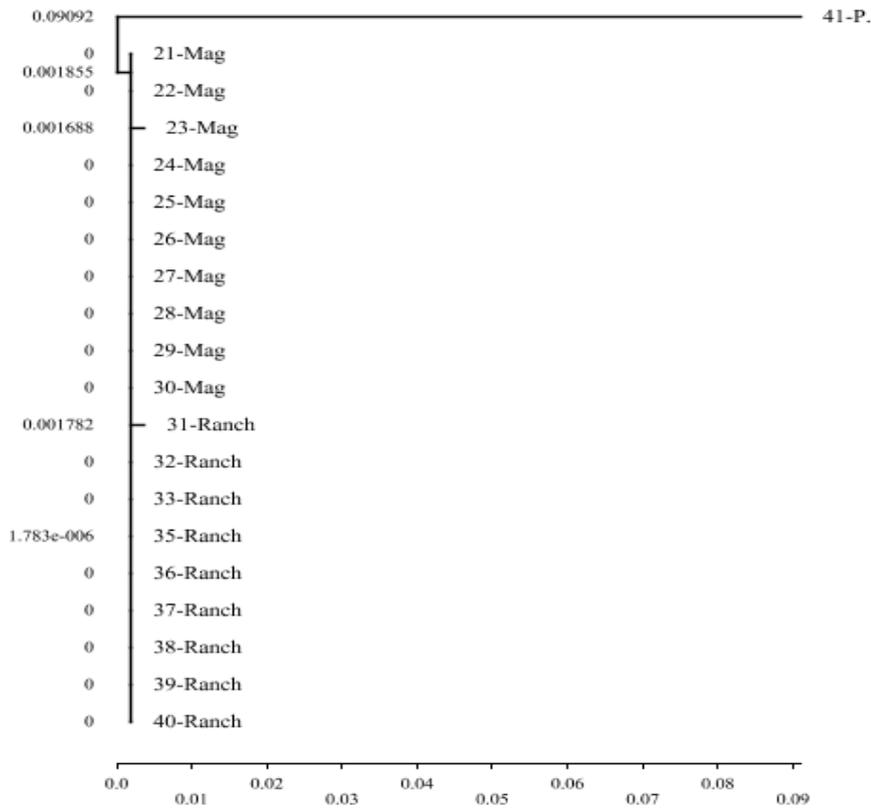


Figura 11. Construcción del árbol filogenético con el gen mitocondrial 16S bajo el modelo evolutivo HKJ para la especie *I. logirostris* presente en el río Magdalena y Ranchería, enraizado con un individuo de la especie *Prochilodus magdalenae* (41-P).

Gen Mitocondrial COI

Verificación visual y alineación

Con el gen mitocondrial COI se amplificaron y se purificaron un total de 16 muestras con un tamaño de 637 pb, de las cuales 10 se colectaron en el río Magdalena en la localidad de Neiva y 6 en el río Ranchería en la Guajira, en la

localidad de Chorreras y la represa del Ranchería, las cuales fueron verificadas y alineadas en *Clustal W* presente en el *software* Bioedit (Hall, T.A. 1999) (Figura 12).

Las secuencias que presentaron bases nitrogenadas asignadas erroneamente (picos superpuestos) por el *software* del secuenciador fueron verificadas y corregidas manualmente, aquellas secuencias que presentaron cadenas superpuestas fueron eliminadas de los respectivos analisis ya que estas podrian generar resultados dudosos.



Figura 12. Verificación y alineación del gen COI de individuos de la localidad del Magdalena (Neiva) y Ranchería.

Variación del polimorfismo

Las variaciones del polimorfismo con este marcador generaron 6 haplótipos entre las localidades, con 162 sitios polimórficos, con un total de 190 mutaciones.

Con este marcador la distribución de los haplótipos se encuentra bien marcada obteniendo como resultado que en la localidad del río Magdalena los individuos presentan 3 haplótipos, diferentes a los 3 que presenta la localidad del río Ranchería, observándose que entre las localidades no comparten haplótipos (Tabla 6).

Tabla 6. *Distribución por localidad de los haplótipos del gen COI para la especie I. longirostris.*

Localidades	Haplotipos						Total
	1	2	3	4	5	6	
Magdalena	8	1	1	-	-	-	10
Ranchería	-	-	-	3	2	1	6
Total	8	1	1	3	2	1	16

Estimando el polimorfismo del gen tomando las localidades como una sola, la diversidad haplotípica fue de 0,667 (Hd) diversidad nucleotídica de 0.10372 (π), En la tabla 7 muestra la variaciones del polimorfismo presente en cada una de las localidades.

Tabla 7. *Diversidad genética observada en cada una de las localidades con el gen mitocondrial COI en la especie I. logirostris. Diversidad haplotípica (Hd), Diversidad nucleotídica (π).*

	Magdalena	Ranchería
Hd	0,200	0,733
π	0,00191	0,11892

En la red de haplótipos para el COI con las muestras analizadas (figura 13) se observa la existencia de 6 haplótipos uno ancestral o basal en el que agrupan los individuos de la localidad del Magdalena excepto el individuo 2-Mag y 5-Mag el cual constituye otro haplótipo debido a sus mutaciones.

Para la localidad del río Ranchería presenta tres haplótipos derivados de la localidad del Magdalena, pero dos de estos siguen pasos mutacionales diferentes, formando grupos distintos, lo que puede revelar que el río Ranchería presenta dos grupos muy diferentes.

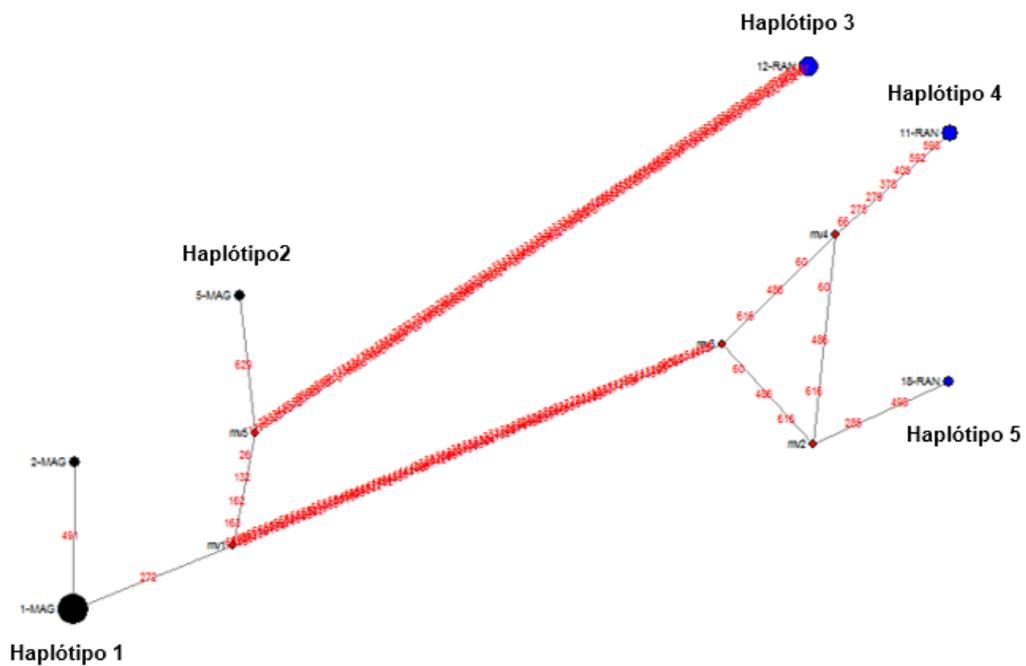


Figura 13. Rede de haplótipos del gen mitocondrial COI con los individuos de los ríos Magdalena y Ranchería. En el haplótipo basal 9 individuos del río Magdalena (Negro) del cual se derivan el resto de haplótipos, 6 individuos del río Ranchería (Azul), los cuales presentan diversas mutaciones.

Estimativas de subdivisión poblacional.

Análisis de varianza molecular.

En los datos mostrados por el análisis de varianza molecular (AMOVA) para el gen mitocondrial COI, indican que la mayor fuente de variación está entre las poblaciones con un promedio del 73.25% y la variación dentro las poblaciones es de 26.75% (Tabla 8)

Tabla 8. *Resultados del AMOVA para el gen mitocondrial COI de los individuos I. longirostris de los ríos Magdalena y Ranchería.*

Fuente de variación	d.f	Suma de cuadrados	Componente de la variación	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	344.187	43.76106 Va	73.25
Dentro de la poblaciones	14	223.710	15.97931 Vb	26.75
Total	15	567.898	59.74037	

La variación encontrada entre las poblaciones por el análisis del AMOVA es soportada por los valores encontrados por el FST que según Wright (1978) este valor indican estructuración poblacional entre los individuos de la localidad del río Magdalena con respecto a los del río Ranchería siendo estos valores significativos (Tabla 9)

Tabla 9. *Índice de diferenciación genética entre las poblaciones*

Índice de Fijación
FST : 0.73252

Prueba de significancia 1023 permutaciones

P-valor = 0.00098+-0.00098

Inferencias demográficas.

Pruebas de neutralidad.

En la prueba de neutralidad de tajima's D y Fu and Li's con el gen COI se obtuvieron valores globales tajima's D= 0,59861 ($P > 0.10$) valor no significativo, contrario a lo encontrado por el índice de Fu and Li's D 1,59991 ($P < 0.02$) valor significativo, lo cual refuta la evolución neutra del gen. En la tabla 10 se pueden observar los valores obtenidos por localidades para el gen COI donde los valores fueron significativos, indicando que el gen COI en la población del Pataló puede estar presentando una selección positiva o un cuello de botella.

Tabla 10. *Valores de las pruebas de neutralidad para el gen COI en las localidades de los ríos Magdalena y Ranchería en la especie I. logirostris*

Prueba	Localidades			
	Río Ranchería		Río Magdalena	
Tajima'D	2,03225	P < 0.05	-1,79631	P < 0.05
Fu and Li'S D*	1,55356	P < 0.05	-2,08124	P < 0.05
Fu and Li's F*	1,82035	P < 0.02	-2,25642	P < 0.05

Mismatch distribution.

Los resultados obtenidos con *Mismatch distribution* indican que la localidad del Magdalena presenta una variación unimodal (Figura 14A), mostrando que los individuos en esta localidad no se encuentran en equilibrio demográfico, o sea que los individuos están pasando por una expansión poblacional, distinto a la localidad del río Ranchería la cual presenta una variación multimodal, indicando que los individuos de esta localidad están en equilibrio demográfico (Figura 14B).

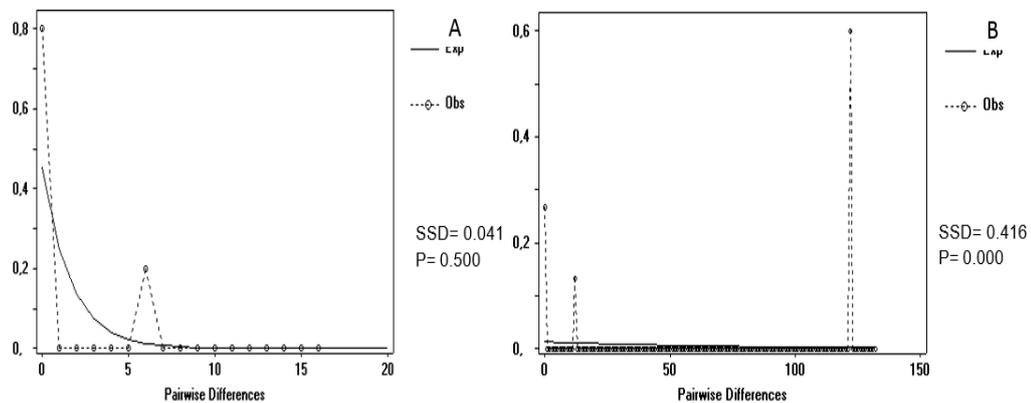


Figura 13. Gráficos de *Mismatch distribution* de cada una de las localidades del río Magdalena (A) y Ranchería (B).

Construcción del árbol filogenético.

La reconstrucción del árbol filogenético se realizó en el *software* TREEFINDER bajo el modelo evolutivo HKJ propuesto por el *Software* JModeltest (Posada, 2008) el cual es el que mejor explica el modelo evolutivo que siguen las secuencias, obteniendo como resultado tres agrupaciones bien diferenciadas con un *bootstrap* no inferior a 98,2 entre las localidades (Figura 15).

Consensus over 1000 Replicates

Consensus Level: 90

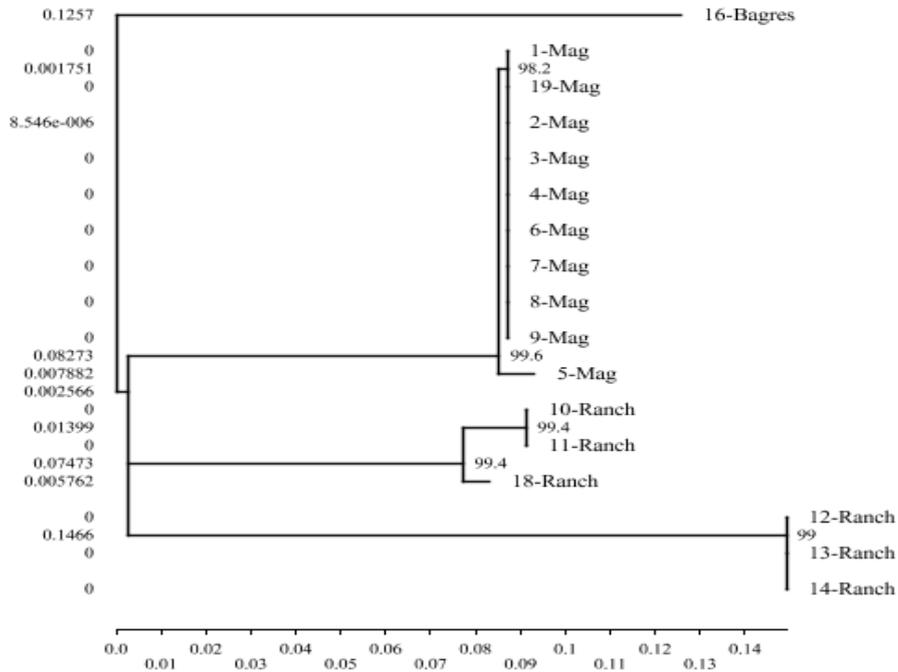


Figura 14. Construcción del árbol filogenético con el gen mitocondrial COI bajo el modelo evolutivo HKJ para la especie *I. logirostris* presente en el río Magdalena y Ranchería, enraizado con un individuo de la especie *Pseudoplatystoma magdalenae* (16-Bagres).

Discusión

Gen ADNmt 16S

Los valores encontrados en la variación del polimorfismo (diversidad haplotípica y nucleotídica) para el gen ADNmt 16S es de 0,250(Hd) y 0.00038(π), lo que indica que las secuencias fueron totalmente conservadas para la especie, al no presentar variaciones entre las localidades como debería ser en especies que están aisladas geográficamente y siguen historias evolutivas diferentes.

Esta poca variabilidad en la diversidad haplotípica y nucleotídica entre las localidades del río Magdalena y Ranchería, pueden ser buenos indicadores de las fortalezas y limitaciones de un conjunto de datos de un gen en particular (Ortí and Meyer, 1997). Como era de esperar, la estructura y requerimientos funcionales en la proteína para la codificación de un gen es más rígida que en otros genes al momento de permitir sustituciones, ya sean estas transiciones (pirimidina por una pirimidina o purina por purina) o transversiones (pirimidina por una purina o purina por pirimidina) (Simon *et al.*, 1994), como consecuencia de cientos de años en un proceso de adaptación y selección de un alelo al medio ambiente.

Teniendo en cuenta estas variaciones se ha realizado la construcción de una red de haplotipos obteniendo como resultado que las localidades comparten haplotipos, comportándose como una sola población, lo que es reflejado por el bajo valor del FST de 0.00650, y el análisis de varianza molecular (AMOVA) donde la mayor variación se encuentra dentro de las localidades con un valor del 99.35%,

contrariamente a lo esperado por el aislamiento geográfico existente entre las cuencas que genera la interrupción del flujo génico entre estas.

La similitud de esta red de haplótipos concuerda con otras redes realizadas con individuos perteneciente a la familia Prochilodontidae que no presentan ningún aislamiento geográfico (Garcez, *et al.*, 2011; Aguirre-Pabón *et al.*, 2013).

Con la red de haplótipos en forma de estrella encontrada y la distribución unimodal del *Mismatch distribution*, se podría pensar que la población puede estar en un proceso de expansión poblacional o selección purificadora (Gaffney *et al.*, 2007; Vergara, Azpeliculeta, & Garcia, 2008) o que presentaba un tamaño poblacional constante y ha comenzado una fragmentación (Aguirre, 2007), tal posibilidad también es soportada por los valores negativos obtenidos para este *locus* en los índices de Tajima's D para la localidad de río Ranchería y Magdalena de -1,08 y -1.11 y Fu and Li's de -1.18 y -1.24 (Holsinger, 2012). Sin embargo, estos valores no fueron significativos, descartando por lo tanto para este gen algún tipo de selección o expansión poblacional, considerando por tal razón que el gen presenta un comportamiento evolutivo neutro.

En la construcción de árbol filogenético para el ADNmt 16s se presentó una politomía, debido a que el gen no tuvo el suficiente poder resolutivo para presentar un *cluster* por localidades o bien que las localidades no son diferentes, obteniendo un solo nodo de donde se desprenden todos los individuos, presentando las mismas distancias evolutivas.

El resultado de una politomía puede deberse a que los individuos se han separaron al mismo tiempo tan rápidamente en vez de secuencialmente que los marcadores no permiten distinguir el orden específico de separación llegando todos a la misma distancia evolutiva (Martínez, 2007, pg 90).

El poco poder resolutivo del marcador ADNmt 16S ha sido reportado por Lovejoy and Collette, (2001) en donde ellos produjeron 12 árboles parsimoniosos cuyos consensos han sido relativamente irresueltos pero siendo congruentes con las evidencias de las hipótesis de muchos más grupos de especies de peces, caso contrario a lo reportado por Guisande, *et al.*, (2012) donde el marcador mitocondrial 16S fue altamente resolutivo en las relaciones filogenéticas de los Characiformes.

Estas incongruencias muestran claramente que algunos genes pueden ser mas apropiados en ciertos grupos de especies, debido a que proporcionan datos para el descubrimiento de filogenias, pero que no puede ser acertado para otros taxones (Ortí and Meyer, 1997).

Gen ADNmt COI

La variación de los valores encontrados en la diversidad haplotípica de 0,667 y nucleotídica de 0,103 para el gen ADNmt COI, presentan valores similares, a los valores obtenidos por Goodall-Copestake, *et al.* (2012) donde se valoró la diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) de diferentes taxones con el gen ADNmt COI obteniendo el valor más alto de (Hd) 0,96078 y (π) 0,00981 en un crustáceo, el camarón *Phycomenes zostericola*.

La mayor variación de la Hd y π la presenta la localidad del río Ranchería con valores de 0,733 y 0,118 con respecto a la localidad del Magdalena con valores de 0,200 y 0,00191.

El valor obtenido de 0,0667 de diversidad haplotípica del gen ADNmt COI para la *I. longirostris*, es bastante alto cuando comparado con valores para el mismo gen en especies pertenecientes a la misma familia Prochilodontidae y que en algún momento histórico han compartido un ancestro en común, y que actualmente no presentan ningún aislamiento geográfico como el *Prochilodus mariae* (*P. mariae*) con un valor de 0,000 y *Prochilodus rubrotaeniatus* (*P. rubrotaeniatus*) con un valor de 0,000. Esta alta diversidad que presenta el Pataló con respecto a las otras especies, es producto de la tasa evolutiva, la cual depende de diferentes factores como el tiempo generacional, tamaño poblacional, tasa metabólica, la eficacia de

reparación de ADN y al grado para cual es benéfica o deletérea, todo lo cual puede variar entre especies (Pybus, 2006).

Gaffney *et al.*, (2007) menciona que las especies que presentan una mayor diversidad haplotípica que nucleotídica están pasando por una expansión poblacional después de un tamaño poblacional pequeño.

Esta idea es soportada por los valores negativos (significativos) obtenidos para el *locus* en los índices de Tajima's D y Fu and Li's (Holsinger, 2012) para la localidad del Magdalena de -1,79 y -2,08, respectivamente, que concuerdan con la expansión demográfica representada en la variación unimodal del *Mismatch distribution*. Un valor similar del índice de Fu and Li's (-2,57) fue encontrado por Turner, *et al.* (2004) para la especie *P. mariae*.

Caso contrario, se encontró en la localidad del Ranchería en los índices Tajima's D =2.03 y Fu and Li's 1,553 siendo estos valores significativos. Estos valores encontrados pueden indicar que la población pueden estar pasando por una cuello de botella o una selección positiva pero en equilibrio demográfico.

En la construcción de la red de haplótipos se puede observar que la localidad del Magdalena presenta un solo haplótipo siendo este el ancestral, debido a que la mayoría de los individuos de la localidad del Magdalena agrupan en este solo haplótipo de donde derivan todos los demás haplótipos de la localidad del Ranchería, presentando dos haplótipos en los cuales agrupan los individuos.

La variación de las secuencias es interesante teniendo en cuenta que los individuos de la localidad del Magdalena no comparten haplótipos con los individuos de la localidad del Ranchería. Estos resultados son confirmados por los valores obtenidos en el AMOVA donde se observa que la gran variación encontrada está representada entre las localidades con un valor de 73.25% y esto también es corroborado mediante el índice de fijación que presentó un valor de $F_{ST} = 0.73252$ el cual fue significativo. Tal valor de F_{ST} indica que la población presenta una elevada estructuración poblacional según la clasificación realizada por Wright (1978) en donde las poblaciones pueden presentar cuatro niveles de diferenciación genética; baja (0.00 a 0.05), moderada (0.05 a 0.15), alta (0.15 a 0,25) y elevada ($> 0,25$).

Esta diferenciación genética se puede observar en la construcción del árbol filogenético donde todos los individuos de la localidad del Magdalena presentan un *cluster* en un solo nodo y los individuos de la localidad de Ranchería presentan dos *cluster* bien diferenciados dentro del grupo, todos los *cluster* son soportados por un *bootstrap* superior al 90%.

La formación de los *cluster* concuerda en la hipótesis de un aislamiento geográfico, o que las especies no presenta flujo génico. Filogenias similares han sido obtenidas para especies pertenecientes a la familia Prochilodontidae (Turner, 2004; Sivasundar, et al. 2001), Pimelolidae (Carvalho-Costa, et al., 2011; Torrico et al., 2008).

La filogenia intra-específica del gen ADNmt COI fue altamente resuelta con una asociación significativa entre las locaciones geográficas para el Pataló, sin embargo, Sivansundar *et al.*, (2001) utilizando el mismo gen para *Prochilodus*, encontró una filogenia intra-específica moderadamente resuelta pero no una asociación significativa entre la genealogía y las locaciones geográficas encontradas.

Estos resultados indican que la distribución del Pataló en la cuenca del Magdalena y en el río Ranchería es una consecuencia de diferentes eventos geológicos e hidrográficos conduciendo a la diversificación de la especie, que según Hubert & Renno, (2006) y López-Fernández & Albert, (2011) explican el origen de la riqueza de las especies tropicales y patrones de distribución en Sur-América

Uno de los primeros eventos geológicos para llegar a la actual distribución geográfica fue el rompimiento geológico del occidente de Gondwana (Sur América + África), resultando en la formación de Sur América como una isla aislada del continente (López-Fernández and Albert, 2011).

Con la formación de Sur-América y cada uno de los principales ejes paleodrenajes (Proto-Amazonas, Amazonas Oriental, Paraná-Paraguay), el continente fue expuesto a varios episodios prolongados de transgresiones marinas y regresiones durante el cretácico superior y cenozoico, siendo las principales regresiones marinas durante el Maastrichtiano (71-66 Millones de años), el Paleoceno (59-55 Millones de años) el Bajo Eoceno (43-42 Millones de años) y el

Oligoceno (34-23 Millones de años) exponiendo grandes áreas de llanuras a inundaciones y costas de planos aluviales permitiendo una dramática y rápida expansión del hábitat de peces de agua dulce (López-Fernández and Albert, 2011).

En Sur-América las incursiones pueden haber tenido un fuerte impacto en los patrones de la biodiversidad como una fuerza que conduce a la especiación alopátrica creando enormes presiones de supervivencia para taxones exclusivamente residentes de la biota de agua dulce del Neotrópico, permitiendo su expansión y diversidad. (Bloom And Lovejoy, 2011; López-Fernández and Albert, 2011).

Las últimas incursiones marinas en Sur-América ocurrieron durante el Mioceno temprano, aproximadamente, entre los 20-17 Millones de años y 12-10 millones, cuando se establecieron los límites hidrográficos como consecuencias de la formación de cadenas montañosas culminado la era del Neógeno (Bloom And Lovejoy, 2011).

Estos límites hidrográficos fueron establecidos como consecuencia de la orogénesis, donde los mayores drenajes de Sur-América desarrollados hasta el presente se formaron después de varios episodios tectónicos, comenzando cerca de 89 millones de años y culminando con el surgimiento final de la Cordillera Andes hace unos 10 millones de años (Sivasundar, *et al.*, 2001), aunque existen evidencias que los linajes y fenotipos de los peces del Amazonas moderno son más ancestrales,

del Paleógeno (65-22 Millones de años), o incluso del cretácico (110-65 Millones de años) (Albert and Carvalho, 2011).

La cordillera de los Andes se extiende casi en la totalidad del continente ocupando cerca del 17% de la amplitud del continente a su punto más amplio, y cubre aproximadamente 9% del área de la superficie (Schaefer, 2011).

En el norte, en Colombia, los Andes se dividen en tres sub-cordilleras conocidas como la Occidental, la Central y la Oriental (Irving, 1975), cada una como resultado de diferentes procesos geológicos que han ocurrido en diferentes tiempos (Schaefer, 2011).

La cordillera occidental está unida a un arco formado en el Paleoceno temprano por compresión causada por la colisión de arcos volcánicos del occidente con la margen continental. En el estrecho Cauca-Patia se crea una fosa tectónica que separa la cordillera occidental de la central, mientras más se amplía hacia el norte y continua hacia el mar Caribe se va separando la cordillera Central de la Oriental, la cordillera Oriental diverge para formar la parte baja de la Serranía del Perijá rango para el Occidente y la parte alta de los Andes de Mérida hacia el Oriente del lago de Maracaibo (Schaefer, 2011).

El surgimiento de la cordillera oriental hace unos 12 millones de años (Mioceno medio) y el surgimiento de los Andes de Mérida hace unos 8 millones de años (Mioceno tardío) fueron responsables de definir los límites de los drenajes

modernos de Sur-América incluyendo el occidente del Amazonas y las cuencas del Orinoco, Maracaibo y el Magdalena (Albert, *et al.* 2006) (Figura 16).

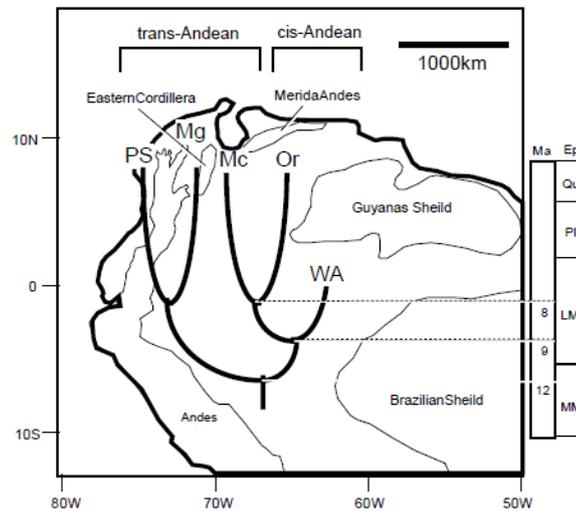


Figura 15. Modelo para un aislamiento secuencial de los drenajes del Noreste de sur América resultado del movimiento tectónico del Mioceno, el surgimiento de la cordillera oriental (12 Ma), conjunto de datos mínimos para el aislamiento del Magdalena (Mg) y pendiente del Pacífico (PS). Regiones de la cuenca del cis-andes la formación inicial de la división del Amazonas (9 Ma), conjunto mínimo de datos para la separación del Occidente del Amazonas (WA) y el Orinoco (Or), el surgimiento de los Andes de Mérida (8 Ma) conjunto de datos mínimos para la separación de la cuenca del Maracaibo (Mc) y el Orinoco (Or) (Albert *et al.*, 2006)

En el mismo tiempo geológico otra importante formación se inició, el surgimiento de la Serranía del Perijá, que ocurrió durante el Mioceno tardío y la orogénesis Andina, surgiendo la Sierra Nevada de Santa Marta y los Andes de Venezuela, convirtiéndose en un límite internacional entre Venezuela y Colombia,

dividiendo la cuenca de Maracaibo (Venezuela) y el Valle del Cesar (Colombia) (Kellogg, 1984).

En la cuenca de Maracaibo y Magdalena actualmente se puede apreciar una marcada similitud faunística, mostrada por los coeficientes de similitud, especialmente a nivel de especies 61% y una menor similitud entre las Cuencas del Maracaibo-Orinoco 12% (Pérez & Taphorn, 1993), como consecuencias de periodos globales de niveles altos del océano causando incursiones marinas que conectaron el presente lago de Maracaibo, región del Llano y Noroccidente de la Amazonia (Hoorn, *et al.*, 1995)

Tales congruencias en patrones de la distribución puede indicar las conexiones paleográficas entre grandes distancias para el movimiento de taxones (Albert and Carvalho, 2011), donde la presencia de taxones compartidos podría ser reflejado como áreas que fueron históricamente conectadas (Hubert and Renno, 2006).

Para este periodo las especies sobrevivientes de los cambios climáticos y geográficos durante el Mioceno en la Cuenca del río Magdalena, pudieron dispersarse y colonizar todos los hábitats y nichos ecológicos desocupados alcanzando a la Cuenca del Lago Maracaibo (Pérez & Taphorn, 1993)

Si consideramos la actual altitud del Valle del río Magdalena y la tasa de elevación de la Sierra del Perijá, es de suponer que antes del Plioceno ésta zona

constituyó una planicie de sedimentación lo suficientemente extensa como para que las aguas de un brazo o del propio río Magdalena se dirigiera por ésta zona con dirección suroeste-noreste descargando sus aguas hacia el Este, en el golfo de Venezuela, por un río como el actual río limón; este río debió proporcionar la vía de la dispersión de la ictiofauna de la cuenca del río Magdalena hacia la cuenca del lago de Maracaibo. Con el surgimiento de la Cordillera Oriental y la Serranía del Perijá es interrumpido el flujo del río Magdalena hasta la cuenca del lago de Maracaibo, formando una planicie inundada entre la Sierra Nevada de Santa Marta y la Serranía del Perijá, para luego ser irrigada por el actual río Ranchería, lo cual actualmente puede explicar que en el río ranchería se encuentre el *Ichthyoelephas longirostris* (Pérez & Taphorn, 1993)

El tiempo de divergencia de las dos poblaciones estudiadas coincide con la formación de la Cordillera Oriental, 12 Millones de años, Este tiempo fue calculado con la fórmula de la distancia genética que es igual a la tasa mutacional de las secuencias por el tiempo en millones de años. De allí se despeja para obtener el tiempo en millones de años, o sea se divide la distancia genética, cuyo valor es 0.24 (valor tomado de la distancia genética calculada en el *software* MEGA entre un individuo de la localidad del Ranchería y uno del Magdalena valor no mostrado), en la tasa mutacional. cuyo valor aproximado para el ADNmt es del 2% en peces, teniendo un valor estimado de separación de los individuos de la localidad del Magdalena con respecto a los de la localidad del rancheria Ranchería de 12 millones de años. Tiempo que concuerda para otros taxones que habitaron y que actualmente

habitan en la cuenca del Magdalena (Carvalho-Costa *et al.*, 2011; Torrico *et al.*, 2008).

Conclusiones

- El gen ADNmt 16S presentó poco poder resolutivo para la especie del *Ichthyoelephas longirostris*.
- El gen ADNmt COI presentó un alto poder resolutivo capaz de realizar *clusters* por zonas geográficas para la especie del *Ichthyoelephas longirostris*.
- La metodología y teoría propuesta por Avise, (2000) basada en la utilización del ADN mitocondrial fue congruente con los resultados obtenidos, encontrado una gran influencia del cambio del paisaje como consecuencia de diferentes eventos geográficos e hidrográficos en la variaciones a nivel molecular para la especie del *I longirostris*.
- Basados en los datos y las inferencias filogenéticas realizadas con el gen mitocondrial COI la especie del *Ichthyoelephas longirostris* de la cuenca del Magdalena es un grupo distinto al del río Ranchería como consecuencia de un aislamiento geográfico ocurrido hace unos 12 millones de años como consecuencia del surgimiento de la Cordillera Oriental impidiendo flujo génico entre las localidades.

- Es importante aumentar el tamaño muestral de la localidad del río Ranchería para determinar si los dos grupos encontrados son diferentes y no sea un error de investigación tipo I.
- Es necesario soportar los valores encontrados por los genes mitocondriales con genes nucleares .
- Como consecuencia al aislamiento geográfico entre las cuenca del Magdalena y el río Ranchería, es importante que los individuos de ambas localidades sean manejados con políticas de conservación diferentes, ya que al introducir nuevos genes, puede promover la pérdida de genes importantes para la adaptación local, como los asociados a la supervivencia (Leuzzi, *et al.*, 2003).

Bibliografía

(s.f.).

- Aguirre, K. (2007). Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En V. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (págs. 49-61). Republica Federal de Mexico: Universidad Nacional Autonoma de México.
- Aguirre-Pabón, J., Narváez, J., & Castro, L. (2013). Mitochondrial DNA variation of the bocachico *Prochilodus magdalenae* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin, Colombia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 23, 594-605.
- Akihito, A., Kobayashi, T., Ikeo, K., Imanichi, T., Ono, H., Umehara, Y., . . . Gojobori, T. (2000). Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes. *Genes*, 259, 5-15.
- Albert, J., & Carvalho, T. (2011). The biogeography of marine incursions in south america. En J. Albert, R. Reis, J. Albert, & R. Reis (Edits.), *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). London. England: Los Angeles, California Ltd.
- Albert, J., Lovejoy, N., & Crampton, W. (2006). Miocene tectonism and the separation of cis- and trans- Andean river basins: evidence from neotropical fishes. *Journal of South America Earth Sciences*, 21, 14-67.
- Anderson, B. (1998). Identifying novel bacteria using a broad-range polimerase chain reaction. En S. Specter, M. Bendinelli, H. Friedman, S. Specter, M. Bendinelli, & H. Friedman (Edits.), *Rapid detection of infectious agents* (págs. 117-119). New York: Plenum Press.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. United of States of America: Harvard University.
- Avice, J. C. (2004). *Molecular Marker, Natural History and Evolution* (segunda ed.). Massachusetts: Sinauer Associates, inc. Publishers.
- Avice, J. C., Lansman, R. A., & Shade, R. O. (1979). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial ADN sequence relatedness in natural populations. I population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, 92, 279-295.
- Avice, J. C. (1986). Mitochondrial ADN and the evolutionary genetics of higher animals. Philosophical transactions of the royal society of London. *Biological Sciences*, 312, 325-342.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., . . . Saunderson, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography the mitochondrial ADN bridge between

- population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18, 489-522.
- Ayuso, G., & Banet, E. (2002). Alternativas a la enseñanza de la genética en educación secundaria. *Enseñanza de las ciencias* 2002, 20(1), 133-, 20(1), 133-143.
- Beltran , I. C., Estrada, M., & Valderrada, M. (2000). *Plan de Ordenamiento: manejo y aprovechamiento sostenible pesquero y cuicultura en la cuenca del río Magdalena*. Santa fe de Bogotá D.C. : Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura - INPA.
- Bloom, D., & Lovejoy, N. (2011). The biogeography of marine incursions in south america. En J. Albert, & R. Reis, *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). London, England: Los Angeles, California Ltd.
- Brown, W. M., George, M. J., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of mitochondrial ADN. *Proceeding of the national academy of sciences*, 76, 1967-1971.
- Calcagnotto, D. (2001). Taxas de evolucao e o relagio molecular. En S. Russo (Ed.), *Biología molecular e evolucao* (pág. 52). Sao Paulo, Brasil.
- Calcagnotto, D. (2001). Taxas de evolucao e relagio molecular. En S. Russo (Ed.), *Biología molecular e evolucao* (pág. 52). Sao Paulo, Brasil.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S., & Desalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitpochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36, 135-153.
- Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaleta, M. N., & Saccone, C. (1994). Evolutionary analysis of the cytochrome b sequence in some preciformes:evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 39, 589-597.
- Caporales, D., Rich, S., Spielman, A., Telford, S., & Kocher, T. (1995). Discriminating between Ixodes Ticks by Means of Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4(4), 361-365.
- Carvalho, L., Ladvocat, M., & Boer, N. (2011). Evolución biológica: percepciones de profesores de biología. *Carvalho, L. Ladvocat, M. Boer, N. (2011). Evolución biológica: percRevista electrónica de enseñanza de las ciencias vol. 10 N° 2,243-263, 10 (2), 243-263 .*
- Carvalho, L., Ladvocat, M., & Boer, N. (2011). Evolución biológica: percepciones de profesores de biología. *Revista electrónica de enseñanza de las ciencias*, 10(2), 243-263.

- Carvalho-Costa, L. F., Piorski, N. M., Willis, S. C., Galetti, P. M., & Ortí, G. (2011). Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862) based on nuclear and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59, 177-194.
- Castro, R., & Vari, R. (2004). Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 622, 1-187.
- CCI. (2006). *Pesca y Acuicultura Colombia 2006*. Bogotá: INCODER.
- Clabaut, C., Salzburger, W., & Meyer, A. (2005). Comparative phylogenetic analyses of the adaptive radiation of lake tanganyika cichlid fish: nuclear sequences are less homoplasious but also less informative than mitochondrial ADN. *Journal of molecular evolution*, 61, 666-681.
- Cubero, J. I. (2003). *Marcadores Moleculares: Introducción a la mejora genética vegetal* (segunda ed.). Muldi-Prensa.
- Dahl, G. (1971). *Los peces del norte de Colombia*. Bogotá: Inderena.
- Daltonico. (3 de marzo de 2013). *Atlas Geográfico*. Obtenido de <http://atlasgeografico.net/mapa-hidrografico-de-colombia-con-sus-ros.html>
- Domínguez, O., & Vázquez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 59-70.
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. Guiarte, V. Sousa, & X. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (págs. 517-536). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- FAO. (2012). Examen Mundial de la Pesca y la Acuicultura . En D. d. FAO, *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012* (págs. 3-114). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Farias, I. P., Ortigi, G., Sampaio, I., Schneider, H., & Meyer, A. (2001). The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of molecular evolution*, 53, 89-103.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., & Lutz, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 294-299.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2008). Fundamentos de genética de la conservación. *Genetics*, 1, 280.
- Freeland, J. (2005). Molecular genetics in ecology. *Molecular ecology*.

- Freeland, J., Kirk, H., & Petersen, K. (2011). *Molecular genetics in ecology*. *Molecular ecology*. Noida, India: Wiley-Blackwell.
- Gaffney, P. M., Rupnow, J., & Domeier, M. (2007). Genetic similarity of disjunct populations of the giant sea bass *Stereolepis gigas*. *J Fish Biol* 70, 111-124.
- Gangolf, J., Arndt, v. H., & Korbibian, S. (2004). TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC evolutionary biology*.
- Gasces, R., Calcagnotto, D., & Foresti, L. (2011). Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from río Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conserv: Mar. Freshwater Ecosyste*, 21, 268-275.
- Gerstein, M., Bruce, C., Rozowsky, J., Zheng, D., Du, J., Korbel, J., . . . Snyder, M. (2015). What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Research*.
- Gibson, T., Higgins, D., & Thompson, J. (1996). Clustal W . *Hinxton*.
- Goodall-Copestake, W., Tarling, G., & Murphy, E. (2012). On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene COI in animal. *Heredity*, 109, 50-56.
- Guisande, G., Pelayo-villamil, P., Vera, M., Manjarrés-Hernandez, A., Carvalho, M., Vari, R., . . . Duque, S. (2012). Ecology factors and diversification among neotropical Characiforms. *Internal Journal of Ecology*, 2012, 20-25.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids*, 41, 95-98.
- He, S., Mayden, R. L., Wang, X., Wang, W., Tang, K. L., Chen, W. J., & Chen, Y. (2008). Molecular phylogenetics of the family cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of S7 ribosomal, pretein-coding gene: further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family. *Mol phylogenet evol*, 46(3), 818-829.
- Hebert P, D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & De Waard, J. R. (2003). Biological identifications through ADN barcodes. *The Royal Society*, 270, 313-321.
- Holsinger, K. (2012). *Lecture note in population genetics*. Departamento of ecology and evolutionary Biology.
- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G., & Lorente, M. (1995). Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, 23(3), 237-240.
- Huber, N., & Renno, J. F. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33, 1414-1436.

- Irving, E. (1975). *Structural evolution of the northernmost Andes, Colombia*. Geological survey profesional.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D., & Wilson, A. C. (1991). Evolution of cytochrome b gene in mammals. *Journal of molecular evolution*, 2, 13-34.
- Johnson, J. B. (2002). Evolution after the flood: Phylogeography of the desert fish Utah Chud. *Evolution*, 56, 948-960.
- Kellogg, J. (1984). Cenozoic tectonic history of the Sierra de Perija, Venezuela-Colombia and adjacent Basinc. *Geological Society of America Memoir*, 162, 239-261.
- Klug, W., Cummings, & Spencer, C. (2008). *Introducción a la genética: Conceptos de genética*. Madril: Pearson education S.A.
- Kumazawa, Y., & Nishida, M. (2000). Molecular phylogeny of osteoglossoids: a new model for gondwanian origin and plate tectonic transportation of the asian arowana. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1869-1878.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics Applications note*, 25(11), 1451-1452.
- Londoño, C. (2001). *El hombre y su relación con la naturaleza. Cuencas Hidrográficas: Bases conceptuales caracterización planificación-administración*. Ibagué, Colombia: Universidad del Tolima Facultad de ingeniería forestal.
- López, O., & Ostrowski, M. (2004). Mecanismos para la recombinación cromosómica. En Rabinovich, *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina* (págs. 606-607). Argentina: Paramericana.
- López-Fernández, H., & Albert, J. (2011). The biogeography of marine incursions in south america. En J. Albert, & R. Reis, *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). Londong, England: Los Angeles, California Ltd.
- Lovejoy, N., & Collette, B. (2001). Phylogenetic relationships of new world needlesfishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*, 2001(2), 324-338.
- Lydeard, C., & Roe, K. J. (1997). The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among actinopterygian fishes. En T. D. Kocher, C. A. Stepien, T. D. Kocher, & C. A. Stepien (Edits.), *Molecular systematics of fish* (págs. 285-303). New York: Academic Press.
- Martínez, L. (2007). Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En V. Eguiarte, X. Souza, & V. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (primera ed., págs. 87-152). Republica Federal de Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

- Martinez, L. (2007). Adaptación a nivel molecular: Laselección Natural a nivel molecular. En V. Eguiarte, Souza, X. Aguirre, V. Eguiarte, Souza, & X. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (págs. 89-152). Republica federal de México: Universidad Autonoma de México.
- Meyer, A. (1994). ADN technology and phylogeny of fish. En A. R. Beaumont (Ed.), *Genetics and evolution of aquatic organisms* (pág. 219-249). London: Chapman e Hall.
- Meyer, A., & Wilson, C. (1990). Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial ADN affiliation to lungfish. *Journal of molecular evolution*, 31, 359-364.
- Mojica, J. C. (1999). *Lista preliminar de peces dulceacuicola de Colombia* (Vol. XXIII). Bogotá: Revista académica colombiana de ciencias.
- Mojica, J. C., Castellanos, C., Sánchez, P., & Díaz, C. (2006). Peces de la cuenca del río Ranchería, la Guajira Colombia. *Biota Colombia*, 7(1), 129-142.
- Mojica, J. I., Usma, J. S., Álvarez León, R., & Lasso, C. L. (Edits.). (2012). *Libro Rojo de Peces Dulceacuícolas de Colombia (2012)*. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Medio Ambiente, WWF Colombia y Universidad de Manizales.
- Mora , C., Tittensor, D., Adl, S., Simpson, A., & Worm, B. (2011). How many species are there on earth and ocean? *PLos Biol*, 9(8).
- Muela, F., & Quijano, R. (2003). *Herencia y genética: concepciones y conocimientos de los alumnos*.
- Oliveira, C., Avelino, G., Abe, K., Mariguela, T., Benine, R., Ortíz, G., . . . Castro, R. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) base don multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 275-278.
- Ortí, G., & Meyer, A. (1997). The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitchondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, 46(1), 75-100.
- Palumbi, S. R. (1996). Nuclei acids II: the polymerase chain reaction. En D. Hillis, C. Morits, B. Mable, D. Hillis, C. Morits, & B. Mable (Edits.), *Molecular Systematics*. Sunderland, USA: Sinauer Associates Inc.
- Patiño, A. (1973). Cultivo experimental de peces en estanques. *Cedespia*, 2(5), 75-128.
- Pérez , A., & Taphorn, D. (1993). Relaciones zoogeograficas entre las ictiofaunas de las cuencas del río Magdalena y lago de Maracaibo. *Biollania*, 9, 95-105.

- Pérez, J. (2000). Para reflexionar desde la didáctica sobre la enseñanza de temas de genética. *Didáctica de las ciencias naturales* .
- Polania, J., Orosco, C., & Ángel, L. (2006). Delta del río Ranchería (la Guajira, Colombia): caudal, sanidad y transporte de sólidos y sus posibles influencias sobre la composición y estructura de los manglares. *Actual Biol*, 28(84), 27-37.
- Pybus, O. G. (2006). Model selection and the molecular clock. *Plos Biol*, 4(5).
- Ramirez-Soriano, A., Ramos Osins, S., Rozas, J., Calafell, F., & Navarro, A. (2008). Statical power analysis of neutraty test under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics Society of America*.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuencias del ARNr 16S: Fundamentos, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22(4), 238-45.
- Rodríguez , B. (2000). La didacica de la genética: revision bibliografica. *Departamento de didáctica de ciencias experimentales*.
- Rodriguez Olarte, D., Mojica, J., & Taphorn, D. (2011). Northern south America Magdalena and Maracaibo Basic. En J. Albert, & R. Reis, *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). Londong, England: Los Angeles,California Ltd.
- Roman-Valencia, C. (1993). Historia natural del jetudo Ichthyoelphas longirostris (Steindachner, 1879)(Pisces: Prochilodontidae) en la cuenca del río La vieja, Alto Cauca, Colombia. *Brenesia*, 71-80.
- Román-Valencia, C., & Ortiz-Muñoz, V. (2001). Sobre la reproducción de Ichthyoelphas longirostris (Pisces, Prochilodontidae) en la cuenca del río Magdalena, Colombia. *Dahlia Revista de Asociación Colombiana de Ictiología*, 4, 33-35.
- Romero, M., Cabrera, E., & Ortiz, N. (2007). *Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007*. Bogotá D.C: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Rubinoff, D. (2006). Utility of mitochondrial DNA Barcodes in species conservation. *Conservation Biology*, 20(4), 1026-1033.
- Rudas, G., Marcelo, D., Armenteras, D., Rodríguez, N., Morales, M., Delgado, L., & Sarmiento, A. (2007). *Biodiversidad y Actividad Humana: Relaciones en Ecosistemas de Bosques Subandinos en Colombia*. Bogotá D.C.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Manitis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold-Springer*.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Manitis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold-Springer .
- Schaefer, S. (2011). The Andes riding the tectonic uplift. En J. Albert, & R. Reis, *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). Londong, England: Los Angeles, California Ltd.
- Schlick, N., Jense-seaman, I., Orlebeke, K., Kwitek, A., Jacob, H., & Lazar, J. (2006). Sequence analysis of the complete mitochondrial ADN in 10 commonly used inbred rat strains. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1183-C1192.
- SIPA. (2010). *La explotación pesquera enmarcada en el código de conducta para la pesca responsable* (Vol. 45). Bogotá: SIPA.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., & Ortiz, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (prochilodus: Characiformes) in major south american river. *Molecular Ecology*, 10, 407-417.
- Solano, A., Playán, A., López Pérez, M. J., & Montoya , J. (2001). Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Pública de Mexico*, 43, 151-161.
- Somma, L. M. (2012). El estudio de casos. Una estrategia de construcción del aprendizaje. *Reflexión Académica en Diseño y Comunicación*.
- Sork, V. L., & Smouse, P. E. (2006). Gnetic analysis of lanscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology*, 21, 821-836.
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, ADN, and the barcode of life. *Bioscience*, 53(9).
- Sullivan, J., Lavoué, S., & Hopkins, C. (2000). Molecular systematics of the African electric fishes (mormyroidea:Teleostei) and a model for the evolution of their electric organs. *The journal of experimental biology*, 203, 665-683.
- Taccioli, G. (2004). Molecular genetics of antibody diversity. En G. Pier, J. Lyczak, L. Wetzler, G. Pier, J. Lyczak, & L. Wetzler (Edits.), *Immunology, Infection, and immunity* (págs. 145-177). NW: American society for microbiology.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by ADN polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *MOI Biol Evol*, 2725-2729.
- Templeton, A. R. (2006). Scope and Basic Premises of Population Genetics. En Wiley, & Sons (Edits.), *Polulations genetics and microevolutionary theory*.
- Torrico, K., Hubert, N., Desmarais, E., Duponchelle, F., Nuñez-Rodriguez, J., Montoya-Burgos, J., . . . Renno, J. (2008). Molecular phylogeny of the genus

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

Turner, T. F., Mcphee, M. V., Campbell, P., & Winemillers, K. (2004). Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic o rivers of northern South America. *Journal of fish Bilogy*, 64, 186-201.

Vásquez-Domínguez, E. (2007). Filogeografía y vertebrados. En V. Eguiarte, X. Souza, & V. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (primera ed., págs. 441-461). Republica Federal de Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

Velasco, R. (2004). La bilogía molecular y el ADN. *Facultad de ciencias agropecuarias*, 2(1), 55-60.

Vergara, J., Azpeliculeta, M., & Garcia, G. (2008). Phylogeography of the neotropical castfish pimelodus albicans (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la plata basic, South America and conservation remarks. *Neotropical Ichthyology*, 6(1), 75-85.

Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2008). *Bilología Molecular del gen* (Quinta ed.). Buenos Aires: medica Panamericana.

Wright, S. (1978). *Evolution and genetics of population*. Chicago, USA: Universidad of Chicago Press.

Anexos

Anexo 1.

Tabla 1. *Cuantificación de las muestras de ADN de Pataló y dilución a concentración de trabajo de las cuencas del río Magdalena y río Ranchería.*

ESPECIE	LUGAR DE COLECTA	CONCENTRACIÓN DE DNA ng/ µl	VOLUMEN DE DNA STOCK µl	VOLUMEN DE TRABAJO µl	CONCENTRACIÓN DE DNA DE TRABAJO ng/ µl
---------	------------------	--------------------------------	----------------------------	--------------------------	---

<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	234,6	21,31	78,68	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	504,3	9,91	90,09	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	136,5	36,63	63,36	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	197,8	25,27	74,72	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	510,7	9,79	90,21	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	731,7	6,83	93,17	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	924,7	5,41	94,59	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	682,5	7,33	92,67	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	872,2	5,73	94,27	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	579,9	8,62	91,38	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	1103,9	4,53	95,47	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	1540,5	3,25	96,75	50

<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	133,3	37,50	62,49	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	1006,9	4,97	95,03	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	251,0	25,27	74,72	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (El Cercado)	281,3	17,8	82,2	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (El Cercado)	365,8	13,7	86,3	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (El Cercado)	565,3	8,8	91,2	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (El Cercado)	525,9	9,5	90,5	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (El Cercado)	486,4	10,3	89,7	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (El Cercado)	678,5	7,4	92,6	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (El Cercado)	708,2	7,1	92,9	50

<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	400,2	12,5	87,5	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	373,2	13,4	86,6	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	519	9,6	90,4	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	297	16,8	83,2	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	373,9	13,4	86,6	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	550,9	9,1	90,9	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	496,2	10,1	89,9	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	721,3	6,9	93,1	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	661,5	7,6	92,4	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	268,2	18,6	81,4	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	420,0	11,9	88,1	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	489,8	10,2	89,8	50

<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	711,9	7,0	93,0	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	806,9	6,2	93,8	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	438,1	11,4	88,6	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	338,4	14,8	85,2	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	579,8	8,6	91,4	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	724,5	6,9	93,1	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	646,4	7,7	92,3	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Magdalena (Neiva)	760,5	6,6	93,4	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	1042,6	4,8	95,2	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Las lajas)	732,3	6,8	93,2	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Represa)	695,6	7,2	92,8	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería (Represa)	737,9	6,8	93,2	50
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Río Ranchería	1005,7	5,0	95,0	50

	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Ranchería	927,6	5,4	94,6	50
	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Ranchería	318,3	15,7	84,3	50
	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Ranchería	160	31,3	68,8	50
	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Ranchería	901,1	5,5	94,5	50
	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Ranchería	268,6	18,6	81,4	50
	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Ranchería	230,2	21,7	78,3	50
	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Ranchería	348,8	14,3	85,7	50
	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Ranchería	1357,4	3,7	96,3	50
	(Represa)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Magdalena	762,3	6,6	93,4	50
	(Neiva)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Magdalena	4032,1	1,2	98,8	50
	(Neiva)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Magdalena	632,4	7,9	92,1	50
	(Neiva)				
	Río				
<i>Ichthyoelephas longirostris</i>	Magdalena	704,8	7,1	92,9	50
	(Neiva)				

Anexo 2.

Componente pedagógico

El aprendizaje de la biología molecular en general presenta cierto grado de dificultad para los estudiantes tanto a nivel de bachillerato como universitario, debido a la complejidad de los temas, falta de interés, falencias conceptuales, metodologías tradicionales en el abordaje del contenido; todo puede ser generado por la falta de asociación de los procesos con sucesos reales.

Algunos de los problemas más frecuentes en la biología molecular y en la genética son según Ayuso & Banet (2002) y Muela & Quijano (2003) es que los estudiantes no comprenden la transmisión y los cambios de la información hereditaria, como: localización de la información hereditaria, confusión entre cromosomas sexuales y células sexuales entendiéndolo como un mismo concepto, las células somáticas también son portadoras de información hereditaria, todas las células contienen información hereditaria, la transmisión de la herencia biológica, la información hereditaria se transmite exclusivamente a los gametos, la información hereditaria está en los gametos, pero una parte se transmite a cada célula somática, cada célula tiene la información hereditaria que necesita para desarrollar sus funciones.

Varios investigadores como Pérez (2000) proponen que antes de comenzar con el modelo de Mendel es necesario asociar los cromosomas a las células y como fuente de la herencia e implantar estas características a procesos como la mitosis y

la meiosis y luego si comenzar hacer relaciones algorítmicas y utilizar métodos como el cuadro de Punnet.

Muchas falencias también se ven asociadas a las concepciones de los educadores y la forma tradicional como son enseñados los conceptos moleculares. El profesor percibe la evolución apenas como un proceso en dirección a las causas finales, con la idea de que la evolución biológica tiene un objetivo. Esa información muestra que el profesor no comprende que los mecanismos de evolución tienen un componente estocástico (Carvalho et al. 2011). También tienen una idea antropocéntrica en el concepto de la concepción de la predecibilidad manifestado por la expresión “sé de dónde vengo, quien soy y para donde voy” lo que distorsiona el entendimiento de la evolución como algo natural e inherente a todos los seres vivos.

La expresión evolución como equilibrio permite inferir que los profesores entienden que el proceso evolutivo ocurre en dirección a una mejor causa final positiva. De este modo se observa que los docentes tienen problemas de concepciones sobre el concepto de evolución que estos son fundamentales para la enseñanza de la genética.

La didáctica de la genética se ha centrado precisamente en la relación entre el conocimiento conceptual y las estrategias de resolución de problemas. En primer lugar, se ha intentado describir la organización del conocimiento y la resolución de problemas por estudiantes y especialistas (Hackling & Lawrence, 1988; Simons &

Lunnetta, 1993; Smith, 1988; Smith, 1992; Smith & Good, 1984) (citado por Rodríguez, 2000)

Dentro del pensum académico de la Licenciatura en Ciencias Naturales de la Universidad Surcolombiana se encuentra la asignatura de Biología Molecular. Allí, los estudiantes han manifestado a la docente no encontrar una aplicación de los conceptos propios de la Biología Molecular y sus herramientas, a la parte práctica, preguntándose ¿Cómo puedo aplicar la variación del ADN, duplicación del ADN, la variación de los alelos en una población?, razón por la cual se propone utilizar el trabajo de investigación denominado “ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DEL PATALÓ, *Ichthyoelephas longirostris* (STEINDACHNER, 1879) EN LA CUENCA DEL MAGDALENA Y EL RÍO RANCHERÍA” como un estudio de caso para lograr una aplicación práctica de los contenidos teóricos con la realidad. Esto con el objetivo de ser utilizado como una herramienta pedagógica de los temas establecidos en el microdiseño de la materia como: la molécula del ADN y los procesos de duplicación, transcripción y traducción.

El estudio de casos, es una técnica en la cual se desarrollan habilidades tales como el análisis, la síntesis y la evaluación de la información. Se fomenta el pensamiento crítico que facilita no solo la integración de los conocimientos de la materia, sino también ayuda al alumno a generar y fortalecer el trabajo en equipo, y la toma de decisiones, además de otras actitudes como la innovación y la creatividad (Somma, 2012).

El estudiante mediante un planteamiento de la vida real estimula su pensamiento y basado en los conceptos teóricos, realiza las reflexiones necesarias para darle una explicación coherente de los hechos.

Esta estrategia puede ser aplicada desde el punto práctico y darle un enfoque en donde los estudiantes logren asimilar con mayor facilidad los conceptos, dando al maestro la oportunidad de enriquecer su ejercicio docente y la generación de aprendizajes significativos.

Un ejemplo claro sobre aprendizaje significativo es el planteamiento y análisis de un caso en la medida en que los alumnos, logren involucrarse y comprometerse con la actividad, logrando así los objetivos deseados por el profesor y la reflexión de forma grupal en dicho desarrollo (Somma, 2012).

En consecuencia, mediante la extrategia didactica basada en estudio de casos, permite que el estudiante se apropie de los conceptos científicos mediante el razonamiento, argumentación, comunicación, utilización de la información y otros procesos requeridos en la actividad científica

La técnica de estudio de caso como método docente, tiene la gran ventaja de que se adapta perfectamente a distintas edades, diversos niveles y áreas de conocimientos. Lo mismo se puede emplear en la educación primaria, media y superior, en la formación de adultos analfabetas o en la capacitación para empresarios.

Estudio de Caso

El *Ichthyoelephas longirostris* o comúnmente conocido como Pataló es endémico de Colombia y se encuentra distribuido en la cuenca del río Magdalena y en la cuenca del río Ranchería. Dichos afluentes hídricos actualmente están separados por la Sierra Nevada de Santa Marta, aislando reproductivamente el Pataló de las dos cuencas y de esta manera no existe flujo génico entre los individuos. En este contexto, se podría pensar que: ¿El Pataló de las dos cuencas pertenece a una misma especie o debido a ese aislamiento geográfico y el tiempo de separación entre las poblaciones actualmente se tratan de grupos diferentes?

¿Cómo se puede valorar el impacto ocasionado por un aislamiento geográfico a una especie?

Para valorar las consecuencias que produce un aislamiento geográfico en una especie es necesario iniciar con el estudio de la molécula de la vida, el ADN. Según Velazco (2004) el ADN es una molécula de doble cadena de nucleótidos, arreglados en forma antiparalela y complementaria, unidas entre sí por puentes de hidrogeno entre los nucleótidos: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Es aquí donde los estudiantes pueden empezar a estudiar la estructura del ADN, sus características y funciones.

Para el análisis del ADN y poder resolver esta problemática, se han establecido muchos protocolos de extracción a partir del material biológico. A continuación se describe el protocolo de extracción de ADN con solución de

tampón salino (Sambrook et al. 1989) utilizado para la realización de este estudio, que presenta la ventaja de no usar reactivos tóxicos ni necesita cabinas de extracción de vapores:

1. Colocar una muestra de tejido (de 50 a 100 mg) en un vial de 1.5 ml, macerar el tejido en nitrógeno líquido y agregar 400 μ l de la solución buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) 2 mM pH 8, y NaCl 0,4 M).
2. Adicionar 40 μ l de SDS (Dodecilsulfato Sódico) 20 %, 12 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y dar vortex por 1 min.
3. Incubar a 55°C, durante toda la noche.
4. Agregar 300 μ l de NaCl 6M, agitar brevemente por 30 seg. y centrifugar por 30 min a 10000 rpm.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio evitando tocar la fracción sólida del fondo (pellet), y adicionar igual volumen de isopropanol frío, e incubar las muestras por 1 hora a -20°C.
6. Centrifugar por 20 min a 10000 rpm. Descartar todo el sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
7. Lavar con 300 μ l de etanol 70% frío y centrifugar por 5 min a 10000 rpm y descartar el sobrenadante.
8. Secar el ADN a 37°C y resuspender en 80 μ l de la solución de TE (Tris-HCl 10 mM- EDTA 1 mM pH.8 autoclavado).
9. Dejar la solución a temperatura ambiente por 4 horas. Adicionar 2 μ l de RNasa.

10. Guardar a -20°C.

Teniendo en cuenta que la molécula de ADN está constituida por genes en donde según Gerstein et al. (2007) un gen es una secuencia de nucleótidos que determina una característica en particular de un organismo (fenotipo) y el cual es heredada de padres a hijos

¿Qué genes pueden ser utilizados para identificación de especies? En este estudio se analizaron los genes mitocondriales 16S y COI, debido a que el ADN mitocondrial es una herramienta importante en los estudios de las relaciones evolutivas de los individuos, especies y poblaciones por presentar características peculiares como la herencia uniparental generalmente materna, ausencia de recombinación y las altas tasas evolutivas, comparadas con el genoma nuclear (Calcagnotto, 2001).

Dichos genes presentan variaciones dentro de las secuencias de los nucleótidos que los componen; pero ¿Cómo se originan este tipo de variaciones a nivel molecular? Una variación puede generarse por errores en el proceso de duplicación de ADN o cuando los genes están siendo afectados por las fuerzas evolutivas como la deriva génica, la selección, la migración y la mutación. Para la realización de estos estudios se utilizan genes neutrales, es decir, que no se vean afectados por dichas fuerzas, teniendo en cuenta que una alteración en una secuencia de nucleótidos podría alterar la síntesis de una proteína determinada y afectar seriamente los individuos.

¿Qué mecanismo es usado para lograr identificar estas variaciones a nivel molecular? Para lograr analizar estas variaciones se implementó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en donde permite obtener muchas copias del fragmento de interés, en este caso de los genes 16S y COI mediante la utilización de reactivos que le proporcionan las condiciones idóneas a la reacción y llevar a cabo la duplicación *in vitro* del ADN.

En una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar (donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar), los oligonucleotidos (llamados también *primer's*, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, los dinucleotidos (dNTPs), el *Buffer* (regula el pH de la reacción), y el cloruro de Magnesio (catalizador de la reacción) (Espinosa, 2007).

El siguiente paso es colocar los tubos en una maquina conocida como Termociclador, que básicamente sirve para aumentar o disminuir la temperatura siendo estas muy precisas. Pero ¿Cómo es que se amplifica el (o los) fragmento(s) que queremos? Primero, el Termociclador aumenta o disminuye la temperatura de los tubos a tres distintas, que se repiten una y otra vez (lo que se llama los ciclos de reacción), la primera es a 95°C (desnaturalización) durante la cual la doble cadena del ADN se abren o desnaturaliza, quedando en forma de cadenas sencillas; después el termociclador ajusta la temperatura en un intervalo entre 40°C y 60°C (alineamiento), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los

puentes de hidrogeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables (las que son complementarias), quedando los oligonucleotidos “alineado ” formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5´a 3´; al agregar unas bases más, los puentes de hidrogeno que se forman entre las bases estabilizan más la unión y el oligonucleotido permanece en este sitio para el siguiente paso. Después la temperatura sube a 72°C (extensión), que es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continua la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleotidos que ya se habían alineado (Espinosa, 2007) (figura 1).

Con la realización de la técnica de PCR los estudiantes logran a tener una mayor aproximación de lo sucedido en el proceso de duplicación del ADN que se da en la célula y el papel que cada componente cumple dentro de dicho proceso, entendiendo éste como un método *in vitro* diseñado por el hombre para cumplir objetivos a fines al campo molecular.

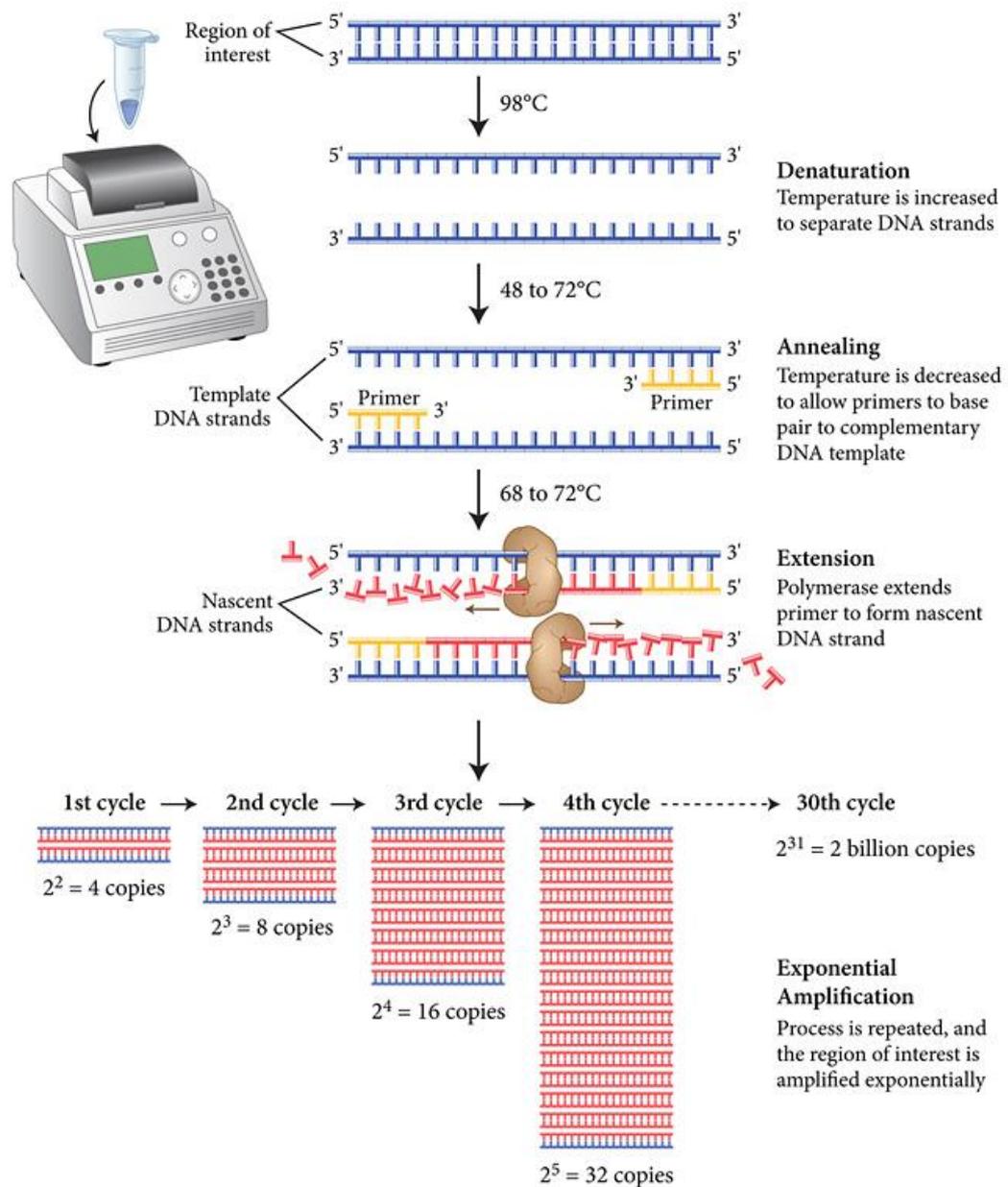


Figura 1. Representación gráfica de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Fuente: sitio web <http://www.slideshare.net/MetheeSri/principle-of-pcr>

Los fragmentos amplificados son verificados mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa que se emplea para separar los ácidos nucleicos y

las proteínas. La separación de las macromoléculas depende de dos variables: carga y masa. Cuando una muestra biológica, como por ejemplo el ADN, se mezcla en una solución tampón y se aplica a un gel, esas dos variables actúan conjuntamente. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza de fricción del material de gel actúa como «tamiz molecular», separando las moléculas en función de su tamaño. Durante la electroforesis, las macromoléculas son empujadas a través de los poros, dependiendo su tasa de migración por el campo eléctrico (Somma & Querci, 2004).

Después de la verificación de los amplicones se realiza el proceso de purificación en donde permite retirar los excesos de la reacción de PCR. Una vez listo el fragmento amplificado se realiza su respectivo secuenciamiento. ¿Por qué es necesario secuenciar las muestras? El secuenciamiento permite visualizar mutaciones, deleciones o inserciones que se producen en las secuencias de nucleótidos que componen el fragmento (figura 2).

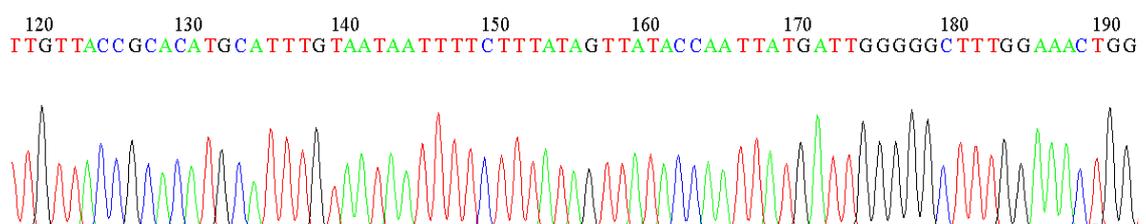


Figura 2. Fragmento de la secuencia del gen COI.

En la identificación de las variaciones se hace uso de las herramientas bioinformáticas que por medio de programas se realizan los análisis respectivos. Para alinear las secuencias de los individuos estudiados se utilizó el programa

BioEdit que mediante una secuencia consenso alinea las secuencias restantes y se puede identificar en donde se encuentran dichas variaciones.

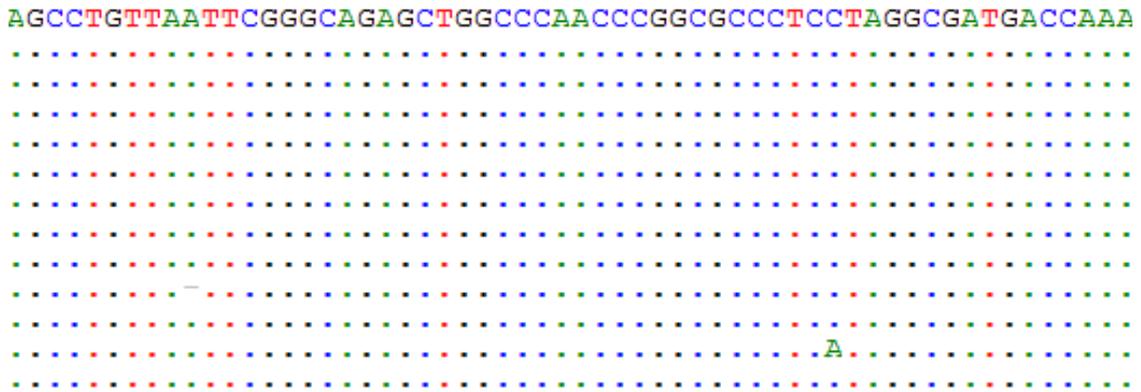


Figura 3. Secuencias alineadas donde se puede observar una mutación (A en lugar de C) en la secuencia del gen COI.

¿De qué manera puede verse representado dichas variaciones en los individuos?

Las variaciones en la secuencias de nucleótidos de un fragmento se denominan como “haplotipo” que es definido básicamente como una única forma genética que difiere de cualquier otra forma por variaciones en las posiciones individuales (al menos en un nucleótido) en una secuencia de ADN (Templeton 2006). Así mismo se puede realizar una red de haplótipos donde muestras ciertos patrones de ancestralidad y similaridad entre los mismos (figura 4).

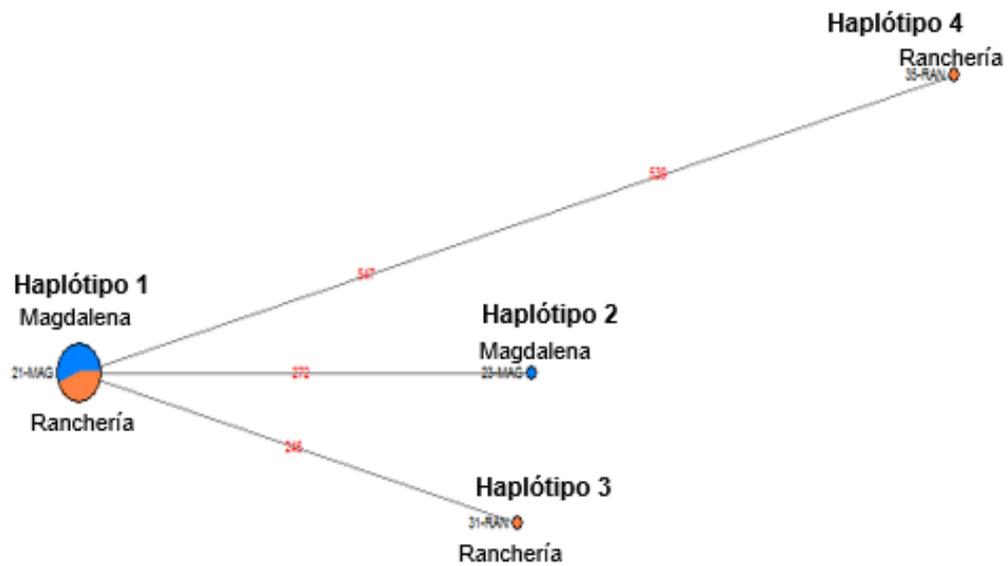


Figura 4. Representación de una red de haplotipos

La comparación de las secuencias de los diferentes individuos ayuda a aclarar patrones de parentesco y ancestralidad. Para ello se usa los árboles filogenéticos que son definidos como un grafo que describe las relaciones de parentesco, ancestría y descendencia, entre un conjunto de genes, de organismos, de especies o de taxas superiores (figura 5). Las relaciones de parentesco se infieren a partir de un conjunto de características representativas que pueden ser más o menos compartidas entre las entidades biológicas cuyas relaciones se intenta dilucidar, lo que, a grandes rasgos, permitirá concluir que están emparentados en mayor o menor grado (Martínez, 2007).

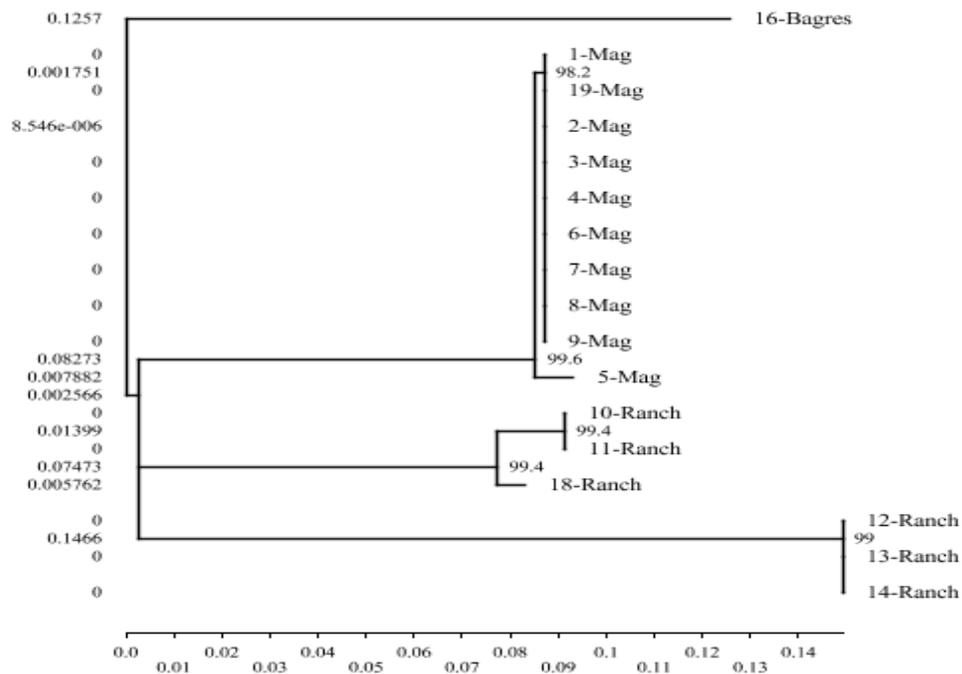


Figura 5. Construcción del árbol filogenético con el gen mitocondrial COI para los Pataló del río Magdalena y río Ranchería.

En la construcción del árbol filogenético para el presente estudio los individuos de la localidad del Magdalena presentan un solo nodo también llamados, hojas o taxa que representan secuencias u organismos que por su alto grado de similitud agrupan en una sola taxa. Por otro lado, los individuos de la localidad de Ranchería presentan dos nodos bien diferenciados dentro del grupo.

La formación de los nodos encaja en la hipótesis de un aislamiento geográfico, o de especies que no presenta flujo génico, similares filogenias obtenidas para especies pertenecientes a la familia Prochilodontidae (Turner, 2004;

Sivasundar, et al. 2001), Pimelolidae (Carvalho-Costa et al. 2011; Torrico et al. 2008).

De esta manera se puede corroborar que mediante el estudio del ADN se logran rastrear eventos históricos y geográficos que en cierto modo han determinado la diferenciación genética de los organismos.

Bibliografía

(s.f.).

Aguirre, K. (2007). Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En V. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (págs. 49-61). Republica Federal de Mexico: Universidad Nacional Autonoma de México.

Aguirre-Pabón, J., Narváez, J., & Castro, L. (2013). Mitochondrial DNA variation of the bocachico *Prochilodus magdalenae* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin, Colombia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 23, 594-605.

Akihito, A., Kobayashi, T., Ikeo, K., Imanichi, T., Ono, H., Umehara, Y., . . . Gojobori, T. (2000). Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes. *Genes*, 259, 5-15.

Albert, J., & Carvalho, T. (2011). The biogeography of marine incursions in south america. En J. Albert, R. Reis, J. Albert, & R. Reis (Edits.), *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). London. England: Los Angeles, California Ltd.

Albert, J., Lovejoy, N., & Crampton, W. (2006). Miocene tectonism and the separation of cis- and trans- Andean river basins: evidence from neotropical fishes. *Journal of South America Earth Sciences*, 21, 14-67.

Anderson, B. (1998). Identifying novel bacteria using a broad-range polymerase chain reaction. En S. Specter, M. Bendinelli, H. Friedman, S. Specter, M. Bendinelli, & H. Friedman (Edits.), *Rapid detection of infectious agents* (págs. 117-119). New York: Plenum Press.

- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. United States of America: Harvard University.
- Avice, J. C. (2004). *Molecular Marker, Natural History and Evolution* (segunda ed.). Massachusetts: Sinauer Associates, inc. Publishers.
- Avice, J. C., Lansman, R. A., & Shade, R. O. (1979). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial ADN sequence relatedness in natural populations. I population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, *92*, 279-295.
- Avice, J. C. (1986). Mitochondrial ADN and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical transactions of the royal society of London. Biological Sciences*, *312*, 325-342.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., . . . Saunderson, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial ADN bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, *18*, 489-522.
- Ayuso, G., & Banet, E. (2002). Alternativas a la enseñanza de la genética en educación secundaria. *Enseñanza de las ciencias* *2002*, *20(1)*, 133-143.
- Beltrán, I. C., Estrada, M., & Valderrada, M. (2000). *Plan de Ordenamiento: manejo y aprovechamiento sostenible pesquero y acuicultura en la cuenca del río Magdalena*. Santa fe de Bogotá D.C. : Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura - INPA.
- Bloom, D., & Lovejoy, N. (2011). The biogeography of marine incursions in south america. En J. Albert, & R. Reis, *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). London, England: Los Angeles, California Ltd.
- Brown, W. M., George, M. J., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of mitochondrial ADN. *Proceeding of the national academy of sciences*, *76*, 1967-1971.
- Calcagnotto, D. (2001). Taxas de evolucao e o relagio molecular. En S. Russo (Ed.), *Biología molecular e evolucao* (pág. 52). Sao Paulo, Brasil.
- Calcagnotto, D. (2001). Taxas de evolucao e relagio molecular. En S. Russo (Ed.), *Biología molecular e evolucao* (pág. 52). Sao Paulo, Brasil.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S., & Desalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *36*, 135-153.
- Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaleta, M. N., & Saccone, C. (1994). Evolutionary analysis of the cytochrome b sequence in some

preciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 39, 589-597.

- Caporales, D., Rich, S., Spielman, A., Telford, S., & Kocher, T. (1995). Discriminating between Ixodes Ticks by Means of Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4(4), 361-365.
- Carvalho, L., Ladvoat, M., & Boer, N. (2011). Evolución biológica: percepciones de profesores de biología. *Carvalho, L. Ladvoat, M. Boer, N. (2011). Evolución biológica: percRevista electrónica de enseñanza de las ciencias vol. 10 N° 2, 243-263, 10 (2), 243-263 .*
- Carvalho, L., Ladvoat, M., & Boer, N. (2011). Evolución biológica: percepciones de profesores de biología. *Revista electrónica de enseñanza de las ciencias*, 10(2), 243-263.
- Carvalho-Costa, L. F., Piorski, N. M., Willis, S. C., Galetti, P. M., & Ortí, G. (2011). Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862) based on nuclear and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59, 177-194.
- Castro, R., & Vari, R. (2004). Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 622, 1-187.
- CCI. (2006). *Pesca y Acuicultura Colombia 2006*. Bogotá: INCODER.
- Clabaut, C., Salzburger, W., & Meyer, A. (2005). Comparative phylogenetic analyses of the adaptive radiation of lake tanganyika cichlid fish: nuclear sequences are less homoplasious but also less informative than mitochondrial ADN. *Journal of molecular evolution*, 61, 666-681.
- Cubero, J. I. (2003). *Marcadores Moleculares: Introducción a la mejora genética vegetal* (segunda ed.). Muldi-Prensa.
- Dahl, G. (1971). *Los peces del norte de Colombia*. Bogotá: Inderena.
- Daltonico. (3 de marzo de 2013). *Atlas Geográfico*. Obtenido de <http://atlasgeografico.net/mapa-hidrografico-de-colombia-con-sus-ros.html>
- Domínguez, O., & Vázquez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 59-70.
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. Guiarte, V. Sousa, & X. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (págs. 517-536). México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- FAO. (2012). Examen Mundial de la Pesca y la Acuicultura . En D. d. FAO, *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012* (págs. 3-114). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Farias, I. P., Ortigi, G., Sampaio, I., Schneider, H., & Meyer, A. (2001). The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of molecular evolution*, *53*, 89-103.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., & Lutz, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 294-299.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2008). Fundamentos de genética de la conservación. *Genetics*, *1*, 280.
- Freeland, J. (2005). Molecular genetics in ecology. *Molecular ecology*.
- Freeland, J., Kirk, H., & Petersen, K. (2011). *Molecular genetics in ecology. Molecular ecology*. Noida, India: Wiley-Blackwell.
- Gaffney, P. M., Rupnow, J., & Domeier, M. (2007). Genetic similarity of disjunct populations of the giant sea bass *Stereolepis gigas*. *J Fish Biol* *70*, 111-124.
- Gangolf, J., Arndt, v. H., & Korbibian, S. (2004). TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC evolutionary biology*.
- Gasces, R., Calcagnotto, D., & Foresti, L. (2011). Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from río Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conserv: Mar. Freshwater Ecosyste*, *21*, 268-275.
- Gerstein, M., Bruce, C., Rozowsky, J., Zheng, D., Du, J., Korbil, J., . . . Snyder, M. (2015). What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Research*.
- Gibson, T., Higgins, D., & Thompson, J. (1996). Clustal W . *Hinxton*.
- Goodall-Copestake, W., Tarling, G., & Murphy, E. (2012). On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene COI in animal. *Heredity*, *109*, 50-56.
- Guisande, G., Pelayo-villamil, P., Vera, M., Manjarrés-Hernandez, A., Carvalho, M., Vari, R., . . . Duque, S. (2012). Ecology factors and diversification among neotropical Characiforms. *Internal Journal of Ecology*, *2012*, 20-25.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids*, *41*, 95-98.

- He, S., Mayden, R. L., Wang, X., Wang, W., Tang, K. L., Chen, W. J., & Chen, Y. (2008). Molecular phylogenetics of the family cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of S7 ribosomal, pretein-coding gene: further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family. *Mol phylogenet evol*, 46(3), 818-829.
- Hebert P, D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & De Waard, J. R. (2003). Biological identifications though ADN barcodes. *The Royal Society*, 270, 313-321.
- Holsinger, K. (2012). *Lecture note in population genetics*. Departamento of ecology and evolutionary Bilogy.
- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G., & Lorente, M. (1995). Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene norther south America. *Geology*, 23(3), 237-240.
- Huber, N., & Renno, J. F. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33, 1414-1436.
- Irving, E. (1975). *Structural evolution of the northernmost Andes, Colombia*. Geological survey profesional.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D., & Wilson, A. C. (1991). Evolution of cytochrome b gene in mammals. *Journal of molecular evolution*, 2, 13-34.
- Johnson, J. B. (2002). Evolution after the flood: Phylogeography of the desert fish Utah Chud. *Evolution*, 56, 948-960.
- Kellogg, J. (1984). Cenozoic tectonic history of the Sierra de Perija, Venezuela-Colombia and adjacent Basinc. *Geological Society of America Memoir*, 162, 239-261.
- Klug, W., Cummings, & Spencer, C. (2008). *Introducción a la genética: Conceptos de genética*. Madril: Pearson education S.A.
- Kumazawa, Y., & Nishida, M. (2000). Molecular phylogeny of osteoglossoids: a new model for gondwanian origin and plate tectonic transportation of the asian arowana. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1869-1878.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polimorphism data. *Bioinformatics Applications note*, 25(11), 1451-1452.
- Londoño, C. (2001). *El hombre y su relación con la naturaleza. Cuencas Hidrográficas: Bases conceptuales caracterización planificación-administración*. Ibague, Colombia: Universidad del Tolima Facultad de ingeniería forestal.
- López, O., & Ostrowski, M. (2004). Mecanismos para la recombinación cromosómica. En Rabinovich, *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina* (págs. 606-607). Argentina: Paramericana.

- López-Fernández, H., & Albert, J. (2011). The biogeography of marine incursions in south america. En J. Albert, & R. Reis, *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). Londong, England: Los Angeles, California Ltd.
- Lovejoy, N., & Collette, B. (2001). Phylogenetic relationships of new world needlesfishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*, 2001(2), 324-338.
- Lydeard, C., & Roe, K. J. (1997). The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among actinopterygian fishes. En T. D. Kocher, C. A. Stepien, T. D. Kocher, & C. A. Stepien (Edits.), *Molecular systematics of fish* (págs. 285-303). New York: Academic Press.
- Martínes, L. (2007). Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En V. Eguiarte, X. Souza, & V. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (primera ed., págs. 87-152). Republica Federal de Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Martinez, L. (2007). Adaptación a nivel molecular: Laselección Natural a nivel molecular. En V. Eguiarte, Souza, X. Aguirre, V. Eguiarte, Souza, & X. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (págs. 89-152). Republica federal de México: Universidad Autonoma de México.
- Meyer, A. (1994). ADN technology and phylogeny of fish. En A. R. Beaumont (Ed.), *Genetics and evolution of aquatic organisms* (pág. 219-249). London: Chapman e Hall.
- Meyer, A., & Wilson, C. (1990). Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial ADN affiliation to lungfish. *Journal of molecular evolution*, 31, 359-364.
- Mojica, J. C. (1999). *Lista preliminar de peces dulceacuicola de Colombia* (Vol. XXIII). Bogotá: Revista académica colombiana de ciencias.
- Mojica, J. C., Castellanos, C., Sánchez, P., & Díaz, C. (2006). Peces de la cuenca del río Ranchería, la Guajira Colombia. *Biota Colombia*, 7(1), 129-142.
- Mojica, J. I., Usma, J. S., Álvarez León, R., & Lasso, C. L. (Edits.). (2012). *Libro Rojo de Peces Dulceacuícolas de Colombia (2012)*. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Medio Ambiente, WWF Colombia y Universidad de Manizales.
- Mora , C., Tittensor, D., Adl, S., Simpson, A., & Worm, B. (2011). How many species are there on earth and ocean? *PLoS Biol*, 9(8).
- Muela, F., & Quijano, R. (2003). *Herencia y genética: concepciones y conocimientos de los alumnos*.

- Oliveira, C., Avelino, G., Abe, K., Mariguela, T., Benine, R., Ortíz, G., . . . Castro, R. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, *11*, 275-278.
- Ortíz, G., & Meyer, A. (1997). The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, *46*(1), 75-100.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. En D. Hillis, C. Moritz, B. Mable, D. Hillis, C. Moritz, & B. Mable (Eds.), *Molecular Systematics*. Sunderland, USA: Sinauer Associates Inc.
- Patiño, A. (1973). Cultivo experimental de peces en estanques. *Cedespia*, *2*(5), 75-128.
- Pérez, A., & Taphorn, D. (1993). Relaciones zoogeográficas entre las ictiofaunas de las cuencas del río Magdalena y lago de Maracaibo. *Biollania*, *9*, 95-105.
- Pérez, J. (2000). Para reflexionar desde la didáctica sobre la enseñanza de temas de genética. *Didáctica de las ciencias naturales*.
- Polanía, J., Orosco, C., & Ángel, L. (2006). Delta del río Ranchería (la Guajira, Colombia): caudal, sanidad y transporte de sólidos y sus posibles influencias sobre la composición y estructura de los manglares. *Actual Biol*, *28*(84), 27-37.
- Pybus, O. G. (2006). Model selection and the molecular clock. *Plos Biol*, *4*(5).
- Ramirez-Soriano, A., Ramos Osins, S., Rozas, J., Calafell, F., & Navarro, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality test under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics Society of America*.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuencias del ARNr 16S: Fundamentos, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, *22*(4), 238-45.
- Rodríguez, B. (2000). La didáctica de la genética: revisión bibliográfica. *Departamento de didáctica de ciencias experimentales*.
- Rodríguez Olarte, D., Mojica, J., & Taphorn, D. (2011). Northern south America Magdalena and Maracaibo Basin. En J. Albert, & R. Reis, *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). Londong, England: Los Angeles, California Ltd.
- Roman-Valencia, C. (1993). Historia natural del jetudo *Ichthyoelephas longirostris* (Steindachner, 1879) (Pisces: Prochilodontidae) en la cuenca del río La vieja, Alto Cauca, Colombia. *Brenesia*, 71-80.

- Román-Valencia, C., & Ortiz-Muñoz, V. (2001). Sobre la reproducción de *Ichthyoelephas longirostris* (Pisces, Prochilodontidae) en la cuenca del río Magdalena, Colombia. *Dahlia Revista de Asociación Colombiana de Ictiología*, 4, 33-35.
- Romero, M., Cabrera, E., & Ortiz, N. (2007). *Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007*. Bogotá D.C: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Rubinoff, D. (2006). Utility of mitochondrial DNA Barcodes in species conservation. *Conservation Biology*, 20(4), 1026-1033.
- Rudas, G., Marcelo, D., Armenteras, D., Rodríguez, N., Morales, M., Delgado, L., & Sarmiento, A. (2007). *Biodiversidad y Actividad Humana: Relaciones en Ecosistemas de Bosques Subandinos en Colombia*. Bogotá D.C.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Manitis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold-Springer*.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Manitis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold-Springer*.
- Schaefer, S. (2011). The Andes riding the tectonic uplift. En J. Albert, & R. Reis, *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (págs. 3-369). Londong, England: Los Angeles, California Ltd.
- Schlick, N., Jense-seaman, I., Orlebeke, K., Kwitek, A., Jacob, H., & Lazar, J. (2006). Sequence analysis of the complete mitochondrial ADN in 10 commonly used inbred rat strains. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1183-C1192.
- SIPA. (2010). *La explotación pesquera enmarcada en el código de conducta para la pesca responsable* (Vol. 45). Bogotá: SIPA.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., & Ortiz, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (prochilodus: Characiformes) in major south american river. *Molecular Ecology*, 10, 407-417.
- Solano, A., Playán, A., López Pérez, M. J., & Montoya, J. (2001). Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Pública de Mexico*, 43, 151-161.
- Somma, L. M. (2012). El estudio de casos. Una estrategia de construcción del aprendizaje. *Reflexión Académica en Diseño y Comunicación*.
- Sork, V. L., & Smouse, P. E. (2006). Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology*, 21, 821-836.
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, ADN, and the barcode of life. *Bioscience*, 53(9).

- Sullivan, J., Lavoué, S., & Hopkins, C. (2000). Molecular systematics of the African electric fishes (mormyroidea:Teleostei) and a model for the evolution of their electric organs. *The Journal of experimental biology*, 203, 665-683.
- Taccioli, G. (2004). Molecular genetics of antibody diversity. En G. Pier, J. Lyczak, L. Wetzler, G. Pier, J. Lyczak, & L. Wetzler (Edits.), *Inmunology, Infection, and immunity* (págs. 145-177). NW: American society for microbiology.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by ADN polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *MOI Biol Evol*, 2725-2729.
- Templeton, A. R. (2006). Scope and Basic Premises of Population Genetics. En Wiley, & Sons (Edits.), *Polulations genetics and microevolutionary theory*.
- Torrico, K., Hubert, N., Desmarais, E., Duponchelle, F., Nuñez-Rodriguez, J., Montoya-Burgos, J., . . . Renno, J. (2008). Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51, 588-594.
- Turner, T. F., Mcphee, M. V., Campbell, P., & Winemillers, K. (2004). Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic o rivers of northern South America. *Journal of fish Biology*, 64, 186-201.
- Vásquez-Domínguez, E. (2007). Filogeografía y vertebrados. En V. Eguiarte, X. Souza, & V. Aguirre (Edits.), *Ecología Molecular* (primera ed., págs. 441-461). Republica Federal de Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Velasco, R. (2004). La bilogía molecular y el ADN. *Facultad de ciencias agropecuarias*, 2(1), 55-60.
- Vergara, J., Azpeliculeta, M., & Garcia, G. (2008). Phylogeography of the neotropical castfish *pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la plata basic, South America and conservation remarks. *Neotropical Ichthyology*, 6(1), 75-85.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2008). *Bilología Molecular del gen* (Quinta ed.). Buenos Aires: medica Panamericana.
- Wright, S. (1978). *Evolution and genetics of population*. Chicago, USA: Universidad of Chicago Press.